دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

بررسی تنوع مولکولی نواحی فاصله‌انداز رونویسی‌شونده داخلی (ITS1,4) در برخی ژنوتیپ‌های کاهو

زهرا جمعه قاسم آبادی[۱]، براتعلی فاخری[۲] و بهمن فاضلی‌نسب[۳]

۱ و ۲- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد و استاد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل
۳- عضو هیئت‌علمی گروه پژوهشی زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، (نویسنده مسوول: Bfazeli@uoz.ac.ir)
تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۳۱ تاریخ پذیرش: ۹۷/۶/۳
صفحه: ۲۹ تا ۳۹

چکیده

کاهو از خانواده کاسنیان، برگی، سرمادوست یک‌ساله، غنی از مواد معدنی، ویتامین‌ها و مواد مغذی است. هدف تحقیق حاضر ارزیابی تنوع ژنتیکی ۱۵ رقم و جمعیت کاهو با استفاده از ناحیه ITS بود. کیفیت توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Chromas 2.1.1 بررسی و سپس با روش ClustalW توسط نرم‌افزار MegAlign 5 هم‌ردیف سازی شده و دندروگرام روابط تبارزایی و ماتریس تفاوت و تشابه توالی‌ها ترسیم گردیدند. همچنین مقایسه‌ای بین کاهوهای مورد استفاده در این تحقیق و سایر گیاهان جنس‌های مختلف خانواده کاسنیان (ارائه‌شده در سایت NCBI) صورت گرفت. مقدار عددی نسبت (dN\dS) برابر ۰/۰۱۵ بود که نشان‌دهنده انتخاب خالص بر ژن مورد بررسی بوده و باعث تغییرات کلیدی نشده است. تجزیه خوشه‌ای، ژنوتیپ‌های مختلف کاهو را در ۳ گروه تقسیم و نتوانست بر اساس موقعیت جغرافیایی از هم تفکیک کند؛ اما توانست کاهوهای این تحقیق و سایر گیاهان جنس‌های مختلف خانواده کاسنیان را از هم تفکیک کند. لذا می‌توان نتیجه گرفت که ITS می‌تواند ابزاری مناسب جهت ارزیابی‌های ژنتیکی بین‌گونه‌ای و بین جنسی باشد. کمتر از یک بودن عدد dN\dS و تعداد کم جایگاه‌های حذف و اضافه (از ۱۵۵۱ جایگاه، ۳۷۶) نشان‌دهنده تغییرات کم بین لاین‌های مختلف بوده لذا شاید عدم توانایی ITS در تفکیک درون گونه‌ای جمعیت‌ها به همین دلیل باشد. با توجه به اینکه منشأ یا خواستگاه اولیه گیاهان متعلق به مراکزی است که بیشترین تنوع را دارند و چون جمعیت‌های کاهو ورزنه اصفهان دارای بیشترین تنوع بودند در نتیجه ضرورت دارد در جمع‌آوری ژرم‌پلاسم‌های کاهو جهت بهره‌برداری‌های اصلاح نژادی به منطقه ورزنه اصفهان توجه بیشتری شود.

واژه‌های کلیدی: کاهو، تنوع ژنتیکی، ITS، dN/dS

مقدمه

کاهو (*Lactuca sativa L.*) گیاهی برگی، سرمادوست، یک‌ساله و خودگشن از خانواده کاسنیان هست (۱۸) که بومی آسیا و به‌احتمال زیاد ایران و ترکمنستان است (۳۰). مرکز پیدایش و تنوع در جنوب غرب آسیا و نواحی مدیترانه است (۲۸،۱۱). جنس *Lactuca* از لحاظ ویژگی‌های مورفولوژی (ویژگی‌های سر و تغییر شکل برگ) دارای ۶ تیپ و بیش از ۱۰۰ گونه و ارقام بسیار زیادی در مناطق مختلف جهان است (۳۱،۷،۳۶). سطح زیر کشت کاهو در جهان حدود ۱/۷ میلیون هکتار بوده و غنی از مواد معدنی، ویتامین‌ها و مواد مغذی است (۱). از دغدغه‌های متخصصان سیستماتیک گیاهی در شناسایی گونه‌های گیاهی، روبه کاهش بودن تنوع زیستی، وقوع دورگ‌ها و مضاعف شدگی کروموزومی و از طرف دیگر دستیابی به روشی سریع و دقیق و ارزان است (۸،۲۵،۲۶). ازاین‌رو برخی از محققان بهترین وسیله برای تشخیص گونه‌های درختی را استفاده از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA می‌دانند (۶). در سال‌های اخیر یکی از نشانگرهای مولکولی که در پژوهش‌های فیلوژنتیکی و فن DNA بارکدینگ کاربرد بسیاری پیدا کرده است، ناحیه فاصله انداز رونویسی شونده داخلی[۱] (ITS) بوده که این ناحیه در کنار ژن‌های ریبوزومی قرار دارد (۳۹،۲۲). ژن‌های ریبوزومی هسته‌ای در دو گروه ۱۸s(زیر واحد کوچک ریبوزوم) و۵/۸s و۲۸s(زیر واحد بزرگ ریبوزوم) قرار می‌گیرند. فاصله بین این نواحی را دو ناحیه فاصله انداز داخلی (ITS2 وITS1) و یک قطعه ۵/۸s پر کرده است (۹). نواحی کد کننده مانند ۱۸s و ۲۸s که به‌شدت محافظت شده‌اند برای بررسی در سطح خانواده و بالاتر مفید هستند (۲۰،۴۰). بنابراین برای مقایسه گونه‌ها و جنس‌های بسیار نزدیک و همچنین بررسی‌های تبارزایی (فیلوژنی) مناسب هستند (۲۰،۴۰). نشانگر مولکولی ITS، بیش از ۱۰ سال است که در مطالعات فیلوژنتیک کاربرد دارند (۳۴). در تحقیقی (۲۷) با استفاده از توالی ITS، طبقه‌بندی *Lactuca.s* L در جنس کاهو را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داده که توالی ITS1 طولانی‌تر و متغیرتر از توالی ITS2 بود؛ بنابراین توالی ITS1 مناسب‌تر بود و برای آنالیزهای تبار زایی مورد استفاده قرار گرفت. نتایج بررسی‌های صورت گرفته نشان داد که گونه‌های *L. sativa*، *L. serriola*، *L. dregeana* و *L. altaica* دارای توالی‌های مشابهی بودند ولی توالی گونه *L. aculeata* تفاوت اندکی داشت و همچنین بررسی شد که تنوع درون گونه‌ای در مقایسه با تنوع بین‌گونه‌ای کمتر بود. همچنین در پژوهشی دیگر از طریق توالی‌یابی نواحی ITS، تنوع درون گروهی *Erysiphe aquilegia* (۱۰) و همچنین تنوع گونه‌های جنس Fasciolidae (۳) مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد ITS توانایی جدا کردن زیرگونه‌ها را از یکدیگر دارا است. از آنجایی که هدف از تحقیق حاضر شناسایی متنوع‌ترین رقم کاهو بوده تا در اصلاح کاهو بتوان از آن به‌عنوان دهنده ژن و یا یکی پایه‌های اصلی اصلاح، استفاده کرد در نتیجه در تحقیقات مختلفی، جمعیت‌های مورد مطالعه در این تحقیق بر اساس صفات مورفولوژی و فیزیولوژی مورد بررسی قرار داده (۴۸) و چون ثابت شده است

1- Internal transcribed spacer

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-11-19]
[DOI: 10.29252/jcb.11.29.29]

که نشانگر ITS در رده‌بندی گونه‌های گیاهی (۱۵)، مطالعه ۱۱۴ نمونه از تیره بقولات بومی کشور چین (شامل ۸۵ گونه از ۴۱ جنس مختلف) (۱۹)، شناسایی ۲۴۳۱ گونه از ۶۱ گیاه دارویی بومی چین (۳۳) و ارزیابی ۵۱ گونه متعلق به ۱۹ جنس مختلف از گیاهان دارویی (۴۲) مورد تأیید قرار گرفته است لذا سعی شد جمعیت‌های مختلف کاهو در تحقیق حاضر از لحاظ ژنتیکی بر اساس نشانگر ITS مورد ارزیابی قرار گیرند.

مواد و روش‌ها

جهت انجام مطالعات مولکولی جمعیت‌های کاهو تعداد ۱۵ نمونه (جدول ۱) از مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی اصفهان و شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه، در آزمایشگاه گیاه‌شناسی دانشگاه زابل مورد شناسایی قرار گرفته و نهایت برگ نمونه‌ها جمع‌آوری شده، بعد از کاشت و رسیدن به مرحله چند برگی برداشت و بلافاصله به یخ‌زن ۷۰- در آزمایشگاه ژنتیک واقع در پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه زابل منتقل شده و مورد آزمایش قرار گرفتند.

جدول ۱- مشخصات ارقام و جمعیت‌های کاهو مورد استفاده در این تحقیق

Table 1. Lettuce cultivars and population properties were used in this research

Accession Number	نام ژنوتیپ (genotype Name)	ژنوتیپ (Genotype)
KY946000	Lechuga Reina de mayo(lettuca May Queen)	1
KY945999	کاهوی سالادی فردوس (Lettuca Ferdows)	2
KY946002	کاهو پیچ اورست (Lettuca Everest)	3
KY946001	کاهو پیچ تهران Tehran_Lettuce_Screw	4
KY941102	کاهو پیچ بلند (کونکویستادور) Lettuce_screws_(Konkovistador)	5
KY941103	کاهو سالاد Lettuca Salad	6
KY941104	کاهو برگی یزد Lettuce_leaves_Yazd	7
KY941105	Lechuga Romana larga verde- Teresa (Romaine lettuce long, green Teresa)	8
KY941106	کاهو طالخونچه اصفهان lettuce_TalkhoncheIsfahan	9
KY941110	کاهو پیچ پاسارگاد Parsagad_Lecttuce_Screw	10
KY941111	Lechuga Romana larga rubia –Galaica (Romaine lettuce long, blonde Ggalaica)	11
KY941112	کاهو برگی ورزنه اصفهان Isfahan lettuce_Leaf	12
MF510831	Escarola rizada Cabello de angel (Curly endive hair angel)	13
MF510833	Col de milan Aubervilliers (Cabbage Milan Aubervilliers)	14
MF510832	کاهو برگی نائین اصفهان Nain Lettuce_leaves	15

استخراج DNA با استفاده از روش SDS (۱۳) صورت گرفت. با استفاده از اسپکتروفتومتر و سنجش جذب در طول موج‌های ۲۶۰ نانومتر و ۲۸۰ نانومتر غلظت و خلوص DNA کل بررسی شد؛ و کیفیت DNA از طریق الکتروفورز ژل آگاروز با غلظت یک درصد تعیین گردید. واکنش PCR با دستگاه ترموسایکلر (Hamburg germany) با حجم ۴۵ میکرولیتر، شامل ۲۴ میکرولیتر مستر میکس حاوی رنگ بارکدگذاری، ۶ میکرو لیتر DNA الگو و میزان ۱/۵ میکرو لیتر از هر دو آغازگر رفت‌وبرگشت انجام شد؛ که در نهایت حجم واکنش با آب سترون (استریل) دیونیزه (۱۲ میکرولیتر) به حجم ۴۵ میکرولیتر رسید. ناحیه ITS با استفاده از توالی آغازگر پیش رو (ITS1: TCCGTAGGTGAACCTGCGG) و پس رو (ITS2: TCCTCCGCTTATTGATATGC) گزارش شده توسط White و همکاران (۴۶) تکثیر شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل یک مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه، ۳۵ چرخه با واسرشته سازی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۶۰ ثانیه، اتصال آغازگر به مدت ۵۰ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه و در نهایت بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ده دقیقه بود. جهت حصول اطمینان از تکثیر موفق از ژل آگاروز ۲ درصد و رنگ‌آمیزی با استفاده ماده Gel Red Staining انجام شد.

توالی‌یابی و تجزیه‌و تحلیل داده‌ها

بعد از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، محصولات جهت توالی‌یابی به شرکت Macrogen کره جنوبی ارسال و سپس جهت انجام تصحیحات توالی‌ها از نرم‌افزارهای Sequencing Analysis Software ver5.1 و نرم‌افزار Chromas 2.1.1 استفاده و همچنین ارزیابی تک‌تک توالی‌ها با توالی‌های پایگاه داده NCBI با نرم‌افزار آنلاین BLAST انجام شد. توالی‌ها به روش ClustalW توسط نرم‌افزار MegAlign 5 حاصل از بسته نرم‌افزاری Dnastar 5 و نرم‌افزار Mega 6 هم‌ردیف سازی، خوشه‌بندی و تعیین شباهت و فاصله ژنتیکی شدند و جهت انجام تجزیه‌های تکمیلی از جمله محاسبه dn و ds از نرم‌افزار DnaSP 5 استفاده شد. جانشینی نوکلئوتیدی بر اساس الگوی Tamura-Nei model (۴۳) به‌صورت میزان جانشینی‌های نوع انتقالی (Transition) و متقاطع (Transversionsal) محاسبه شد.

نتایج و بحث

پس از استخراج DNAی کاهو، محدوده غلظت DNA های استخراج شده بین ۲۵۰-۴۴۵ ng/µL شد. بعد از توالی‌یابی میزان همولوژی توالی‌های مورد بررسی با توالی‌های گونه مرجع موجود در سایت NCBI سنجیده شد و شباهت همگی در محدوده ۹۹ تشخیص داده شد و سپس تمام توالی‌ها در سایت NCBI ثبت و کد دسترسی مربوطه

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-11-19]

[DOI: 10.29252/jcb.11.29.29]

کسب کردند (جدول ۱). توالی‌ها بعد از تایید و ثبت مورد هم‌ترازی قرار گرفته و نهایت یک قطعه bp 1600 به دست آمد که ۵۰۰ باز آن حفاظت‌شده بود. سپس توالی‌های به‌دست‌آمده با کمک نرم‌افزار Dnasp مورد ارزیابی قرار گرفتند که در مجموع ۱۵۵۱ جایگاه (۱۱۷۵ جایگاه فاصله و یا داده گم‌شده (۲۳۳ جایگاه چند شکل، ۱۴۳ تک‌شکل) و ۳۷۶ جایگاه دارای حذف و اضافه)، ۲۹ سینگلتن (Singleton)، شناسایی شد. در این جمعیت تعداد ۱۲ هاپلوتیپ (شاخص تنوع هاپلوتیپی ۰/۹۴) شناسایی شد. مقدار عددی (dN/dS) برابر ۰/۰۱۵ بود که کمتر از یک و نشان دهنده این است که انتخاب خالص بر ژن مورد بررسی اتفاق افتاده و باعث تغییرات کلیدی نشده است که با نتایج ارائه‌شده در تحقیقات قبلی مشابهت (۱۶،۲۹) داشت. ضمناً تعداد هاپلوتیپ بسته به نوع موجود و گونه گیاهی متفاوت است به‌طوری‌که در تحقیقاتی از ۴ هاپلوتیپ در ملخ (۳۵)، ۶ هاپلوتیپ در واکامه (۴۴)، ۲۶ هاپلوتیپ در قارچ دیگچه‌ای دوزیستان(۲۱)، ۷۴ در کلادهای *Symbiodinium* (۳۸) تا ۱۳۵ هاپلوتیپ در تریکودرما (۱۴) گزارش شده است.

آنالیز توالی‌های نوکلئوتیدی

جانشینی نوکلئوتیدی بر اساس الگوی Tamura-Nei Model (۴۳) به‌صورت میزان جانشینی‌های نوع انتقالی و متقاطع محاسبه شد که بیشترین میزان انتقالی از نوع پورین (۴۸/۳۵ درصد) و کمترین میزان از نوع پیریمیدین (۰/۱۷ درصد) بود (جدول ۲). همچنین نسبت جایگزینی انتقالی به تقاطعی (Transition/Transversion) R=۰/۱۰ محاسبه شد که بیانگر درصد جانشینی تقاطعی نسبت به جانشینی انتقالی است. بیشترین و کمترین درصد نوکلئوتیدها به ترتیب مربوط به نوکلئوتیدهای G(۲۶/۶) و C(۲۳/۵) بود. همچنین محتوای G+C (۵۲/۶) بود (جدول ۳) که با گزارش ارائه شده مبنی بر اینکه محتوای GC در محدوده‌ی ۳۰ تا ۶۰ درصد است (۱۷) مشابهت داشت.

جدول ۲- برآورد حداکثر درصد جابه‌جایی توالی نوکلئوتیدهای ژن ریبوزومی کاهو بر اساس الگوی Tamura-Nei Model (۴۳)*

Table 2. Maximum Composite Likelihood Estimate of the Pattern of Nucleotide Substitution of lettuce ribosomal genes based on Tamura-Nei Model (43)*

	A	T	C	G
A	_	1.14	1.14	48.35
T	1.09	_	0.21	1.27
C	1.09	0.17	_	1.27
G	41.39	1.14	1.44	_

*احتمال جایگزینی هر ورودی از یک‌پایه (ردیف) به پایه دیگر است که مجموع آن برابر با ۱۰۰ است. در این جدول درصد جهش‌های انتقالی (جایگزینی پورین به پورین دیگر و یا پیریمیدین به پیریمیدین دیگر) به‌صورت پررنگ و جهش تقاطعی (جایگزینی پورین به پیریمیدین و برعکس) به‌صورت ایتالیک نشان داده شده‌اند.

جدول ۳- نسبت بازهای تشکیل دهنده توالی‌های ITS تمام جمعیت‌ها و ارقام کاهو

Table 3. The Proportion of bases pair forming in the ITS sequence of all cultivars and populations of lettuce

رقم/ژنوتیپGenotypes	T	C	A	G	Total
Lettuce May Queen	22.3	27.5	21.8	27.4	669
Lettace Ferdows	22.7	26.5	24	26.8	992
Lettace Everest	23.2	27.6	21.8	27.4	671
Tehran Lettuce Screw	26.1	27.1	22	24.8	568
Lettuce screws (Konkovistador)	22.4	26	24.1	27.4	991
Lettace Salad	22.3	25.7	23.3	27.7	982
Lettuce leaves Yazd	23.1	24.3	24.7	27.9	847
Romaine lettuce long green Teresa	22.8	27.1	23	27.2	961
lettuce Screw	25.4	26.9	23.8	23.8	940
Parsagad Lecttuce Screw	21.1	26.4	24.4	28.2	907
Romaine lettuce long blonde Galaica	25.6	26.2	22.9	25.3	946
lettuce Leaf	24.9	26.8	24.5	23.8	1026
Curly endive hair angel	27.3	25.1	22	25.5	685
cabbage milan Aubervilliers	22	24.3	26.7	26.9	830
Lettuce leaves Nain	21.2	23.3	26.7	28.8	1018
Avg.	23.5	26	23.9	26.6	837

نتایج مقایسه داده‌های ژنتیکی میان جفت نواحی

فاصله ژنتیکی در میان نمونه‌های مورد بررسی از صفر تا ۰/۴۸۵ متغیر به‌طوری‌که بیشترین فاصله ژنتیکی (۰/۴۸۵) بین نمونه‌های *lettuce_Leaf* و *Romaine lettuce long, bionde Ggalaica* به دست آمد (جدول ۴). همچنین ماتریس فاصله ژنتیکی در بین نمونه‌های بررسی شده بر اساس مقایسه کشوری نیز انجام (جدول ۵) و مشخص شد که بیشترین فاصله ژنتیکی (۰/۱۳) بین کاهوهای کشور ایران و اسپانیا بود. بیشترین تنوع درون گونه‌ای (۰/۱۷) مربوط به کشور ایران بود؛ و همچنین مقایسه بین کشورها و شهرهای ایران نیز صورت گرفت که بیشترین فاصله ژنتیکی بین کشور ایتالیا و شهر اصفهان مشخص گردید. بیشترین تنوع درون

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-11-19]

[DOI: 10.29252/jcb.11.29.29]

گونه‌ای (۰/۲۹) مربوط به اصفهان و در بین ژنوتیپ‌های کاهو اصفهان، کاهو ورزنه دارای بیشترین تنوع بود. ضمناً در تحقیق قبلی که تأثیر تنش شوری بر خصوصیات مورفولوژیک ژنوتیپ‌های کاهو مورد استفاده در این تحقیق بررسی شده بود (۴۸) نیز مشخص گردید که کاهو ورزنه اصفهان دارای بیشترین مقدار طول بوته است. از طرفی نتایج تحقیق حاضر و تحقیق قبلی (۳۲) وجود چندشکلی بالا بین ژنوتیپ‌های کاهوی ایرانی را نشان داده که به نحوی تائیدکننده نظریه خاستگاه احتمالی و موطن کاهو در ایران است (۳۰) و چون طبق نظریه واویلوف، منشأ یا خاستگاه اولیه گیاهان متعلق به مراکزی است که بیشترین تنوع را دارا هستند (۲) لذا می‌توان ایران را به‌عنوان خاستگاه کاهو دانست.

جدول ۴- ماتریس فاصله ژنتیکی حاصل تنوع توالی ناحیه ITS جمعیت‌ها و ارقام کاهو

Table 4. Genetic distance matrix of lettuce populations and cultivars based on ITS region sequences

Genotypes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
2	0.000													
3	0.000	0.000												
4	0.209	0.209	0.209											
5	0.000	0.000	0.000	0.209										
6	0.000	0.000	0.000	0.029	0.000									
7	0.000	0.000	0.000	0.209	0.000	0.000								
8	0.007	0.007	0.007	0.220	0.007	0.007	0.007							
9	0.289	0.289	0.289	0.066	0.289	0.289	0.289	0.301						
10	0.000	0.000	0.000	0.209	0.000	0.000	0.000	0.007	0.289					
11	0.040	0.040	0.040	0.230	0.040	0.040	0.040	0.049	0.213	0.040				
12	0.441	0.441	0.441	0.248	0.441	0.441	0.441	0.443	0.320	0.441	0.485			
13	0.209	0.209	0.209	0.000	0.209	0.209	0.209	0.220	0.066	0.209	0.230	0.248		
14	0.040	0.040	0.40	0.178	0.40	0.040	0.040	0.049	0.265	0.040	0.083	0.444	0.178	
15	0.000	0.000	0.000	0.209	0.000	0.000	0.000	0.007	0.289	0.000	0.040	0.411	0.209	0.040

شماره ژنوتیپ‌ها همان شماره ارقام و جمعیت‌های کاهو در جدول ۱ است

جدول ۵- ماتریس فاصله ژنتیکی ناحیه ITS کاهوهای مورد استفاده بر اساس کشورهای محل جمع‌آوری

Table 5. Genetic distance matrix of lettuces ITS region sequences based on collecting countries

	Spain	Iran	Chain	Italy
Spain	1			
Iran	0.1332	1		
Chain	0.0644	0.1044	1	
Italy	0.0881	0.1260	0.0409	1

درخت تبارزایی با استفاده از روش اتصال مجاور Neighbor joining (NJ) ترسیم گردید. بررسی تبارزایی در این روش نشان داد که جمعیت‌های مورد مطالعه به سه گروه تقسیم شدند هرچند از نظر جغرافیایی از یکدیگر جدا نشدند (شکل ۱) اما با گروه‌بندی حاصل از بررسی مورفولوژیک ژنوتیپ‌های مذکور تحت تنش شوری (۴۸) مطابقت داشت. تجزیه خوشه‌ای بر اساس نشانگر ITS نتوانست جمعیت‌های مختلف کاهو را بر اساس مناطق جغرافیایی از هم تفکیک کند که این نتایج با نتایج عظیم‌زاده و همکاران (۴) در بررسی اکوتیپ‌های زیره سیاه (*Bunium Persicum*) مطابقت داشت. قرار گرفتن نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق جغرافیایی مختلف در خوشه‌های یکسان می‌تواند نشانه‌ای از تشابه ژنتیکی و یا تبادل فیزیکی بذر بین مناطق مختلف باشد که تفسیر آن بر اساس تبادلات فیزیکی نسبت به تشابهات ژنتیک توجیه پذیری بیشتری دارد (۵). به دلیل اینکه در تحقیق حاضر ITS نتوانست جمعیت‌های مختلف کاهو را از نظر جغرافیایی از هم جدا کند لذا جهت بررسی قابلیت ITS در ارزیابی تنوع ژنتیکی بین‌گونه‌ای و بین جنسی، آزمون دیگری انجام شد بدین‌صورت که از توالی‌های برخی گیاهان سایر گونه‌های خانواده *Asteraceae* در NCBI استفاده و با توالی‌های تحقیق حاضر مقایسه شد و مشخص گردید که گونه‌های مشابه در یک شاخه کنار هم قرار گرفتند (شکل ۱). لذا می‌توان گفت ITS ابزاری مناسب جهت ارزیابی‌های بین‌گونه‌ای باشد که همین موضوع در تحقیقات دیگر (۴۵، ۴۷،۲۳) نیز گزارش شده است. از طرفی تنوع درون و بین‌گونه‌ای منشأ مهم گونه‌زایی و از شاخص‌های ذخایر مهم تنوع زیستی به شمار می‌رود بنابراین بررسی آن در راستای شناخت تنوع زیستی حائز اهمیت است به‌طوری‌که کمبود تنوع بین و درون گونه‌ای در میان گیاهان باعث بروز مشکلات زیادی می‌گردد. گزارش شده مقاومت گیاهان به آفات و بیماری‌ها و تنش‌های محیطی بستگی به مراکز تنوع دارد (۴۱) و چون کشور ایران به دلیل داشتن تنوع آب و هوایی بالا و ذخایر ژنتیکی گیاهی فراوان، به‌عنوان یکی از غنی‌ترین کشورها از نظر امکانات و استعدادهای طبیعی به شمار می‌رود در نتیجه بررسی تنوع ژنتیکی در برنامه‌های اصلاحی برای بهبود گیاهان نقش مهمی ایفا می‌کند و کمک زیادی به پیشبرد برنامه‌های تحقیقاتی خواهد کرد (۱۲).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-11-19]

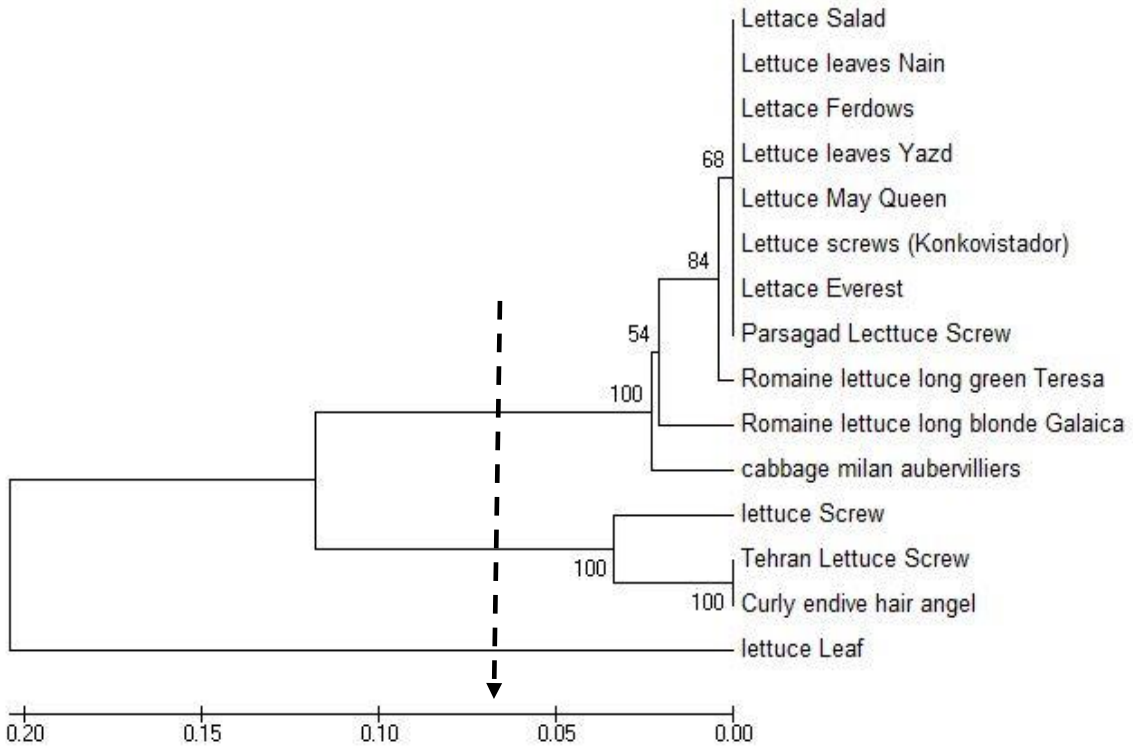
[DOI: 10.29252/jcb.11.29.29]

تجزیه In silico نمونه‌های کاهو

توالی مورد توافق (Consensus Sequence) در همه نمونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار BioEdit Sequence Aligment Editor 7 (۲۴) محاسبه شد و سپس در سایت Nebcutter (http://tools.neb.com/ NEBcutter2/) وارد شد تا آنزیم‌های برشی اختصاصی که توانایی تشخیص هاپلوتیپ‌ها را دارند شناسایی شوند (شکل ۲) نتایج نشان داد که آنزیم‌های برشی متعددی توانایی برش در ناحیه تکثیر شده را دارند به‌طوری‌که مشخص شد ۵ نوع آنزیم برشی (PspGI ، ScrfI،SfaNI ،MapA1I ،SenSARA26III) می‌تواند ناحیه تکثیر شده را در نمونه‌های مختلف برش و تفکیک نماید (جدول ۶).

تجزیه مؤلفه‌های اصلی

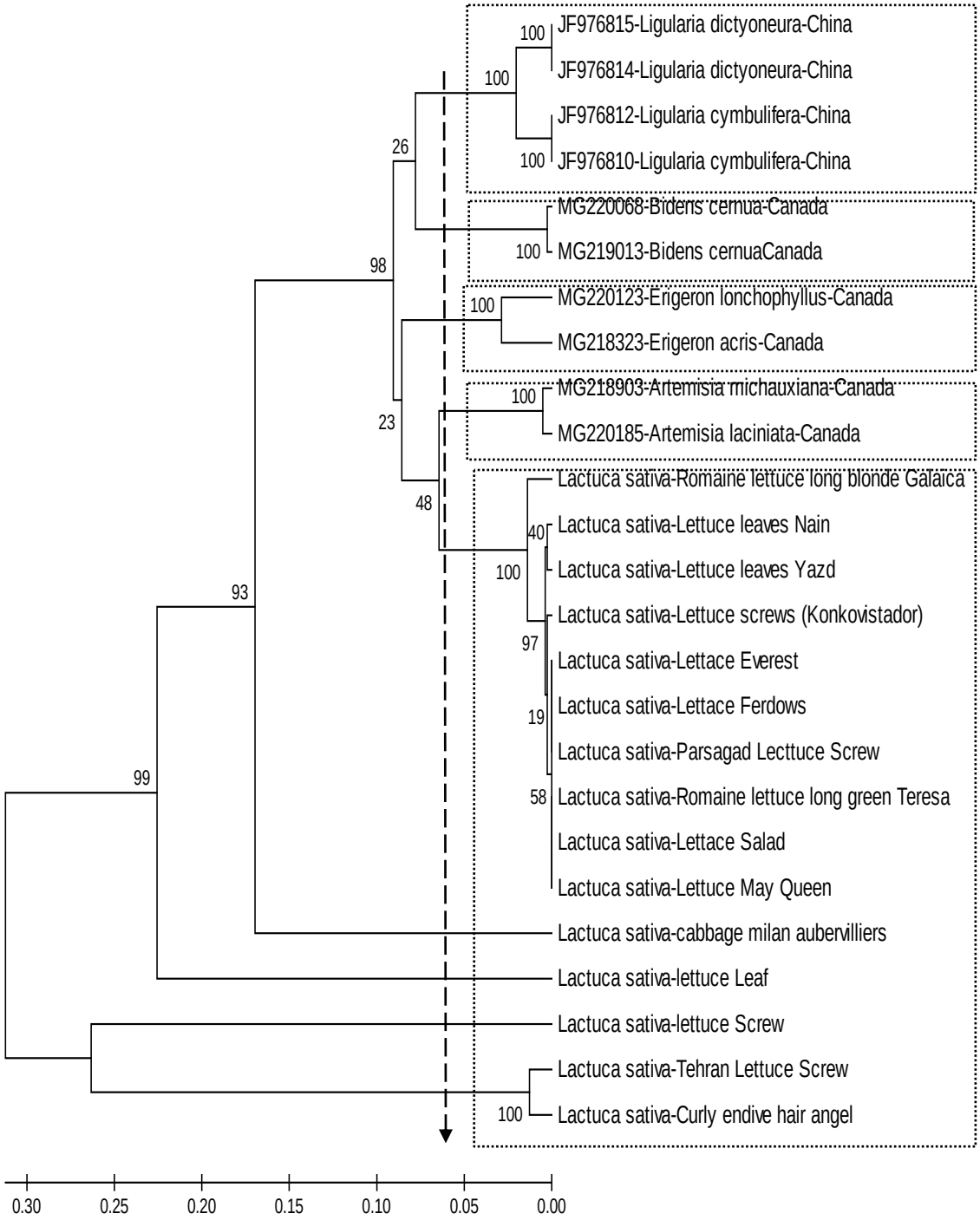
به‌منظور بررسی پراکندگی، فاصله و رابطه‌های تکاملی بین جمعیت‌های مورد بررسی، نمودار دو وجهی (بای پلات) آن‌ها بر اساس تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) و بر پایه‌ی ۳ مؤلفه اول با استفاده از نرم‌افزار DARwin6 0/12 (۳۷) ترسیم شد (شکل ۳). سهم ۳ مؤلفه اول به ترتیب برابر ۷۹/۰۸ ، ۱۷/۰۳ و ۱/۴۵ درصد و در مجموع ۹۷/۵۶ درصد از کل داده‌ها بود. این مقادیر نشان می‌دهد که سه مؤلفه اول به‌خوبی توانسته‌اند میزان بالایی از درصد تنوع را محاسبه کنند. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، جمعیت‌ها به سه گروه تقسیم شدند. که تا حدود زیادی مبین گروه‌بندی‌های انجام شده به روش تجزیه خوشه‌ای بود.



شکل ۱- دندروگرام مقایسه توالی ITS جمعیت‌ها و ارقام کاهو مورد بررسی بر اساس روش Clustal W و نرم‌افزار Mega 6
Figure 1. Dendrogram Comparison of ITS Sequences in Lettuce populations and cultivars based on Clustal W methods using Mega 6 Software

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-11-19]

[DOI: 10.29252/jcb.11.29.29]

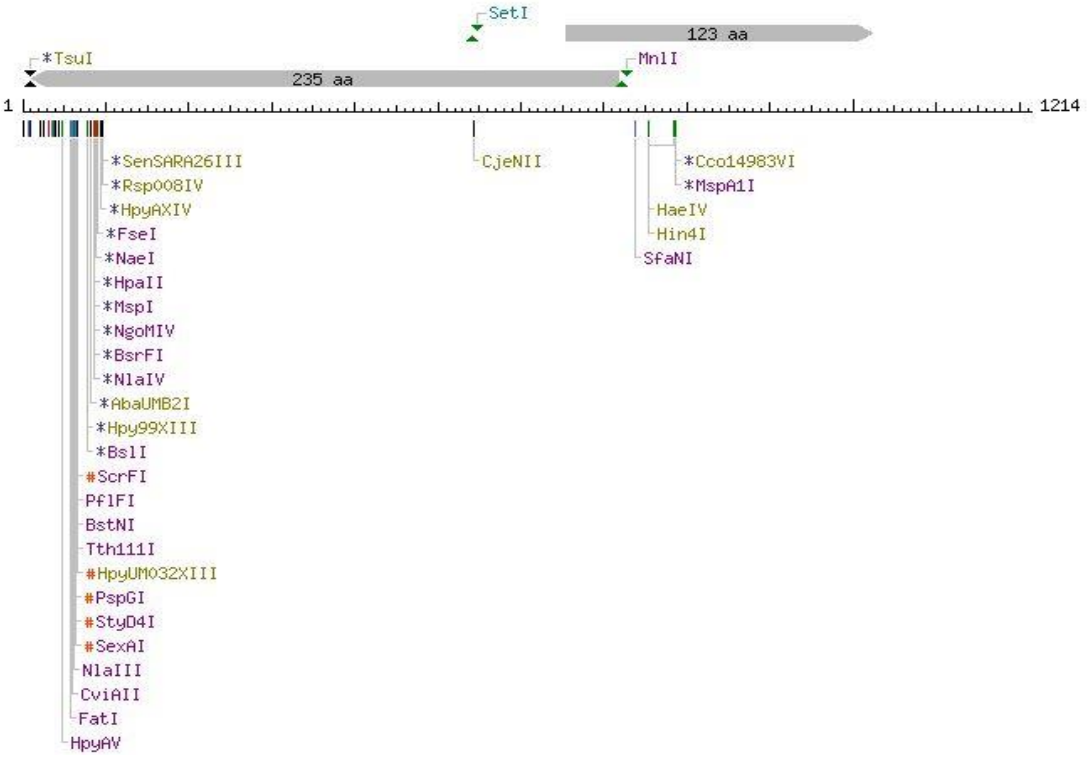


شکل ۲- دندروگرام مقایسه توالی ITS جمعیت‌ها و ارقام کاهو مورد بررسی با برخی توالی‌های خانواده کاسنیان بر اساس روش Clustal W و نرم‌افزار Mega6

Figure 2. Dendrogram Comparison of ITS Sequences in Lettuce populations and cultivars in this research and some others of Asteraceae genus family based on Clustal W methods using Mega 6 Software

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-11-19]

[DOI: 10.29252/jcb.11.29.29]



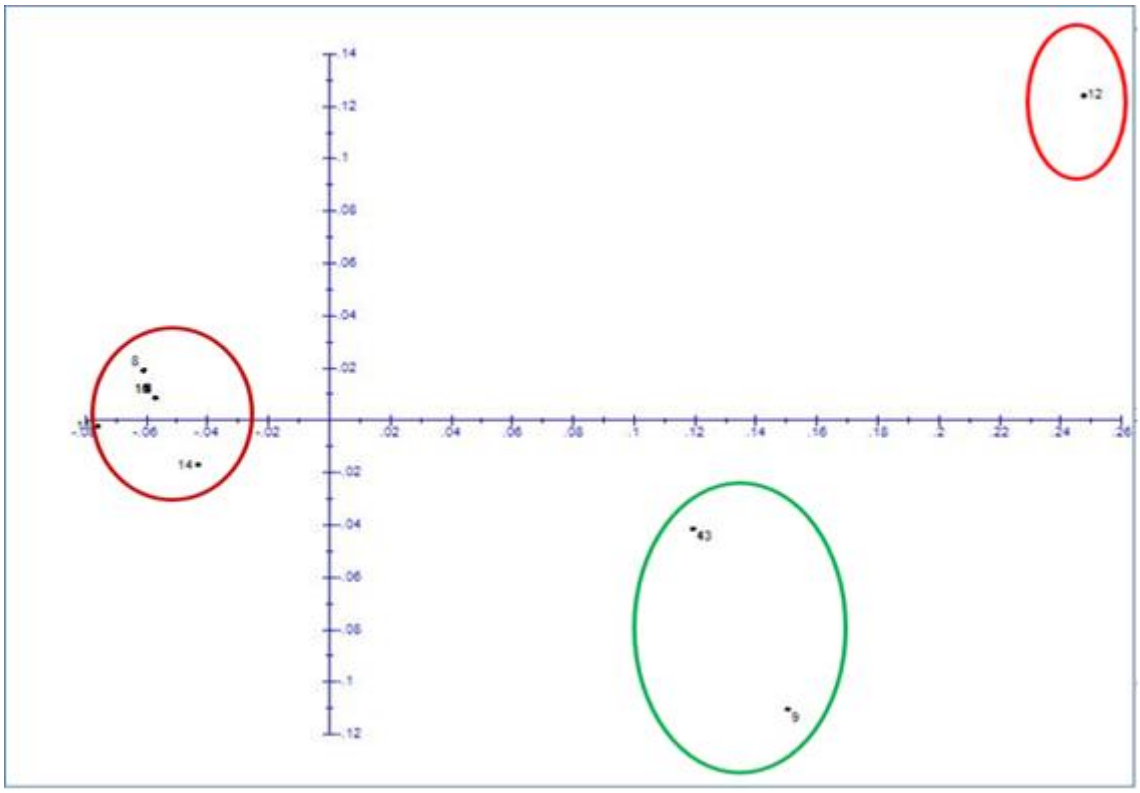
شکل ۳- جایگاه برشی آنزیم‌های محدودکننده روی توالی ژن ITS به‌دست‌آمده ازین تحقیق
Figure 3. The position of restriction enzymes site on the ITS gene sequence in this research

جدول ۶- معرفی آنزیم‌های برش با قابلیت تولید قطعات چند شکل در توالی ITS مورد مطالعه در این تحقیق
Table 6. Introduction of the restriction enzymes with the ability to produce polymorphic bands in the ITS sequence in this research

Enzyme Name	Number cut	Restriction site	The size of polymorphic bands
PspGI	1	5′…▼CCWGG … 3′ 3′ … GGWCC▲ … 5′	65 nucleotide and 1535 nucleotide
SenSARA26III	1	5′ … ARCAG … 3′ 3′ … TGYGTC … 5′	97 nucleotide and 1503 nucleotide
MapA1I	1	5′ … CMG▼CKG … 3′ 3′ … GKC▲GMC … 5′	788 nucleotide and 812 nucleotide
SfaNI	1	5′ … GCATC$(N)_5$▼…3′ 3′ …CGTAG$(N)_9$▲ …5′	738 nucleotide and 862 nucleotide
ScrfI	1	5′ … CC▼NGG … 3′ 3′ … GGN▲CC … 5′	108 nucleotide and 1492 nucleotide

نتایج این تحقیق نشان داد که بیشترین تنوع درون‌گروهی مربوط به کاهوهای کشور ایران بوده و در بین کاهوهای ایران نیز بیشترین تنوع را کاهو برگی ورزنه اصفهان دارا بود. در نتیجه در برنامه‌های اصلاحی آتی کاهو بهتر است از کاهو برگی ورزنه اصفهان به‌عنوان دهنده ژن استفاده شود. ضمناً طبق نظریه واویلوف، منشأ یا خاستگاه اولیه گیاهان متعلق به مراکزی است که بیشترین تنوع را دارا هستند (۲) لذا به علت وجود چندشکلی بالا بین ژنوتیپ‌های کاهوی ایرانی، می‌توان ایران را به‌عنوان خاستگاه کاهو دانست که به نحوی تائید کننده نظریه خاستگاه احتمالی و موطن کاهو در ایران است. در تحقیق حاضر مشخص شد که نشانگر ITS می‌تواند ابزاری مناسب جهت ارزیابی‌های بین‌گونه‌ای باشد.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-11-19]
[DOI: 10.29252/jcb.11.29.29]



شکل ۴- الگوی دو بعدی پراکنش جمعیت‌ها و ارقام کاهو مورد بررسی با استفاده از سه مؤلفه اصلی
Figure 4. Two-dimensional pattern of distribution of Lettuce populations and cultivars studied using three main components

منابع

1. Aćamović-Đoković, G., R. Pavlović, J. Mladenović and M. Đurić. 2011. Vitamin C content of different types of lettuce varieties. Acta Agriculturae Serbica, 16(32): 83-89.
2. Adams, M.D., J.M. Kelley, J.D. Gocayne, M. Dubnick, M.H. Polymeropoulos, H. Xiao, C.R. Merril, A. Wu, B. Olde and R.F. Moreno. 1991. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. Science, 252: 1651-1656.
3. Adlard, R.D., S.C. Barker, D. Blair and T.H. Cribb. 1993. Comparison of the second internal transcribed spacer (ribosomal DNA) from populations and species of Fasciolidae (Digenea). International journal for parasitology, 23(3): 423-425.
4. Azimzade, M., R. Amir, M.H. Osare, M.R. Bihamta and M. Frotan. 2014. Evaluation of genetic diversity of Iranian Cumin (*Bunium persicum Boiss*) of nuclear ribosomal DNA using ITS. The Journal of Genetic Research and plant breeding pasture and forest, 22(1): 1-10.
5. Bahari, Z., A. Shojaeiyan, S. Rashidi Monfared, A. Mirshekari, K. Nasiri and M. Amiriyan. 2015. Investigation of Genetic Diversity among Some Iranian Dill (*Anethum graveolens* L.) Landraces, Using ISSR Markers. Journal of Plant Genetic Research, 2(1): 11-22.
6. Balasaravanan, T., P. Chezhian, R. Kamalakannan, R. Yasodha, M. Varghese, K. Gurumurthi and M. Ghosh. 2006. Identification of species-diagnostic ISSR markers for six Eucalyptus species. Silvae Genetica, 55(3): 119-122.
7. Bartha, C. 2012. Comparative Study of Physiological and Molecular Manifestations of Salt Stress Tolerance in Different Intraspecific Varieties of Lactuca Sativa L. Biology PH. D. School, Babes-Bolyai" University, Faculty of Biology and Geology, 100 Pages
8. Blaxter, M. 2003. Molecular systematics: counting angels with DNA. Nature, 421: 122-124.
9. Cubeta, M.A., R. Vilgalys and D. Gonzalez. 1996. Molecular analysis of ribosomal RNA genes in Rhizoctonia fungi, , Rhizoctonia Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Springer, 81-86.
10. Cunnington, J.H., A.C. Lawrie and I.G. Pascoe. 2004. Unexpected ribosomal DNA internal transcribed spacer sequence variation within Erysiphe aquilegiae sensu lato. Fungal Diversity, 161-10.
11. De Vries, I. 1997. Origin and domestication of Lactuca sativa L. Genetic resources and crop evolution, 44(2): 165-174.
12. Dehdashtian, Z., M.R. Wahabi, M. Fazilati, K. Ghaedi and A. Salamian. 2011. Analysis of the Genetic Diversity of Astragalus Gossypinus Population in Isfahan. Genetics in the 3rd Millennium, 9(3): 2474-2467.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-11-19]

[DOI: 10.29252/jcb.11.29.29]

13. Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation: version II. Plant molecular biology reporter, 1(4): 19-21. DOI: 10.1007/BF02712670
14. Druzhinina, I,S., A,G. Kopchinskiy, M. Komoń, J. Bissett, G. Szakacs and C.P. Kubicek. 2005. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. Fungal Genetics and Biology, 42(10): 813-828. https://doi.org/10.1016/j.fgb.2005.06.007
15. Feliner, G.N., and J.A. Rosselló. 2007. Better the devil you know? Guidelines for insightful utilization of nrDNA ITS in species-level evolutionary studies in plants. Mol Phylogenet Evol, 44(2): 911-919.
16. Forni, D., R. Cagliani, U. Pozzoli, M. Colleoni, S. Riva, M. Biasin, G. Filippi, L. De Gioia, F. Gnudi and G.P. Comi. 2013. A 175 million year history of T cell regulatory molecules reveals widespread selection, with adaptive evolution of disease alleles. Immunity, 38(6): 1129-1141. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.04.008
17. Fullerton, S.M., A. Bernardo Carvalho and A.G. Clark. 2001. Local rates of recombination are positively correlated with GC content in the human genome. Molecular biology and evolution, 18(6): 1139-1142. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev, 003886
18. Funk, V.A., R.J. Ba, R. Chan, L. Watson, B. Gemeinholzer, E. Schilling, J.L. Panero, B.G. Baldwin, N. Garcia-Jacas and A. Susanna. Year. Published. B555 343 Everywhere but Antarctica: Using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae, p. 343. *In*, Plant Diversity and Complexity Patterns: Local, Regional and Global Dimensions: Proceedings of an International Symposium Held at the Royal Danish Academy of Sciences and Letters in Copenhagen, Denmark, May, 2003, 2005. Kgl. Danske Videnskabernes Selskab, 25-28 pp.
19. Gao, T., H. Yao, J. Song, C. Liu, Y. Zhu, X. Ma, X. Pang, H. Xu and S. Chen. 2010. Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2. J Ethnopharmacol, 130(1): 116-121. 10.1016/j.jep.2010.04.026
20. Garcia, S., A. Kovařík, A.R. Leitch and T. Garnatje. 2017. Cytogenetic features of rRNA genes across land plants: analysis of the Plant rDNA database. The Plant Journal, 89(5): 1020-1030.
21. Goka, K., J. Yokoyama, Y. Une, T. Kuroki, K. Suzuki, M. Nakahara, A. Kobayashi, S. Inaba, T. Mizutani and A. D. Hyatt. 2009. Amphibian chytridiomycosis in Japan: distribution, haplotypes and possible route of entry into Japan. Mol Ecol, 18(23): 4757-4774. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04384.x
22. Gültepe, M., U. Uzuner, K. Coşkuncelebi, A.O. Beldüz and S. Terzioğlu. 2010. Internal transcribed spacer (ITS) polymorphism in the wild Primula (Primulaceae) taxa of Turkey. Turkish Journal of Botany, 34(3): 147-157.
23. Haidari, P., A.A. Mehrabi and A.A. Nasrollah Nejad Ghomi. 2014. Genetic Diversity of Balm (*Melissa Officinalis* L.) Landraces and Genetic Relationship Within and Between Them using ITS Markers. Journal of Crop Breeding, 6(13): 29-39.
24. Hall, T.A. Year. Published. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, pp. 95-98. *In*, Nucleic acids symposium series, 1999. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000.
25. Hebert, P.D., A. Cywinska and S.L. Ball. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 270: 313-321.
26. Hebert, P.D., S. Ratnasingham and J.R. de Waard. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 270: S96-S99.
27. Koopman, W.J., E. Guetta, C.C. vandeWiel, B. Vosman and R.G. van den Berg. 1998. Phylogenetic relationships among Lactuca (Asteraceae) species and related genera based on ITS-1 DNA sequences. American Journal of Botany, 85(11): 1517-1530.
28. Lindqvist, K. 1960. Cytogenetic studies in the serriola group of Lactuca. Hereditas. 46(1-2): 75-151.
29. Liu, F., Y. Hu, Q. Wang, H.M. Li, G.F. Gao, C.H. Liu and B. Zhu. 2014. Comparative genomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. BMC Genomics, 15(1): 469. https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-469
30. Mehta, D. 2012. An Insight on Traditional System of Medicine in Pharmaceutical Industry, with Pharmacological Profile Reporting on Devadaru and Indian Rhubarb: Vital to Pharmaceutical Research Endeavor. Ethnopharmacology, 2012(4): 200-211.
31. Mikel, M.A. 2007. Genealogy of contemporary North American lettuce. HortScience, 42(3): 489-493.
32. Mousavi, S., R. Choukan, N. Sepahvand and A. Ghanbari. 2014. Genetic Diversity of Iranian Lettuce Genotypes Based on RAPD Markers. Seed and Plant Improvment Journal, 30(1): 115-131.
33. Pang, X., L. Shi, J. Song, X. Chen and S. Chen. 2013. Use of the potential DNA barcode ITS2 to identify herbal materials. J Nat Med, 67(3): 571-575.
34. Park, J.H., Y.H. Kim, C.S. Ham, S.E. Shin, H.J. Lee, K.S. Ko, J. Choi, G.H. Son and S.H. Park. 2018. Molecular identification of forensically important calliphoridae and sarcophagidae species using ITS2 nucleotide sequences. Forensic Sci Int, 10: 28-41.1016/j.forsciint.2017.12.017
35. Parkin, E.J. and R.K. Butlin. 2004. Within-and between-individual sequence variation among ITS1 copies in the meadow grasshopper *Chorthippus parallelus* indicates frequent intrachromosomal gene conversion. Molecular biology and evolution, 21(8): 1595-1601. https://doi.org/10.1093/molbev/msh163
36. Patras, A., C.E. Luchian, M. Niculaua and V. Stoleru. 2013. Effects of some Abiotic Factors on Brassica Oleracea Var. Capitata Sprouts. Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Horticulture, 70(1): 172-179.
37. Perrier, X. and J.P. Jacquemoud-Collet. 2006. DARwin software http://darwin.cirad.fr/darwin computer program, version By Perrier, X. and J. P. Jacquemoud-Collet,
38. Rodriguez-Lanetty, M. 2003. Evolving lineages of *Symbiodinium*-like dinoflagellates based on ITS1 rDNA. Mol Phylogenet Evol, 28(1): 152-168. https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00033-2.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-11-19]

[DOI: 10.29252/jcb.11.29.29]

39. Schultz, J. and M. Wolf. 2009. ITS2 sequence–structure analysis in phylogenetics: a how-to manual for molecular systematics. Mol Phylogenet Evol, 52(2): 520-523.
40. Silva, S.R., R. Gibson, L. Adamec, Y. Domínguez and V.F. Miranda. 2018. Molecular phylogeny of bladderworts: A wide approach of Utricularia (Lentibulariaceae) species relationships based on six plastidial and nuclear DNA sequences. Mol Phylogenet Evol, 118: 244-264.
41. Sindhu, A., S.K. Tehlan and A. Chaudhury. 2017. Analysis of genetic diversity among medicinal therapist Trigonella foenum-graecum L. genotypes through RAPD and SSR markers. Acta Physiologiae Plantarum, 39(4): 100. 10.1007/s11738-017-2395-8.
42. Sun, Z. and S. Chen. 2013. Identification of cortex herbs using the DNA barcode nrITS2. J Nat Med, 67(2): 296-302.
43. Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular biology and evolution, 30: 2725-2729.
44. Uwai, S., N. Yotsukura, Y. Serisawa, D. Muraoka, M. Hiraoka and K. Kogame. 2006. Intraspecific genetic diversity of *Undaria pinnatifida* in Japan, based on the mitochondrial cox3 gene and the ITS1 of nrDNA. Hydrobiologia, 553(1): 345-356. https://doi.org/10.1007/s10750-005-0883-0
45. Varela, E., J. Lima, A. Galdino, L.D.S. Pinto, W. Bezerra, E. Nunes, M. Alves and T. Grangeiro. 2004. Relationships in subtribe Diocleinae (*Leguminosae*; *Papilionoideae*) inferred from transcribed spacer sequences from nuclear ribosomal DNA. Phytochemistry, 65(1): 59-69. doi: 10.1016/j.phytochem.2003.08.005.
46. White, T.J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications, 18(1): 315-322.
47. Wu, C.T., C.C. Hsieh, W.C. Lin, C.Y. Tang, C.H. Yang, Y.C. Huang and Y.J. Ko. 2013. Internal transcribed spacer sequence-based identification and phylogenic relationship of I-Tiao-Gung originating from Flemingia and Glycine (Leguminosae) in Taiwan. Journal of food and drug analysis, 21(4): 356-362. doi: 10.1016/j.jfda.2013.08.002.
48. Zarea, M., B. Fakheri and S. Farokhzadeh. 2016. Effect of Salinity on Morphological Characteristics of Lettuce Genotypes (*Lactuca Sativa* L.) Journal of Horticultural Science, 30(3): 457-468 (In Farsi with Abstract English).

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-11-19]

[DOI: 10.29252/jcb.11.29.29]

Study of the Molecular Diversity of Internal Transcribed Spacer Region (ITS1.4) in Some Lettuce Genotypes

Zahra Jomeh Ghasem Abadi[1], Baratali Fakheri[2] and Bahman Fazeli-Nasab[3]

1 and 2- M.Sc. Student and Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol
3- Faculty Member, Research Department of Agronomy and Plant Breeding, Agricultural Research Institute, University of Zabol, Zabol, Iran, (Corresponding author: Bfazeli@uoz.ac.ir)
Received: May 21, 2017 Accepted: August 25, 2018

Abstract

Lettuce is belong to the *Cichorium* family with leaf consumption, Annual cold weather plants and rich in minerals, vitamins and nutrients. The aim of the present study was to evaluate the genetic diversity of 15 varieties and lettuce populations using the ITS area. Sequence quality was evaluated using Chromas 2.1.1 software, aligned by MegAlign 5 software and then similarity matrix and dendrogram of phylogenic relationships of Lettuce sequences were conducted using Mega 6 software. Also, a comparison was conducted among the lettuce were used in this research and other plants of the Asteraceae genus family (presented on NCBI site). The numerical value of the ratio (dN/dS) was 0.015, which indicates a pure selection in the examined gene and has not caused any key changes. Cluster analysis split the different genotypes of lettuce into 3 groups and could not differentiate by geographical location but it could separate the lettuce of this research and other plants from different species of the Asteraceae family related by NCBI. Therefore, it can be concluded that ITS can be a suitable tool for genetic evaluations among genus and among species. The inability of ITS marker to separate the intra-species of populations it could be because dN/dS was less than and a small number of deletion and insertion sites (376 out of 1551 positions) indicating low variation between different genotypes and populations. Considering that the Initial origin of the plants is belong to the centers that are most diverse and because varzaneh Lettuce populations of Isfahan have the most varieties, as a result, it is necessary to pay more attention to the Varzaneh region of Isfahan to collection of lettuce germplasms for breeding programs.

Keywords: DN/Ds, Genetic Diversity, *Lactuca sativa* L, ITS

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-11-19]

[DOI: 10.29252/jcb.11.29.29]