

Phylogenetic Position of Two *Origanum* Species Native to Iran in the Lamiaceae Family Based on Isolation and Sequencing of Two Key Genes Involved in the Rosmarinic Acid Biosynthesis Pathway

Soghra Zaerinejad¹  | Saeed Tarkesh Esfahani^{1*}  | Asghar Mosleh Arani² 

1- Department of Arid Land and Desert Management, School of Natural Resources and Desert Studies, Yazd University, Yazd, Iran

2- Department of Environmental Science, School of Natural Resources and Desert Studies, Yazd University, Yazd, Iran

*Corresponding author ✉: s.tarkesh@yazd.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Article

Article history:

Received: April 28, 2026;
Received in revised form: June 16, 2026;
Accepted: June 23, 2026;
Available online: June 30, 2026

Keywords:

Intron,
Rosmarinic acid,
Phylogenetics,
Marjoram,
Oregano

ABSTRACT

The genus *Origanum* in the lamiaceae family includes several pharmaceutically important plants whose antioxidant properties are known to depend on the phenolic compounds, including rosmarinic acid. Biosynthetic pathway of rosmarinic acid is common to many species of the lamiaceae family. This study aimed to isolate and sequence two genes, *Rosmarinic acid synthase* (RAS) and *Hydroxyphenylpyruvate reductase* (HPPR), involved in the biosynthesis of rosmarinic acid in three taxa including *Origanum vulgare* subsp. *vulgare*, *Origanum vulgare* subsp. *viridulum* and *Origanum majorana*, L. as well as to unravel phylogenetic relationships in the lamiaceae family based on the sequences of these two genes. Specific primers were designed based on the available sequences deposited in the GenBank database. Gene amplification was performed via Polymerase Chain Reaction (PCR) using DNA extracted from the Lamiaceae species as template, followed by PCR products sanger sequencing. The obtained sequences, along with other sequences recorded from these two genes in the GenBank database, were used to investigate phylogenetic relationships in the lamiaceae family. Species of the genus *Mentha* L. and the species *Satureja khuzestanica* Jamzad were found to be the closest taxa to *Origanum* plants. The genetic similarity coefficient between endemic Iranian species was higher than that between other studied species. These findings can be explained by the close geographical proximity and the high likelihood of gene flow among endemic species. Furthermore, this study contributes to the global genomic database, enhances the taxonomic identification of *Origanum* and Lamiaceae species, and supports the genetic improvement of this valuable endemic medicinal plant.



Cite this article: Zaerinejad, S., Tarkesh Esfahani, S. and Mosleh Arani, A. (2026). Phylogenetic position of two *Origanum* species native to Iran in the lamiaceae family based on isolation and sequencing of two key genes involved in the rosmarinic acid biosynthesis pathway. *Plant Genetic Research*, 13(1): 111–128 (In Persian).

DOI: <https://doi.org/10.22034/pgr.2026.2089956.1036>

Introduction

The Lamiaceae family is known as the sixth largest family of herbaceous plants, comprises approximately 230 genera and more than 7000 species, distributed globally across warm and temperate regions. The genus *Origanum* belonging to the lamiaceae family consists several pharmaceutically important plants in the world, with circa 50 identified species. The considerable anticancer and antioxidant properties of this plant are mainly due to phenolic compounds, including rosmarinic acid. The biosynthesis pathway of rosmarinic acid is known to be common in many lamiaceae species. The three important species of this genus in Iran include *Origanum vulgare* L., *O. majorana* L. and *O. laevigatum* Boiss. In the species *O. vulgare*, six subspecies have been identified so far among which three subspecies *vulgare*, *viridulum* and *gracile* are found naturally in Iran, mainly in the western, northwestern and northern regions. Rosmarinic acid is an ester of caffeic acid and dihydroxyphenyl rosmarinic acid that the highest amount of its biosynthesis occurs in the mint family in species of the subfamily Nepetoideae. This study aimed to identify and sequence the *Rosmarinic acid synthase* (*RAS*) and *Hydroxyphenylpyruvate reductase* (*HPPR*) genes involved in the biosynthetic pathway of rosmarinic acid in three lamiaceae taxa, including *Origanum vulgare* subsp. *vulgare*, *O. vulgare* subsp. *viridulum* and *O. majorana*, and to identify the phylogenetic relationships between lamiaceae taxa based on the sequences of these two genes.

Materials and Methods

Specific primers were designed and constructed based on the conserved regions of two genes in the sequences registered in the GenBank database. Due to the large size of the reported sequences of the *RAS* and *HPPR* genes, both larger than 1000 bp, in order to increase the efficiency of gene amplification in the polymerase chain reaction, the sequence of each gene was divided into two smaller overlapping fragments. Therefore, two pairs of specific primers were designed for each gene, which together amplified a larger region of the target gene as two overlapping fragments. Gene amplification was performed by polymerase chain reaction with DNA extracted from the studied species and the reaction products were used to sequence the genes. The sequences obtained, along with other sequences registered in GenBank, were used to investigate phylogenetic relationships in the Lamiaceae family based on the sequences of the *RAS* and *HPPR* genes using MEGA 11 software.

Results and Discussion

For all three taxa examined, fragment lengths for the *RAS* sequence were 1,322, 1,319, and 775 bp, respectively, while the *HPPR* gene regions measured 2,217, 2,203, and 2,222 bp, respectively. The *HPPR* had a large intron approximately 1300 bp and with a very similar position and sequence in all three studied plants. BLASTn results showed that the coding region sequences of the *RAS* and *HPPR* genes in the two studied species have a very high similarity (alignment score higher than 200) with other records studied and registered in the GenBank database. In the phylogenetic tree drawn for both genes, different species of *Origanum* were classified together in a separate subclass. The Bootstrap test statistic confirmed with high accuracy the validity and reliability of the branches in both trees. Within this genus, the most similar species were *O. majorana* and *O. vulgare* subsp. *vulgare*, followed closely by *O. vulgare* subsp. *viridulum*. The two species *Salvia yangii* and *Salvia abrotanoides* were identified as the closest species to *Origanum* based on the sequence of the coding region of both genes. These results demonstrated that single-gene phylogenies in plants, especially at the intrageneric level, can diverge from traditionally taxonomic markers and conventional interspecific similarity patterns. In both trees, the species of the genus *Mentha* spp. and the species *Satureja khuzestanica* were known as the closest species to the *Origanum* spp. in terms of evolutionary history.

Conclusion

In general, a newer and more comprehensive scheme of the phylogenetic and evolutionary relationships of plants in the mint family was obtained. The phylogenetic affinity based on the *RAS* and *HPPR* sequences in the native Iranian species was higher than that of other lamiaceae species. This phylogenetic position can be explained considering the close geographical distance between habitats and the greater probability of gene flow between the species. The results of this study play an important role in enriching the international genomic database and in deeper identification of the *Origanum* spp. taxa and the phylogenetic relationships between species of this genus and other lamiaceae taxa, and can be an effective contribution to planning for the genetic improvement of this native medicinal plant.

Author Contributions

S.Z and S.T.E. conducted the research and contributed in methodology, data collection, data analysing and writing original draft of the manuscript. S.T.E. and A.M.A. supervised the study and contributed to conceptualization, manuscript review and editing. All authors contributed to the final manuscript and approved the submitted version.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgements

The implementation of this research was made possible through the material and organizational support of Yazd University. The authors express their gratitude to Yazd University for this support.

Ethical Considerations

This study did not involve human or animal participants or identifiable personal data and no ethical approval was required.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.



بررسی جایگاه فیلوژنتیکی دو گونه *Origanum* بومی ایران در تیره نعنائیان بر اساس جداسازی و توالی‌یابی دو ژن کلیدی مسیر بیوستز رزمارینیک اسید

صغری زائری‌نژاد^۱ | سعید ترکش اصفهانی^{۱*} | اصغر مصلح آرانی^۲

۱- گروه مدیریت مناطق خشک و بیابانی، دانشکده منابع طبیعی و کویرشناسی، دانشگاه یزد، یزد، ایران

۲- گروه محیط‌زیست، دانشکده منابع طبیعی و کویرشناسی، دانشگاه یزد، یزد، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:

مقاله پژوهشی

جنس مرزنجوش در تیره نعنائیان، شامل چندین گیاه دارویی مهم است که خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها به وجود ترکیبات فنولی از جمله رزمارینیک اسید وابسته است. مسیر شناخته شده بیوستز رزمارینیک اسید در بسیاری از گونه‌های تیره نعنائیان مشترک است. این مطالعه با هدف جداسازی و توالی‌یابی دو ژن *Rosmarinic acid synthase* و *Hydroxyphenylpyruvate reductase* فعال در مسیر بیوستز رزمارینیک اسید در سه تاکسون از جنس مرزنجوش شامل *Origanum vulgare* subsp. *viridulum*، *Origanum vulgare* subsp. *vulgare* و *Origanum majorana* L. و شناسایی روابط فیلوژنتیکی در تیره نعنائیان بر اساس توالی این دو ژن انجام شد. آغازگرهای اختصاصی بر اساس توالی‌های ثبت شده در پایگاه GenBank طراحی و ساخته شد. تکثیر ژن‌ها از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با DNA استخراج شده از گونه‌های مورد مطالعه انجام و از محصول واکنش برای تعیین توالی ژن‌های هدف استفاده شد. این توالی‌ها همراه با سایر توالی‌های ثبت شده از این دو ژن به منظور بررسی روابط فیلوژنتیکی در تیره نعنائیان مورد استفاده قرار گرفت. گونه‌های جنس *Mentha* L. و گونه *Satureja khuzestanica* Jamzad نزدیک‌ترین تاکسون‌ها به مرزنجوش بودند. ضریب شباهت ژنتیکی بین گونه‌های بومی ایران بالاتر از سایر گونه‌های مورد مطالعه بود که این نتیجه را می‌توان با توجه به فاصله جغرافیایی نزدیک و احتمال بیشتر برای وقوع جریان ژنی در بین این گونه‌ها توجیه نمود. نتایج این مطالعه در غنی‌سازی بانک داده‌های بین‌المللی اطلاعات ژنومی و شناسایی عمیق‌تر گیاه مرزنجوش و تیره نعنائیان نقش دارد و می‌تواند کمک مؤثری جهت اصلاح ژنتیکی این گیاه دارویی ارزشمند بومی کشور باشد.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۲/۰۸

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۵/۰۳/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۴/۰۲

تاریخ انتشار: ۱۴۰۵/۰۴/۰۹

واژگان کلیدی:

اینترون،

رزمارینیک اسید،

فیلوژنتیک،

مرزنجوش اروپایی،

مرزنجوش وحشی



مقدمه

گیاهان دارویی در سراسر جهان به‌طور گسترده در پزشکی، داروسازی و صنایع غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند و نه تنها ابزار اصلی برای طب سنتی، بلکه تأمین‌کننده امنیت غذایی و سلامت، بخش بزرگی از جمعیت جهان هستند. تیره نعنائیان (Lamiaceae) به‌عنوان ششمین تیره بزرگ از گیاهان نهاندانه شامل حدود ۲۳۰ جنس و بیش از ۷۰۰۰ گونه شناخته شده است که در مناطق گرم و معتدل جهان پراکنده هستند (Zhao et al., 2021). جنس *Origanum* L. متعلق به تیره نعنائیان و شامل تعداد زیادی گونه گیاهی معطر و دارویی بومی مدیترانه، اوراسیا و شمال آفریقا است که با تنوع مورفولوژیکی و شیمیایی بسیار زیاد شناخته می‌شود و به‌عنوان یکی از مهمترین و پرفروش‌ترین گیاهان ادویه‌ای و دارویی در جهان به‌شمار می‌رود. منابع تاریخی نشان می‌دهند که گونه‌های مختلف مرزنجوش از ۳ هزار سال قبل در مصر کشت می‌شده‌اند و مورد استفاده یونانیان باستان بوده‌اند. طیف گسترده‌ای از ترکیبات فعال دارویی شامل اسانس، گلیکوزیدهای فنولی، فلاونوئیدها، تانن‌ها، استروئول‌ها و ویتامین‌ها در مرزنجوش شناسایی و جداسازی شده‌اند (Neeru, 2015). این گیاه به‌دلیل داشتن خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجه و وجود اسانس معطر و ترکیبات طبیعی ارزشمند از جمله کارواکرول، تیمول، رزمارینیک اسید و برخی دیگر از ترکیبات فنلی، به‌طور گسترده در صنایع غذایی و دارویی استفاده می‌شود (Azizi et al., 2009).

جنس *Origanum* شامل ۴۹ گونه پذیرفته شده مشتمل بر بیش از ۶۰ تاکسون و ۱۸ هیبرید مختلف است که همگی از گیاهان چندساله و با تنوع مورفولوژیکی بالا هستند (Papaioannou et al., 2020). سه گونه مهم این جنس در ایران شامل *O. vulgare* L.، *O. majorana* L. و *O. laevigatum* Boiss. هستند که دو گونه اول به‌ترتیب معروف به مرزنجوش وحشی (یا پونه کوهی) و مرزنجوش اروپایی (بستانی)، به‌دلیل خواص دارویی که از زمان‌های قدیم در آن‌ها شناخته شده است، در مطالعات

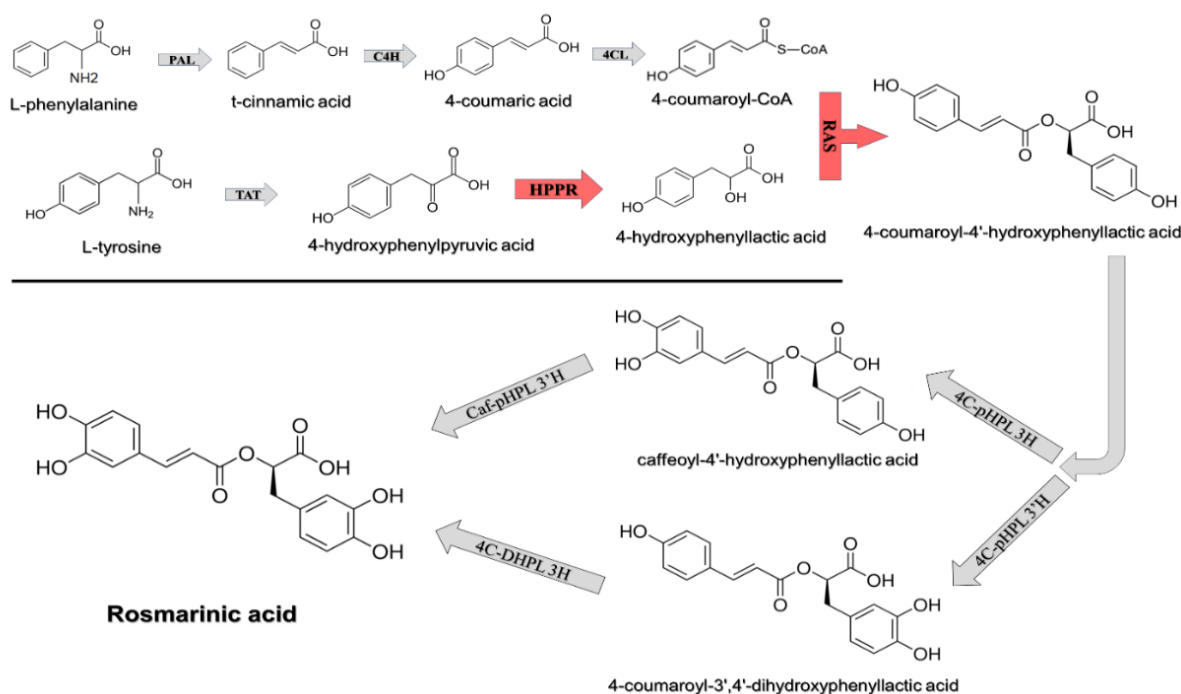
فارماکولوژیک و طب سنتی مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند و در کشور شناخته شده‌تر هستند (Jafari et al., 2023). در گونه *O. vulgare* تاکنون شش زیرگونه شامل *O. vulgare* subsp. *Vulgare*، *O. vulgare* subsp. *Vulgare*، *O. vulgare* subsp. *glandulosum* Desf.، *O. vulgare* subsp. *gracile* (K.Koch) Ietsw.، *O. vulgare* subsp. *viridulum* (Martin- hirtum) Ietsw.، *O. vulgare* subsp. *virens* و Donos) Nyman (Hoffmanns. and Link) Ietsw. شناسایی شده است که در میان آن‌ها سه زیرگونه *viridulum*، *vulgare* و *gracile* به‌طور طبیعی در ایران، عمدتاً در مناطق غربی، شمال‌غربی و شمالی یافت می‌شوند (Mehdizadeh et al., 2018). در این میان بیشترین مطالعات بر روی زیرگونه *O. vulgare* subsp. *viridulum* به‌دلیل اسانس با کیفیت‌تر و غنی بودن از ترکیبات ارزشمند دارویی انجام شده است (Azizi et al., 2009). گونه *O. majorana* که بومی آناتولی و قبرس است، به‌طور طبیعی در مناطق وسیعی از خاور میانه، شمال آفریقا، هند و جنوب آسیا و از جمله در غرب و شمال غرب ایران به‌عنوان یک گیاه بومی شده می‌روید (Tarkesh Esfahani et al., 2025). علاوه بر این، در سراسر جهان از جمله مناطق مختلف هند، فرانسه، ایالات متحده آمریکا و شمال و مرکز ایران به‌طور گسترده به‌عنوان یک گیاه دارویی و ادویه‌ای ارزشمند کشت و تولید می‌شود (Tarkesh Esfahani et al., 2024). گونه *O. laevigatum* را نیز فقط می‌توان در منطقه کوچکی در شمال غربی ایران در نزدیکی مرز ایران و ترکیه به‌طور طبیعی یافت (Jamzad, 2013).

رزمارینیک اسید یک استر کافئیک اسید و دی‌هیدروکسی فنیل رزمارینیک اسید است که عمدتاً در گونه‌های متعلق به تیره گاوزبانیان (Boraginaceae) و به مقدار کمتری در سایر گونه‌های گیاهی از قبیل برخی سرخس‌ها و نیز اعضای از تیره‌های گوشایان (Potamogetonaceae) و اختریان (Cannaceae) تولید می‌شود، اما بالاترین مقدار بیوستر آن در تیره نعنائیان در گونه‌های زیرتیره Nepetoideae گزارش شده است (Sik et al., 2019). این توزیع گسترده باعث شده است از توانایی سنتز و یا تجمع

فنیل آلانین آمونیلایز (PAL) به اسید سینامیک و سپس با دخالت آنزیم سیتوکروم P450، اسید سینامیک به اسید کوماریک و کومارویل کوآنزیم تبدیل می‌شود. پیش‌ساز دیگر تیروزین است که ابتدا توسط آنزیم ترانس‌آمینوترانسفراز (TAT) به هیدروکسی‌فنیل پیرووات و در ادامه توسط آنزیم هیدروکسی‌فنیل پیرووات ردوکتاز (HPPR) به هیدروکسی‌فنیل لاکتیک اسید تبدیل می‌شود. در ادامه گروه کربوکسیل از کوماریک اسید و گروه هیدروکسیل از هیدروکسی‌فنیل لاکتیک اسید با دخالت آنزیم رزماریک اسید سیتاز (RAS) به هم متصل می‌شوند و ماده رزماریک اسید حاصل می‌شود (Petersen *et al.*, 2009).

رزماریک اسید نتوان به‌عنوان یک شاخص تاکسونومیکی برای تمایز بین تیره‌های مختلف گیاهی استفاده کرد (Petersen *et al.*, 2009).

مسیر بیوسنتز رزماریک اسید در گیاهان از دو شاخه موازی با پیش‌سازهای متفاوت شروع می‌شود (شکل ۱). این دو شاخه که در ابتدای یکی از آن‌ها اسید آمینه فنیل آلانین و در ابتدای شاخه دیگر تیروزین قرار دارد، چند واکنش آنزیمی اولیه را به‌صورت مستقل طی می‌کنند و سپس به هم می‌پیوندند تا پس از چند واکنش دیگر، ماده رزماریک اسید به‌عنوان محصول نهایی تولید شود. در شاخه اول، ابتدا فنیل آلانین توسط آنزیم



شکل ۱- مسیر پیشنهادی برای بیوسنتز رزماریک اسید در گونه‌های تیره نعنائیان (Petersen *et al.*, 2009) و موقعیت ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه که در شکل با رنگ قرمز مشخص شده‌اند. آنزیم‌های درگیر در این مسیر عبارتند از: PAL = فنیل آلانین آمونیلایز؛ C4H = سینامیک اسید ۴ هیدروکسیلاز؛ 4CL = ۴-کوماریک اسید کوآنزیم ۴-لیگاز؛ TAT = تیروزین آمینوترانسفراز؛ HPPR = هیدروکسی‌فنیل لاکتات ۳-هیدروکسیلاز؛ RAS = رزماریک اسید سیتاز؛ 4C-pHPL 3'H = ۴-کومارویل-۴'-هیدروکسی‌فنیل لاکتات ۳-هیدروکسیلاز؛ 4CpHPL 3'H = ۴-کومارویل-۴'-هیدروکسی‌فنیل لاکتات ۳-هیدروکسیلاز؛ Caf-pHPL 3'H = کافئویل-۴'-هیدروکسی‌فنیل لاکتات ۳-هیدروکسیلاز؛ 4C-DHPL 3'H = ۴-کومارویل-۳',۴'-دی‌هیدروکسی‌فنیل لاکتات ۳-هیدروکسیلاز؛

Figure 1. Proposed biosynthetic pathway for rosmarinic acid in lamiaceae (Petersen *et al.*, 2009) and the position of the genes investigated in this study, which are marked in red. The enzymes involved in the pathway include: PAL = phenylalanine ammonia lyase; C4H = cinnamic acid 4-hydroxylase; 4CL = 4-coumaric acid CoA-ligase; TAT = tyrosine aminotransferase; HPPR = hydroxyphenylpyruvate reductase; RAS = rosmarinic acid synthase; 4C-pHPL 3'H = 4-coumaroyl-4'-hydroxyphenyllactate 3-hydroxylase; 4CpHPL 3'H = 4-coumaroyl-4'-hydroxyphenyllactate 3'-hydroxylase; Caf-pHPL 3'H = caffeoyl-4'-hydroxyphenyllactate 3'-hydroxylase; 4C-DHPL 3'H = 4-coumarol-3',4'-dihydroxyphenyllactate 3-hydroxylase

رویشگاه‌هایی با خاک و آب و هوای مختلف از سطح دریا تا ارتفاع ۱۵۰۰ متری بر روی سنگ‌های آهکی و در مناطق خشک و آفتابی نزدیک سواحل به وفور یافت می‌شوند. اما نزدیکی تاکسون‌های مختلف جنس *Origanum* از نظر شاخص‌های مورفولوژیکی، آناتومیکی، فیتوشیمیایی، ژنتیکی و فیزیولوژیکی، باعث شده است که محققان در سطح تقریباً تمامی رویشگاه‌های متعلق به تاکسون‌های مختلف این جنس در سطح ایران و جهان، با ابهامات و تناقضات متعددی در زمینه تشخیص هویت و رده‌بندی دقیق و مستند این تاکسون‌ها مواجه باشند. در نتیجه الگوی رده‌بندی این جنس همواره دستخوش اصلاح و به‌روزرسانی بوده است و فراهم کردن شواهد ژنتیکی و مولکولی برای کمک به شناسایی الگوی صحیح رده‌بندی تاکسونومیکی و روابط فیلوژنتیکی در این جنس، از گذشته به‌عنوان یک هدف مطالعاتی مهم و ارزشمند برای محققان این حوزه مطرح بوده است.

در گذشته در ایران مطالعاتی با هدف بررسی تنوع مورفولوژیکی جمعیت‌های مختلف گیاه مرزنجوش و شناسایی دقیق گونه‌ها و زیرگونه‌ها انجام شده که با نتایج متنوع و بعضاً متناقضی همراه بوده است، اما اغلب نتایج مؤید وجود تنوع زیاد از نظر صفات مهم در بین جمعیت‌ها در رویشگاه‌های سراسر کشور بوده است (Andi et al., 2011; Tarkesh Esfahani et al., 2024). بنابراین، پژوهش حاضر با هدف بررسی روابط فیلوژنتیکی گونه‌های جنس مرزنجوش بر اساس شناسایی و توالی‌یابی ژن‌های رزماریک اسید سیتریک (RAS) و هیدروکسی‌فیل‌پیروات ردوکتاز (HPPR) که دو ژن کلیدی مسیر بیوسنتز رزماریک اسید به‌عنوان یک شاخصه فیتوشیمیایی شناخته شده و برجسته در سطح اعضای تیره نعنائیان هستند، انجام شد. پرسش محوری این پژوهش، تعیین الگوی فیلوژنتیکی تیره نعنائیان (Lamiaceae) مبتنی بر توالی ژن‌های کلیدی مسئول سنتز اسید رزماریک (به‌عنوان متابولیت ثانویه شاخص) و ارزیابی میزان انطباق آن با طبقه‌بندی تاکسونومیک کلاسیک است. به‌علاوه، این مطالعه در پی آن است که با شناسایی توالی ژن‌های RAS و HPPR در گونه‌های مرزنجوش وحشی و مرزنجوش بستانی، برای اولین بار جایگاه این گیاهان بومی ایران را در روابط فیلوژنتیکی بین اعضای تیره نعنائیان تعیین کند و به

اگرچه گونه‌های مختلف *Origanum* spp. از زمان‌های دور به‌عنوان دارو و ادویه مورد استفاده قرار می‌گرفته‌اند، اما ارزیابی تنوع ژنتیکی، روابط فیلوژنتیکی و روند تکامل آن‌ها اخیراً مورد توجه قرار گرفته است. در گذشته مطالعات متعددی با هدف بررسی روابط فیلوژنتیکی جنس‌ها و گونه‌های متعلق به تیره نعنائیان بر اساس ژن‌های مهم این گیاهان گزارش شده است (Li et al., 2013; Dündar et al., 2013; Mansour et al., 2020; He et al., 2020; Chen et al., 2021; Niu et al., 2023). روابط فیلوژنتیکی در گونه‌های مختلف جنس مرزنجوش بومی یونان نیز بر اساس توالی سه ناحیه DNA هسته‌ای و پنج ناحیه کلروپلاستی مورد بررسی و بازنگری قرار گرفت و گزارش شد که توالی‌های هسته‌ای بهتر از انواع کلروپلاستی و میتوکندریایی می‌تواند روابط فیلوژنتیکی بین جنس‌ها، گونه‌ها و حتی زیرگونه‌های مورد بررسی را شناسایی کند (Antaloudaki et al., 2022). به‌طور کلی علی‌رغم وجود گزارش‌های متعدد از بهره‌گیری از ژن‌ها و توالی‌های کلروپلاستی برای بررسی روابط فیلوژنتیکی در گونه‌های گیاهی متعلق به تیره نعنائیان (Paton et al., 2018; He et al., 2020; Chen et al., 2021; Antaloudaki et al., 2022; Niu et al., 2023) و تیره‌های مختلف دیگر (Hosseini et al., 2018; Arbabi et al., 2023)، این توالی‌ها به‌دلیل وراثت تک‌والدی و داشتن تعداد زیادی مناطق حفاظت‌شده با تنوع بسیار کم، در مقایسه با توالی‌های هسته‌ای از توانایی کمتری در شناسایی روابط فیلوژنتیکی و تفکیک رده‌های تاکسونومیکی نزدیک، به‌ویژه در سطح گونه و زیرگونه برخوردارند. در حالی‌که توالی‌های هسته‌ای به‌خاطر وراثت دو والدی و روند تکاملی سریع‌تر نسبت به کلروپلاست و میتوکندری، قابلیت بسیار بیشتری در آشکارسازی دقیق روابط فیلوژنتیکی، بخصوص بین گونه‌ها و زیرگونه‌های نزدیک دارند (Hosseini et al., 2018; Antaloudaki et al., 2022).

به‌طور کلی در پهنه وسیعی از مناطق مدیترانه‌ای از جمله کشورهای یونان، سوریه، اردن، لبنان، فلسطین، قبرس، بخش‌هایی از جنوب ترکیه و شرق مصر و گاهی بخش‌هایی از غرب عراق، به وفور ابهاماتی در زمینه تمایز تاکسونومیکی گیاهان معطر تیره نعنائیان از جمله گونه‌های جنس مرزنجوش گزارش شده است (Katsiotis et al., 2009). این گونه‌ها در

ناخالصی‌های فنولی به میزان دو درصد (m/v) در ترکیب بافر استخراج DNA و نیز افزودن محلول استات سدیم ۳ مولار به میزان ۰/۱ برابر حجم محلول همراه با ایزوپروپانول در مرحله رسوب دهی انجام شد. ارزیابی کمیت و کیفیت DNA با دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۰/۸ درصد انجام شد.

جهت طراحی و ساخت آغازگرهای اختصاصی دو ژن *RAS* و *HPPR*، ابتدا توالی‌های شناسایی شده از این دو ژن در گونه‌های مختلف تیره *Lamiaceae* از بانک اطلاعاتی GenBank جستجو و دریافت شدند (جدول ۲). در نتیجه، ۱۰ توالی از نوع mRNA برای ژن *RAS* و ۱۶ توالی از نوع mRNA برای ژن *HPPR* در تیره نعنائیان شناسایی و برای بررسی‌های فیلوژنتیکی در این مطالعه استفاده شدند (جدول ۲). به منظور ریشه‌دار کردن درخت‌های فیلوژنتیکی و کمک به استنباط صحیح روابط تکاملی در سطح تیره، توالی ژن *RAS* در دو گونه *Ehretia asperula* Zoll. & Moritzi متعلق به تیره *Boraginaceae* و *Phacelia campanularia* A. Gray متعلق به تیره *Hydrophyllaceae* که هر دو در سطح تبار با اعضای تیره نعنائیان مشترک هستند (Lamiids)، به عنوان گونه‌های خارج گروه در ترسیم درخت فیلوژنتیکی استفاده شدند. این دو توالی نزدیکترین خویشاوندان تیره نعنائیان بودند که توالی ژن *RAS* در آن‌ها در GenBank قابل دسترسی بود. در مورد ژن *HPPR* نیز از دو گونه *Henckelia pumila* (D. Don) A. Dietr. متعلق به تیره *Gesneriaceae* و *Olea europaea* L. متعلق به تیره *Oleaceae* که هر دو در سطح رده با اعضای تیره نعنائیان مشترک هستند (Lamiales)، به عنوان برون‌گروه استفاده شدند (جدول ۲).

در مرحله بعد، با همردیف کردن مجموعه توالی‌های شناسایی شده برای هر ژن، یک توالی مورد توافق (Consensus sequence) به عنوان برآیند این توالی‌ها در اعضای تیره نعنائیان با استفاده از برنامه BioEdit ساخته شد و به عنوان الگو برای طراحی آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به اندازه بزرگ توالی‌های گزارش شده از ژن‌های *RAS* و *HPPR* که هر دو بزرگتر از ۱۰۰۰ جفت‌باز بود، به منظور افزایش کارایی تکنیر ژن در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و نیز

پرسش‌های مذکور به طور خاص در مورد این گونه‌ها پاسخ گوید. برای این منظور اطلاعات گونه‌هایی که توالی ژن‌های مورد مطالعه قبلاً در آن‌ها شناسایی و گزارش شده است، در بانک داده‌های بین‌المللی GenBank جستجو شد و آغازگرهای اختصاصی بر اساس توالی مناطق حفاظت شده‌تر و دارای همولوژی بیشتر در سطح DNA در این ژن‌ها در گیاهان تیره نعنائیان طراحی و ساخته شد. توالی ژن‌ها در دو گونه مرزنجوش بستانی و مرزنجوش وحشی تعیین و روابط فیلوژنتیکی و گروه‌بندی گونه‌های مختلف جنس مرزنجوش بر اساس توالی ژن‌های شناسایی شده بررسی شد. نتایج این تحقیق می‌تواند در زمینه اصلاح و تولید تولید گیاهان دارویی، صنعت پزشکی، داروسازی، زیست‌شناسی و سایر زمینه‌های مرتبط کاربرد داشته و در افزایش بهره‌وری اصلاح، تولید و فراوری مرزنجوش قابل استفاده باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: مواد گیاهی مورد استفاده در این مطالعه شامل بذر دو زیرگونه از مرزنجوش وحشی (*O. vulgare*) و گونه مرزنجوش بستانی (*O. majorana*) بود که از مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع ایران تهیه شد (جدول ۱). برای اطمینان بیشتر نتایج، تمام آزمایش‌های مولکولی شامل استخراج DNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و توالی‌یابی با استفاده از دو تکرار زیستی انجام شد.

استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز: بذرها ابتدا با اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و سپس با محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت سه دقیقه ضدعفونی شدند و سپس سه مرتبه و هر بار به مدت ۹۰ ثانیه با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. بذره‌های ضدعفونی شده به شیشه‌های کشت حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت MS ½ منتقل شدند. برای حذف اثر مواد فنولی و سایر عوامل کاهنده جوانه‌زنی، از ذغال فعال به میزان یک درصد (m/v) در ترکیب محیط کشت استفاده شد. هنگامی که گیاهچه‌ها به مرحله هشت برگی رسیدند از محیط کشت خارج، بافت سبز آن‌ها برداشت و به فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. استخراج DNA ژنومی به روش CTAB (Doyle and Doyle, 1987) با تغییرات اندک شامل افزودن بتامرکاپتواتانول به میزان ۰/۳ درصد (m/v) و PVP (Polyvinylpyrrolidone) جهت حذف

همپوشان به اندازه ۶۱۶ و ۴۷۹ جفت‌باز تقسیم شد. اندازه ناحیه همپوشان بین دو قطعه در هر دو ژن حدود ۱۵۰ جفت‌باز در نظر گرفته شد. به این ترتیب، پس از تعیین توالی دو قطعه و تلفیق آن‌ها با توجه به ناحیه همپوشان، می‌توان توالی ناحیه بزرگتری از ژن هدف را به‌دست آورد. آغازگرهای اختصاصی برای دو ژن مورد مطالعه با استفاده از برنامه Primer-BLAST ارائه شده در سایت مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) طراحی و توسط شرکت زیست‌فناوری پیشگام (تهران، ایران) ساخته شد (جدول ۳).

دستیابی به توالی ناحیه تا حد امکان بزرگ‌تری از ژن‌های مورد بررسی، طول توالی مورد توافق در هر ژن به دو قسمت کوچکتر همپوشان تقسیم شد. بنابراین برای هر ژن دو جفت آغازگر اختصاصی طراحی شد که در کنار هم ناحیه بزرگتری از ژن هدف را به‌صورت دو قطعه همپوشان تکثیر می‌کردند (شکل ۲). اندازه قطعه مورد توافق در ژن *RAS* قطعه‌ای با طول ۱۲۸۲ جفت‌باز بود از روی آن، دو قطعه کوتاه همپوشان به‌ترتیب به اندازه ۷۷۱ و ۶۷۶ جفت‌باز طراحی شد. توالی مورد توافق برای ژن *HPPR* نیز قطعه‌ای به طول ۹۴۴ جفت‌باز بود که به دو قطعه کوتاه

جدول ۱- گونه‌ها و زیرگونه‌های مرزنجوش مورد بررسی در این مطالعه

Table 1. *Origanum* species and subspecies assessed in this study

ردیف No.	گونه / زیرگونه Species / Subspecies	شناسه اختصاری Abbreviation	محل جمع‌آوری (منطقه / استان) Collection site (county / province)
1	<i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>viridulum</i>	O.v.Sil	سیلوانه / آذربایجان غربی Silvaneh / West Azerbaijan
2	<i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	O.v.Esf	اصفهان / اصفهان Isfahan / Isfahan
3	<i>Origanum majorana</i> L.	O.m.Pas	پاسارگاد / فارس Pasargad / Fars

جدول ۲- فهرست گونه‌های مورد استفاده در بررسی روابط فیلوژنتیکی تیره نعنائیان بر اساس توالی دو ژن *RAS* و *HPPR*

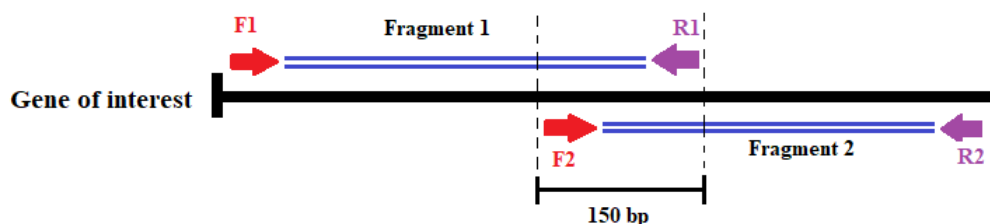
Table 2. List of species used in the study of phylogenetic relationships of the Lamiaceae family based on the sequences of the *RAS* and *HPPR* genes

ردیف No.	نام گونه Species name	شناسه دسترسی GenBank GenBank accession number	
		ژن <i>RAS</i> <i>RAS</i> gene	ژن <i>HPPR</i> <i>HPPR</i> gene
1	<i>Lavandula angustifolia</i> Miller	JF343521.1	----
2	<i>Coleus scutellarioides</i> (L.) Benth.	OQ032559.1	----
3	<i>Ocimum tenuiflorum</i> L.	MN542659.1	----
4	<i>Satureja khuzistanica</i> Jamzad	KY682077.1	MG515244.1
5	<i>Prunella vulgaris</i> L.	KM053280.1	KM053279.1
6	<i>Perilla frutescens</i> L.	KC355369.1	HM587131.1
7	<i>Salvia yangii</i> B.T. Drew	MW854245.1	MN248743.1
8	<i>Salvia abrotanoides</i> (Kar.) Sytsma	MW854244.1	MN248742.1
9	<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge.	KF220573.1	KF220566.1
10	<i>Agastache rugosa</i> (Fisch. and C.A.Mey.) Kuntze	MT268328.1	MT268327.1
11	<i>Salvia officinalis</i> L.	----	JX566894.1
12	<i>Melissa officinalis</i> L.	----	MW118284.1
13	<i>Mentha aquatica</i> L.	----	MG893900.1
14	<i>Mentha spicata</i> L.	----	MG893898.1
15	<i>Mentha longifolia</i> (L.) Huds.	----	MG869898.1
16	<i>Mentha x piperita</i> L.	----	MG893899.1
17	<i>Ocimum basilicum</i> L.	----	KJ004761.1
18	<i>Solenostemon scutellarioides</i> (L.) Benth.	----	AJ507733.2
19	<i>Scutellaria baicalensis</i> Georgi	----	KC834747.1
20	<i>Phacelia campanularia</i> A. Gray*	MH878833.1	----
21	<i>Ehretia asperula</i> Zoll. & Moritzi*	PX688503.1	----
22	<i>Henckelia pumila</i> (D.Don) A.Dietr**	----	XM073272835
23	<i>Olea europaea</i> L.**	----	XM022992761

جدول ۳- مشخصات آغازگرهای طراحی شده برای دو ژن *RAS* و *HPPR* بر اساس توالی مورد توافق این دو ژن در گیاهان تیره نعنائیان

Table 3. Specifications of primers designed for *RAS* and *HPPR* genes based on the consensus sequence of these two genes in Lamiaceae plants

نام ژن	شماره قطعه	توالی آغازگر رفت	توالی آغازگر برگشت	دمای اتصال (°C)
Gene name	Fragment No.	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Annealing temperature (°C)
<i>RAS</i>	1	AGAATCGACGATGGTGAGGC	GGTCGCGAGTGAGCTTGAA	56
	2	CCCTCCACTTCATCAACACG	AAGCGCTCCATATGCTGCTT	54
<i>HPPR</i>	1	GAGGCGATCGGTGTTCTGAT	TGGAGTCAGGGCACATGCTA	57
	2	GGCAGAATCGGGTTAGCAGT	CCACAGGAGTTAACAGAGGCTT	58



شکل ۲- الگوی مورد استفاده برای طراحی آغازگر در دو ژن *RAS* و *HPPR* به صورت دو قطعه همپوشان که با دو جفت آغازگر اختصاصی تکثیر می شوند. با تلفیق توالی دو قطعه، می توان توالی ناحیه بزرگی از ژن هدف را به دست آورد. F1 و R1 به ترتیب نشانگر آغازگرهای رفت و برگشت برای قطعه اول و F2 و R2 به ترتیب نشانگر آغازگرهای رفت و برگشت برای قطعه دوم است.

Figure 2. The template used for primer design in the *RAS* and *HPPR* genes as two overlapping fragments that are amplified with two primer pairs. By combining the sequences of the two fragments, the sequence of a large region of the target gene may be obtained. F1 and R1 indicate the forward and reverse primers for the first fragment, and F2 and R2 indicate the forward and reverse primers for the second fragment, respectively.

به مدت ۷۵ دقیقه الکتروفرز شدند.

توالی یابی و تجزیه و تحلیل داده ها: پس از آشکارسازی و تأیید ماهیت نوارهای به دست آمده، محصولات PCR جهت توالی یابی به شرکت زیست فناوری پیشگام (تهران، ایران) ارسال شد. به منظور بررسی قابلیت اطمینان و تکرارپذیری نتایج، توالی یابی تمام قطعات در این مطالعه در هر دو جهت رفت و برگشت انجام شد. با دریافت نتایج توالی یابی، مونتاژ قطعات دوگانه مربوط به هر ژن با توجه به توالی مناطق همپوشان که در مرحله طراحی آغازگرها لحاظ شده بود، با استفاده از نرم افزار BioEdit صورت گرفت. پس از مونتاژ توالی قطعات همپوشان و حذف نواحی غیرقابل اعتماد از دو سر قطعه نهایی، توالی شناسایی شده برای دو ژن *RAS* و *HPPR* در سه تاکسون مورد مطالعه به دست آمد و برای ثبت به پایگاه داده های توالی نوکلئوتیدی GenBank ارائه و ثبت نهایی شش توالی انجام شد (جدول ۴). برنامه BLASTn بر روی توالی های شناسایی شده در این مطالعه همراه با توالی هایی که قبلاً از این دو ژن در بانک داده های GenBank ثبت شده بود، اجرا شد.

برای تکثیر قطعات DNA، در این مطالعه واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل محلول مستر میکس ۵× (Amplicon، دانمارک) به مقدار ۷ میکرولیتر، آغازگرهای رفت و برگشت (۱۰ پیکومولار) هر کدام به مقدار ۱ میکرولیتر، DNA ژنومی (با غلظت ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر) به مقدار ۲ میکرولیتر و آب دی یونیزه به مقدار ۴ میکرولیتر برای هر نمونه در دستگاه ترمال سایکلر BioRad مدل C1000 (BioRad، آمریکا) انجام شد. چرخه های حرارتی شامل واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت چهار دقیقه و به دنبال آن، تکرار از چرخه تکثیر سه مرحله ای شامل واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگر در دمای ۵۴ تا ۵۸ درجه سانتی گراد (بسته به آغازگر) به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش رشته در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه بود. محصولات PCR روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد حاوی رنگ اختصاصی نوکلئیک اسید RedSafe (iNtRON، کره جنوبی) بارگذاری و با ولتاژ ۸۰

O.v.Esf و O.m.Pas به ترتیب با طول ۱۳۲۲ و ۱۳۱۹ جفت‌باز به‌دست آمد. با توجه به این‌که در گیاه O.v.Sil تنها آغازگرهای طراحی شده در قطعه دوم منجر به تولید نوار شد، اندازه این قطعه از ژن ۷۷۵ جفت‌باز بود. اندازه توالی مورد توافق شناسایی شده برای ژن RAS در گیاهان تیره نعنائیان ۱۲۸۲ جفت‌باز بود که انطباق نزدیکی با اندازه ژن در گیاهان مورد بررسی داشت. این دو توالی به‌دست آمده در این مرحله از طریق برنامه BLASTn هم‌ردیف شدند تا میزان شباهت بین توالی کامل ژن RAS در دو گونه اصلی جنس *Origanum* مشخص شود. نتایج نشان داد که توالی این قطعه در دو گونه بر اساس شاخص درصد همسانی به میزان بیش از ۹۷ درصد مشابه است (جدول ۵).

شناسایی و توالی‌یابی ژن HPPR: در مورد ژن HPPR اندازه توالی مورد توافق حاصل از هم‌ردیفی توالی‌های تیره نعنائیان قطعه‌ای به اندازه ۹۴۴ جفت‌باز بود. از این توالی نیز دو قطعه کوتاه همپوشان به‌ترتیب به اندازه ۶۱۶ و ۴۷۹ جفت‌باز طراحی شد که در ناحیه‌ای به طول حدود ۱۵۰ جفت‌باز همپوشانی داشتند. این دو سری آغازگر در هر سه گیاه مورد آزمایش با موفقیت به ژنوم میزبان متصل شده و منجر به تکثیر و تولید نوار گردید؛ بنابراین توالی تقریباً کاملی از ژن HPPR در هر سه گیاه مورد بررسی قابل شناسایی و توالی‌یابی بود (شکل ۴).

در نهایت جهت بررسی روابط فیلوژنتیکی بین گونه‌ها بر اساس توالی دو ژن RAS و HPPR، کلیه توالی‌های قابل دسترس از این دو ژن که در گونه‌های مختلف تیره نعنائیان در بانک داده GenBank ثبت شده بود (جدول ۲)، همراه با توالی‌های مربوط به *Origanum spp.* که در این مطالعه شناسایی شد (جدول ۴)، با استفاده از الگوریتم Maximum Likelihood و با محاسبه فواصل تکاملی به روش Tamura-Nei در نرم‌افزار MEGA (نسخه ۱۱) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. اعتبارسنجی درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با استفاده از آزمون Bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار انجام شد.

نتایج و بحث

شناسایی و توالی‌یابی ژن RAS: اندازه قطعه مورد توافق حاصل از هم‌ردیفی توالی‌های تیره نعنائیان در ژن RAS قطعه‌ای با طول ۱۲۸۲ جفت‌باز بود که به دو قطعه کوتاه همپوشان کوچکتر به اندازه ۷۷۱ و ۶۷۶ جفت‌باز تقسیم شد. در دو گیاه O.v.Esf و O.m.Pas این دو قطعه در واکنش PCR تکثیر شده و نوار حاصل از هر دو قطعه با اندازه مورد انتظار به‌دست آمد، ولی در گیاه O.v.Sil تنها آغازگرهای طراحی شده برای قطعه دوم منجر به تکثیر و تولید نوار شد، در حالی که برای قطعه اول این ژن تکثیری مشاهده نشد (شکل ۳).

پس از مونتاژ توالی قطعات همپوشان و حذف نواحی غیرقابل اعتماد از دو سر قطعه نهایی، توالی ژن RAS در دو تاکسون

جدول ۴- اطلاعات مربوط به ثبت توالی‌های شناسایی شده برای دو ژن RAS و HPPR در گونه‌های جنس *Origanum spp.* در پایگاه داده GenBank

Table 4. Information related to the registration of sequences identified for the RAS and HPPR genes in *Origanum spp.* species in the GenBank database

ردیف No.	نام گونه Species name	شناسه دسترسی GenBank accession number	
		ژن RAS	ژن HPPR
		RAS gene	HPPR gene
1	<i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>viridulum</i>	PX610330.1	PX641990.1
2	<i>Origanum vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	PX610329.1	PX641989.1
3	<i>Origanum majorana</i>	PX610328.1	PX641988.1

جدول ۵- اطلاعات ساختاری و شاخص‌های BLASTn مربوط به قطعات شناسایی شده از ژن RAS در گونه‌های *O. vulgare* و *O. majorana*

Table 5. Structure information and BLASTn indices related to identified fragments of the RAS gene in *O. vulgare* and *O. majorana* species

نام ژن Gene name	گونه / زیرگونه Species / Subspecies	اندازه قطعه تکثیرشونده Amplicon size (bp)	نتایج BLASTn BLASTn results	
			درصد پوشش Query cover (%)	درصد شباهت Percent identity (%)
RAS	<i>O. vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i> <i>O. majorana</i>	1322 1319	91	97.20



شکل ۳- تصویر ژل الکتروفورز مربوط به تکثیر ژن *RAS* در گونه‌های مختلف جنس *Origanum* spp. ستون اول از سمت چپ نشان‌دهنده نشانگر اندازه (لدر ۱۰۰ جفت‌باز) می‌باشد.

Figure 3. Electrophoresis gel image of *RAS* amplification in different *Origanum* spp. species. The first column from the left indicates the size marker (100 bp ladder).



شکل ۴- تصویر ژل الکتروفورز مربوط به تکثیر ژن *HPPR* در گونه‌های مختلف جنس *Origanum* spp. ستون اول از سمت چپ نشان‌دهنده نشانگر اندازه (لدر ۱۰۰ جفت‌باز) می‌باشد.

Figure 4. Electrophoresis gel image of *HPPR* amplification in different *Origanum* spp. species. The first column from the left indicates the size marker (100 bp ladder).

انتظار داشت (جدول ۶).

از طرفی، هم‌ردیفی سه توالی به‌دست آمده نشان داد که این ناحیه اضافی در هر سه گیاه توالی مشابهی دارد و توالی متناظر آن نیز در سایر گونه‌های نعنائیان وجود ندارد. این شواهد نشان داد که احتمالاً این قطعه بزرگ، یک توالی ایترونی است که در جریان ویرایش RNA از توالی رونویسی شده ژن *HPPR* حذف می‌شود. برای پی بردن به ماهیت قطعی این ناحیه اضافه، سه توالی به‌دست آمده برای ژن *HPPR* با توالی کامل این ژن در گیاه مریم‌گلی قرمز (*Salvia miltiorrhiza*)

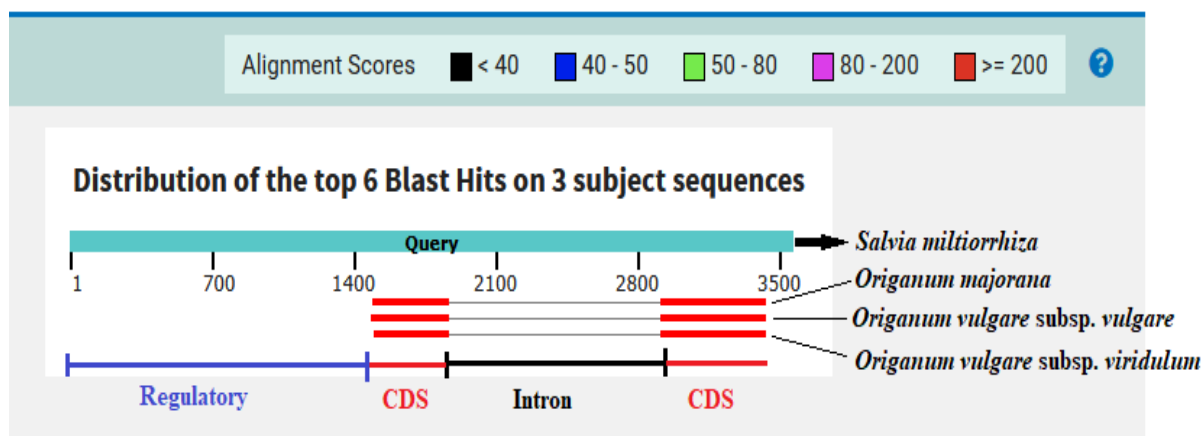
پس از انجام توالی‌یابی و دریافت نتایج، با مونتاژ قطعات همپوشان و حذف نواحی غیرقابل اعتماد از دو سر قطعه نهایی، توالی ژن *HPPR* در سه گیاه *O.v.Sil*، *O.v.Esf* و *O.m.Pas* به‌ترتیب با طول ۲۲۱۷، ۲۲۲۲ و ۲۲۰۳ جفت‌باز به‌دست آمد (جدول ۵). اندازه مورد انتظار برای توالی ژن *HPPR* که با توجه به توالی مورد توافق این ژن از اعضای تیره نعنائیان به‌دست آمده بود، برابر با ۹۴۴ جفت‌باز بود. بنابراین، نتایج نشان داد که توالی به‌دست آمده در هر سه گیاه مورد آزمایش تفاوتی حدود ۱۸۰۰ جفت‌باز با اندازه مورد

P. campanularia از گونه‌های تیره نعنائیان جدا شدند (شکل ۶). سپس گونه *Prunella vulgaris* در قالب یک شاخه مجزا از سایر گونه‌ها جدا شد. این گیاه از نظر توالی ژن *RAS* فاصله زیادی با سایر گونه‌های تیره نعنائیان نشان داد و دورترین گونه از نظر توالی این ژن نسبت به سایر گونه‌ها بود. شاخه اصلی بعدی شامل سایر جنس‌ها و گونه‌های نعنائیان بود. در این شاخه، گونه‌های مختلف *Origanum* در زیرشاخه‌ای مجزا در کنار هم طبقه‌بندی شدند. در جنس *Origanum* شباهت بیشتری بین *O. majorana* و *O. vulgare* subsp. *vulgare* مشاهده شد و در مرتبه بعدی به فاصله نزدیکی از آن‌ها گونه *O. vulgare* subsp. *viridulum* قرار گرفت. به‌طور کلی در این درخت، شباهت بالا بین گونه‌های یک جنس را می‌توان با مشاهده الگوی گروه‌بندی در دو جنس *Origanum* spp. و *Salvia* spp. L. مشاهده کرد. در این دو جنس که تعداد گونه‌های مورد بررسی از آن‌ها بیش از یک گونه بوده است، همه در یک زیرشاخه در نزدیکی هم و با فاصله معنی‌داری از سایر گونه‌های خویشاوند قرار گرفتند و یک زیرشاخه مختص به جنس را تشکیل دادند. در مطالعات گذشته نیز محققان گزارش کرده‌اند که فواصل ژنتیکی بین گونه‌های جنس *Origanum* در مقایسه با فواصل بین گونه‌های سایر جنس‌ها در تیره نعنائیان به‌طور معنی‌داری کمتر است و در نتیجه، ابهامات بیشتری نیز در مرزبندی دقیق تاکسونومیک گونه‌های این جنس بروز می‌کند (Mansour et al., 2020; Antaloudaki et al., 2022).

Bunge) که تنها رکورد ثبت شده از توالی کامل ژن *HPPR* شامل نواحی رمزکننده، نواحی تنظیمی و ایترون‌های این ژن در پایگاه GenBank بود (کد دسترسی در GenBank: EF458148.1)، همردیف شد. نتایج همردیفی نشان داد که نواحی رمزکننده ژن *HPPR* در هر چهار توالی با شباهت بالایی با هم همردیف می‌شوند، در حالی که توالی ناحیه اضافه شناسایی شده در گیاهان *Origanum* با ناحیه ایترون در گیاه مریم گلی قرمز کاملاً متفاوت بود (شکل ۵). علاوه بر این، توالی‌های حفاظت شده ایترون‌های یوکاریوتی شامل GT در انتهای ۳' و AG در انتهای ۵' ایترون در هر سه توالی به‌دست آمده در این مطالعه دقیقاً در موقعیت مورد انتظار مشاهده شد. مجموعه این شواهد نشان می‌دهد که این مناطق اضافه، به احتمال زیاد یک ایترون بزرگ در ژن *HPPR* هستند که در گونه‌های مختلف جنس *Origanum* با شباهت بالایی از نظر توالی و موقعیت، وجود دارند. نتایج BLASTn نشان داد که توالی ناحیه رمز کننده از ژن‌های *RAS* و *HPPR* در دو گونه مورد بررسی با سایر رکوردهای مورد بررسی و ثبت شده در بانک داده‌های GenBank شباهت بسیار بالایی (امتیاز همردیفی بالاتر از ۲۰۰) دارد. همچنین نشان داد که توالی ناحیه ایترون ژن *HPPR* در دو گونه *O. vulgare* و *O. majorana* بسیار شبیه، اما با ناحیه ایترونی در جنس *Salvia* کاملاً متفاوت است (شکل ۵). روابط فیلوژنتیکی بر اساس توالی ژن *RAS* در درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده برای ژن *RAS* در گیاهان تیره نعنائیان ابتدا دو گونه خارج گروه شامل *E. Asperula* و

جدول ۶- اطلاعات ساختاری قطعات شناسایی شده ژن *HPPR* در تاکسون‌های مورد مطالعه در جنس *Origanum*
Table 6. Information on structure of the identified fragments of *HPPR* gene in assessed *Origanum* taxa

نام ژن Gene name	گونه/زیرگونه Species /Subspecies	اندازه قطعه تکثیرشونده (جفت باز) Amplicon size (bp)	اختلاف اندازه مورد انتظار و اندازه واقعی قطعه تکثیر شده (جفت باز) Difference between actual and expected size of the amplicon (bp)
<i>HPPR</i>	<i>O. vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	2217	1806
	<i>O. majorana</i>	2203	1820
	<i>O. vulgare</i> subsp. <i>viridulum</i>	2222	1314



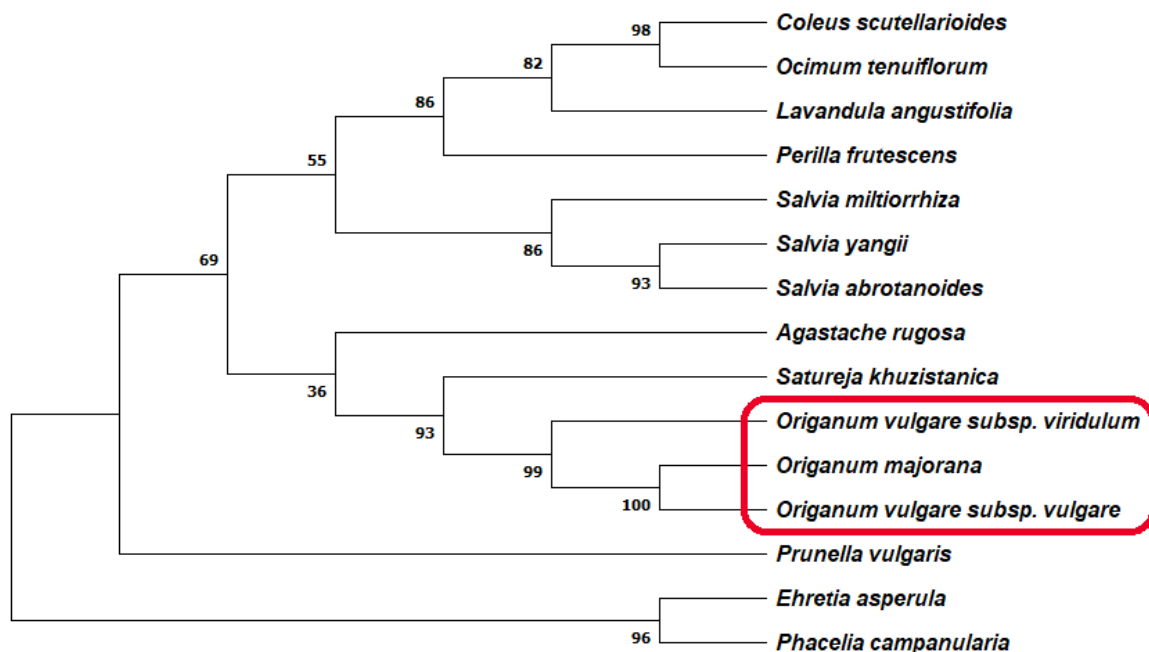
شکل ۵- شمای گرافیکی از همردیفی توالی ژن *HPPR* در گیاه *Salvia miltiorrhiza* Bunge با توالی‌های شناخته شده از این ژن در *Origanum* spp. که با استفاده از الگوریتم BLASTn اجرا شده است. در قسمت پایین شکل، Intron، CDS و Regulatory به ترتیب نشان‌دهنده ناحیه اینترونی، ناحیه رمزکننده و نواحی تنظیمی ژن است.

Figure 5. Graphic summary of the alignment of the HPPR gene sequence in *Salvia miltiorrhiza* Bunge against sequences known in *Origanum* spp. performed using the BLASTn algorithm. In the lower part of the figure, Intron, CDS, and Regulatory represent the intronic region, coding region, and regulatory regions of the gene, respectively.

مشترک در پهنه جغرافیایی محل رویش و اشتراک در روند فرایند تکاملی را می‌توان از دیگر دلایل احتمالی برای شباهت ژنتیکی بالا بین تاکسون‌های بومی دانست. آماره حاصل از آزمون Bootstrap با دقت بالایی میزان اعتبار و قابلیت اطمینان شاخه حامل گونه‌های بومی در این درخت را تأیید کرد (شکل ۶).

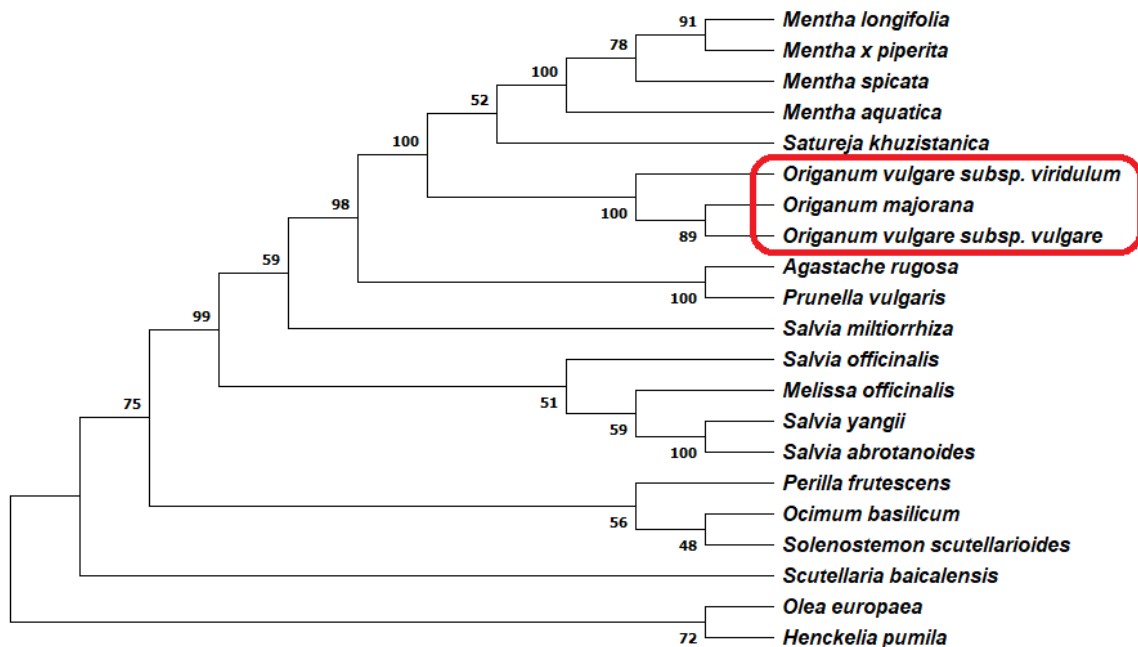
روابط فیلوژنتیکی بر اساس توالی ژن *HPPR*: توالی شناسایی شده برای ژن *HPPR* در *Origanum* spp. شامل یک ناحیه اینترونی بزرگ (حدود ۱۳۰۰ جفت‌باز) بود که در هر سه گونه مورد بررسی مشاهده شد و توالی آن شباهت بالایی بین سه گونه نشان داد. از آنجا که با حذف اینترون‌ها و نواحی تنظیمی از توالی ژن‌های مورد بررسی در روابط فیلوژنتیکی می‌توان این روابط را بر اساس نواحی رمزکننده پروتئین (CDS) و با اعتبار بیشتری مورد مطالعه قرار داد، در این مطالعه نیز روابط فیلوژنتیکی بر اساس توالی ناحیه رمزکننده ژن *HPPR* بررسی شد. بدین منظور، توالی نواحی اینترونی و تنظیمی از همه رکوردهای شناسایی شده در GeneBank و نیز توالی‌های متعلق به *Origanum* spp. که در این مطالعه به‌دست آمد، حذف گردید و تنها نواحی رمزکننده در همه توالی‌ها نگه داشته شد (شکل ۷).

با نگاه دقیق‌تر به این درخت فیلوژنتیک، مشخص شد که گونه‌های بومی ایران در یک زیرشاخه در نزدیکی هم قرار گرفته‌اند. در بین گونه‌های مورد بررسی، گیاه مرزه خوزستانی (*Satureja khuzistanica* Jamzad) شبیه‌ترین گونه از نظر روند تکاملی ژن *RAS* به گونه‌های جنس *Origanum* بود. با توجه به اینکه گونه‌های مورد بررسی از جنس *Origanum* و نیز مرزه خوزستانی از گونه‌های بومی ایران هستند، یکی از دلایل این شباهت فیلوژنتیکی را می‌توان فاصله جغرافیایی نزدیک بین رویشگاه‌های طبیعی این گونه‌ها و احتمال بیشتر برای وقوع جریان ژنی در بین آن‌ها دانست. این نتیجه در مورد تاکسون‌های متعدد از جنس *Origanum* بومی کشور یونان نیز گزارش شده و نزدیکی ژنتیکی بیشتر بین گونه‌های متعلق به رویشگاه‌های نزدیک، به وقوع جریان ژن در بین این جمعیت‌ها نسبت داده شده است (Antaloudaki et al., 2022). در مورد مرزنجوش بومی ایران نیز محققان با مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف و ارتباط آن با الگوی توزیع جغرافیایی آنها، فواصل ژنتیکی نزدیک‌تر بین گونه‌ها را به وقوع جریان ژنتیکی بین آن‌ها و اشتراکات بیشتر در طی مسیر تکاملی نسبت دادند (Tarkesh Esfahani et al., 2025). بنابراین، وجود نیای



شکل ۶- درخت فیلوژنتیک ترسیم شده با استفاده از روش Maximum likelihood در نرم‌افزار MEGA11 بر اساس توالی ژن *Rosmarinic acid synthase (RAS)* در تاکسون‌های مختلف تیره نعنائیان که جایگاه *Origanum* spp. در آن مشخص شده است. اعداد روی گره‌ها نشان‌دهنده آماره آزمون Bootstrap برای بررسی اعتبار گره‌ها می‌باشد.

Figure 6. Phylogenetic tree drawn using the Maximum likelihood method in MEGA11 software based on *Rosmarinic acid synthase (RAS)* gene sequences in different taxa of the lamiaceae family, with the position of *Origanum* spp. highlighted. The numbers on the nodes indicate the Bootstrap test statistics to check the validity of the nodes.



شکل ۷- درخت فیلوژنتیک ترسیم شده با استفاده از روش Maximum likelihood در نرم‌افزار MEGA11 بر اساس توالی نواحی رمزکننده ژن *Hydroxyphenylpyruvate reductase (HPPR)* در تاکسون‌های مختلف تیره نعنائیان که جایگاه *Origanum* spp. در آن مشخص شده است. اعداد روی گره‌ها نشان‌دهنده آماره آزمون Bootstrap برای بررسی اعتبار گره‌ها می‌باشد.

Figure 7. Phylogenetic tree drawn using the Maximum likelihood method in MEGA11 software based on the sequences of the coding regions of *Hydroxyphenylpyruvate reductase (HPPR)* gene in different taxa of the lamiaceae family, with the position of *Origanum* spp. highlighted. The numbers on the nodes indicate the Bootstrap test statistics to check the validity of the nodes.

در درخت حاصل، ابتدا دو گونه خارج گروه شامل *H. pumila* و *O. europaea* از گونه‌های متعلق به تیره نعنائیان جدا شدند و اعتبار نتایج به‌دست آمده در آشکارسازی روابط فیلوژنتیکی در سطح تیره به تأیید رسید (شکل ۷). در این درخت، گونه‌های *Origanum* در یک زیرشاخه مجزا همراه با زیرشاخه متعلق به گونه‌های جنس *Mentha* در یک شاخه قرار گرفتند. گونه مرزه خوزستانی (*S. khuzestanica*) که یک گونه بومی ایران به شمار می‌آید در اینجا نیز در همین شاخه و در کنار گونه‌های *Mentha* در نزدیک‌ترین فاصله به زیرشاخه *Origanum spp.* قرار گرفت. این نتایج نشان می‌دهد که گیاهان مرزنجوش و نعنا از نظر تغییرات تکاملی در نواحی رمزکننده ژن *HPPR* شبیه‌ترین تاکسون‌ها در تیره نعنائیان هستند. در زیرشاخه *Origanum*، در این حالت نیز دو گونه *O. majorana* و *O. vulgare* subsp. *vulgare* شباهت بیشتری به هم نشان دادند و در فاصله کمی از آن‌ها *Origanum vulgare* subsp. *viridulum* قرار گرفت. این نتیجه نشان می‌دهد که روابط تکاملی بر اساس توالی تک‌ژن‌ها در گیاهان بخصوص در سطح درون جنسی می‌تواند با شاخص‌های تاکسونومیکی و الگوی مرسوم شباهت‌های بین‌گونه‌ای در یک جنس، تفاوت داشته باشد. مطالعه تبارشناختی آنتالوداکی و همکاران (Antaloudaki et al., 2022) بر روی گونه‌ها و زیرگونه‌های جنس *Origanum* با استفاده از توالی‌های هسته‌ای و کلروپلاستی، منجر به شناسایی ناهمخوانی‌های متعددی با روابط فیلوژنتیکی کلاسیک گزارش شده توسط ایتسوارت (Ietswaart, 1980) گردید. همان‌طور که در گروه‌بندی بر اساس ژن *RAS* مشاهده شد، در اینجا نیز دو گونه *S. yangii* و *S. abrotanoides* به‌عنوان نزدیک‌ترین گونه‌ها بر اساس توالی ناحیه رمزکننده ژن *HPPR* شناخته شدند. در مرتبه بعد نیز، دو گونه نعنا فلفلی (*Mentha × piperita* L.) و نعنا پونه (*M. longifolia* (L.) Huds.) و نیز دو گونه نعنا کره‌ای (*A. rugosa*) و نعنا چمنی (*P. vulgaris* L.) بیشترین شباهت را از نظر روند تکاملی این ژن در تیره نعنائیان نشان دادند.

در این مطالعه توالی دو ژن *Rosmarinic acid synthase* (*RAS*) و *Hydroxyphenylpyruvate reductase* (*HPPR*) برای اولین بار در دو گونه مهم جنس مرزنجوش شامل *O. vulgare* و *O. majorana* جداسازی و توالی‌یابی شد. همچنین ویژگی‌های ساختاری ژن *HPPR* و توالی ناحیه ایترون و نواحی رمزکننده در این ژن مشخص شد. با استفاده از این اطلاعات، تصویر جدیدتر و جامع‌تری از روابط فیلوژنتیکی و تکاملی گیاهان تیره نعنائیان به‌دست آمد. بررسی روابط فیلوژنتیکی نشان داد که نزدیکی فاصله جغرافیایی در گونه‌های بومی مناطق مختلف کشور می‌تواند با نزدیکی آن‌ها در سیر تکاملی مبتنی بر ژن‌های رمزکننده مسیر بیوستز رزمارینیک اسید ارتباط داشته باشد. رزمارینیک اسید از مهمترین متابولیت‌های ثانویه دارویی است که در اغلب گیاهان تیره نعنائیان (Lamiaceae) از جمله در گونه‌های مختلف جنس مرزنجوش به مقدار قابل توجهی ساخته می‌شود. بنابراین این اطلاعات می‌تواند در بهینه‌سازی فرآیند تولید و فراوری گیاه مرزنجوش و برنامه‌ریزی برای استحصال بیشتر متابولیت‌های دارویی ارزشمند آن و بررسی ساز و کار تغییر در الگوی بیان ژن‌ها و فعالیت آنزیم‌های درگیر در مسیر بیوستز رزمارینیک اسید، از جمله نقش راه‌اندازها و پیش‌ژن‌ها و ارتباط متقابل آن‌ها با عوامل رونویسی در جهت افزایش تولید متابولیت‌های دارویی مفید باشد. همچنین این نتایج نقش قابل توجهی در غنی‌سازی بانک داده‌های بین‌المللی اطلاعات ژنومی و شناسایی عمیق‌تر گیاه مرزنجوش و روابط فیلوژنتیکی بین گونه‌های مختلف این جنس و سایر جنس‌ها و گونه‌های تیره نعنائیان دارد و می‌تواند کمک مؤثری در جهت برنامه‌ریزی برای اصلاح ژنتیکی این گیاهان دارویی ارزشمند بومی کشور باشد.

سپاسگزاری

اجرای این پژوهش با حمایت‌های مادی و سازمانی دانشگاه یزد میسر شده است. نویسندگان به دلیل این حمایت‌ها از دانشگاه یزد قدردانی می‌نمایند.

References

- Andi, S.A., Nazeri, V., Zamani, Z. and Hadian, J. (2011). Morphological diversity of wild *Origanum vulgare* (Lamiaceae) in Iran. *Iranian Journal of Botany*, 17(1): 88-97.
<https://doi.org/10.22092/ijb.2011.101630>
- Antaloudaki, E., Mylonas, M., Kypriotakis, Z. and Poulakakis, N. (2022). Phylogenetic relationships of *Origanum* taxa (Lamiaceae) from Greece: Initial insights from molecular and morphological data. *Botanica Serbica*, 46(1): 71-83.
<https://doi.org/10.2298/BOTSERB2201071A>
- Arbabi, H., Kekhasaber, M., Fahmideh, L. and Ghasemi Omran, V. (2023). Phylogenetic analysis of some *Luffa* genotypes based on the sequence of intergenic region of trnH-psbA. *Plant Genetic Research*, 9(2): 83-94 (In Persian).
<https://doi.org/10.22034/pgr.9.2.7>
- Azizi, A., Wagner, C., Honermeier, B. and Friedt, W. (2009). Intraspecific diversity and relationship between subspecies of *Origanum vulgare* revealed by comparative AFLP and SAMPL marker analysis. *Plant Systematics and Evolution*, 281: 151-160.
<https://doi.org/10.1007/s00606-009-0197-1>
- Chen, G., Wang, L.G. and Wang, Y.H. (2021). Complete chloroplast genome sequence and phylogenetic analysis of *Clerodendrum japonicum* (Thunb.) Sweet (Ajugoideae, Lamiaceae). *Mitochondrial DNA Part B*, 6(8): 2218-2220.
<https://doi.org/10.1080/23802359.2021.1944367>
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. (1987) A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. *Phytochemistry Bulletin*, 19(1): 11-15.
- Dündar, E., Akçiçek, E., Dirmenci, T. and Akgün, Ş. (2013). Phylogenetic analysis of the genus *Stachys* sect. *Eriostomum* (Lamiaceae) in Turkey based on nuclear ribosomal ITS sequences. *Turkish Journal of Botany*, 37(1): 14-23.
<https://doi.org/10.3906/bot-1203-26>
- He, S.L., Yang, Y. and Tian, Y. (2020). Characteristic and phylogenetic analyses of chloroplast genome for *Mentha haplocalyx* (Lamiaceae). *Mitochondrial DNA Part B*, 5(3): 2099-2100.
<https://doi.org/10.1080/23802359.2019.1680322>
- Hosseini, S.Z., Shiran, B. and Ebrahimi, M.A. (2018). Study on phylogenetic relationship among some of iranian wild almond species using sequences of ITS1-5.8S rDNA-ITS2 region and chloroplastic trnL. *Plant Genetic Research*, 5(2): 17-28 (In Persian).
<https://doi.org/10.29252/pgr.5.2.17>
- Ietswaart, J.H. (1980). A taxonomic revision of the genus *Origanum* (Labiatae). *Leiden Botanical Series*, 4(1): 1-153.
- Jafari, S.H., Arani, A.M. and Esfahani, S.T. (2023). The combined effects of rhizobacteria and methyl jasmonate on rosmarinic acid production and gene expression profile in *Origanum vulgare* L. under salinity conditions. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42(3): 1472-1487.
<https://doi.org/10.1007/s00344-022-10632-2>
- Jamzad, Z. (2013). A survey of Lamiaceae in the flora of Iran. *Rostaniha*, 14(1): 59-67 (In Persian).
<https://doi.org/10.22092/botany.2013.101317>
- Katsiotis, A., Nikoloudakis, N., Linos, A., Drossou, A. and Constantinidis, T. (2009). Phylogenetic relationships in *Origanum* spp. based on rDNA sequences and intra-genetic variation of Greek *O. vulgare* subsp. *hirtum* revealed by RAPD. *Scientia Horticulturae*, 121(1): 103-108.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.01.015>
- Li, Q.Q., Li, M.H., Yuan, Q.J., Cui, Z.H., Huang, L.Q. and Xiao, P.G. (2013). Phylogenetic relationships of *Salvia* (Lamiaceae) in China: evidence from DNA sequence datasets. *Journal of Systematics and Evolution*, 51(2): 184-195.
<https://doi.org/10.1111/j.1759-6831.2012.00232.x>
- Mansour, H.M., Younis, R.A., Eldomiati, F.M., Rashed, M.A. and Hassanein, S. H. (2020). Phylogenetic analyses of some Egyptian genus of Lamiaceae family using rbcL sequences. *Arab Universities Journal of Agricultural Sciences*, 28(1): 229-237.
<https://doi.org/10.21608/ajs.2020.26513.1184>
- Mehdizadeh, L., Najafgholi, H.M., Biouki, R.Y. and Moghaddam, M. (2018). Chemical composition and antimicrobial activity of *Origanum vulgare* subsp. *viride* essential oils cultivated in two different regions of Iran. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 21(4): 1062-1075.
<https://doi.org/10.1080/0972060X.2018.1491329>
- Neeru, V. (2015). *Origanum majorana* L.-phyto-pharmacological review. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 6 (4): 261-267.
- Niu, Y., Qin, Q., Dong, Y., Wang, X., Zhang, S. and Mu, Z. (2023). Chloroplast genome structure and phylogenetic analysis of 13 Lamiaceae plants in Tibet. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 28(6): 110.
<https://doi.org/10.31083/j.fbl2806110>

- Papaioannou, C., Zeliou, K., Trigas, P. and Papasotiropoulos, V. (2020). High resolution melting (HRM) genotyping in the genus *Origanum*: molecular identification and discrimination for authentication purposes. *Biochemical Genetics*, 58 (5): 725-737.
<https://doi.org/10.1007/s10528-020-09970-1>
- Paton, A., Mwanyambo, M. and Culham, A. (2018). Phylogenetic study of *Plectranthus*, *Coleus* and allies (Lamiaceae): taxonomy, distribution and medicinal use. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 188(4): 355-376.
<https://doi.org/10.1093/botlinnean/boy064>
- Petersen, M., Abdullah, Y., Benner, J., Eberle, D., Gehlen, K., Hücherig, S. and Wolters, S. (2009). Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry*, 70 (15-16): 1663-1679.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.05.010>
- Sik, B., Kapcsándi, V., Székelyhidi, R., Hanczné, E.L. and Ajtony, Z. (2019). Recent advances in the analysis of rosmarinic acid from herbs in the Lamiaceae family. *Natural Product Communications*, 14(7): 1-10.
<https://doi.org/10.1177/1934578X19864216>
- Tarkesh Esfahani, S., Pourgholamian, F. and Saravi, A.T. (2024). Time and concentration dependent changes in antioxidant and photosynthetic capacity of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) in response to exogenous methyl jasmonate. *Russian Journal of Plant Physiology*, 71(3): 87.
<https://doi.org/10.1134/S1021443724604907>
- Tarkesh Esfahani, S., Salesi, S., Rezaei, R. and Mosleh Arani, A. (2025). Genetic diversity in Iranian *Origanum* L. (Lamiaceae) populations in relationship to geographic distribution as revealed by SRAP and SCoT molecular markers. *Russian Journal of Genetics*, 61(6): 651-663.
<https://doi.org/10.1134/S1022795425700188>
- Zhao, Y., Yang, Y.H., Ye, M., Wang, K.B., Fan, L.M. and Su, F.W. (2021). Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Origanum vulgare* against *Botrytis cinerea*. *Food Chemistry*, 365: 130506.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130506>