

بررسی روابط فیلوژنتیکی و تایید مولکولی گونه گیاه دارویی گز روغنی بلوچستان به روش بارکدگذاری DNA

ساجده بلوچی^۱، نفیسه مهدی نژاد^{۲*}، براتعلی فاخری^۳

چکیده

این تحقیق به منظور ارزیابی تنوع و تایید مولکولی گونه گز روغنی به روش بارکدگذاری DNA انجام شد. بذور مورینگا جمعیت‌های گز روغنی موجود در ده منطقه بلوچستان شامل بنت، کشیگ، دسک، روستای مدحی، نسفوران، کناردان، ورودی تنگ فنوج، دهان و هفت دختران جمع‌آوری و در گلدان کشت شد. پس از گذشت سه ماه و استقرار کامل گیاه DNA از نمونه‌های برگ‌های جدا و ناحیه ITS2 روی آنها تکثیر و تعیین توالی شد. توالی‌ها به روش *ClustalW* توسط نرم افزار *Mega7* هم‌ردیف سازی، خوشه بندی و تعیین شباهت و فاصله ژنتیکی شدند. شباهت درون گونه‌ای نمونه‌های مورینگا بلوچستان بالا و در محدوده ۹۹/۹ درصد تشخیص داده شد. در تحقیق حاضر ITS2 از نظر شناسایی تنوع ژنتیکی درون گروهی نتوانست ده نمونه بلوچستان را از هم جدا کند. لذا جهت بررسی قابلیت در ارزیابی تنوع ژنتیکی بین گونه‌ای آزمون دیگری انجام شد بدینصورت که از توالی‌های سایر گونه‌های خانواده مورینگا در NCBI استفاده و با توالی مورینگا تحقیق حاضر هم‌تراز شد. توالی نمونه مورینگا بلوچستان با توالی‌های گونه *peregrine* ایتالیایی همولوژی در حدود ۹۲ درصد نشان داد. تبارزایی در این روش نشان داد که جمعیت‌های مورد مطالعه به پنج گروه تقسیم شدند و مشخص گردید که گونه‌های مشابه در یک شاخه کنار هم قرار گرفتند. توالی نمونه مورینگا بلوچستان با توالی‌های گونه *peregrine* در یک گروه قرار گرفت. از آنجاییکه گونه مورینگا موجود در بلوچستان بر اساس کلیدهای مورفولوژیکی در فلور ایران *peregrine* معرفی شده است، نتایج این تحقیق نیز همین گونه را از طریق مولکولی شناسایی و تایید کرد.

کلمات کلیدی: ITS، گونه، توالی‌یابی، جمعیت، بلوچستان

^۱دانش‌آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران
^۲آستادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران. * نویسنده مسئول، ایمیل: nmahdinezhad52@gmail.com
nmahdinezhad@uoz.ac.ir
^۳آستاد گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران

مقدمه

گسترش آنها دارد. (Muluvi et al., 1999; Anwar et al., 2005).

دو گونه از چهارده گونه جنس مورینگا در ایران حضور دارند که یکی از آنها به نام گز روغن یا گز رخ (*Moringa peregrina* (Forssk). Fiori) می‌باشد. انتشار این گونه در جهان شامل ایران و پاکستان، مصر، عمان و عربستان است. در ایران در منطقه بلوچستان (تنگه سرخه، بنت، فوج، دهان، دسک) بشاگرد و نسفوران رویش دارد (مظفریان، ۱۳۸۳). گونه *Moringa peregrina* به عنوان دومین گونه مهم از این جنس بعد از گونه *M. Oleifera* یک گونه شناخته شده است. گونه *M. Oleifera* یک گونه وارداتی است که به تعداد محدودی در استان بوشهر به صورت پراکنده در فضاهای سبز شهری دیده می‌شود. این گونه یکی از گونه‌های سریع‌الرشد مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری است و در پاکستان، در دشت پنجاب، بلوچستان پاکستان و در استان‌های شمال غربی این کشور بسیار رایج است (Anwar et al., 2005).

خواص متعددی به فرآورده‌های حاصل از درختان این تیره گیاهی نسبت داده شده است، که به دلیل وجود ترکیب‌هایی همچون نیازیمپسین پتریگواسپیرمین، بنزیل ایزوتیوسیانات و مشتقات آن، مشتقات بنزیل گلوکوزینولات مقادیر زیادی از ویتامین‌های گروه B، ویتامین C، مقادیر بالای آهن، کلسیم، پتاسیم و همچنین بتا-کاروتن می‌باشد (Fahey, 2005).

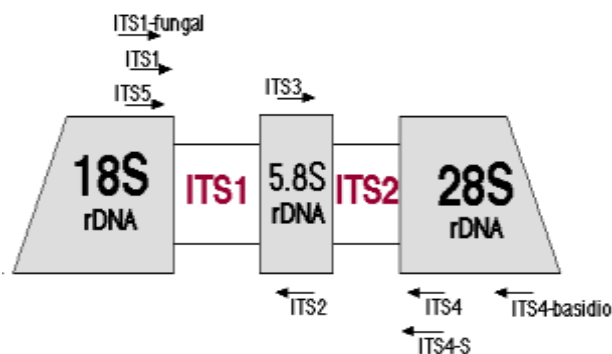
بارکد گذاری DNA روشی ساده برای شناسایی گونه‌ها با استفاده از یک توالی کوتاه ژنتیکی از یک بخش استاندارد

ارقام بومی گیاهان دارویی مختلف و خویشاوندان وحشی آنها بخش اعظم نمونه‌های گیاهی ارزنده هر کشوری را تشکیل می‌دهند. امروزه خطرات مختلفی از جمله خشک‌سالی، چرای بیش از حد دام، برداشت بیش از حد گیاهان دارویی ذخایر ژنتیکی این گیاهان را در خطر انقراض قرار داده است (Roy et al., 2010). شناسایی ژنتیکی و ثبت ارقام مختلف گیاهی یکی از ارکان مهم حفاظت و بهره‌برداری صحیح از منابع ژنتیکی به شمار می‌آید که این امر در اکثر گیاهان در مراحل اولیه از روی خصوصیات مورفولوژیکی کاری سخت خواهد بود (قهرمان‌زاده و همکاران، ۱۳۹۱). شناسایی تنوع ژنتیکی در گونه‌های مختلف گیاهی به ویژه در مراحل اولیه رشد در گونه‌های جنگلی و چند ساله می‌تواند به طور غیر مستقیم در اصلاح و افزایش تولید نهایی آن گونه به کار گرفته شود (Dean et al., 2006).

در کشور ما گیاه گز روغنی *Moringa peregrina* در معرض خطر فرسایش شدید ژنتیکی است. البته به دلایل متعدد اکثر گونه‌های جنس مورینگا در دنیا در معرض فرسایش و خطر انقراض هستند (Stephenson and Fahey, 2001). در سطح بین‌المللی اگر چه مطالعات گسترده‌ای روی جزییات تنوع ژنتیکی و پراکنش این تنوع در گونه‌های مورینگا دیده نمی‌شود ولی مطالعات پراکنده‌ای در زمینه ویژگی‌های مورفولوژیک و گاهی ویژگی‌های ملکولی این گونه‌ها در جمعیت‌های طبیعی گزارش شده است که حکایت از توانمندی بالقوه جهت استفاده در احیا و

محققان بسیاری آزمون شده اند (Chen *et al.*, 2010; Gao *et al.*, 2010; Pang *et al.*, 2013). (ناحیه ITS شامل توالی‌هایی است که ژن‌های 5.8S, 18S و 28S را از هم جدا می‌کند. به طوری که ITS1 بین نواحی ژنی 5.8S, 18S و ITS2 بین ژن‌های 5.8S, 28S واقع شده است (Brasileiro, 2004; Wheeler *et al.* 1988).

ژنوم است. پیشرفت در فن‌آوری‌های تعیین توالی و محاسبات بیوانفورماتیکی، بارکدگذاری DNA را به یکی از منابع اصلی و جدید اطلاعات برای مطالعه روابط تکامل ژنتیکی، کشف گونه‌های ناشناس، شناسایی تنوع زیستی و رسم درخت خویشاوندی تبدیل نموده است (اسدی و همکاران، ۱۳۹۴). در شناسایی و مستندسازی تنوع گیاهان بارکدهای *trnH-psbA*, *matK*, *rbcl* و ITS توسط



شکل ۱- مناطق ژن‌های ریبوزومی

(Porter *et al.*, 1991). گرچه این نواحی درون یک گونه عموماً حفاظت شده‌اند، ولی توالی‌های آن خیلی متنوع‌تر از آن است که به طور واضح در بین خانواده‌ها به راحتی هم ردیف شوند. بنابراین آزمایش‌های تشخیص تنوع بین گونه‌ها و جنس‌ها ابزار با ارزشی محسوب می‌شود (Poczai and Hyvonen 2010).

در تحقیقی تنوع گونه‌های جنس Fasciolidae مورد مطالعه قرار گرفت و نتایج نشان داد ITSها توانایی لازم جهت تفکیک زیر گونه‌ها را از یکدیگر دارا می‌باشند با تکثیر نواحی ITS و هضم قطعات تکثیرشده، ۲۰ نمونه

طول کل ناحیه ITS1, ژن‌های 5.8S و ITS2 متنوع است (Baldwin *et al.*, 1995). هر دو این نواحی تحت یک شکاف اختصاصی در حین بلوغ مولکول‌های RNA ریبوزومی قرار می‌گیرند (Hadjiolova *et al.*, 1984). از آن جا که برخلاف نواحی ژنی DNA ریبوزومی تکامل نواحی بین ژنی خیلی سریع‌تر است، این نواحی به طور گسترده‌ای به عنوان یک نشانگر مناسب برای بررسی روابط فیلوژنتیکی در سطوح مختلف از جمله در بررسی یک جنس منفرد، زیرجنس، در میان گونه‌های خویشاوند و یا در میان جمعیت‌های درون یک گونه استفاده می‌شوند

Chen, 2013) بارکد ITS2 به عنوان یک بارکد مناسب معرفی گردید. گزارش شده که در سال‌های اخیر بررسی نواحی ITS گیاهان در ۶۶ درصد از مقاله‌ها مبتنی بر نواحی ITS مطالعات به منظور روابط فیلوژنی انجام گرفته است (Hebert *et al.*, 2003).

در مطالعه حاضر هدف این می‌باشد که با استفاده از مزایای روش بارکدگذاری DNA گامی موثر در جهت شناسایی و ثبت تنوع گونه دارویی گز روغنی بلوچستان برداشته شود. روز و ۱۹ درجه سانتی‌گراد شب قرار گرفتند. و پس از جوانه زنی به گل‌دان انتقال داده شد. به منظور استخراج DNA از برگ‌های جوان استفاده شد. استخراج DNA با روش CTAB انجام گرفت (Saghaimarouf *et al.*, 1994). ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده با ژل آگارز یک درصد و رنگ آمیزی فلورسنس بررسی گردید، کمیت و خلوص نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر ارزیابی شد. آغازگر ITS2 (MPF و MPR) گزارش شده در (جدول ۱) آورده شده‌اند (Alaklab, 2015).

باقلا از هم تفکیک گردید (Souframanien *et al.*, 2013). همچنین از پنج بارکد گیاهی rpoC1, rpoB, matK, rbcL و ITS برای شناسایی گونه‌هایی از جنس *Paphiopedilum* استفاده شد که دو بارکد matK و ITS به عنوان بارکد مناسب معرفی شدند (Parveen *et al.*, 2012). همچنین در شناسایی ۲۴۳۱ گونه از ۶۱ گیاه دارویی بومی چین (Pang *et al.*, 2013) و 51 نمونه متعلق به 19 جنس مختلف از گیاهان دارویی (Sun and

مواد و روش

در این تحقیق بذور ۱۰ جمعیت گز روغنی در استان سیستان و بلوچستان شهرستان نیکشهر مناطق مختلف (هفت دختران، بنت، دهان، روستای مدحی، کناردان، نسفوران، تنگ فنوج، ورودی تنگ فنوج، دسک) جمع‌آوری شد. بذور جمع‌آوری شده بعد از مراحل ضد عفونی و استریل کردن با وایتکس ۱۰ درصد و اتانول در پتری دیش کشت گردید پس از کاشت، ظروف کشت محتوی جنین‌های نارس در اتاق رشد با تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن ITS₂

نوع پرایمر	نام پرایمر	توالی پرایمر
F	MPF	5'-TCGAATGAAAAAGCACGCC-3'
R	MPR	5'-TTTTTAAGCCAACCGGAGC-3'

آگاروز ۲ درصد و رنگ آمیزی با استفاده از Gel Red Staining انجام شد .

توالی یابی و تجزیه و تحلیل داده ها

بعد از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، محصولات جهت توالی یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال و سپس *Sequencing Macrogen* جهت انجام تصحیحات توالی‌ها از نرم‌افزار *Chromas 2.1.1* استفاده شد و همچنین ارزیابی تک تک توالی‌ها با توالی‌های پایگاه داده *NCBI* با نرم‌افزار آنالین *BLAST* انجام شد. توالی‌ها به روش *ClustalW* توسط نرم افزار *Mega7* هم‌ردیف سازی، خوشه بندی و تعیین شباهت و فاصله ژنتیکی شدند.

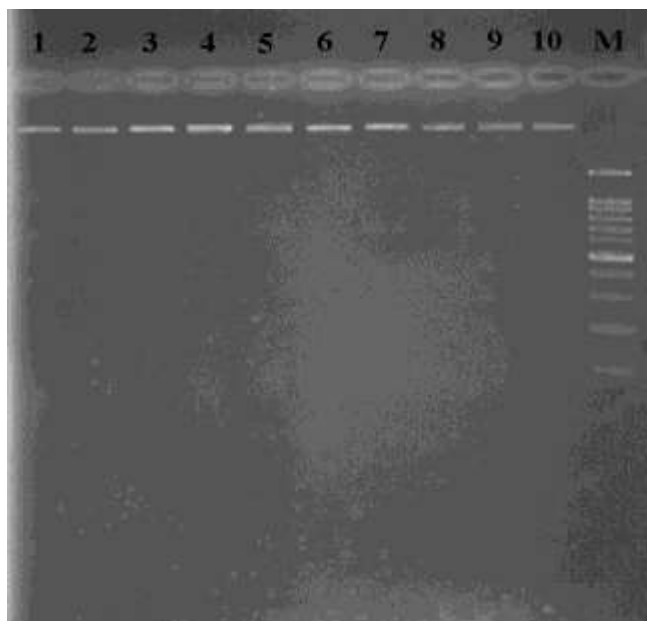
منظور بررسی سالم بودن و عدم شکستگی DNA استخراج شده، نمونه‌های به دست آمده بر روی ژل آگارز 1/5 درصد الکتروفورز شدند. شکل زیر DNA استخراج شده از برخی از نمونه‌ها را بر روی ژل آگارز 1/5 درصد نشان می‌دهد وجود تک باند نشان دهنده کیفیت و سلامت DNA استخراج شده می‌باشد.

پرایمرها طبق دستورالعمل شرکت تولید کننده (پیشگام ژن) رقیق و سپس غلظت نهایی آن‌ها بر اساس نانوگرم به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر بررسی گردید. پس از آن جهت تعیین دمای بهینه اتصال پرایمرها از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز گرادپانت با شیب دمایی ۵۷، ۵۷/۷، ۵۸/۴، ۵۹/۱، ۵۹/۹، ۶۰/۶، ۶۱/۳، ۶۲، ۶۲/۸، ۶۳/۵، ۶۴/۲ و ۶۵ درجه سلسیوس استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۵ میکرو لیتر و برنامه دمایی واسرشت اولیه در ۹۴ C به مدت ۴ دقیقه، به دنبال آن ۳۰ چرخه (واسرشت سازی در ۹۴C به مدت ۶۰ ثانیه، اتصال در C ۵۷ به مدت ۴۵ ثانیه و بسط در دمای ۷۲C به مدت ۱ دقیقه و در نهایت بسط نهایی در دمای C ۷۲ به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. جهت حصول اطمینان از تکثیر موفق از ژل

نتایج و بحث

ارزیابی کیفی DNA استخراج شده

استخراج DNA از گیاه با استفاده از روش CTAB صورت گرفت. بعد از استخراج DNA و اطمینان از خلوص آن به



شکل ۲- نتایج کیفیت DNA استخراج شده به روش CTAB، از گیاه مورینگا چاهک ۱ تا چاهک ۱۰ DNA استخراج شده از گیاه و ستون M

مارکر ۱۰۰ جفت بازی (ladder)

DNA میزان جذب نوری در ۲۶۰ نانومتر استفاده گردید. محدوده غلظت DNA های استخراج شده بین $ng/\mu L$ ۱۸۰- ۲۴۸ شد. نتایج این غلظت‌ها در جدول ۲ آورده شده است.

نتایج تعیین غلظت و کیفیت DNA توسط اسپکتروفتومتری

کیفیت DNA های استخراج شده مطلوب بود یعنی نسبت $260/280$ مناسب و بین $1/5 - 1/7$ بود. جهت تعیین غلظت

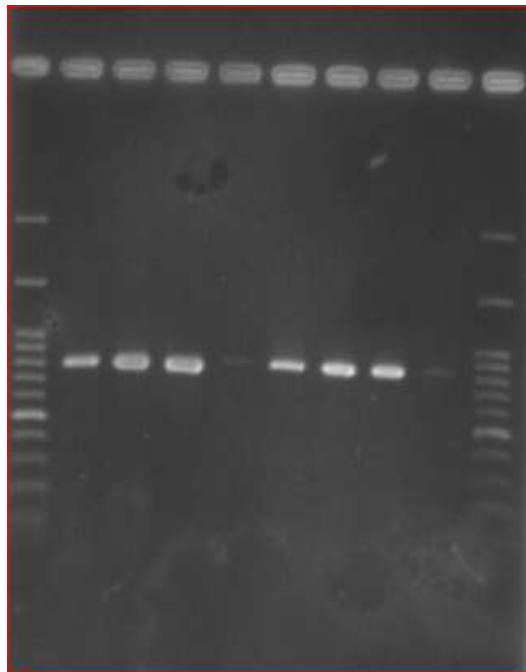
جدول ۲- نسبت $OD(A_{260}/A_{280})$ در تعدادی از نمونه‌های استخراج شد

OD	نمونه DNA استخراجی
۱/۵۶	۱
۱/۶۳	۲
۱/۷	۳

نتایج PCR شیب دمایی

به منظور یافتن بهترین دما، PCR شیب دمایی برای پرایمرهای طراحی شده، صورت گرفت. انجام PCR در محدوده دمایی تعیین شده نشان داد که دمای 62°C ، بهترین دما برای انجام واکنش PCR است. پس از تعیین کیفیت DNA به منظور تأیید تکثیر قطعه مورد نظر، محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۲% الکتروفورز شدند.

پس از تکثیر قطعه مورد نظر تنها یک باند که مربوط به قطعه ۷۵۰ جفت بازی برای جفت آغازگر ITS است، نشان دهنده تکثیر درست قطعات و صحت انجام PCR می‌باشد. عدم وجود کشیدگی و شفاف بودن باندها نشان دهنده عدم وجود آلودگی‌های پروتئینی و نمکی می‌باشد و مشاهده تنها یک باند، عدم وجود باندهای کاذب را مورد تأیید قرار داد. شکل زیر الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز را نشان می‌دهد.



شکل ۳- الکتروفورز محصولات ITS PCR روی ژل آگارز

نتایج تعیین توالی

در این مرحله جهت آنالیزهای بیوانفورماتیکی از نتایج حاصل از توالی نمونه‌ها استفاده شد. کیفیت گراف‌ها نشان دهنده میزان دقت در تعیین توالی می‌باشد. با توجه به کیفیت گراف‌ها، تعیین توالی در حد مطلوب صورت پذیرفته

بود. در مرحله‌ی اول نتایج حاصل از تعیین توالی نمونه‌های مورینگا بلوچستان با استفاده از نرم‌افزار Chromas 1.4.2 version مورد بررسی قرار گرفتند و سپس میزان همولوژی بین این توالی‌ها توسط نرم‌افزار آنلاین BLAST (از طریق سایت <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)

در سال ۱۳۷۲ بر اساس کلیدهای مورفولوژیکی شناسایی و به فلور ایران اضافه گردید (جوانشیر، ۱۳۷۲). نتایج این تحقیق نیز همین گونه را از طریق مولکولی شناسایی و تایید کرد.

نتایج مقایسه داده های ژنتیکی میان جفت نواحی

فاصله ژنتیکی در میان نمونه‌های مورد بررسی از صفر تا ۰/۲۱۸ متغیر بود. بیشترین فاصله ژنتیکی مربوط به گونه *drouhardi* ماداسکار با گونه *peregrine* بلوچستان ایران بود. فاصله ژنتیکی بین گونه *peregrine* موجود در اتیوپی با گونه *peregrine* بلوچستان ایران صفر بود. گونه *peregrine* بلوچستان با گونه *oleifera* هند کمترین فاصله را داشت.

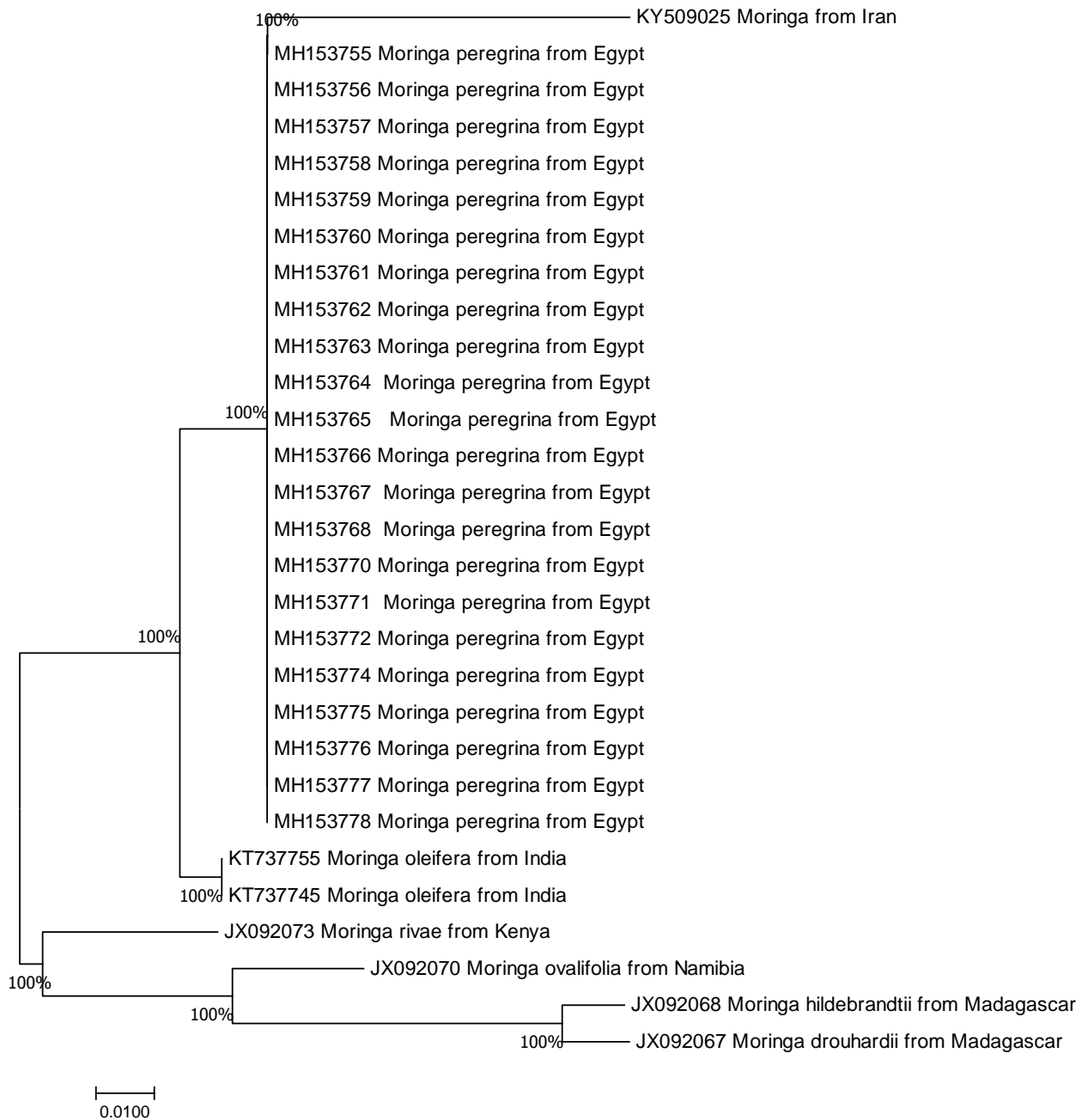
مورد بررسی قرار گرفت و شباهت همگی در محدوده ۹۹/۹ درصد تشخیص داده شد در مرحله دوم با توجه به شباهت زیاد توالی های مورینگا بلوچستان فقط یکی از آنها در پایگاه داده NCBI ثبت و کد دسترسی KY509025 کسب نمود. سپس این توالی با توالی‌های مرجع ثبت شده موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI مورد مقایسه قرار گرفتند. همولوژی بالایی بین این توالی نمونه مورینگا بلوچستان با توالی‌های گونه *peregrine* موجود در بانک ژن در محدوده ۹۲ درصد تشخیص داده شد. از آنجاییکه یکی از اهداف این تحقیق تایید مولکولی نوع گونه گیاه مورینگا بود. بر اساس نتیجه این تحقیق می توان گفت که گونه مورینگا موجود در سیستان و بلوچستان *peregrine* می باشد. این گونه اولین بار توسط مرحوم دکتر جوانشیر

که بصورت حفاظت شده‌های در طبق تکامل باقی مانده است. بنابراین یک بارکد باید دارای قدرت تفکیک مناسبی باشد و حاوی اطلاعات خویشاوندی کافی برای اختصاص دادن ناشناخته‌ها و یا گونه‌های بارکد نشده به داخل گروه‌های رده‌بندی شده بوده و جامعیت داشته باشد (Mahadani and Ghosh, 2013). با توجه به نتایج بدست آمده پیشنهاد می‌گردد که از سایر بارکدها مانند *trnH-psbA*، *matKt*، *rbcL* استفاده شود کاربرد ترکیبی از بارکدهای در کنار هم نتایج مناسب‌تری را نمایان خواهد کرد.

از طرفی تنوع درون و بین گونه‌ای منشأ مهم گونه‌زایی و از شاخص‌های ذخایر مهم تنوع زیستی به شمار می‌رود بنابراین بررسی آن در راستای شناخت تنوع زیستی حائز اهمیت است به طوریکه کمبود تنوع بین و درون گونه‌ای در میان گیاهان باعث بروز مشکلات زیادی می‌گردد. از آنجائیکه تنها دو گونه از جنس مورینگا در ایران وجود دارد و سایر گونه‌های مورینگا در کشور ما دیده نشده است، با توجه به ویژگی‌های خاص برخی از این گونه‌ها اقدام در وارد کردن آنها به کشور به منظور استفاده در مناطق خشک و گرمسیری می‌تواند در دستور کار مسئولین اجرایی و تحقیقاتی کشور قرار گیرد.

درخت تبارزایی با استفاده از روش اتصال مجاور (NJ (Neighbor joining) ترسیم گردید. به دلیل اینکه در نتحقیق حاضر ITS2 از نظر شناسایی تنوع درون گروهی نتوانست ده نمونه متفاوت بلوچستان را از هم جدا کند. می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که تنوع موجود در میان ژنوتیپ‌های گز مورد بررسی، به طور مستقیم متأثر از فواصل جغرافیایی و همچنین شرایط توپوگرافیک زیستگاه‌های طبیعی آنها بود (Peters, *al et.*, 1995). بررسی موجود نشان داد که ITS توانایی تفکیک زیر گونه‌ها و ژنوتیپ‌های درون یک جمعیت را از یکدیگر دارا نمی‌باشد. لذا جهت بررسی قابلیت در ارزیابی تنوع ژنتیکی بین گونه‌ای و بین جنسی، آزمون دیگری انجام شد بدینصورت که از توالی‌های سایر گونه‌های خانواده مورینگا در NCBI استفاده و با توالی مورینگا تحقیق حاضر مقایسه شد. تبارزایی در این روش نشان داد که جمعیت‌های مورد مطالعه به پنج گروه تقسیم شدند هرچند از نظر جغرافیایی نیز از یکدیگر جدا شدند و مشخص گردید که گونه‌های مشابه در یک شاخه کنار هم قرار گرفتند. لذا می‌توان گفت ITS ابزاری مناسب جهت ارزیابی‌های بین گونه‌ای باشد که همین موضوع در تحقیقات دیگر نیز گزارش شده است. (Varela *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2010; Gültepe *et al.*, 2013)

همانطوریکه قبلا ذکر شد نواحی فاصله انداز رونوشت‌های ژن‌های ریبوزومی جزء توالی‌های هستند



منابع

- fingerprinting based on PCR markers. *Brazilian Microbiology*, 35, 205-210.
- Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C. and Song, J. (2010). Validation of the *ITS2* region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PloS one*. 5, e8613.
- Dean, C. A., Cotterill, P. P. and Burdon, R. D. (2006). Early Selection of *Radiata Pine*. *Silvae Genetica*, 55, 182-191.
- Fahey, J. W. (2005). *Moringa oleifera*: a review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. Part 1. *Trees for life*, 1, 5-20.
- Gao, T., Yao, H., Song, J., Liu, C., Zhu, Y, Ma, X., Pang, X., Xu, H. and Chen, S. (2010) Identification of medicinal plants in the family *Fabaceae* using a potential DNA barcode *ITS2*. *Ethnopharmacol.*, 116–121.
- Gültepe, M.U., Uzuner, K., Coşkuncelebi, A., Beldüz, O. and Terzioğlu, S. (2010). Internal transcribed spacer (ITS) polymorphism in the wild *Primula* (Primulaceae) taxa of Turkey. *Turkish Botany*, 34, 147-157.
- Hebert, P.D.N., Ratnasingham, S. and deWaard, J.R. (2003). Barcoding animal life: *cytochrome c oxidase subunit 1* divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. Biology*, 270, 96-99.
- Mahadani, P. and Ghosh, S.K. (2013). DNA Barcoding: A tool for species identification from herbal juices. *DNA Barcodes*, 35-38.
- Muluvi, G.M., Sprent, J.I., Soranzo, N., Provan, J., Odee, D., Folkard, G. and Powell, W. (1999). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of genetic variation in *Moringa oleifera* Lam. *Molecular Ecology*, 8, 463-470.
- Pang, X., Shi, L., Song, J., Chen, X. and Chen, S. (2013). Use of the potential DNA barcode
- اسدی، ف.، غزن، س.، قهرمان زاده، ر.، رزمجو، ج. و ال ابراهیم، م. (۱۳۹۴). زمان بارگذاری شده توسط DNA برخی از گیاهان دارویی. *مجله بیوتکنولوژی زراعی*، ۱۰، ۳۱-۴۰.
- جوانشیر، ک. (۱۳۷۲). گونه و خانواده جدید برای فلور ایران، چاپ دوم، انتشارات دانشگاه تهران. ۲۸۰ ص.
- قهرمانزاده، ر.، مروشی، ح.، ون دیلیل، ک.، ملک زاده، س.، شهریاری، ف. و اسمالدر، ر. (۱۳۹۱). استفاده از DNA بارکد به جداسازی گونه های مهاجم علف های هرز *Myriophyllum spp.* غیر مهاجمی. *حفاظت محصول*، ۱۰۱.
- مظفریان، و. (۱۳۸۳). درختان و درختچه ایران. چاپ دوم، انتشارات فرهنگ معاصر، تهران، ص ۹۹۰.
- Anwar, F., Ashraf, M. and Bahanger, M.I. (2005). Inter-provenance variation in the composition of *Moringa oleifera* oilseeds from Pakistan. *Oil Chemists Society*, 82, 45-51.
- Alaklab, A. (2015). Genetic diversity of *Moringa peregrina* species in Saudi Arabia with ITS sequences. *Saudi J Biol Sci*, 22(2): 186–190.
- Baldwin, B.G., Sanderson, M.J., Porter, J.M., Wojciechowski, M.F., Campbell, C.S. and Donoghue, M.J. (1995). The ITS region of nuclear ribosomal DNA-A valuable source of evidence on Angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. Missouri Botanical Garden, 82, 247–277.
- Brasileiro, B. T. R. V., Coimbra, M. R. M., Morais, M. A. D. and Oliveira, N. T. D. (2004). Genetic variability within *Fusarium solani* specie as revealed by PCR-

- Souframanien, J., Joshi, A. and Gopalakrishna, T. (2003). Intraspecific variation in the internal transcribed spacer region of rDNA in black gram (*Vigna mungo* (L.) Hepper). *CURRENT SCIENCE-BANGALORE*, 85, 798-801.
- Sun, Z. and Chen, S. (2013). Identification of cortex herbs using the DNA barcode. *Nat. Med*, 296-302.
- Varela, E., J. Lima, A. Galdino, L.D.S. Pinto, W. Bezerra, E. Nunes, M. Alves and Grangeiro, T. (2004). Relationships in subtribe Diocleinae (Leguminosae; Papilionoideae) inferred from transcribed spacer sequences from nuclear ribosomal DNA. *Phytochemistry*, 65, 59-69.
- Wu, C.T., Hsieh, C.C., Lin, W.C., Tang, C.Y. Yang, C.H., Huang, Y.C. and Ko, Y.J. (2013). Internal transcribed spacer sequence-based identification and phylogenetic relationship of *I-Tiao-Gung* originating from *Flemingia* and *Glycine* (Leguminosae) in Taiwan. *food and drug analysis*, 21, 356-362.
- ITS* to identify herbal materials. *Nat Med*, 571-575.
- Parveen, I., Singh, H., Raghuvanshi, S., Pradhan, U. and Babbar, S. (2012). DNA barcoding of endangered Indian *Paphiopedilum* species. *Molecular Ecology Resources*, 12, 82-90.
- Peters, W.S., Pirl, M., Gottsberger, G. and Peters, D.S. (1995). Pollination of the Crown Imperial *Fritillaria imperialis* by Great Tits *Parus major*. *für Ornithologie*, 136, 207-212.
- Poczai, P., Hyvonen, J. (2010). Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: problems and prospects. *Molecular Reports* 37:1897-1912.
- Porter, C.H., Collins, F.H. (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* 45:271.
- Roy, S., Tyagi, A., Shukla, V., Kumar, A. and Singh, U.M. (2010). Universal plant DNA barcode loci may not work in complex groups: A case study with Indian *Berberis* species. *PloS one*, 5: e13674.
- Saghai Maroof, M.A., Biyashev, R.M., Yang, G.P., Zhang, Q. and Allard, R.W. (1994). Extraordinarily polymorphic micro satellite DNA in barley: species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 5466-5470.
- Stephenson, K.K. and Fahey, J.W. (2001). Development of tissue culture methods for the rescue and propagation of endangered *Moringa* spp. germplasm. *Economic botany*, 58, 116-124.

Investigating phylogenetic relationships and molecular confirmation medicinal plants *Moringa balochistan* using DNA barcoding method

Sajedeh Balochi¹, Nafiseh Mahdinezhad^{*2}, Baratali Fakheri³

Abstract

This research was conducted to evaluate the diversity and molecular confirmation of oat gaze by DNA barcoding method. *Moringa* seeds were cultivated in Baluchestan province of Baluchestan province including Bennett, Kishigh, Dosh, Madhadi village, Nesfaran, Condar, Tang Fanyjh entrance, mouth and seven girls. After three months, the DNA was isolated from the leaf samples and the ITS2 region was amplified and sequenced. The ClustalW sequences were combined with Mega7 software, clustering and genetic similarity and spacing. The intrinsic similarities of the *Moringa* Baluchistan specimens were detected in the range of 99.9%. In the present study, ITS2 did not distinguish between Baluchistan's ten variants in terms of genetic variation within the group. Therefore, in order to evaluate the ability to evaluate the genetic diversity of the species, another test was performed, so that the sequences of other species of *Moringa* family were used in NCBI, and the *Moringa* sequence of the present study was compared. The *Moringa*-Baluchestan sample sequence with Ethiopic peregrine sequences showed homology of about 92%. The emergence in this method showed that the studied populations were divided into five groups and it was determined that the similar species were placed in the same branch. The *Moringa*-Baluchestan sample sequence was grouped with sequences of peregrine species in one group. Since the *Moringa* species in Baluchistan have been introduced based on morphological keys in the Iranian flora, peregrine has been introduced. Based on the results of this study, the same was also recognized and confirmed through molecular.

Keywords: ITS, Species, Sequencing, Population, Baluchestan

¹ M. Sc. Student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol. Iran.

² Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol. Iran.

*Corresponding Author: nmahdinezhad52@gmail.com nmahdinezhad@uoz.ac.ir

³ Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol. Iran.