مجله زیست فناوری گیاهان دارویی

سال پنجم، شماره دوم، پاییز و زمستان ۱۳۹۸

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 برگی 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 اتیوپی 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

[۱] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات ، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران

[۲] استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران. * نویسنده مسئول، ایمیل: nmahdinezhad@uoz.ac.ir or nmahdinezhad52@gmail.com

[۳] استاد گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، ایران

مقدمه

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 بهره‌برداري صحیح از منابع ژنتیکی به شمار می‌آید که این امر در اکثر گیاهان در مراحل اولیه از روي خصوصیات مورفولوژیکی کاري 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).

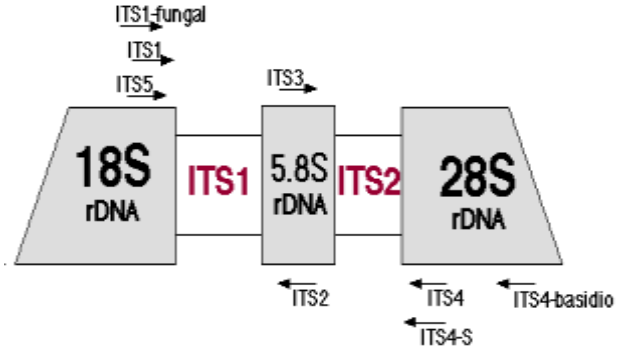
در کشور ما گیاه گز روغنی Morniga peregrine در معرض خطر فرسایش شدید ژنتیکی است. البته به دلایل متعدد اکثر گونه‌های جنس مورینگا در دنیا در معرض فرسایش و خطر انقراض هستند (Stephenson and Fahey, 2001). در سطح بین‌المللی اگر چه مطالعات گسترده‌ای روی جزییات تنوع ژنتیکی و پراکنش این تنوع، در گونه‌های مورینگا 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 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 گَز 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، فنوج، 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 Lamarck 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 سریع الرشد 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 متعددي به فرآورده‌هاي حاصل از درختان این تیره گیاهی نسبت داده شده است، که به دلیل وجود ترکیب‌هایی همچون نیازیمپسین پتریگواسپیرمین، بنزیل ایزوتیوسیانات و مشتقات آن، مشتقات بنزیل‌گلوکوزینولات مقادیر زیادي از ویتامین‌هاي گروه B، ویتامین C، مقادیر بالاي 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 استاندار

ژنـوم اسـت. پیشـرفت در فـن‌آوری‌هـای تعیـین تـوالی و محاسبات بیوانفورماتیکی، بارکدگذاری DNA را به یکـی از منابع اصلی و جدید اطلاعـات بـرای مطالعـه روابـط تکامـل ژنتیکی، کشف گونه‌های ناشناس، شناسایی تنـوع زیسـتی و رسـم درخـت خویشـاوندی تبـدیل نمـوده اسـت (اسـدی و همکاران، ۱۳۹۴). در شناسایی و مستندسازي تنـوع گیاهـان بارکـــدهاي rbcL، matKt، trnH-psbA و ITS توســـط محققان بسیاري آزمـون شـده انـد (Chen *et al*., 2010; Gao *et al*., 2010; Pang *et al*., 2013). (ناحیـه ITS شامل توالی‌هایی است که ژن‌های S ۵.۸ S , ۱۸وS ۲۸ را از هم جدا می کند. به طوری که ITS1 بـین نـواحی ژنـیS ۵/۸ , S ۱۸ و ITS2 بـین ژن‌هـای ۵.۸S , و ۲۸S واقـع شده است (Brasileiro, 2004;Wheeler *et al*. 1988).



شکل ۱-مناطق ژن هاي ریبوزومی

طول کل ناحیه ITS1, ژن های s۵.۸ و ITS2 متنوع است (Baldwin *et al*., 1995). هر دو این نواحی تحت یک شکاف اختصاصی در حین بلوغ مولکول های RNA ریبوزومی قرار می‌گیرند (Hadjiolova *et al*., 1984). از آن جا که برخلاف نواحی ژنی DNA ریبوزومی تکامل نواحی بین ژنی خیلی سریع تر 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 (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 گونه‌هاي 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

باقلا از هم تفکیک گردید (Souframanien *et al*., 2013). همچنین از پنج بارکد گیاهی rpoB، rpoC1، rbcL، matK و ITS براي 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 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 می‌باشدکه با استفاده از مزایاي روش بارکدگذاري DNA گامی موثر در جهت شناسایی و ثبت تنوع گونه دارویی گز روغنی بلوچستان برداشته شود.

مواد و روش

در ایـن تحقیـق بـذور ۱۰ جمعیـت گـز روغنـی در اسـتان سیستان و بلوچستان شهرسـتان نیکشـهر منـاطق مختلـف (هفت دختـران، بنـت، دهـان، روسـتای مـدحی، کنـاردان، نسفوران، تنگ فنوج، ورودی تنگ فنوج، دسک) جمـع‌آوری شد. بـذور جمـع‌آوری شـده بعـد از مراحـل ضـد عفـونی و استریل کردن با وایتکس ۱۰ درصد و اتانول در پتری دیـش کشـت گردیـد پـس از کاشـت، ظـروف کشـت محتـوي جنین هاي نارس در اتاق رشد بـا تنـاوب نـوري ۱۶ سـاعت روشنایي و ۸ ساعت تاریکي و دماي ۲۵ درجـه سـانتي‌گـراد روز و ۱۹ درجه سانتي‌گراد شب قرار گرفتند. و پس از جوانه زنی به گلدان انتقال داده شد. به منظور اسـتخراج DNA از بـرگ‌هـای جـوان اسـتفاده شـد. اسـتخراج DNA بـا روش CTAB انجـام گرفـت (saghaimaroof *et al*., 1994). ارزیابی کیفیت DNA استخراج شده با ژل آگارز یک درصد و رنگ آمیزی فلورسنس بررسی گردیـد، کمیـت و خلـوص نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در دو طـول مـوج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر ارزیـابی شـد. آغـازگر ITS2 (MPF و MPR) گـزارش شـده در (جـدول ۱) آورده شـده‌انـد (Alaklab, 2015).

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن ITS_2

نوع پرایمر	نام پرایمر	توالی پرایمر
F	MPF	’-۵TCGAATGAAAAAGCACGCCC -3’
R	MPR	’TTTTTAAGCCAACCGCGAGC -۵3’

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 پلیمراز گرادیانت 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 پلیمراز در حجم ۲۵ میکرو لیتر و برنامه دمایی واسرشت اولیه در C ۹۴ به مدت ۴ دقیقه، به دنبال آن۳۰ 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 آگاروز ۲ درصد و رنگ آمیزی با استفاده از. Gel Red Staining انجام شد .

نتایج و بحث

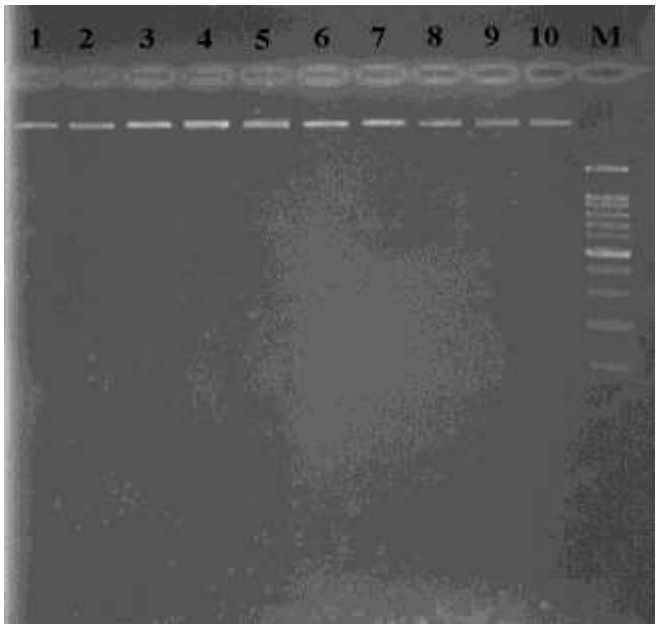
ارزیابی کیفی DNA استخراج شده

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

توالی یابی و تجریه و تحلیل داده ها

بعد از انجام واکنش زنجیرهای پلیمراز، 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 پایـگـاه داده *NCBI* با نرمافزار آنلاین *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 1/5درصد الکتروفورز شدند .شکل زیر DNA استخراج شده از برخی از نمونه‌ها را بر روی ژل آگارز ۱/۵درصد نشان می‌دهد وجود تک باند نشان دهنده کیفیت و سلامت DNA استخراج شده می‌باشد.



شکل۲- نتایج کیفیت DNA استخراج شده به روش CTAB ، از گیاه مورینگا چاهک۱ تا چاهک۱۰ DNA استخراج شده از گیاه و ستون M مارکر ۱۰۰ جفت بازی (ladder)

نتایج تعیین غلظت و کیفیت DNA توسط اسپکتروفتومتری

کیفیت DNA های استخراج شده مطلوب بود یعنی نسبت ۲۶۰/۲۸۰ مناسب و بین ۱/۵ -۱/۷ بود. جهت تعیین غلظت DNA میزان جذب نوری در ۲۶۰ نانومتر استفاده گردید. محدوده غلظت DNAهای استخراج شده بین ng/µL ۲۴۸ -۱۸۰ شد. نتایج این غلظت‌ها در جدول ۲ آورده شده است.

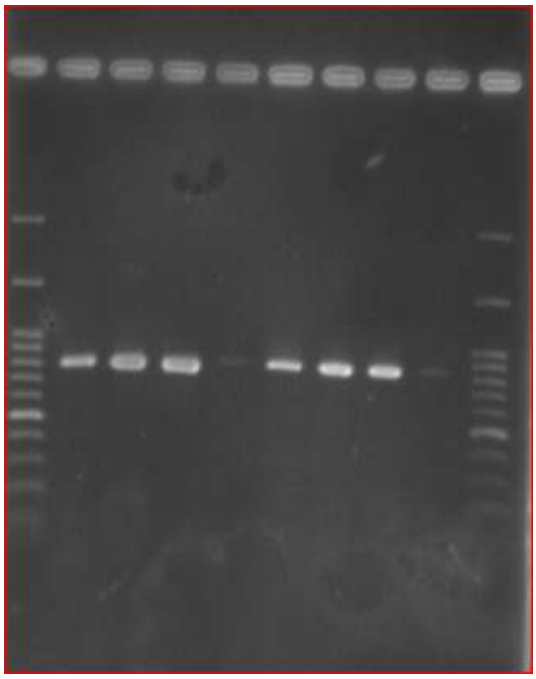
جدول ۲- نسبت (OD(A۲۶۰/A۲۸۰ در تعدادی از نمونه‌های استخراج شد

نمونه DNAاستخراجی	OD
۱	۱/۵۶
۲	۱/۶۳
۳	۱/۷

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 ۶۲°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 ۷۵۰جفت 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.



شکل۳- 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 نمونه های مورینگا بلوچستان با استفاده از نرم‌افزار Chromas version 2. 4. 1 مورد بررسی قرار گرفتند و سپس میزان همولوژی بین این توالی‌ها توسط نرم‌افزار آنلاین BLAST از طریق سایت (ttp://blast. ncbi nlm. nih. gov/Blast.cgi)

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 انجاییکه 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 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

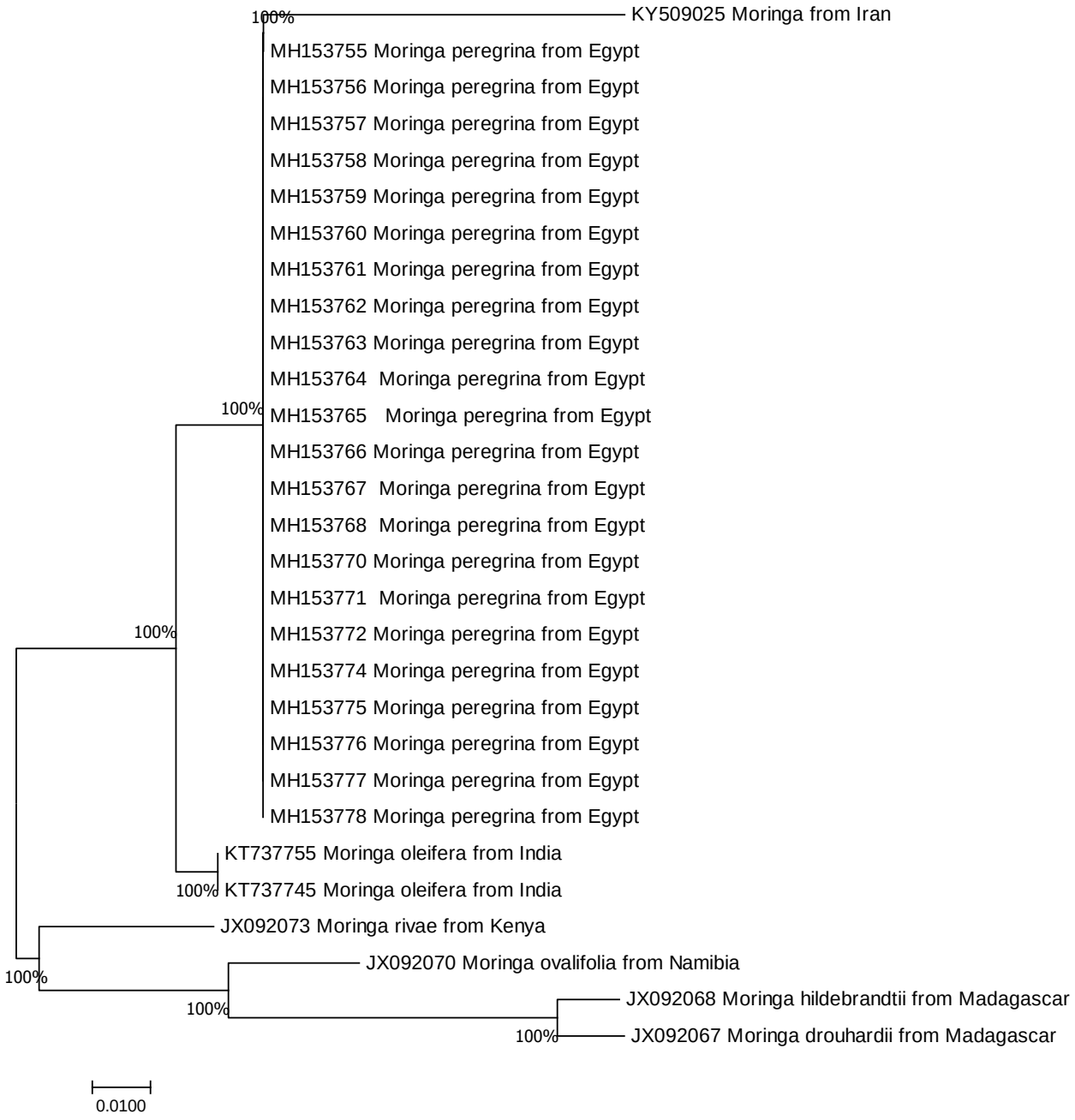
فاصله ژنتیکی در میان نمونه‌های مورد بررسی از صفر تا ۰/۲۱۸ متغیر بود. بشترین فاصله ژنتیکی مربوط به گونه drouhardi ماداسکار با گونه peregrine بلوچستان ایران بود. فاصله ژنتیکی بین گونه peregrine موجود در اتیوپی با گونه peregrine بلوچستان ایران صفر بود. گونه peregrine بلوچستان با گونه oleifera هند کمترین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

KT737755																
KY509025	0.080															
MH153778	0.022	0.062														
MH153777	0.022	0.062	0.000													
MH153776	0.022	0.062	0.000	0.000												
MH153775	0.022	0.062	0.000	0.000	0.000											
MH153774	0.022	0.062	0.000	0.000	0.000	0.000										
MH153772	0.022	0.062	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000									
MH153771	0.022	0.062	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000								
MH153770	0.022	0.062	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000							
MH153768	0.022	0.062	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000						
MH153767	0.022	0.062	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000					
MH153766	0.022	0.062	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000				
MH153765	0.022	0.062	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000			
MH153764	0.022	0.062	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		
MH153763	0.022	0.062	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
MH153762	0.022	0.062	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
MH153761	0.022	0.062	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
MH153760	0.022	0.062	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
MH153759	0.022	0.062	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
MH153758	0.022	0.062	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
MH153757	0.022	0.062	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
MH153756	0.022	0.062	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
MH153755	0.022	0.062	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
JX092070	0.093	0.166	0.101	0.101	0.101	0.101	0.101	0.101	0.101	0.101	0.101	0.101	0.101	0.101	0.101	0.101
JX092068	0.138	0.217	0.146	0.146	0.146	0.146	0.146	0.146	0.146	0.146	0.146	0.146	0.146	0.146	0.146	0.146
JX092073	0.069	0.138	0.076	0.076	0.076	0.076	0.076	0.076	0.076	0.076	0.076	0.076	0.076	0.076	0.076	0.076
JX092067	0.138	0.218	0.146	0.146	0.146	0.146	0.146	0.146	0.146	0.146	0.146	0.146	0.146	0.146	0.146	0.146
KT737745	0.000	0.087	0.022	0.022	0.022	0.022	0.022	0.022	0.022	0.022	0.022	0.022	0.022	0.022	0.022	0.022

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. مي‌توان چنین نتیجه‌گیري کرد که تنوع موجود در میان ژنوتیپ‌هاي گز مورد بررسي، به طور مستقیم متأثر از فواصل جغرافیایي و همچنین شرایط توپوگرافیك زیستگاه‌هاي طبیعي آنها بود (Peters, *al el*., 1995). بررسی موجود نشان داد کهITS توانایی تفکیک زیر گونه‌ها و ژنوتیپ‌هاي درون یک جمعیت را از یکدیگر دارا نمی باشد. لذا جهت بررسی قابلیت در ارزیابی تنوع ژنتیکی بین گونه‌ای و بین جنسی، آزمون دیگری انجام شد بدینصورت که از توالی های 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 گفتITS ابزاری مناسب جهت ارزیابی‌های بین گونه‌ای باشد که همین موضوع در تحقیقات دیگر نیز گزارش شده است.(Varela *et al*.,2004; Wu *et al*.,2013; Gültepe *et al*.,2010)

همانطوریکه قبلا ذکر شد نواحی فاصله انداز رونوشت‌هاي ژن‌هاي ریبوزومی جزء توالی‌هاي هستند که بصورت حفاظت شدهاي در طبق تکامل باقی مانده است. بنابراین یک بارکد باید داراي قدرت تفکیک مناسبی باشد و حاوی اطلاعات خویشاوندي کافی براي اختصاص دادن ناشناخته‌ها و یا گونه‌هاي بارکد نشده به داخل گروه‌هاي رده‌بندي شده بوده و جامعیت داشته باشد (Mahadani and Ghosh, 2013). با توجه به نتایج بدست آمده پیشنهاد می‌گردد که از سایر بار کدها مانند rbcL، matKt، trnH-psbA استفاده شود کاربرد ترکیبی از بارکدهای در کنار هم نتایج مناسب‌تری را نمایان خواهد کرد.

از طرفی تنوع درون وبین 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.


100%
KY509025 Moringa from Iran
MH153755 Moringa peregrina from Egypt
MH153756 Moringa peregrina from Egypt
MH153757 Moringa peregrina from Egypt
MH153758 Moringa peregrina from Egypt
MH153759 Moringa peregrina from Egypt
MH153760 Moringa peregrina from Egypt
MH153761 Moringa peregrina from Egypt
MH153762 Moringa peregrina from Egypt
MH153763 Moringa peregrina from Egypt
MH153764 Moringa peregrina from Egypt
100%
MH153765 Moringa peregrina from Egypt
MH153766 Moringa peregrina from Egypt
MH153767 Moringa peregrina from Egypt
MH153768 Moringa peregrina from Egypt
MH153770 Moringa peregrina from Egypt
MH153771 Moringa peregrina from Egypt
100%
MH153772 Moringa peregrina from Egypt
MH153774 Moringa peregrina from Egypt
MH153775 Moringa peregrina from Egypt
MH153776 Moringa peregrina from Egypt
MH153777 Moringa peregrina from Egypt
MH153778 Moringa peregrina from Egypt
KT737755 Moringa oleifera from India
100%
KT737745 Moringa oleifera from India
JX092073 Moringa rivae from Kenya
100%
JX092070 Moringa ovalifolia from Namibia
100%
JX092068 Moringa hildebrandtii from Madagascar
100%
JX092067 Moringa drouhardii from Madagascar
0.0100

منابع

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.، ون‌دیلیل، 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 تهاجمی. 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 nuclearribosomal DNA-A valuable source of evidence on Angiospermphylogeny. Annals of the Missouri Botanical Garden. Missouri Botaical 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-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 *ITS*2. 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

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 phylogenic 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 ImperialFritillaria imperialis by Great TitsParus major. für Ornithologie,136, 207-212.

Poczai, P., Hyvonen, J.(2010). Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics:problems and prospects.Mulecular Reports 37:1897-1912.

Porter, C.H., Collins, F.H. (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 45:271.

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.

Journal of Medicinal Plants Biotechnology

Vol 5, No 2, Autumn & Winter 2020

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

Sajedeh Balochi[1], Nafiseh Mahdinezhad[*2], Baratali Fakheri[3]

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, Desh, Madhadi village, Nesfaran, Condar, Tang Fanvjh 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 Balochistan'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 Balochistan 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, Departement of Plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol. Iran.
[2] Assistant Professor, Departement of Plant Breeding and Biotechnology, University of Zabol. Iran. *Corresponding Author: nmahdinezhad52@gmail.com nmahdinezhad@uoz.ac.ir
[3] Professor, Departement of Plant Breeding and Biotechnology , University of Zabol. Iran.