

بررسی تنوع ژنتیکی و رابطه فیلوژنتیکی برخی ژنوتیپ‌های کدو با

استفاده از مکان ژن ریبوزومی ITS و ژن کلروپلاستی *rbcL*

Study of genetic diversity and phylogenetic relationship of some gourd pumpkin (*Cucurbita pepo*) genotypes using the ITS ribosomal and *rbcL* 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

واژه‌های کلیدی

بارکد گذاری DNA.

ITS

rbcL

کدو

روش بارکدگذاری DNA پتانسیل زیادی برای احیاء علم آرایه‌شناسی و مطالعات تنوع زیستی
ستی 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 برگگی، 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 *rbcL* باز آدنین (۲۷/۴) بیشترین فراوانی و باز سیتوزین (۲۰/۱) کمترین فراوانی را داشت.
برآورد جایگزینی نوکلئوتیدی ژن‌های *rbcL* و ITS در خانواده کدو، مقادیر بالای جایگزینی
پیریمیدینی را نشان داد. به‌طوری‌که درصد تبدیل تیمین به سیتوزین در توالی‌های نوکلئوتیدی
ژن ITS و *rbcL* به‌ترتیب ۳۱/۶۹ و ۲۰/۴۳ درصد و درصد تبدیل سیتوزین به تیمین به‌ترتیب
۴۷/۰۵ و ۱۶/۰۴ 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 توالی‌یابی کدو
مناسب‌تر است.

مقدمه

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 طویل‌خزنده 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 *rbcL* یک ابزار ارزشمند برای ارزیابی روابط فیلوژنیک است. این ژن در کلروپلاست‌های بیشتر موجودات فتوسنتزی یافت می‌شود. *rbcL* یک پروتئین فراوان در بافت برگ است؛ بنابراین این ژن به‌عنوان عاملی مشترک بین موجودات فتوسنتزی وجود دارد؛ و می‌تواند با ژن‌های *rbcL* از گیاهان دیگر مقایسه شود تا تشابهات و تفاوت‌های ژنتیکی را تعیین کند. این کد برای زیرمجموعه بزرگ پروتئین روبیسکو (ریبولوز ۵-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 بیس فسفات 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 ریبولوزومی قرار می‌گیرند (Hadjiolaova et al., 1994). از آنجایی‌که بر خلاف

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 کنترل‌کننده 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 وارسته 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 از جمله استفاده از وارسته‌های پر محصول و اصلاح شده به جای وارسته‌های بومی، روش‌های مدرن زراعی، تبدیل محیط‌های دست‌نخورده 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

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 al., 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 شرکت 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).

نواحی ژنومی DNA ریپوزومی تکامل نواحی بین ژنی خیلی سریع‌تر است، این نواحی به‌طور گسترده‌ای به‌عنوان یک نشانگر مناسب برای بررسی روابط فیلوژنتیکی در سطوح مختلف از جمله 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

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	ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTTCG	750bp	60
Revers	TAGAATTCCCCGGTTCGCTCGCCGTTAC	750bp	60

جدول ۲- برنامه‌ی گرمایی چرخه‌های PCR

Table 2- Thermal cycles of PCR

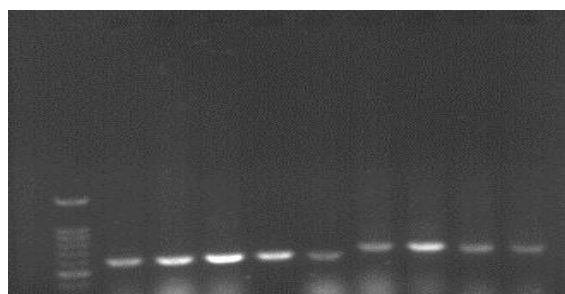
نوع واکنش	گام واکنش	دما	زمان
سیکل 35	Initial Denaturation	94°C	6 دقیقه
	Denaturation	94°C	45 ثانیه
	Annealing	60°C	45 ثانیه
	Extension	72°C	50 ثانیه
-	Hold	72°C	15 دقیقه
		4°C	-

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 *rbcL*، باز آدنین بیشترین فراوانی (۲۷/۴) و باز سیتوزین کمترین فراوانی (۲۰/۱) را داشت (جدول ۳).



شکل ۱- الکتروفورز ژن ITS و *rbcL* در نمونه کدو

Figure 1- ITS and *rbcL* gene electrophoresis in the pumpkin sample
ماتریس برآورد الگوی جایگزینی نوکلئوتیدی در خانواده کدو

در برآورد جایگزینی نوکلئوتیدی ژن *rbcL* در خانواده کدو، مقادیر بالای جایگزینی پیریمیدینی بود، به‌طوری‌که این مقدار برای تبدیل تیمین به سیتوزین ۳۱/۶۹ درصد و برای تبدیل سیتوزین به تیمین ۴۷/۰۵ درصد به‌دست آمده است. این مقادیر برای بازهای پورینی کمتر و به‌ترتیب برای تبدیل آدنین به گوانین و گوانین به آدنین ۹/۴۶ درصد و ۱۱/۴۸ درصد بود. برآورد جایگزینی نوکلئوتیدی ژن

محصولات به‌دست آمده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، 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 آنالین 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 ۴ 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 *rbcL*

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

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

جایگاه پلی مورفیسم ژن *rbcL* در خانواده کدو

در بررسی شاخص های ژنتیکی ژن *rbcL* خانواده کدو، ۴ جهش شناسایی شد. توزیع آن ها در طول ژنوم متفاوت بود. تعداد جایگاه های چند شکلی نیز ۴ جایگاه مشاهده شد.

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					
	G	C	T/U	A	نوکلئوتید
ITS	26.9	29.5	23.3	20.3	فراوانی
<i>rbcL</i>	22.6	20.1	29.9	27.4	فراوانی

جدول ۴- ماتریس برآورد الگوی جایگزینی نوکلئوتیدی ژن های *rbcL* و ITS در خانواده کدو

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

ژن	From/To	A	T	C	G
<i>rbcL</i>	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 یک پایه (ردیف) به پایه دیگر (ستون) است. در این جدول درصد جهش های انتقالی (جایگزینی پورین به پورین دیگر و یا پیریمیدین به پیریمیدین دیگر) به صورت ضخیم و جهش تقاطعی (جایگزینی پورین به پیریمیدین و برعکس) به صورت ایتالیک نشان داده شده اند.

جدول ۵- جایگاه پلی مورفیسم ژن ITS در خانواده کدو

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

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

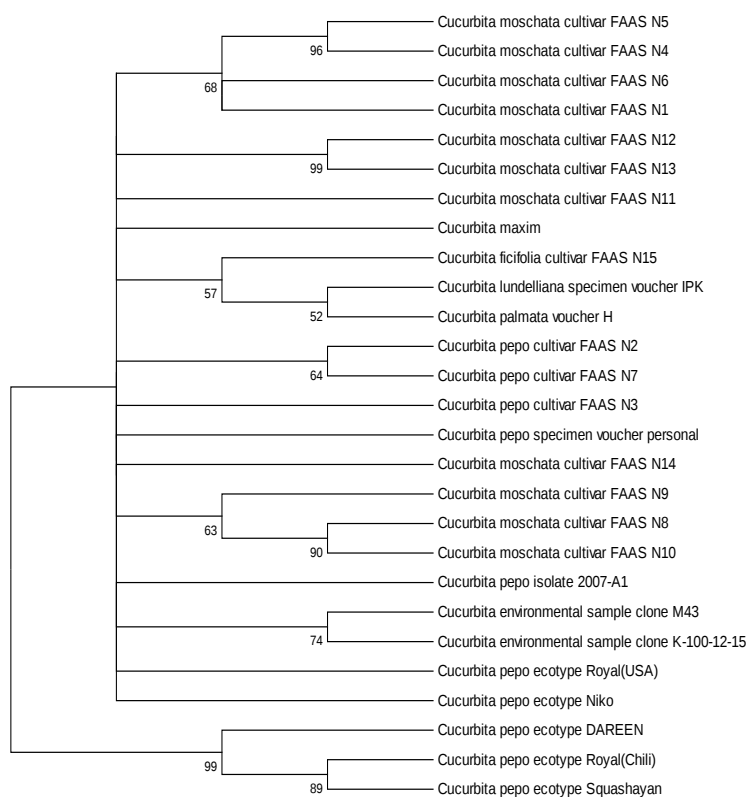
S: تعداد جایگاه چندشکلی، H: تعداد هاپلوتاایپها، Pi: تنوع نوکلئوتیدی، Eta: تعداد کل جهش، K: تعداد تفاوت نوکلئوتیدها بین جمعیت یا گونه‌ها (واگرایی نوکلئوتیدی).

جدول ۶- مناطق حفاظت شده DNA ژن ITS در خانواده کدو

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

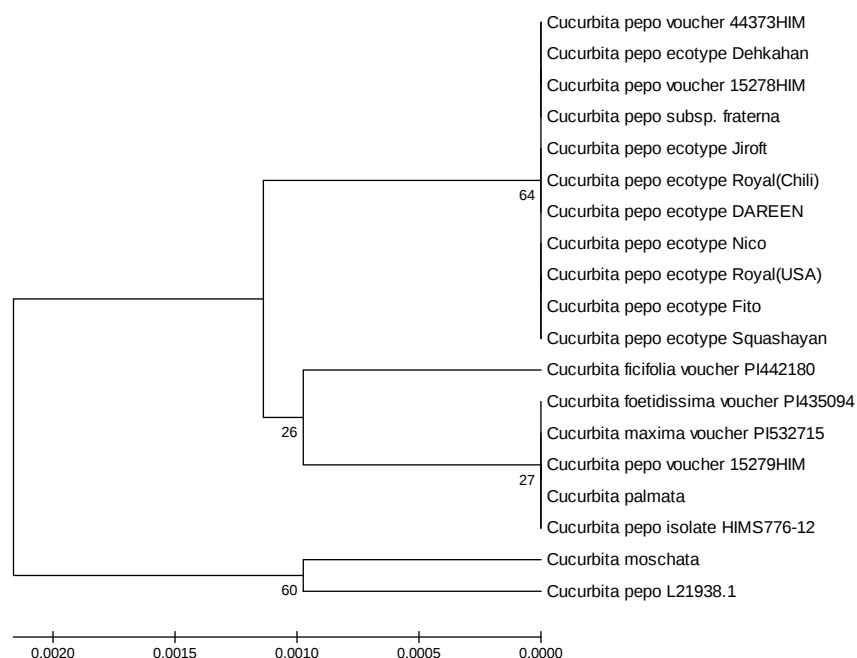
CT	MWL	C	جمعیت
1	271	0.992	کدو

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



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

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

تجزیه و تحلیل فیلوژنی ناحیه ITS و *rbcL* در گونه‌های

مهم مورد بررسی در خانواده کدو

در این پژوهش، برای رسم درخت فیلوژنتیکی توالی نوکلئوتیدی در ۲۷ وارسته 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 *rbcL* توالی نوکلئوتیدی در ۱۹ وارسته 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 نسبتاً 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 *rbcL* که دارای قدرت تفکیک

های مختلفی این بارکد در کنار بارکد *rbcL* به عنوان بارکد مکمل توصیه شده است (Steinke *et al.*, 2017; Piredda *et al.*, 2011; Ren *et al.*, 2019; Roy *et al.*, 2010). همچنین بارکد ITS به دلیل تکثیر از ژنوم قارچ‌های موجود روی نمونه‌های گیاهی طول بالای ژنوم هسته‌ای و به خاطر داشتن تکامل غیر یکنواخت به طور معمول به عنوان بارکد مکمل استفاده می‌شود (Hollingsworth *et al.*, 2011). در واقع استفاده ترکیبی از بارکدها در کنار هم نتایج مناسب-تری 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 *rbcL* توانست همه نمونه‌ها را شناسایی کند و این دلیل بر توانایی بالای این آغازگر در توالی‌یابی است.

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 به عنوان 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 به عنوان بهترین گزینه بارکد عمومی در گیاهان معرفی کرده است. همچنین یافته‌های پژوهشگران بارکد مکان ژنی هسته‌ای ITS را به عنوان بارکدهای مکمل بارکدهای عمومی در گیاهان پیشنهاد می‌کند (Hollingsworth *et al.*, 2011). با این حال 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 پژوهش-

منابع

- Bafeel, SO, Arif IA, Bakir MA, Homaidan AA, 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, Wojeciechowski 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,

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.

Poccai 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 spacer from the sibling species *Anopheles freeborni* and *Anopheles hermsi* (*Diptera Culicidae*). 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 Evolution 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.

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 *rbcL* 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 *rbcL* gene, adenine (27.4) was highest and cytosine (20.1) was the least frequent. Estimation of the nucleotide replacement of *rbcL* 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, *rbcL*, pumpkin