

تحلیل و بررسی فیلوژنتیکی برخی ژنوتیپ‌های گیاه لوف (Luffa cylindrica) بر اساس توالی ناحیه بین ژنی trnH-psbA

حلیمه اربابی^۱، مجتبی کیخاسابر^{۲*}، لیلا فهمیده^۳ و ولی‌الله قاسمی عمران^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه اصلاح‌نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل

۲- استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل

۳- دانشیار، گروه اصلاح‌نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان

۴- استادیار، پژوهشکده ژنتیک و بیوتکنولوژی طب‌رستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۱۶)

چکیده

لوف با نام علمی *Luffa cylindrica* گیاهی از خانواده کدویان است که بیشتر در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری جهان از جمله در اکثر مناطق ایران رشد می‌کند. در این تحقیق تنوع ژنتیکی ۹ ژنوتیپ بومی و غیربومی *L. cylindrica* از طریق ارزیابی ناحیه بین ژنی trnH-psbA (*IGS*) کلروپلاستی مورد بررسی قرار گرفت. پس از نمونه‌برداری از برگ‌های جوان، استخراج DNA به روش دلاپورتا و PCR با استفاده از آغازگرهای ناحیه بین ژنی *IGS* انجام شد. محصولات تکثیر شده پس از تعیین توالی، با استفاده از نرم‌افزار Chromas تعیین کیفیت شده و سپس با برنامه ClustalW توسط نرم‌افزارهای BioEdit و MEGA7 هم‌ردیف‌سازی شدند. در ادامه نمودار درختی روابط فیلوژنی و ماتریس تفاوت و تشابه توالی‌ها تعیین و ترسیم شدند. در تحقیق حاضر با بررسی قرابت‌ها با استفاده از نشانگر trnH-psbA (*IGS*) در میان نمونه‌های مورد مطالعه، تنوع شدید درون‌گونه‌ای در *L. cylindrica* بومی و غیربومی مشاهده شد. ماتریس فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های بررسی شده در این تحقیق از صفر تا ۶/۸۶۵ با میانگین کلی فاصله ۲/۵۳ بود. مقدار متوسط جایگزینی‌های مترادف و غیرمترادف (dN/dS) برای توالی *IGS* $ds/dn = 0/68$ بود که نشان دهنده گزینش‌های مثبت و خالص در روند انتخاب طبیعی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه می‌باشد. تاکنون هیچ مطالعه‌ای در خصوص بررسی مولکولی و شناسایی ژنوتیپ‌های بومی مختلف گیاه لوف در ایران و مطالعات فیلوژنتیکی این ژنوتیپ‌ها صورت نگرفته است. در این تحقیق از نشانگر trnH-psbA (*IGS*) استفاده شد تا تنوع موجود در برخی از ژنوتیپ‌های لوفای بومی و غیربومی بررسی و فاصله ژنتیکی آن‌ها تعیین شود. نتایج این تحقیق نشان داد که بر اساس درخت فیلوژنی و بررسی فواصل ژنتیکی با کمک نشانگر trnH-psbA تنوع درون‌گونه‌ای این گونه گیاهی به‌خوبی قابل ارزیابی می‌باشد.

واژگان کلیدی: تنوع ژنتیکی درون‌گونه‌ای، نشانگر کلروپلاستی، DNA بارکدینگ

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: mkeikhasaber@uoz.ac.ir

کدو اسفنجی یا لوفّا با نام علمی (*Syn. Luffa aegyptiaca*) (*Cucurbitaceae*) گیاهی از خانواده کدوئیان است که عمدتاً در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری می‌روید. این گیاه در برخی از کشورها مانند چین، مالزی، هند، تایلند، آمریکای مرکزی و آفریقا به‌صورت تجاری کشت می‌شود (Oboh and Aluyor, 2009). میوه نرم این گیاه قبل از رسیدگی کامل به‌عنوان محصول خوراکی استفاده می‌شود که به‌راحتی قابل‌هضم بوده و اشتهاآور است (Okusanya et al., 1981). علاوه بر مصرف خوراکی، میوه رسیده و خشک آن شامل یک پوسته سخت در اطراف و یک شبکه سخت و متراکم سلولزی (اسفنج) است که منبع خوبی از فیبر مورد استفاده در صنعت به‌عنوان فیلتر و تمیز کردن موتور وسایل نقلیه، شیشه، ظروف آشپزخانه، حمام و شست و شوی بدن است (Shah et al., 1980; Oboh and Aluyor, 2009; Akinyinka et al., 2022).

ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود بین ژنوتیپ‌های مختلف یک گونه گیاهی برای اصلاح و حفظ منابع ژنتیکی ضروری است و در انتخاب والدین برای پرورش هیبریدها بسیار مهم است (Talebi et al., 2008; Asghari Mirak et al., 2022; Gholipour et al., 2021). رهیافت مولکولی کدگذاری DNA به‌عنوان یک روش سریع و عملی برای شناسایی موجودات در سطح گونه‌ها ابتدا توسط هبرت و همکاران (Hebert et al., 2003) معرفی شد و سپس استفاده از آن در جوامع علمی سراسر جهان توسعه پیدا کرد (Schindel and Miller, 2005; Miller, 2007). از این فن تاکنون در مطالعات متعددی جهت شناسایی و سنجش تنوع ژنتیکی در حیوانات، گیاهان و قارچ‌ها استفاده شده است (Hajibabaei et al., 2006; Kress et al., 2005; Seifert et al., 2007; Min and Hickey, 2007; Ross et al., 2008). تعیین یک ناحیه استاندارد DNA به‌عنوان بارکد از پیش شرط‌های اساسی در استفاده از فن کدگذاری DNA است. بر همین اساس در گیاهان هفت ناحیه مختلف از DNA هسته‌ای (ITS و ITS2) و کلروپلاستی (*rbcL*) از *trnH-psbA*، *matK*، *rpoC1* و *rpoB* به‌عنوان بارکد پیشنهاد شده است (Pang et al., 2012). ناحیه بین‌ژنی *trnH-psbA*

که اولین بار در سال ۲۰۰۵ توسط کرس و همکاران (Kress et al., 2005) معرفی شد در بین تمامی گیاهان عالی تغییرپذیری نسبتاً مناسبی دارد و به‌دلیل طول نسبتاً کوتاهی که دارد، در اکثر موارد به‌راحتی قابل تکثیر است (Maheswaran, 2004; Bolson et al., 2015). حسین‌زاده کلاگر و همکاران (Hosseinzadeh Colagar et al., 2013) جایگاه تاکسونومیک شاه‌بلوط شمال ایران را با استفاده از نشانگرهای مولکولی *psbA* و ناحیه بین‌ژنی *trnH-psbA* مورد بررسی قرار دادند که نتایج آن حاکی از این موضوع بود که فن DNA بارکدینگ مبتنی بر نشانگرهای *trnH-psbA* و *psbA* روشی آسان و سریع برای شناسایی جایگاه تاکسونومیک شاه‌بلوط‌های شمال ایران می‌باشد. همچنین شیرزایی و همکاران (Shirzaie et al., 2021) در مطالعه‌ای تنوع ژنتیکی درون‌گونه‌ای ۳۰ ژنوتیپ انبه از برخی مناطق کرمان و هرمزگان را از طریق ارزیابی ناحیه بین‌ژنی *trnH-psbA* کلروپلاستی مورد بررسی قرار دادند و نتایج آن‌ها نشان داد که استفاده از ناحیه بین‌ژنی *trnH-psbA* برای مطالعه و شناخت تنوع و روابط درون‌گونه‌ای انبه مفید بوده است.

گیاه لوفّا اگرچه در اکثر مناطق ایران می‌روید، اما در زمینه بررسی روابط خویشاوندی بین ژنوتیپ‌های مختلف لوفّا تعیین میزان قرابت و نزدیکی آن‌ها با یکدیگر و نیز با سایر ژنوتیپ غیربومی اقدامی صورت نگرفته است. در این پژوهش تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های لوفّا بومی و غیربومی از طریق ارزیابی ناحیه بین‌ژنی *trnH-psbA* کلروپلاست مورد بررسی قرار گرفت. هدف از این پژوهش تعیین فاصله ژنتیکی و ترسیم درخت فیلوژنتیکی ژنوتیپ‌های لوفّا مورد بررسی بر اساس توالی ناحیه بین‌ژنی *trnH-psbA* بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های گیاهی: ژنوتیپ‌های بومی مورد استفاده در این تحقیق از نقاط مختلف ایران (مازندران، کرمان و سیستان و بلوچستان) و ژنوتیپ‌های غیربومی از چین، برزیل و افغانستان تهیه شدند (شرکت نسیم، قم، ایران). مشخصات این ژنوتیپ‌ها در جدول ۱ آمده است. بذرها در اسفند ۱۳۹۸ در گلخانه‌ای به وسعت ۵۰۰ مترمربع در پژوهشکده کشاورزی دانشگاه زابل کشت شدند. قبل از کشت خاک گلخانه با افزودن کود دامی

DNA، از ژل آگارز ۱ درصد و دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Unico USA UV-2100 جهت تعیین کمیت و کیفیت نمونه DNA استخراجی استفاده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR): جهت انجام واکنش PCR از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده از روی ناحیه بین‌ژنی trnH-psbA (جدول ۲) استفاده شد. به این منظور از دستگاه Eppendorf (22331 Humburg) طبق برنامه حرارتی و زمانی مطابق جدول ۳ استفاده شد. از ژل رد (Sambio انگلیس) جهت رنگ‌آمیزی محصولات PCR روی ژل آگارز ۱ درصد استفاده و از دستگاه ژل‌داک (vilber lourmat E- Box- VX2- 20m) جهت نمایان شدن باندها و عکس‌برداری استفاده شد.

آماده شد. بذرها به فاصله یک متر از هم روی پشته‌ها در گلخانه کشت شدند. جهت آبیاری از آبیاری قطره‌ای با دوره آبیاری ۳ ساعت در روز استفاده شد. در طول مدت رشد، هفته‌ای یک‌بار از کود KPN20 هر بار به میزان حدود ۲ کیلوگرم محلول با آب آبیاری جهت تقویت گیاهان استفاده شد. پس از نمونه‌برداری از برگ‌های جوان، نمونه‌های جمع‌آوری شده به‌صورت جداگانه در پلاستیک‌های مخصوص بسته‌بندی قرار داده شدند و تا زمان استخراج DNA در فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی دانشگاه زابل نگهداری شدند.

استخراج و ارزیابی DNA: از روش دلاپورتا و همکاران (Dellaporta et al., 1993) جهت استخراج DNA از برگ‌های جوان گیاه لوفا استفاده شد. پس از استخراج

جدول ۱- مشخصات ژنوتیپ‌های لوفا مورد مطالعه

Table 1. Characteristics of luffa genotypes used in this study

شماره ژنوتیپ Genotype number	نام فارسی Persian name	علامت اختصاری Symbol	منطقه جغرافیایی Geographical region
1	شمالی بذرسياه Northern black seed	Si	مازندران Mazandaran
2	شیاردار Angled	He	کرمان Kerman
3	شمالی بذرسفید Northern white seed	Se	مازندران Mazandaran
4	افغانی Afghani	Af	افغانستان Afghanistan
5	اسپانیایی Spanish	Es	اسپانیا Spain
6	توری Touri	Tu	سیستان و بلوچستان Sistan and Baluchistan
7	لانگ لوفاف Long luffa	Lc	چین China
8	شمالی بزرگ Northern large	Gh	مازندران Mazandaran
9	برزیلی Brazilian	Be	آمریکای لاتین Latin America

جدول ۲- توالی آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق برای تکثیر ناحیه IGS

Table 2. Primer sequences used in this study for amplification of IGS region

آغازگر Primer	توالی آغازگر Primer sequence	منبع Reference
psbA3_f	5'-GTTATGCATGAACGTAATGCTC-3'	Sang et al., 1997
trnHf_05	5'-CGCGCATGGTGGATTCCAAATCC-3'	Sang et al., 1997

جدول ۳- برنامه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با آغازگر IGS

Table 3. Polymerase Chain Reaction cycle using IGS primers

مرحله واکنش Reaction stage	چرخه Cycle	دما (سانتی‌گراد) Temperature (°C)	زمان Time
واسرشته‌سازی اولیه (Pre-denaturation)	1	94	6 min
واسرشته‌سازی (Denaturation)	35	94	45s
اتصال آغازگر (Annealing)	35	61.3	45s
توسعه آغازگر (Extension)	35	72	50s
توسعه نهایی (Final extension)	1	72	15 min

پس از توالی‌یابی و ارزیابی کیفیت نتایج، میزان همولوژی نواحی تکثیر شده *trnH-psbA* با یکدیگر و با توالی‌های ثبت شده در پایگاه داده NCBI مورد مقایسه قرار گرفتند. توالی‌ها همولوژی بالایی با یکدیگر و با توالی‌های گونه *L. cylindrica* موجود در بانک ژن داشتند. توالی نواحی تکثیر شده *trnH-psbA* ژنوتیپ‌های مورد بررسی در پایگاه داده NCBI ثبت گردید. در جدول ۴ مشخصات ثبت و شماره دسترسی توالی‌ها نشان داده شده است.

نتایج تجزیه و تحلیل توالی‌های مورد مطالعه به کمک نرم‌افزار DNAsp نشان داد در مجموع ۴ سینگلتون در جایگاه‌های ۲۹۲، ۲۹۳، ۳۰۱ و ۳۰۳ و یک (PIS Parsimony Informative Sites) در جایگاه ۲۹۱ ناحیه تکثیر شده *IGS* شناسایی وجود دارد. از مجموع ۷۰۳ جایگاه، ۲۲۷ جایگاه دارای حذف و اضافه (۲۲۲ مونومورف و ۵ پلی‌مورف) و ۴۷۹ جایگاه بدون حذف و اضافه بودند. یک ناحیه حفاظت‌شده بین جایگاه ۳۰۳-۱۷۲ با ضریب حفاظتی ۰/۷۰ و میزان شباهت ۰/۹۹ با $P_value = 0$ در ناحیه تکثیر شده *trnH-psbA* شناسایی شد. در این جمعیت ۴ هاپلوتیپ (شاخص هاپلوتیپی ۰/۶۹) وجود داشت.

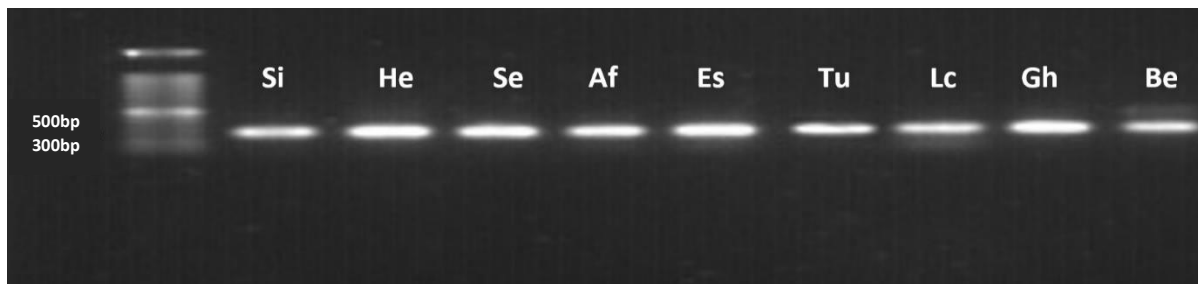
نتایج تجزیه و تحلیل جانشینی‌های نوکلئوتیدی با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 نشان داد که بر اساس مدل تامورا و نی (Tamura and Nei, 1993) بیش‌ترین جانشینی‌ها برای ناحیه توالی‌یابی شده *IGS* از نوع انتقالی (۲۲/۱ درصد) بوده و تنها ۷۷/۹ درصد جانشینی‌ها از نوع متقاطع می‌باشند (جدول ۵).

توالی‌یابی و تجزیه و تحلیل داده‌ها: محصول PCR برای انجام توالی‌یابی به شرکت فزپژوه ارسال و توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی خالص‌سازی و سپس توالی‌یابی ناحیه مورد نظر انجام شد. کیفیت توالی‌ها توسط نرم‌افزارهای Chromas و BioEdit بررسی شده و نتایج پس از هم‌ترازی و ویرایش در پایگاه داده NCBI ثبت گردید. پارامترهای ژنتیکی از قبیل تعداد جهش‌ها، تنوع نوکلئوتیدی، تعداد جایگاه‌های شامل جایگزینی و همچنین تنوع آن‌ها با کمک نرم‌افزارهای DNAsp (نسخه ۵) و MEGA7 ارزیابی شدند. همچنین به‌منظور ترسیم درخت فیلوژنی (با استفاده از روش UPGMA)، تعیین روابط خویشاوندی و فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها از نرم‌افزار MEGA7 استفاده شد.

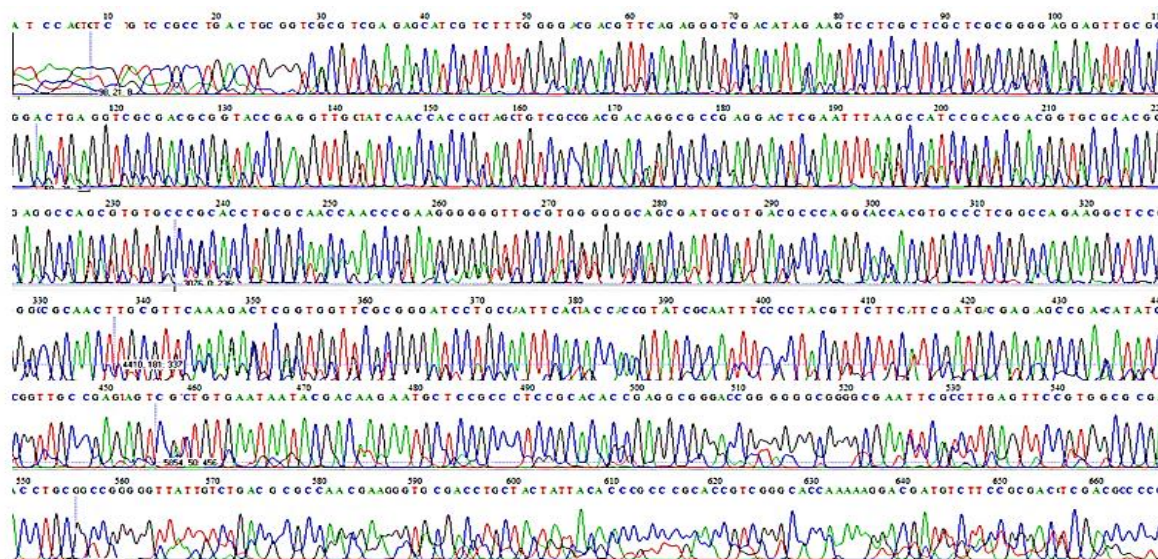
نتایج و بحث

تکثیر و توالی‌یابی: واکنش PCR با استفاده از DNA استخراج شده از نمونه‌های برگ لوف انجام گردید و محصولات بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شدند. با توجه به باندهای مشاهده شده بر روی ژل مشخص شد که آغازگرهای *trnH-psbA* قطعات حدود ۳۰۰bp را تکثیر کردند که با آنچه مورد انتظار بود مطابقت داشت (شکل ۱).

تجزیه و تحلیل توالی‌ها: کیفیت نتایج توالی‌یابی قطعات تکثیر شده با استفاده از نرم‌افزار BioEdit مورد بررسی قرار گرفت. کیفیت خوب گراف‌های توالی‌یابی همه نمونه‌ها بیانگر دقت بالا در تعیین توالی بود. در شکل ۲ گراف حاصل از نتایج توالی‌یابی ناحیه *IGS* مورد مطالعه در لوفای شپاردار به‌عنوان نمونه نشان داده شده است.



شکل ۱- محصولات PCR با آغازگرهای *IGS* برای ۹ ژنوتیپ لوفای مورد مطالعه
Figure 1. PCR products with *IGS* primers for 9 studied Luffa genotypes



شکل ۲- کرومोगرام حاصل از نتایج توالی‌یابی ناحیه *IGS* مورد مطالعه در لوفای شیاردار به‌عنوان نمونه
Figure 2. The chromogram results of *IGS* gene in angle luffa, as a sample

جدول ۴- مشخصات ثبت و شماره دسترسی نتایج توالی‌یابی قطعات تکثیر شده *IGS* در پایگاه داده NCBI

Table 4. Registration details and accession numbers of sequencing results of *IGS* amplified fragments in the NCBI database

شماره ژنوتیپ Genotype number	نام فارسی Persian name	کد شناسایی Identification code	شماره دسترسی Accession
1	شمالی بذر سیاه Northern black seed	Si	LC548423
2	شیاردار Angled	He	LC548424
3	شمالی بذر سفید Northern white seed	Se	LC548425
4	افغانی Afghani	Af	LC548426
5	اسپانیایی Spanish	Es	LC548427
6	توری Touri	Tu	LC548428
7	لانگ لوفای Long luffa	Lc	LC548429
8	شمالی بزرگ Northern large	Gh	LC548430
9	برزیلی Brazilian	Be	LC548431

همچنین تجزیه و تحلیل نسبت نوکلئوتیدهای مختلف به کل نوکلئوتیدها در ناحیه تکثیر شده *trnH-psbA* نشان داد که به طور میانگین نسبت تیمین ۲/۲۸، سیتوزین ۱۹، آدنین ۳/۳۶ و گوانین ۵/۱۶ درصد بود (جدول ۶).

نرخ جایگزینی‌ها: بررسی روند انتخاب طبیعی (*dN/dS*) برای ناحیه تکثیر شده *trnH-psbA* با استفاده از روش نی و گوجوبوری (Nei and Gojobori, 1986) و آمار ارتقاء یافته توسط اتا و نی (Ota and Nei, 1994) نشان داد علی‌رغم وجود جایگزینی‌های مترادف و غیرمترادف در بین جفت توالی‌ها، مقدار متوسط عددی این نسبت *dN/dS*، ۰/۶۸ بود. نرخ‌های جایگزینی‌های مترادف و

غیرمترادف بر اساس جفت توالی‌های هم‌تراز شده در جدول ۷ ارائه شده است.

مقایسه میان جفت نواحی: تجزیه و تحلیل فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های مورد بررسی با استفاده از مدل Maximum Composite Likelihood نشان داد که بر اساس توالی ناحیه تکثیر شده *trnH-psbA*، فاصله ژنتیکی در میان نمونه‌های بررسی شده از صفر تا ۶/۸۶۵ با میانگین کلی ۲/۵۳ بود. بیش‌ترین فاصله ژنتیکی (۶/۸۶۵) بین نمونه‌های توری (Tu3) و شمالی بزرگ از ایران (Gh3) و کم‌ترین فاصله ژنتیکی (۰) بین نمونه‌های شیاردار (He3) و شمالی بذرسپاه از ایران (Si3) بود (جدول ۸).

جدول ۵- جانشینی نوکلئوتیدی در ناحیه توالی‌یابی شده *IGS* به صورت میزان جانشین‌های نوع انتقالی و متقاطع محاسبه شده به کمک نرم‌افزار MEGA7. جانشین‌های انتقالی به صورت پررنگ شده مشخص شده‌اند.

Table 5. Nucleotide substitution in the sequenced region of *IGS* as the amount of transition and transversion substitutions calculated using MEGA7 software. Transitional substituents are marked in bold.

From\To	A	T/U	C	G
A	-	11.3	6.9	3.5
T/U	14.6	-	4	6.2
C	14.6	6.5	-	6.2
G	8.1	11.3	6.9	-

جدول ۶- نسبت نوکلئوتیدهای مختلف به کل نوکلئوتیدها در ناحیه توالی‌یابی شده *IGS* محاسبه شده به کمک نرم‌افزار MEGA7.

Table 6. The calculated ratio of different nucleotides to the total nucleotides in the *IGS* region using MEGA7 software.

ژنوتیپ Genotype	T(U)	C	A	G	مجموع Total
<i>IGS-Si3</i>	27.6	19.6	37.6	15.2	250.0
<i>IGS-He3</i>	28.4	18.8	36.8	16.0	250.0
<i>IGS-Se3</i>	27.5	20.2	36.8	15.4	247.0
<i>IGS-Af3</i>	28.0	20.0	35.6	16.4	250.0
<i>IGS-Es3</i>	28.8	19.6	36.4	15.2	250.0
<i>IGS-Tu3</i>	28.0	19.6	36.8	15.6	250.0
<i>IGS-Lc3</i>	27.6	20.0	37.2	15.2	250.0
<i>IGS-Gh3</i>	28.2	19.0	36.3	16.5	248.0
<i>IGS-Be3</i>	27.8	19.8	37.1	15.3	248.0
میانگین (Mean)	28.0	19.6	36.7	15.6	249.2

جدول ۷- محاسبه نرخ‌های جایگزینی‌های مترادف و غیرمترادف بر اساس توالی‌های هم‌تراز شده IGS

Table 7. Calculation of rates of synonymous and non-synonymous substitutions based on IGS aligned sequences

مقایسه	نام توالی	Sd*	Sn*	S*	N*	ps*	pn*	ds*	dn*	ds/dn*	ps/pn*
Compare	Sequence names										
0 1	IGS-Si3 IGS-He3	1.1667	5.8333	58.6667	190.3333	0.0199	0.0306	0.0202	0.0313	0.6441	0.6489
0 2	IGS-Si3 IGS-Se3	34.0000	133.0000	59.1667	186.8333	0.5746	0.7119	1.0900	2.2342	0.4879	0.8072
0 3	IGS-Si3 IGS-Af3	2.0000	11.0000	59.1667	189.8333	0.0338	0.0579	0.0346	0.0603	0.5735	0.5834
0 4	IGS-Si3 IGS-Es3	0.5000	4.5000	59.0000	190.0000	0.0085	0.0237	0.0085	0.0241	0.3541	0.3578
0 5	IGS-Si3 IGS-Tu3	1.1667	7.8333	58.5000	190.5000	0.0199	0.0411	0.0202	0.0423	0.4780	0.4850
0 6	IGS-Si3 IGS-Lc3	0.0000	1.0000	58.8333	190.1667	0.0000	0.0053	0.0000	0.0053	-	-
0 7	IGS-Si3 IGS-Gh3	35.3333	132.6667	57.1667	188.8333	0.6181	0.7026	1.3034	2.0704	0.6295	0.8797
0 8	IGS-Si3 IGS-Be3	35.8333	135.1667	54.6667	191.3333	0.6555	0.7064	1.5535	2.1346	0.7278	0.9279
1 2	IGS-He3 IGS-Se3	35.5000	134.5000	58.8333	187.1667	0.6034	0.7186	1.2243	2.3802	0.5144	0.8397
1 3	IGS-He3 IGS-Af3	3.3333	12.6667	58.8333	190.1667	0.0567	0.0666	0.0589	0.0698	0.8446	0.8506
1 4	IGS-He3 IGS-Es3	1.6667	10.3333	58.6667	190.3333	0.0284	0.0543	0.0290	0.0564	0.5139	0.5233
1 5	IGS-He3 IGS-Tu3	1.0000	1.0000	58.1667	190.8333	0.0172	0.0052	0.0174	0.0053	3.3074	3.2808
1 6	IGS-He3 IGS-Lc3	1.3333	6.6667	58.5000	190.5000	0.0228	0.0350	0.0231	0.0358	0.6458	0.6513
1 7	IGS-He3 IGS-Gh3	35.1667	133.8333	56.8333	189.1667	0.6188	0.7075	1.3073	2.1527	0.6073	0.8746
1 8	IGS-He3 IGS-Be3	37.1667	138.8333	54.3333	191.6667	0.6840	0.7243	1.8234	2.5316	0.7202	0.9444
2 3	IGS-Se3 IGS-Af3	34.1667	132.8333	59.0000	187.0000	0.5791	0.7103	1.1092	2.2048	0.5031	0.8152
2 4	IGS-Se3 IGS-Es3	35.0000	132.0000	59.1667	186.8333	0.5915	0.7065	1.1660	2.1357	0.5459	0.8373
2 5	IGS-Se3 IGS-Tu3	35.6667	135.3333	58.6667	187.3333	0.6080	0.7224	1.2479	2.4772	0.5038	0.8416
2 6	IGS-Se3 IGS-Lc3	34.5000	132.5000	59.0000	187.0000	0.5847	0.7086	1.1344	2.1718	0.5224	0.8253
2 7	IGS-Se3 IGS-Gh3	5.8333	27.1667	57.6667	188.3333	0.1012	0.1442	0.1087	0.1602	0.6783	0.7013
2 8	IGS-Se3 IGS-Be3	39.3333	136.6667	55.1667	190.8333	0.7130	0.7162	2.2567	2.3238	0.9711	0.9956
3 4	IGS-Af3 IGS-Es3	2.0000	15.0000	59.1667	189.8333	0.0338	0.0790	0.0346	0.0835	0.4142	0.4278
3 5	IGS-Af3 IGS-Tu3	2.1667	13.8333	58.6667	190.3333	0.0369	0.0727	0.0379	0.0764	0.4954	0.5081
3 6	IGS-Af3 IGS-Lc3	1.5000	10.5000	59.0000	190.0000	0.0254	0.0553	0.0259	0.0574	0.4506	0.4600
3 7	IGS-Af3 IGS-Gh3	36.1667	132.8333	57.0000	189.0000	0.6345	0.7028	1.4031	2.0746	0.6763	0.9028
3 8	IGS-Af3 IGS-Be3	35.3333	132.6667	54.5000	191.5000	0.6483	0.6928	1.4987	1.9298	0.7766	0.9358
4 5	IGS-Es3 IGS-Tu3	1.6667	10.3333	58.5000	190.5000	0.0285	0.0542	0.0290	0.0563	0.5159	0.5252
4 6	IGS-Es3 IGS-Lc3	0.5000	5.5000	58.8333	190.1667	0.0085	0.0289	0.0085	0.0295	0.2898	0.2938
4 7	IGS-Es3 IGS-Gh3	34.8333	134.1667	57.1667	188.8333	0.6093	0.7105	1.2552	2.2079	0.5685	0.8576
4 8	IGS-Es3 IGS-Be3	35.3333	136.6667	54.6667	191.3333	0.6463	0.7143	1.4842	2.2834	0.6500	0.9049
5 6	IGS-Tu3 IGS-Lc3	0.6667	7.3333	58.3333	190.6667	0.0114	0.0385	0.0115	0.0395	0.2917	0.2971
5 7	IGS-Tu3 IGS-Gh3	35.1667	133.8333	56.6667	189.3333	0.6206	0.7069	1.3178	2.1418	0.6153	0.8779
5 8	IGS-Tu3 IGS-Be3	36.0000	139.0000	54.1667	191.8333	0.6646	0.7246	1.6297	2.5386	0.6420	0.9172
6 7	IGS-Lc3 IGS-Gh3	35.8333	132.1667	57.0000	189.0000	0.6287	0.6993	1.3661	2.0205	0.6761	0.8990
6 8	IGS-Lc3 IGS-Be3	35.3333	134.6667	54.5000	191.5000	0.6483	0.7032	1.4987	2.0810	0.7202	0.9219
7 8	IGS-Gh3 IGS-Be3	34.6667	120.3333	53.1667	192.8333	0.6520	0.6240	1.5266	1.3380	1.1410	1.0449

*Sd: تعداد تفاوت‌های مترادف بین توالی‌ها؛ Sn: تعداد تفاوت‌های غیرمترادف بین توالی‌ها؛ S: تعداد جایگاه‌های مترادف؛ N: تعداد جایگاه‌های

غیرمترادف؛ ps: چندشکلی مترادف؛ pn: چندشکلی غیرمترادف؛ ds: نرخ جایگزینی مترادف؛ dn: نرخ جایگزینی غیرمترادف؛ ds/dn: نسبت نرخ

جایگزینی‌های مترادف به غیرمترادف؛ ps/pn: نرخ چندشکلی‌های مترادف به غیرمترادف

*Sd: Numbers of synonymous differences; Sn: Numbers of nonsynonymous differences; S: Numbers of synonymous sites; N: Numbers of nonsynonymous sites; ps: Synonymous polymorphism; pn: Nonsynonymous polymorphism; ds:

Synonymous substitutions rate; dn: Nonsynonymous substitutions rate; ds/dn: The ratio of the synonymous codon-substitution rate to that for nonsynonymous codons; ps/pn: The rates of synonymous and nonsynonymous polymorphism

جدول ۸- فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌های لوفای مورد مطالعه با توجه به توالی نشانگر IGS

Table. Genetic distance of luffa genotypes according to IGS marker sequence.

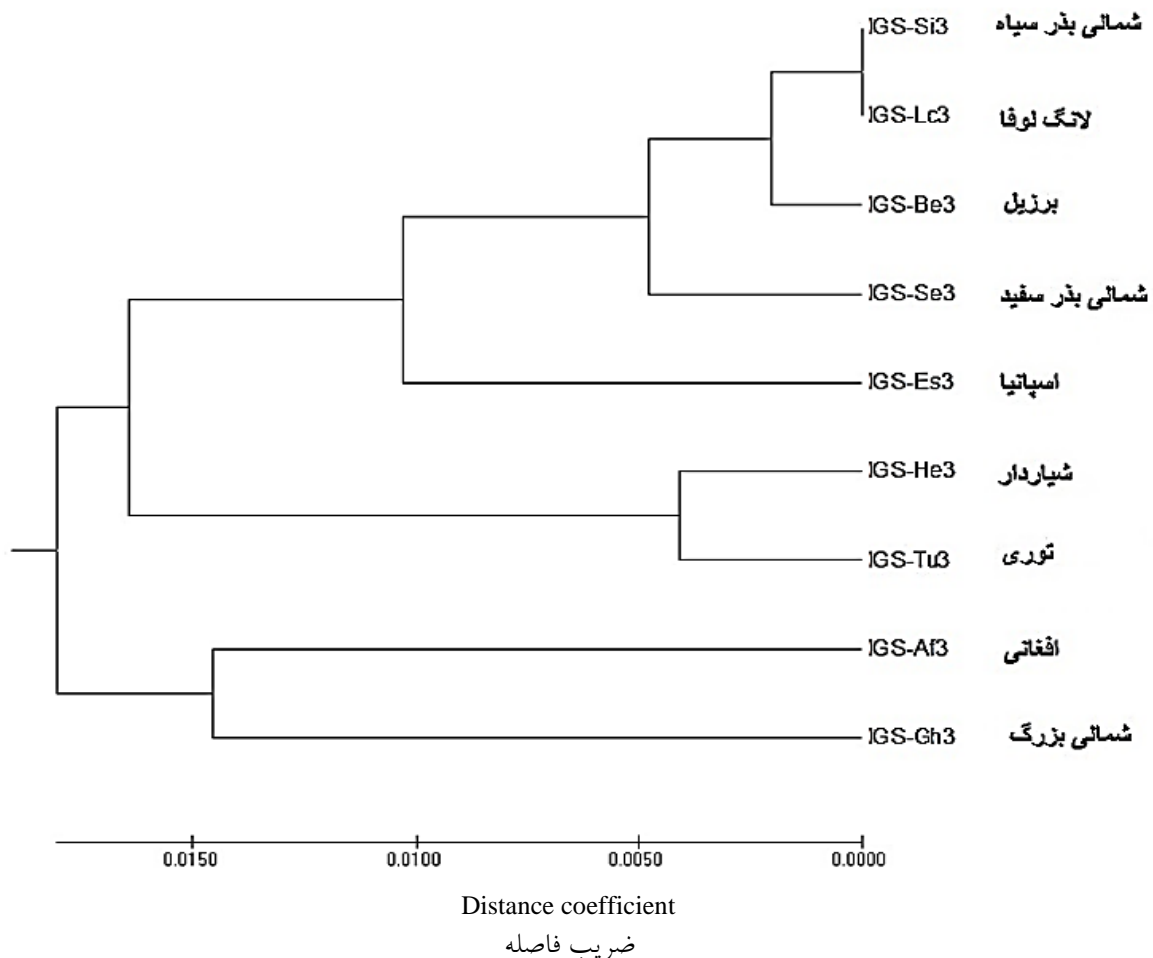
کد ژنوتیپ	Si3	He3	Se3	Af3	Es3	Tu3	Lc3	Gh3
Genotype code								
Si3								
He3	0.000							
Se3	0.004	0.004						
Af3	5.400	5.400	5.400					
Es3	0.014	0.014	0.009	5.353				
Tu3	6.759	6.759	6.759	5.213	6.756			
Lc3	0.000	0.000	0.004	5.400	0.014	6.759		
Gh3	0.130	0.130	0.137	5.210	0.137	6.865	0.130	
Be3	0.000	0.000	0.004	5.400	0.014	6.759	0.000	0.130

شاه‌بلوط شمال ایران و بررسی تنوع ژنتیکی ۳۰ ژنوتیپ انبه ایران استفاده کرده بودند هم‌خوانی داشت.

چاپلاق پریدری و همکاران (Chapolagh Paridari *et al.*, 2012) به‌منظور تعیین روابط فیلوژنتیکی جنس ممرز (Carpinus) در ایران از دو آغازگر هسته‌ای (ITS) و کلروپلاستی (trnH-psbA) استفاده کردند که بر اساس این مطالعه گونه‌های مختلف این جنس را در دو خوشه جداگانه دسته‌بندی کردند. حاجی احمدی و همکاران (Haji Ahmadi *et al.*, 2013) از چهار بارکد ITS, rbcL, matk و trnH-psbA برای بررسی تنوع درون و برون گونه‌ای سه خانواده Myrtaceae, Punicaceae, Lythraceae استفاده کردند. نتایج نشان داد که ناحیه psbA-trnH دارای اطلاعات فیلوژنتیک کافی برای تعیین روابط درون‌گونه‌ای انار است (Haji Ahmadi *et al.*, 2013). قهرمان‌زاده و همکاران (Ghahramanzadeh *et al.*, 2012) از نواحی بین‌ژنی هسته‌ای ITS1 و ITS2 و نواحی کلروپلاستی rbcL, matk و trnH-psbA برای تشخیص گونه‌های بومی و مهاجم در بین ۸۱ نمونه متعلق به ۱۳ گونه مختلف از جنس مریافیوم استفاده کردند. بر اساس نتایج، منطقه غیر کدکننده trnH-psbA و قسمتی از منطقه کدکننده rbcL به‌خاطر دارا بودن قابلیت تکثیر و تفکیک بالا در بین گونه‌های مورد بررسی مریافیوم، به‌عنوان بارکد ایده‌آل شناسایی شدند. ادوای (Advai, 2012) روابط خویشاوندی بین ۱۸ گونه موجود از جنس لاله واژگون (جنس *Fritillaria L.*) در ایران را با استفاده از توالی‌یابی ناحیه بین‌ژنی trnH-psbA و صفات ریخت‌شناسی مورد ارزیابی قرار دادند که نتایج آن نشان داد زیرجنس *Petilium* با زیرجنس *Theresia* و زیرجنس *Fritillaria* با زیرجنس *Rhinopetalum* از قرابت مورفولوژیکی و ژنتیکی برخوردار می‌باشند؛ بنابراین بر اساس نتایج حاصله از مطالعات مشابه (Fattahi Dehkordi *et al.*, 2021; Shirzaie *et al.*, 2022) و همچنین یافته‌های پژوهش حاضر می‌توان بیان نمود که نشانگر trnH-psbA می‌تواند به‌عنوان روشی آسان و سریع برای بررسی تنوع ژنتیکی و یا شناسایی جایگاه تاکسونومیک گیاهان ذکر شده مورد توجه قرار گیرد.

روابط فیلوژنتیکی: با استفاده از روش UPGMA و Maximum-likelihood method و بر اساس برش دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در چهار شاخه اصلی قرار گرفتند. در شاخه اول رقم شمالی بزرگ، در شاخه دوم رقم افغانی و در شاخه سوم ارقام شیاردار و توری قرار گرفتند. شاخه چهارم به دو زیرشاخه تقسیم شد که در زیرشاخه اول رقم اسپانیا و در زیرشاخه دوم ارقام شمالی بذرسیاه و رقم وارداتی لانگ لوفاء با فاصله ژنتیکی بیشتر نسبت به رقم برزیل و همچنین نسبت به رقم شمالی بذر سفید قرار گرفتند (شکل ۳).

بارکدهای DNA مناطق ژنومی محافظت شده‌ای هستند که به‌طور عمومی در ژنوم گروه‌های مختلف موجودات حضور دارند و تنوع توالی این نواحی میان گونه‌ها به شناسایی و طبقه‌بندی آن‌ها کمک می‌کند. جایگاه‌های ژنی متنوعی به‌عنوان بارکدهای DNA گیاهی پیشنهاد شده است که شامل نواحی کدکننده ژنی و غیرکدکننده بین و درون‌ژنی در ژنوم‌های هسته‌ای و پلاستییدی می‌باشند (Woese, 1987, Fox *et al.*, 1977, Kress, 2017, De Vere *et al.*, 2015). برای گیاهان گل‌دار مناطق بین‌ژنی غیرکدکننده پلاستییدی trnH-psbA (IGS) و ریوزومی ITS دو کاندید مناسب برای این هدف هستند. محدوده بین‌ژنی trnH-psbA یکی از متغیرترین مناطق در ژنوم کلروپلاست گیاهان گل‌دار است و یک ابزار محبوب برای ژنتیک جمعیت گیاه و فیلوژنتیک در سطح گونه است و به‌عنوان ابراز مناسب برای مطالعات بارکدینگ DNA پیشنهاد شده است (Bolson *et al.*, 2015). بر اساس نتایج تجزیه و تحلیل انجام شده در میان نمونه‌های بررسی شده با استفاده از نشانگر trnH-psbA، وجود تنوع درون‌گونه‌ای بالا در *L. cylindrica* بومی و غیربومی مشاهده شد که این امر نشان دهنده قابلیت نسبی این نشانگر در مطالعات ژنتیکی گیاه لوفاء می‌باشد. همچنین نتایج این پژوهش نشان داد که این بارکد قادر به تفکیک و دسته‌بندی ۹ رقم لوفای مورد استفاده در این تحقیق بود که با نتایج به‌دست آمده از مطالعات قبلی (Hosseinzadeh *et al.*, 2013; Shirzaie *et al.*, 2021) که از این بارکد DNA به‌ترتیب برای تشخیص جایگاه تاکسونومیک



شکل ۳- درخت روابط فیلوژنتیکی ارقام لوف، ترسیم شده به روش UPGMA بر اساس توالی ناحیه IGS مورد مطالعه

Figure 3. The phylogenetic relationships of luffa genotypes, drawn by the UPGMA method based on the sequence of the IGS region

مطابقت دارد. آن‌ها تنوع ژنتیکی ۳۰ ژنوتیپ انبه از کشور ایران را با استفاده از نشانگر *trnH-psbA* مورد بررسی قرار داده و گزارش کردند که ارتباطی بین فواصل ژنتیکی ژنوتیپ‌های انبه مورد آزمایش آن‌ها با مکان‌های جغرافیایی که نمونه‌ها از آنجا جمع‌آوری شده بودند وجود ندارد. تغییرات نوکلئوتیدی که سبب تغییر در اسیدهای آمینه می‌شوند (dN) نسبت به تغییراتی که بر اسیدهای آمینه بی‌تأثیر هستند (dS)، شاخصی مهم برای شناخت روند طبیعی در طول تکامل ژن‌ها محسوب می‌شوند که اگر مقدار آن کم‌تر از یک باشد بیانگر انتخاب خالص در طی تکامل ژن‌ها می‌باشد (Li et al., 2008). مقدار متوسط عددی جایگزینی‌های مترادف و غیرمترادف (dN/dS) برای توالی IGS $ds/dn = 0.68$ بود که نشان‌دهنده گزینش‌های مثبت و

ماتریس فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های بررسی شده در این تحقیق از صفر تا ۶/۸۶۵ با میانگین فاصله ۵۳/۲ بود. بررسی روابط فیلوژنتیکی و تنوع ژنتیکی در میان نمونه‌های بررسی شده با استفاده از نشانگر *trnH-psbA* نشان داد که تنوع ژنتیکی نمونه‌های لوف مورد بررسی در پژوهش حاضر از تنوع جغرافیایی آن‌ها تبعیت نمی‌کرد. به‌عنوان مثال بیش‌ترین فاصله ژنتیکی (۶/۸۶۵) بین نمونه‌های توری از سیستان و بلوچستان و شمالی بزرگ از مازندران و کم‌ترین فاصله ژنتیکی (۰) بین نمونه‌های شیاردار از کرمان و شمالی بذرسياه از مازندران بود. این در حالی است که ژنوتیپ‌های افغانی با شمالی بزرگ و نیز لانگ لوف و برزلی با شمالی بذر سیاه قرابت نزدیکی را نشان می‌دهند. این نتایج با نتایج پژوهش شیرزایی و همکاران (Shirzaie et al., 2021)

خالص در روند انتخاب طبیعی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه می‌باشد.

به‌طور کلی بررسی قرابت‌ها در میان نمونه‌های بررسی شده با استفاده از نشانگر (IGS) trnH-psbA در پژوهش حاضر نشان‌دهنده وجود تنوع درون‌گونه‌ای بالا در *L. cylindrica* بومی و غیربومی و همچنین قابلیت نسبی این نشانگر در مطالعات ژنتیکی گیاه لوفای بود. علاوه بر این روابط فیلوژنتیکی و تنوع ژنتیکی در میان نمونه‌های بررسی شده

در این تحقیق با استفاده از نشانگر (IGS) trnH-psbA نشان داد که تنوع ژنتیکی نمونه‌های لوفای مورد ارزیابی از تنوع جغرافیایی آن‌ها تبعیت نمی‌کند.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه زابل با شماره گرنت UOZ-GR-9618-129 انجام شده است. بدین‌وسیله از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه زابل جهت انجام تحقیق حاضر قدردانی می‌شود.

References

- Advai, M.** (2012). Studying the kinship relationships between inverted tulip species (*genus Fritillaria* L.) in Iran using the synonymy of the chloroplastic trnH-psbA intergenic region and morphological traits. M.Sc. Thesis, Shahrekord University, Shahrekord, Iran (In persian).
- Akinyinka Akinwumi, K., Olusoji Eleyowo, O. and Omowunmi Oladipo, O.** (2022). A review on the ethnobotanical uses, phytochemistry and pharmacological effect of *Luffa cylindrica*. *Natural Drugs from Plants*. doi: 10.5772/intechopen.98405.
- Asadi, F., Dezhsetan, S., Ghahramanzadeh, R., Razmjou, J., Alebrahim, M.T.** (2015). DNA barcoding of some medicinal plants. *Journal of Crop Biotechnology*, **4(10)**: 31-40 (In persian).
- Asghari Mirak, A., Alaviakia, S.S. and Mohammadi, S.A.** (2022). Investigating genetic diversity and relationships in some henbane (*Hyoscyamus* spp.) populations based on polymorphisms resulting from retrotransposon insertion. *Plant Genetic Researches*, **9(1)**: 117-134 (In Persian).
- Bolson, M., Smidt, E.C., Brotto, M.L. and Silva-Pereira, V.** (2015). ITS and trnH-psbA as efficient DNA barcodes to identify threatened commercial woody angiosperms from Southern Brazilian Atlantic rainforests. *PLoS ONE*, **10**: e0143049.
- Chapolagh Paridari, I., Jalali, G., Sonboli, A. and Zarafshar, M.** (2012). Revision of Iranian carpinus species using of molecular markers (nrDNA its and trnh-psba). *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, **20(1)**: 1-13 (In Persian).
- De Vere, N., Rich, T.C., Trinder, S.A. and Long, C.** (2015). DNA barcoding for plants. *Methods in Molecular Biology*, **1245**: 101-18.
- Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B.** (1993). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, **1**: 19-22.
- Fattahi Dehkordi, N., Ghaemi Ghehsareh, M., Shiran, B. and Siampoor, M.** (2022). Comparison of the Efficacy of Two Chloroplast DNA Marker (psbA-trnH and trnL-F) in Determining the Phylogenetic Relationships among Honeysuckle Species in Iran. *Iranian Journal of Horticultural Science and Technology*, **23(1)**: 1-12 (In Persian).
- Fox, G.E., Pechman, K.R. and Woese, C.R.** (1977). Comparative cataloging of 16 S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to procaryotic systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **27(1)**: 44-57.
- Ghahramanzadeh, R., Marashi, S.H., Van De Wiel, C., Malekzadeh, S., Shahriari, F. and Smulders, R.** (2012). Discrimination of the invasive plant species, *myriophyllum* spp., from native relatives using DNA barcoding. *Iranian Plant Protection Research*, **26(1)**: 101-109 (In Persian).
- Gholipour, A., Kazemitabar, S.K. and Sharifi Soltani, S.** (2021). Study of genetic diversity of wild and regenerated accessions of *Acorus calamus* (Acoraceae) by ISSR markers. *Plant Genetic Researches*, **7(2)**: 109-118 (In Persian).
- Haji Ahmadi, Z., Talebi, M. and Seyyed Tabatabai, B.E.** (2013). Determining pomegranate phylogeny using psbA-trnH, rbcL, matK and ITS plant barcodes. *12th Congress of Iranian Genetics Society*, Tehran, Iran (In Persian).

- Hajibabaei, M., Janzen, D.H., Burns, J.M., Hallwachs, W. and Hebert, P.D.N.** (2006). DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**: 968-971.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. and de Waard, J.R.** (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **270**: 313-322.
- Hosseinzadeh Colagar, A., Akbarzadeh Roshan, F. and Yousefzadeh, H.** (2013). Determination of taxonomic status of chestnut in northern Iran using psbA molecular markers and trnH-psbA intergenic region. *8th Biotechnology Conference of the Islamic Republic of Iran and 4th National Conference on Biosafety*, Tehran, Iran (In Persian).
- Kress, W.J.** (2017). Plant DNA barcodes: applications today and in the future. *Insect Systematics & Evolution*, **55**: 291-307.
- Kress, W.J., Wurdack, K.J., Zimmer, E.A., Weigt, L.A. and Janzen, D.H.** (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **102**: 8369-8374.
- Li, J., Bi, H., Li, Z. and Feng, J.** (2008). Genetic analysis of *Ziziphus Jujube* Huizao using ISSR markers. *1th International Jujube Symposium*, Baoding, China.
- Maheswaran, M.** (2004). Molecular markers: history, features and applications. *Advanced Biotechnology*, **51**: 373-8
- Miller, S.E.** (2007). DNA barcoding and the renaissance of taxonomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**: 4775-4776.
- Min, X.J. and Hickey, D.A.** (2007). Assessing the effect of varying sequence length on DNA barcoding of fungi. *Molecular Ecology Notes*, **7**: 365-373.
- Nei, M. and Gojobori, T.** (1986). Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Molecular Biology and Evolution*, **3(5)**: 418-426.
- Oboh, I. and Aluyor, E.** (2009). *Luffa cylindrical*-an emerging cash crop. *African Journal of Agricultural Research*, **4**: 684-688.
- Okusanya, O.T., Ola-Adams, B.A. and Bamidele, J.F.** (1981). Variations in size, leaf morphology, and fruit characters among 25 populations of *Luffa aegyptiaca*. *Canadian Journal of Botany*, **59(12)**: 2618-2627.
- Ota, T. and Nei, M.** (1994). Estimation of the number of amino acid substitutions per site when the substitution rate varies among sites. *Journal of Molecular Evolution*, **38**: 642-643.
- Pang, X., Luo, H. and Sun, C.** (2012). Assessing the potential of candidate DNA barcodes for identifying non-flowering seed plants. *Plant Biology*, **14**: 839-844.
- Ross, H.A., Murugan, S. and Li, W.L.S.** (2008). Testing the reliability of genetic methods of species identification via simulation. *Systematic Biology*, **57**: 216-230.
- Sang, T., Crawford, D.J. and Stuessy, T.F.** (1997). Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany*, **84**: 1120-1136.
- Schindel, D.E. and Miller, S.E.** (2005). DNA barcoding a useful tool for taxonomists. *Nature*, **435**: 17.
- Seifert, K.A., Samson, R.A., Dewaard, J.R., Houbraken, J., Lévesque, C.A., Moncalvo, J.M., Louis-Seize, G. and Hebert, P.D.** (2007). Prospects for fungus identification using CO1 DNA barcodes, with *Penicillium* as a test case. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104(10)**: 3901-3906.
- Shah, J.J., Thanki, Y.J. and Kothari, I.L.** (1980). Skeletal fibrous net in fruits of *Luffa cylindrical* M. Roem. and *Luffa acutangula* Roxb. In: Nagaraj, M. and Malik, C.P., Eds., *Current Trends in Botanical Research*, p. 61-72. Kalyani Publishers, New Delhi, IN.
- Shirzaie, A., Solouki, M. and Fahmideh L.** (2021). Molecular analysis of some mango genotypes in southern Iran based on trnH-psbA intergenic region. *Iranian Journal of Horticultural Science and Technology*, **22(4)**: 449-464 (In Persian).
- Talebi, R., Fayaz, R., Mardi, M., Pirsyedi, S.M. and Naji, A.M.** (2008). Genetic relationships among chickpea (*Cicer arietinum*) elite lines based on RAPD and agronomic markers. *International Journal of Agriculture and Biology*, **8**: 301-305.
- Tamura, K. and Nei, M.** (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, **10**: 512-526.
- Woese, C.R.** (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews*, **51**: 221-271.

Phylogenetic Analysis of Some Luffa Genotypes Based on the sequence of intergenic region of trnH-psbA

Halime Arbabi¹, Mojtaba Keykhasaber^{2,*}, Leila Fahmideh³ and Valiollah Ghasemi Omran⁴

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

2- Assistant Professor, Department of Plant Pathology, University of Zabol, Zabol, Iran

3- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

4- Assistant Professor, Genetic and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, University of Agriculture Science and Natural Resources, Sari, Iran

(Received: August 19, 2022 – Accepted: January 6, 2023)

Abstract

Luffa (Luffa cylindrica) is a plant from the *Cucurbitaceae* family that grows mostly in tropical and subtropical regions, as well as in most regions of Iran. In this research, the genetic diversity of nine native and non-native genotypes of *L. cylindrica* was investigated through the evaluation of the chloroplast trnH-psbA intergenic region (*IGS*). After sampling the young leaves, DNA extraction was performed by using the Dellaporta method, and PCR was conducted by using *IGS* intergenic region primers. After sequencing of the amplified products, their quality was determined using Chromas software and then aligned using ClustalW method by BioEdit and MEGA7 softwares. Next, the dendrogram of phylogenetic relationships was drawn and the matrix of the difference and similarity of the sequences were determined. In the present research, by analyzing the relationships between studied samples, based on the trnH-psbA (*IGS*) marker, a strong intraspecies variation was observed in native and non-native *L. cylindrical* genotypes. The genetic distance matrix between the samples examined in this research ranged from 0 to 6.865 with an overall average distance of 2.53. The average value of synonymous and non-synonymous substitutions (dN/dS) for the *IGS* sequence was $ds/dn = 0.68$, which indicates positive and pure line selections in the process of natural selection of studied genotypes. The results of this research showed that trnH-psbA is a suitable marker for evaluation of the intraspecific diversity of luffa species.

Keywords: Intraspecies genetic diversity, Chloroplast marker, DNA barcoding

* Corresponding Author, E-mail: mkeikhasaber@uoz.ac.ir