

Molecular Analysis of Some Date Palm Cultivars in Sistan and Baluchestan Province Based on *trnH-psbA* Intergenic Region

Jalil Alrahman Mohamadisib

M.Sc. Students, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran. Email address: jms135789@yahoo.com

Leila Fahmideh 

*Corresponding Author: Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. Email address: l.fahmideh@gau.ac.ir

Barat Ali Fakheri 

Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran. Email address: fakheri@uoz.ac.ir

Nafiseh Mahdinezhad

Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran. Email address: nmahdinezhad@uoz.ac.ir

Bahman Fazeli-Nasab 

Department of Agronomy and Plant Breeding, Agriculture Institute, Research Institute of Zabol, Zabol, Iran. Email address: bfazeli@uoz.ac.ir

Abstract

Objective

The date palm (*Phoenix dactylifera* L.) is a monocotyledonous Arecaceae family plant widely cultivated in arid and semi-arid regions, including Iran. This investigation used the *trnH-psbA* intergenic region to study the intraspecific genetic diversity of 15 date palm cultivars in the southern regions of Sistan and Baluchestan province.

Materials and Methods

After sampling fresh leaves, DNA was extracted using the Dellaporta method. PCR was then performed using primers specific to the *trnH-psbA* genes' region. Next, the amplicons were sent for sequencing.

Results

After receiving the sequencing results, the sequence quality was reviewed using the Chromas software and aligned using BioEdit and MEGA7. According to the analysis of the sequences, a total of 787 polymorphic positions were identified in the trnH-psbA intergenic region. The average value of synonymous and nonsynonymous substitutions (dN/dS) was approximately 0.25, indicating positive and purifying selection in the natural selection process of the studied varieties. The phylogenetic dendrogram and sequence similarity matrix revealed that the cultivars Gozloo 11 and Shand_Shekand 10 from Saravan exhibited the most significant genetic distance, with a coefficient of 0.046. Based on the dendrogram obtained from cluster analysis, the studied cultivars were classified into four distinct groups. Gazalu 11 from Saravan was placed in the first group, Shandeshkand 10 from Saravan in the second group, Peymazo 16 from Jaleq in the third group, and the remaining 12 date genotypes were placed in the fourth group.

Conclusion

This research indicates that the trnH-psbA marker is suitable for investigating the intrageneric diversity of different Date Palm cultivars. However, further investigation is needed to obtain more comprehensive data. It is also recommended that the diversity of this cultivar be studied using other DNA barcodes and appropriate molecular markers.

Keywords: DNA barcoding, intra-species genetic diversity, Date Palm, chloroplast marker

Paper Type: Research Paper.

Citation: Mohamadisib JA, Fahmideh L, Fakheri BA, Mahdinezhad N, Fazeli-Nasab B (2024) Molecular Analysis of Some Date Palm Cultivars in Sistan and Baluchestan Province Based on *trnH-psbA* Intergenic Region. *Journal of Genetics and Plant Breeding* 1 (2), 87-106.

Journal of Genetics and Plant Breeding 1 (2), 87-106. DOI: 10.22103/gpb.2025.24317.1017

Received: April 04, 2024.

Received in revised form: June 18,

2024.

Accepted: June 19, 2024.

Published online: June 29, 2024.

Publisher: Research and Technology Institute of Plant Production,
Afzalipour Research Institute, Shahid Bahonar University of Kerman and
Iranian Genetics Society.



© the authors

واکاری مولکولی برخی ارقام نخل خرماي استان سيستان و بلوچستان براساس ناحیه بين

ژنی *trnH-psbA*

جليل الرحمن محمدی سيب

دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل. رایانامه:

jms135789@yahoo.com

 لیلا فهمیده

*نویسنده مسئول: دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،

گرگان. رایانامه: l.fahmideh@gau.ac.ir

 براتعلی فاخری

استاد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل. رایانامه: fakheri@uoz.ac.ir

نفیسه مهدی نژاد

دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل. رایانامه: nmahdinezhad@uoz.ac.ir

 بهمن فاضلی نسب

مربی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی، پژوهشگاه زابل، زابل، ایران. رایانامه: bfazeli@uoz.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۱/۱۶ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۳/۰۳/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۳۰

چکیده

هدف: نخل خرما با نام علمی (*Phoenix dactylifera* L) گیاهی تک لپه از خانواده پالماسه است که در نواحی گرمسیری و

نیمه گرمسیری و بسیاری از کشورها از جمله ایران پرورش می یابد. در تحقیق حاضر تنوع ژنتیکی درون گونه ای ۱۵ رقم نخل خرما

از برخی مناطق جنوب استان سیستان و بلوچستان بر اساس ناحیه بین ژنی *trnH-psbA* مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: پس از نمونه برداری از برگ های جوان، استخراج DNA به روش دلاپورتا و سپس PCR با استفاده از پرایم های

ژن *trnH-psbA* انجام شد. محصولات تکثیر شده جهت توالی یابی ارسال شدند.

نتایج: پس از دریافت نتایج تعیین توالی، کیفیت توالی‌ها با استفاده از نرم افزار Chromas بررسی شد و در ادامه با استفاده از نرم افزارهای BioEdit و MEGA7 هم‌رديف‌سازی توالی‌ها انجام شد. آنالیز توالی‌های به‌دست آمده نشان داد که در ناحیه بین‌ژنی *trnH-psbA* در مجموع ۷۸۷ جایگاه شناسایی شد. مقدار متوسط عددی جایگزینی‌های مترادف و غیرمترادف (dN/dS) حدود ۰/۲۵ بود که نشان‌دهنده گزینش‌های مثبت و خالص در روند انتخاب طبیعی ارقام مورد مطالعه می‌باشد. در ادامه دندروگرام روابط فیلوژنتیک و ماتریس تشابه توالی‌ها ترسیم شد و نتایج نشان داد که از نظر ناحیه بین‌ژنی *trnH-psbA* ژنوتیپ‌های گزالو ۱۱ و شندشکند ۱۰ از سراوان با ضریب ۰/۴۶ دارای بیشترین فاصله ژنتیکی از یکدیگر بودند. براساس دندوگرام حاصل از تجزیه کلاستر، ارقام مورد مطالعه در ۴ گروه مختلف قرار گرفتند. رقم گزالو ۱۱ از سراوان در گروه اول، شندشکند ۱۰ از سراوان در گروه دوم، پیمازو ۱۶ از جالق در گروه سوم و بقیه ۱۲ ژنوتیپ خرماي مورد بررسی در گروه چهارم قرار گرفتند.

نتیجه‌گیری: در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که نشانگر *trnH-psbA* جهت ارزیابی تنوع درون گونه‌ای ارقام مختلف نخل خرما می‌تواند مناسب باشد. برای حصول اطلاعات جامع‌تر، نیاز به انجام تحقیقات بیشتری است و پیشنهاد می‌شود که تنوع این ارقام به‌وسیله دیگر بارکدهای DNA و همچنین سایر نشانگرهای مولکولی مناسب نیز بررسی شود.

کلیدواژه‌ها: بارکدگذاری DNA، تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای، خرما، نشانگر کلروپلاستی.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: محمدی‌سیب جلیل الرحمن، فهمیده لیلا، فاخری براتعلی، مهدی‌نژاد نفیسه، فاضلی‌نسب بهمن (۱۴۰۳) واکاری مولکولی برخی ارقام نخل خرماي استان سیستان و بلوچستان براساس ناحیه بین ژنی *trnH-psbA*. مجله ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، ۱(۲)، ۸۷-۱۰۶.

Publisher: Research and Technology Institute of Plant Production,
Afzalipour Research Institute, Shahid Bahonar University of Kerman and
Iranian Genetics Society



© the authors

مقدمه

نخل خرما با نام علمی (*Phoenix dactylifera* L.) گیاهی تک‌لپه از خانواده پالماسه است. در حال حاضر نخل خرما یکی از محصولات باغی مهم کشور ایران به‌شمار می‌آید و بیش از ۴۰۰ رقم از آن در کشور موجود می‌باشد. از نظر تنوع رقم، ایران با دارا بودن ۴۰۰ رقم (برخی منابع ۶۰۰ رقم را هم ذکر کرده‌اند) از مجموع بیش از ۴۰۰۰ رقم مختلف موجود در جهان، یکی از غنی‌ترین منابع ژرم پلاسما خرما است (Hassanzadeh Khankahdani & Bagheri 2019; Marsafari et al. 2014). صرف نظر از اهمیت ارزیابی‌های مربوط به تنوع‌های اکولوژیکی و ریخت شناسی، اهمیت تنوع ژنتیکی در برنامه‌های اصلاحی در

تمام تحقیقات ذکر شده است. ارزیابی تنوع ژنتیکی در سطح گونه به سه دلیل عمده حائز اهمیت است: الف) ارتباط درجه تغییرات تکاملی با میزان تنوع ژنتیکی مشاهده شده (ب) هتروزیگوسیتی (ج) تکمیل و مطابقت با خزانه ژن جهانی که نماینده تمام اطلاعات موجود درباره فرایندهای بیولوژیکی است (Newbury & Ford-Lloyd 1977). با دانستن روابط ژنتیکی بین گیاهان، از اطلاعات رده‌بندی می‌توان به‌عنوان راهنمایی برای بهره‌گیری از منابع ژنتیکی در استفاده از آن‌ها در تلاقی‌ها و جداسازی ژن‌های مفید استفاده کرد (Marshall & Brown 1975). اولین قدم در اصلاح این گیاه شناسایی ارقام و دسته‌بندی آن‌ها است که روش‌های مولکولی امکان تفکیک ارقام را فراهم آورده‌اند.

نشانگرهای مولکولی می‌توانند به‌عنوان ابزارهای بسیار مهمی برای مدیریت نمونه‌های ژرمپلاسم در بانک ژن، ارزیابی روابط خویشاوندی ژنتیکی، انتخاب گیاهان برتر و بررسی شباهت یا تفاوت بین نمونه‌های مختلف مورد استفاده قرار گیرند و برای دستیابی به این اهداف از نشانگرهای مولکولی متعددی استفاده می‌شود (Botstein et al. 1980) برای این منظور تکنیک DNA بارکدینگ نیز به‌وفور مورد استفاده قرار گرفته است. در این تکنیک بخش کوچکی از ژنوم گیاه توالی‌یابی شده و برای شناسایی و تعیین ارتباط استفاده شد. در حیوانات ژن میتوکندریایی *Cytochrome Oxidase I (COI)* به‌عنوان بارکد پیشنهاد می‌شود زیرا این ناحیه برای تعیین و تفکیک حیوانات در سطح گونه کارایی بسیار بالایی دارد و بین اکثر محققین نیز پذیرفته شده است. ولی در گیاهان وضعیت پیچیده‌تر از حیوانات بوده و نواحی مختلفی از DNA هسته‌ای (*ITS2*, *ITS*) و کلروپلاستی (*rpoB* و *rpoC1* و *trnH-psbA(IGS)*, *matK*, *rbcl*) به‌عنوان بارکد پیشنهاد شده‌اند (Pang et al. 2012). امروزه از بین نواحی مطرح شده، یکی از نواحی که مورد توجه است ناحیه بین ژنی *trnH-psbA* می‌باشد (Hollingsworth et al. 2011; Akbarzadeh et al. 2013). ناحیه بین ژنی *trnH-psbA* اولین بار توسط Kress et al. (2005) معرفی شد. این ناحیه در بین تمامی گیاهان عالی تغییرپذیری نسبتاً مناسبی دارد و به‌دلیل طول نسبتاً کوتاهی که دارد، در اکثر موارد به‌راحتی قابل تکثیر است (Kress et al. 2005; Maheswaran 2014; Bolson et al. 2015).

در پژوهشی Madras Kia et al. (2012) تنوع ژنتیکی ۱۲ رقم خرماي استان کرمان را با استفاده از مارکر مولکولی RAPD مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان داد که بیشترین و کمترین تعداد باند چند شکل تولیدی به‌ترتیب مربوط به آغازگرهای OPZ-20 و OPAG-06 بود. بنابراین آغازگر OPZ-20 در مقایسه با دیگر آغازگرها، توانایی برتری در شناسایی تنوع ژنتیکی و تفکیک ارقام خرما داشت. در تحقیقی Taghinejad et al. (2018) تنوع ژنتیکی ۱۴ رقم نر و ۲۶ رقم ماده نخل خرما با استفاده از نشانگر SSR مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان داد که بیشترین تشابه ژنتیکی بین ارقام آل مهتری و خیزی و کمترین میزان تشابه مربوط به رقم ابونارنجا و سایر ارقام مورد بررسی بود. در بررسی مولکولی که با ژن‌های هسته‌ای و مناطق بین ژنی کلروپلاستی با استفاده از ناحیه *ITS* و *trnH-psbA* بر روی ارقام مختلف زیتون انجام شد، نتایج تنوع ژنتیکی بالا را بین ارقام نشان داد و نشانگر *trnH-psbA* برای بررسی تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای زیتون مناسب گزارش شد (Firouzi 2016). در تحقیقی تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای ۳۰ ژنوتیپ انبه از برخی مناطق دو استان جنوب کشور (کرمان و هرمزگان) از طریق ارزیابی ناحیه بین ژنی

trnH-psbA مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که استفاده از این ناحیه بین‌ژنی شاید برای مطالعه و شناخت تنوع و روابط بین گونه‌ای انبه نسبت به تنوع درون گونه‌ای انبه موثرتر باشد (Shirzaie et al. 2021). در پژوهشی که با استفاده از ارقام خرما موجود در مطالعه حاضر با استفاده از نشانگر *rbcL* انجام شده بود، نتایج نشان داد که نشانگر *rbcL* برای بررسی تنوع و روابط درون گونه‌ای مفید است اما در خصوص ارقام خرمای مورد مطالعه، فاصله ژنتیکی کمی برآورد شده بود (فاصله ژنتیکی ۰ تا ۰/۳۷)، لذا پیشنهاد شده بود که از سایر بارکدهای DNA و همچنین سایر نشانگرهای مولکولی مناسب نیز استفاده شود (Raeisi et al. 2021). لذا هدف از پژوهش حاضر تعیین فاصله ژنتیکی، تعیین شباهت و دسته‌بندی و همچنین ترسیم درخت فیلوژنتیکی ارقام بومی نخل خرمای مورد بررسی این‌بار با استفاده از ناحیه بین ژنی *trnH-psbA* بود.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق ۱۵ رقم بومی نخل خرما از برخی مناطق استان سیستان و بلوچستان (بخش‌های مرکزی شهرستان سراوان، ناهوک، سینوکان و جالقی) مورد بررسی قرار گرفتند (جدول ۱). ابتدا پس از بازدید منطقه و انتخاب درختان، اتیکت‌گذاری و ترسیم نشانی و کروکی دقیق محل هر درخت انجام شد و سپس جهت تهیه نمونه برای استخراج DNA، نمونه‌برداری در اواخر بهار، از برگ‌های جوان (فلش‌های جوان) صورت گرفت. از هر درخت به‌طور تصادفی ۳ نمونه برگ توسط تیغ استریل بریده شد و نمونه‌ها در شرایط سرد حمل و به‌منظور استخراج DNA در فریزر -۸۰ درجه پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی دانشگاه زابل منتقل شدند. استخراج DNA از برگ‌های جوان خرما با استفاده از روش Dellaporta et al. (1993) انجام شد. پس از استخراج، به منظور تعیین کیفیت DNA استخراج شده، از ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. PCR با استفاده از پرایمر ژن *trnH-psbA* (IGS) (جدول ۲) و با استفاده از دستگاه (Eppendorf (22331 Humburg) در حجم ۴۵ میکرولیتر به شرح زیر انجام شد: ۱/۵ میکرولیتر از هر آغازگر: ۱۵ میکرولیتر ماستر میکس (۲X) (شرکت پیشگام)، ۶ میکرولیتر DNA الگو و ۲۱ میکرولیتر آب دیونیزه شده. چرخه حرارتی بدین‌صورت که یک چرخه واسرشته‌سازی اولیه در ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه (تک‌رشته‌ای شدن DNA در ۹۴ درجه به مدت ۴۵ ثانیه؛ اتصال آغازگر به DNA تک‌رشته‌ای در دمای ۶۱/۳ درجه به مدت ۴۵ ثانیه؛ بسط آغازگر در ۷۲ درجه به مدت ۵۰ ثانیه) و یک چرخه بسط نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. جهت الکتروفورز از ژل آگاروز یک و نیم درصد و سپس جهت رنگ‌آمیزی ژل از ژل رد و از دستگاه ژل داک Vilber – lourmat (E- Box- VX2- 20m) نیز جهت مشاهده باندها استفاده شد.

جهت انجام توالی‌یابی محصولات PCR به دست آمده، نمونه‌ها به شرکت پیشگام ارسال شدند و در ادامه توالی‌یابی توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی انجام شد. کیفیت نتایج دریافت شده از تعیین توالی با استفاده از نرم‌افزارهای Chromas version BioEdit, v.2.4.1 بررسی شدند و نواحی دارای کیفیت توالی‌یابی پایین از دو انتهای ۳' و ۵' حذف شد. توالی‌ها پس از ثبت، جهت همترازی با سایر توالی‌های موجود در پایگاه داده NCBI در قسمت Nucleotide BLAST، بلاست شدند و میزان تشابه

با سایر توالی‌های ثبت شده بررسی شد. بعد از هم ردیف کردن توالی‌ها، در ادامه برخی پارامترهای ژنتیکی مانند تعداد جهش‌ها، تنوع نوکلئوتیدی، تعداد جایگاه‌هایی که در آنها جایگزینی اتفاق افتاده و همچنین تنوع آنها با استفاده از نرم‌افزارهای DNAspv.5 و MEGA7 مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور تعیین روابط خویشاوندی و فاصله ژنتیکی بین ارقام، از نرم‌افزارهای MEGA7 و همچنین ترسیم درخت فیلوژنی از روش UPGMA استفاده شد.

جدول ۱. مشخصات ارقام نخل خرماي مورد مطالعه

Table 1. Characteristics of date palm cultivars studied

شماره Number	نام رقم Name	کد شناسایی Identification code	محل جمع آوری Location	طول جغرافیایی Longitude	عرض جغرافیایی Latitude	ارتفاع از سطح دریا (متر) Height above sea level (m)
1	شندشکند (Shand Shekand)	Jm10	سراوان (Saravan)	65° 20'	27° 22'	1155
2	سبز (Sabzoo)	Jm13	جالق (Jalgh)	62° 30'	27° 20'	857
3	کلوط (Kaloot)	Jm15	جالق (Jalgh)	62° 30'	27° 20'	851
4	پیمازو (Pymazo)	Jm16	جالق (Jalgh)	62° 30'	27° 20'	851
5	صدگنج (Sad-Ganj)	Jm18	سینوکان (Sinokan)	49° 30'	37° 20'	1035
6	ماکیلی (Makili)	Jm19	ناهوک (Nahok)	49° 30'	37° 20'	1319
7	هلیله (Holeileh)	Jm20	سراوان (Saravan)	65° 20'	27° 22'	1155
8	سبز (Sabzoo)	Jm1	سراوان (Saravan)	65° 20'	27° 22'	1155
9	کلوط (Kaloot)	Jn3	سراوان (Saravan)	65° 20'	27° 22'	1162
10	سعودی (Saudi)	Jn10	سراوان (Saravan)	65° 20'	27° 22'	1155
11	زردان (Zardan)	Jn8	سراوان (Saravan)	65° 20'	27° 22'	1155
12	پیمازو (Pymazo)	Jn9	سراوان (Saravan)	65° 20'	27° 22'	1155
13	گوزلو (Gozalo)	Jn11	سراوان (Saravan)	65° 20'	27° 22'	1155
14	هلیله (Holeileh)	Jn12	سراوان (Saravan)	65° 20'	27° 22'	1155
15	ربی (Rabbi)	Jn13	سراوان (Saravan)	65° 20'	27° 22'	1155

جدول ۲. توالی آغازگرهای ژن *trnH-psbA*

Table 2. The primer sequence of *trnH-psbA* genes

نام آغازگر	توالی آغازگر	منبع
Primer name	Primer Sequence	Reference
psbA3_f	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	Sang et al. 1997
trnHf_05	CGCGCATGGTGGATTCAACAATCC	Sang et al. 1997

نتایج و بحث

ارزیابی کیفی DNA استخراج شده: بعد از استخراج DNA و اطمینان از خلوص آن به‌منظور بررسی سالم بودن و عدم شکستگی DNA استخراج شده، نمونه‌های به‌دست آمده بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شدند. در شکل ۱ نتایج DNA استخراج شده ارقام مورد مطالعه نشان داده شده است. وجود تک باند نشان دهنده کیفیت و سلامت DNA استخراج شده می‌باشد.



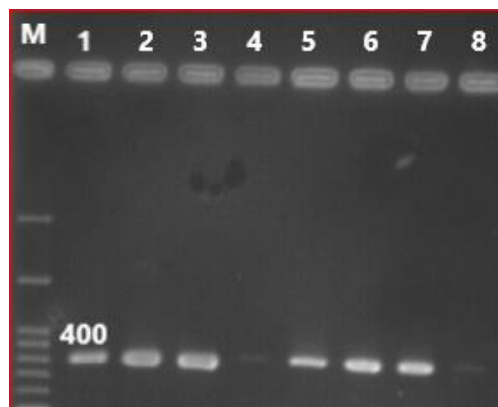
شکل ۱. DNA استخراج شده ارقام خرما. چاهک ۱ تا ۱۵، به ترتیب DNA استخراج شده ارقام ۱ تا ۱۵

۱۵ و ستون M مارکر (100 bp)

Figure 1. Extracted DNA of date palm cultivars. Wells 1 to 15, respectively, are extracted DNA of cultivars 1 to 15 and column M is ladder (100 bp)

پس از انجام واکنش PCR، محصولات PCR بر روی ژل آگارز یک و نیم درصد بررسی شدند. با مقایسه با DNA مارکر

۱۰۰bp مشخص شد پرایمرهای ژن *trnH-psbA* قطعه حدود ۴۰۰ bp را تکثیر کردند (شکل ۲).



شکل ۲. محصولات PCR با آغازگرهای ژن *trnH-psbA* برخی ارقام خرماي مورد مطالعه. به ترتيب

چاهک ۱ تا ۸، محصولات PCR ارقام ۱ تا ۸ و ستون M مارکر (100 bp)

Figure 2. PCR products from *trnH-psbA* primers of some date palm cultivars studied. Wells 1 to 8, respectively, is PCR products of cultivars 1 to 8 and column M is ladder (100 bp)

همترازي ناحیه بین ژنی *trnH-psbA*: نتایج حاصل از تعیین توالی ناحیه بین ژنی *trnH-psbA* ارقام خرماي مورد

بررسی، برای انجام آنالیزهای بیوانفورماتیکی مورد استفاده قرار گرفت. کیفیت مناسب گراف‌ها نشانگر دقت قابل توجه در تعیین توالی نمونه‌ها بود. پس از ارزیابی کیفیت نتایج، میزان همولوژی نواحی تکثیر شده *trnH-psbA* با یکدیگر و با توالی‌های مشابه ثبت شده موجود در پایگاه داده Nucleotide NCBI مورد مقایسه قرار گرفتند. مقایسه توالی‌ها نشان داد که همولوژی بالایی (تشابه ۱۰۰-۹۵ درصد و E-value = 0) بین این توالی‌ها با توالی‌های گونه *P. dactylifera* موجود در بانک ژن وجود داشت. نتایج توالی‌یابی ژنوتیپ‌های مورد بررسی سپس در پایگاه داده NCBI ثبت گردید که مشخصات ثبت و شماره دسترسی هر کدام از توالی‌های ثبت شده در جدول ۳ آورده شده است.

با استفاده از توالی‌های به دست آمده و به کمک نرم افزار DNAsp، در مجموع ۷۸۷ جایگاه شناسایی شده، ۶۱۳ جایگاه بدون حذف و اضافه (۳۰ جایگاه پلی مورف، ۵۸۳ مونومورف)، ۱۷۴ جایگاه دارای حذف و اضافه و ۲۳ سینگلتن (Singleton) شناسایی شد. در این جمعیت تعداد ۴ هاپلوتیپ (شاخص تنوع هاپلوتیپی ۰/۳۷۱) شناسایی شد. همچنین پنج ناحیه حفاظت شده DNA برای نشانگر *trnH-psbA* شناسایی شد (شکل ۳ تا ۷).

جدول ۳. مشخصات ثبت و شماره دسترسی ناحیه توالی‌یابی شده ژن *trnH-psbA* ارقام نخل خرما در پایگاه داده

NCBI

Table 3. Access numbers of *trnH-psbA* sequenced region of date palm cultivars in the NCBI database

شماره ژنوتیپ Genotype Number	نام فارسی Farsi Name	کد شناسایی Identification code	شماره دسترسی Accession
1	شندشکند (Shand Shekand)	Jm10	KY768778.1
2	سبزو (Sabzoo)	Jm13	KY768779.1
3	کلوط (Kaloot)	Jm15	KY768780.1
4	پیمازو (Peymazo)	Jm16	KY768781.1
5	صدگنج (Sad-Ganj)	Jm18	KY768782.1
6	ماکیلی (Makili)	Jm19	KY768783.1
7	هلیله (Holeileh)	Jm20	KY768784.1
8	سبزو (Sabzoo)	Jm1	KY768785.1
9	کلوط (Kaloot)	Jn3	KY768786.1
10	سعودی (Saudi)	Jn10	KY768787.1
11	زردان (Zardan)	Jn8	KY768788.1
12	پیمازو (Peymazo)	Jn9	KY768789.1
13	گزالو (Gozalo)	Jn11	KY768790.1
14	هلیله (Holeileh)	Jn12	KY768791.1
15	ربی (Rabbi)	Jn13	KY768792.1

GAACCTCCATACTTAGATCGAGATATTGGACATAGAATGCCAAT

شکل ۳. ناحیه حفاظت شده ۱

Figure 3. Conserved region 1

TTTAAAATGTAAAAAAAAGGAGTAATCAGCTGTGACACGTTC

شکل ۴. ناحیه حفاظت شده ۲

Figure 4. Conserved region 2

CTAAAAAAAATCCTTTTGTAGCTAATCATTTATCGGGAAAAATTGAAAA
ACTCAACATGAGGGAGGAGAAAGAAAT

شکل ۵. ناحیه حفاظت شده ۳

Figure 5. Conserved region 3

TACCATTATACCCACAATGATTGGCCATACAATCGCTATTCATAATGGAA
AGGAAAATTACCTATTTATATAACAGATCGTATGGTAGGTCACAAATTG
GGAGAATTCGCGCCTACT

شکل ۶. ناحیه حفاظت شده ۴

Figure 6. Conserved region 4

TTCAATATTAATAGAAATATTATTAATATAAATAAATAAATTAATATAAAT
AATAAATACAAAATTAATACTAAAAAAAAAAAAAGTACTTATCATTCATT

شکل ۷. ناحیه حفاظت شده ۵

Figure 7. Conserved region 5

آنالیز توالی‌های نوکلئوتیدی: جانشینی نوکلئوتیدی براساس الگوی Tamura & Nei (1993) و به‌صورت میزان جانشینی‌های نوع انتقالی و متقاطع با استفاده از نشانگر *trnH-psbA* بررسی شد. بیشترین میزان انتقالی از نوع پرمیدین (۳۰/۳۳ درصد) و کمترین میزان از نوع پورین (۰/۰۲ درصد) بود (جدول ۴).

جدول ۴. جانشینی نوکلئوتیدی به صورت میزان جانشین‌های نوع انتقالی و متقاطع

Table 4. Nucleotide replacement as a transition and transversion

	A	T/U	C	G
A	-	8.48	4.31	0.02
T/U	10.7	-	15.41	3.6
C	10.7	30.33	-	3.6
G	0.05	8.48	4.31	-

در این جدول درصد جایگزینی همجنس (جایگزینی پورین با پورین دیگر و یا پرمیدین با پرمیدین دیگر) به‌صورت ضخیم و جایگزینی ناهمجنس (جایگزینی پورین به پرمیدین و برعکس) به‌صورت ایتالیک نشان داده شده است. همچنین نسبت نوکلئوتیدهای مختلف به کل نوکلئوتیدها نیز محاسبه شد. به‌طور میانگین نسبت تیمین ۳۰/۸، سیتوزین ۱۶/۴، آدنین ۳۸/۹، گوانین ۱۳/۹، درصد درون جمعیت به‌دست آمد (جدول ۵).

در این پژوهش نسبت dN/dS، ۰/۲۵ محاسبه شد. نتایج حاصل از تغییرات نوکلئوتیدی که سبب تغییر در اسیدهای آمینه می‌شوند (dN) نسبت به تغییراتی که بر اسیدهای آمینه بی‌تأثیر هستند (dS)، یک روش مفید و بسیار کارآمد جهت تشخیص روند انتخاب طبیعی در طول تکامل برای ژن‌ها می‌باشد. اگر این نسبت بیشتر از ۱ باشد انتخاب مثبت، اگر کمتر از ۱ باشد انتخاب خالص و اگر برابر یک باشد انتخاب خنثی را در طی تکامل این ژن‌ها نشان می‌دهد (Li et al. 2009). از آنجا که در این تحقیق مقدار عددی کمتر از یک بود نشان‌دهنده این است که انتخاب خالص برای ژن مورد بررسی اتفاق افتاده است.

استفاده از نسبت dN/dS (نسبت نرخ‌های جایگزینی غیر هم‌معنی به هم‌معنی) یک روش رایج در زیست‌شناسی تکاملی برای استنباط فشارهای انتخابی بر روی ژن‌ها است. با این حال، کاربرد آن در نواحی غیر کدکننده پروتئین، مانند ناحیه بین‌ژنی *trnH-psbA*، سوالاتی را مطرح می‌کند زیرا این نواحی پروتئین تولید نمی‌کنند. نسبت dN/dS می‌تواند بینش‌هایی درباره دینامیک تکاملی نواحی غیر کدکننده ارائه دهد. در حالی که *trnH-psbA* پروتئین تولید نمی‌کند، ممکن است هنوز تحت فشارهای انتخابی قرار گیرد که بر نرخ‌های جهش آن تأثیر بگذارد. به‌عنوان مثال، تغییرات در این ناحیه ممکن است تحت محدودیت‌های عملکردی مرتبط با تنظیم ژن یا ساختار RNA قرار گیرند که می‌توان آن‌ها را به‌طور غیرمستقیم از طریق تحلیل dN/dS ارزیابی کرد. از آنجا که این ناحیه تنوع نوکلئوتیدی قابل توجهی نشان می‌دهد، تحلیل آن از منظر dN/dS ممکن است اطلاعات ارزشمندی درباره نقش

آن در گونه‌زایی و تمایز ژنتیکی ارائه دهد. اگرچه *trnH-psbA* پروتئین تولید نمی‌کند، جهش‌ها در این ناحیه ممکن است بر ژن‌های کدکننده مجاور یا عناصر تنظیمی تأثیر گذاشته و بر تناسب کلی و سازگاری تأثیر بگذارند. بنابراین، استفاده از dN/dS می‌تواند به روشن کردن اهمیت عملکردی این جهش‌ها در یک زمینه تکاملی گسترده‌تر کمک کند (Kress & Erickson 2007; Hollingsworth et al. 2011; Okoth et al. 2016; Hassan 2023).

مقایسه میان جفت نواحی: فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌های خرما مورد بررسی در جدول ۶ آورده شده است. بر اساس نتایج، ژنوتیپ‌های سبزو، کلوط، پیمازو، صدگنج، ماکیلی، هلیله، سبزو، کلوط، سعودی، زردان، پیمازو، هلیله و ربی در فاصله ژنتیکی کمی از یکدیگر قرار داشتند. همچنین از نظر ناحیه بین‌ژنی *trnH-psbA* ژنوتیپ‌های گزالو و شندشکند از سراوان با ضریب ۰/۰۴۶ دارای بیشترین فاصله ژنتیکی از یکدیگر بودند.

بررسی روابط فیلوژنتیکی: به‌منظور تعیین روابط فیلوژنتیکی ارقام نخل خرما مورد مطالعه از تجزیه کلاستر استفاده شد. درخت فیلوژنتیکی حاصل از تعیین توالی ناحیه بین‌ژنی *trnH-psbA* در نمونه‌های خرما به‌روش UPGMA در شکل ۸ نشان داده شده است. بر اساس برش دندوگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ارقام به دو شاخه تقسیم شدند که در شاخه اول رقم گزالو قرار دارد که از شهرستان سراوان جمع‌آوری گردید. شاخه دوم به دو زیر شاخه به‌شرح زیر تقسیم شدند: در زیر شاخه اول رقم شندشکند قرار داشت و زیر شاخه دوم به دو زیر شاخه فرعی تقسیم گردید که زیر شاخه فرعی اول فقط شامل رقم پیمازو ۱۶ و زیر شاخه فرعی دوم به دو گروه تقسیم شدند که در گروه ارقام کلوط ۱۵ و سبزو ۱۳ قرار دارند و در گروه دوم که شامل چهار زیر گروه شد، زیر گروه اول شامل رقم ماکیلی جمع‌آوری شده از روستای جالق، زیر گروه دوم شامل صد گنج ۱۸ و کلوط ۳، زیرگروه سوم شامل هلیله ۲۰ و سبزو ۱ که هردو مربوط به شهرستان سراوان هستند و زیرگروه چهارم شامل زردان ۸، سعودی ۶ و پیمازو ۹ بود.

با مقایسه فاصله ژنتیکی ارقام با اسم محلی مشابه که از دو منطقه جمع‌آوری شده‌اند، مانند رقم پیمازو ۹ جمع‌آوری شده از سراوان با رقم مشابه آن در شهرستان جالق که شامل پیمازو ۱۶ است. به‌نظر می‌رسد پراکندگی جغرافیایی ارقام نخل خرما باعث ایجاد تغییرات در ژنوم ارقام مشابه گردیده و در نتیجه ارقام با وجود خصوصیات ظاهری مشابه دارای ژنوتیپ‌های متفاوت هستند که می‌تواند به این دلیل باشد که نتایج حاصل از تغییرات نوکلئوتیدی که سبب تغییر در اسیدهای آمینه می‌شوند (dN) نسبت به تغییراتی که بر اسیدهای آمینه بی‌تأثیر هستند (dS)، یک شاخص مهم برای شناخت روند طبیعی در طول تکامل ژن‌ها هستند. اگر این نسبت بیشتر از یک باشد انتخاب مثبت، اگر کمتر از یک باشد انتخاب خالص و اگر برابر یک باشد انتخاب خنثی را در طی تکامل این ژن‌ها نشان می‌دهد (Li et al. 2009). با توجه به اینکه در این پژوهش نسبت dN/dS، ۰/۲۵ محاسبه شد، کمتر از یک بودن مقدار عددی dN/dS برای نشانگر *trnH-psbA* نشان دهنده این است که انتخاب خالص برای ژن مورد بررسی اتفاق افتاده و باعث تغییرات کلیدی نشده است.

جدول ۵. نسبت نوکلئوتیدهای مختلف به کل نوکلئوتیدها براساس ناحیه *trnH-psbA*

Table 5. The ratio of different nucleotides to total nucleotides in the examination of the *trnH-psbA* region

نام فارسی Farsi Name	کد شناسایی Identification code	T (U)	C	A	G	Total
شندشکند (Shand Shekand)	Jm10	30.1	16.2	39.6	14.2	705.0
سبز (Sabzoo)	Jm13	30.2	16.5	39.2	14.1	732.0
کلوط (Kaloot)	Jm15	30.8	16.3	39.5	13.4	692.0
پیمازو (Peymazo)	Jm16	30.6	16.2	38.5	14.7	742.0
صدگنج (Sad-Ganj)	Jm18	30.7	16.2	38.5	14.6	740.0
ماکیلی (Makili)	Jm19	30.5	16.3	38.7	14.5	731.0
هلیله (Holeileh)	Jm20	30.7	16.6	38.7	14.1	724.0
سبز (Sabzoo)	Jm1	31.0	16.4	39.0	13.7	703.0
کلوط (Kaloot)	Jn3	30.8	16.6	39.3	13.3	712.0
سعودی (Saudi)	Jn10	30.9	16.3	39.0	13.8	712.0
زردان (Zardan)	Jn8	30.6	16.0	39.5	13.9	736.0
پیمازو (Peymazo)	Jn9	31.2	16.2	39.0	13.6	705.0
گزالو (Gozalo)	Jn11	32.2	16.9	37.8	13.1	662.0
هلیله (Holeileh)	Jn12	30.7	16.7	38.7	14.0	724.0
ربی (Rabbi)	Jn13	31.1	16.3	39.1	13.5	704.0
میانگین (Average)		30.8	16.4	38.9	13.9	714.9

Whitlock et al. (2010) در مطالعات خود بیان کردند که فاصله بین ژنی *trnH-psbA* به دلیل الگوی جانشینی بالا

همیشه به عنوان یک مارکر مناسب در مطالعاتی که با استفاده از روش DNA بارکد صورت می گیرد مد نظر گیاه‌شناسان بوده است.

محدوده بین ژنی *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 به عنوان ابزار مناسب برای مطالعات بارکدینگ DNA پیشنهاد شده است (Bolson et al. 2015). در پژوهشی از بارکدهای *trnH-psbA*، *rbcl* و *ITS* برای ارزیابی پنج گونه دارویی زنیان، به لیمو، روناس، بارهنگ سرنیزه‌ای و پنیرباد استفاده شد و نتایج نشان داد که از بین مناطق بررسی شده ناحیه بین ژنی *trnH-psbA* به دلیل درجه عمومیت بالا، قابلیت تکثیر و قدرت تفکیک بالایی گونه‌ای در اکثر گونه‌های بررسی شده، قادر به تفکیک گونه‌های جنس پنیرباد بود (Vahabi 2016). براساس نتایج آنالیزهای انجام شده در پژوهش حاضر، بین ارقام نخل خرما مورد مطالعه با استفاده از نشانگر *trnH-psbA*، تنوع درون گونه‌ای مشاهده شد و نتایج این پژوهش نشان داد که این بارکد قادر به تفکیک و دسته‌بندی ۱۵ رقم خرما مورد مطالعه بود، که با نتایج به دست آمده از مطالعات قبلی (Akbarzadeh et al. 2013, Shirzaie et al. 2021) که از این بارکد DNA به ترتیب برای تشخیص جایگاه تاکسونومیکی شاه بلوط شمال ایران و بررسی تنوع ژنتیکی ۳۰ ژنوتیپ انبه ایران استفاده کرده بودند، همخوانی داشت.

این تحقیق اولین بررسی استفاده از بارکد *trnH-psbA* برای گیاه خرما بود، لذا هدف اولیه بررسی کاربری استفاده از این بارکد در گیاه خرما نسبت به بارکد *rbcL* استفاده شده قبلی بود که در آن مطالعه بیشترین فاصله ژنتیکی ۰/۳۷٪ بین نمونه‌های سبز و ۱۳٪ از جالقی و ماکیلی ۱۹٪ از ناهوک مشاهده شده بود و بر اساس تقسیم‌بندی‌های انجام شده رقم سبز و ۱۳٪ از جالقی، بیشترین فاصله را با سایر ارقام نشان داده بود (Raeisi et al. 2021). در حالی که که در تحقیق حاضر ارقام گزالو ۱۱٪ و شندشکند ۱۰٪ از سراوان با ضریب ۰/۴۶٪ دارای بیشترین فاصله ژنتیکی از یکدیگر بودند و بر اساس تقسیم بندی‌های انجام شده رقم گزالو ۱۱٪ بیشترین فاصله را با سایر ارقام دیگر داشت. ارقام جمع‌آوری شده از سطح شهرستان سراوان شامل (پیمازو، سعودی، ۶، زردان ۸) و ارقام ماکیلی ۱۹٪ و صدگنج که از روستاهای ناهوک و سینوکان در فاصله ۳۵ کیلومتری سراوان جمع‌آوری شده‌اند، بیشترین تشابه ژنتیکی را داشتند. با بررسی و مقایسه نتایج تحقیق حاضر با نتایج تحقیق قبلی، شاید بتوان گفت ضمن لزوم بررسی‌های ژنتیکی، بررسی‌های مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی بیشتری هم لازم است تا بتوان با شناسایی و طبقه‌بندی دقیق‌تر، ارقام محلی را به صورت دقیق‌تر مورد بررسی قرار داد.

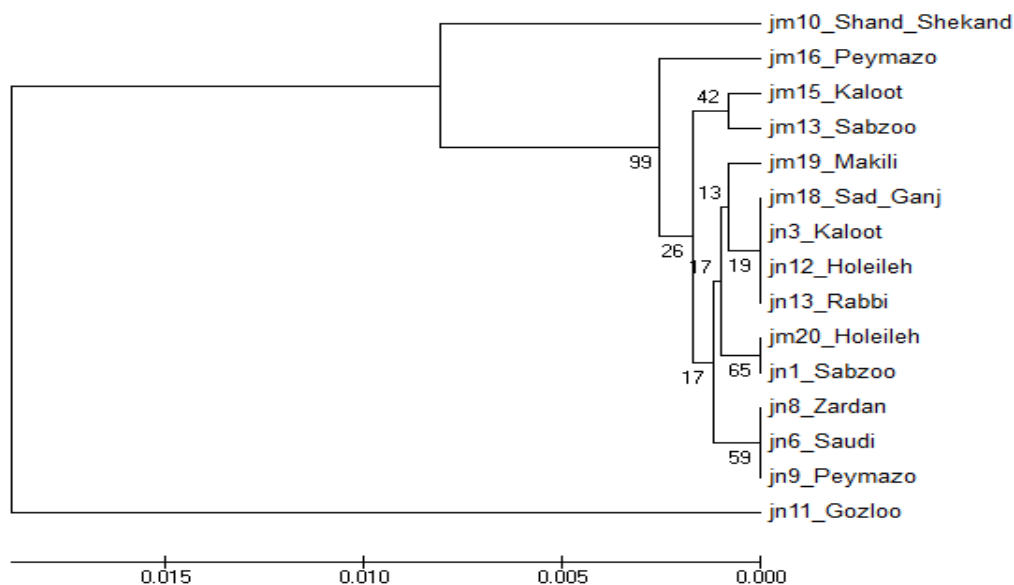
بر اساس داده‌های تعیین توالی ناحیه بین ژنی *trnH-psbA*، رابطه فیلوژنتیکی ژنوتیپ‌های خرما مورد آزمایش با گونه‌های دیگر گیاهی نیز مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۹). برش دندوگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به چهار شاخه تقسیم می‌شود که گونه *Phoenix dactylifera* از امریکا با کمترین فاصله نسبت به ارقام مورد مطالعه قرار می‌گیرد. سپس گونه *P. dactylifera* از عربستان و گونه *Phoenix reclinata* از امریکا نسبت به ارقام خرما مورد مطالعه در فاصله دورتر قرار دارند.

این نتایج نشان داد که از نظر ناحیه بین ژنی *trnH-psbA* ارقام خرما مورد بررسی نسبت به گونه‌های گیاهی دیگر در فاصله نسبتاً قابل توجهی قرار گرفته‌اند. به نظر می‌رسد با توجه به آنکه تاکنون در گیاه خرما در زمینه ارتباط تنوع ناحیه بین ژنی *trnH-psbA* با تنوع جغرافیایی در ایران هیچگونه مطالعه‌ای انجام نشده است، آزمایشاتی با حضور تعداد بیشتر و از نقاط جغرافیایی مختلف می‌تواند اطلاعات کامل‌تری را فراهم نماید.

جدول ۶. فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌های نخل خرما مورد مطالعه

Table 6. Genetic distance of date palm genotypes

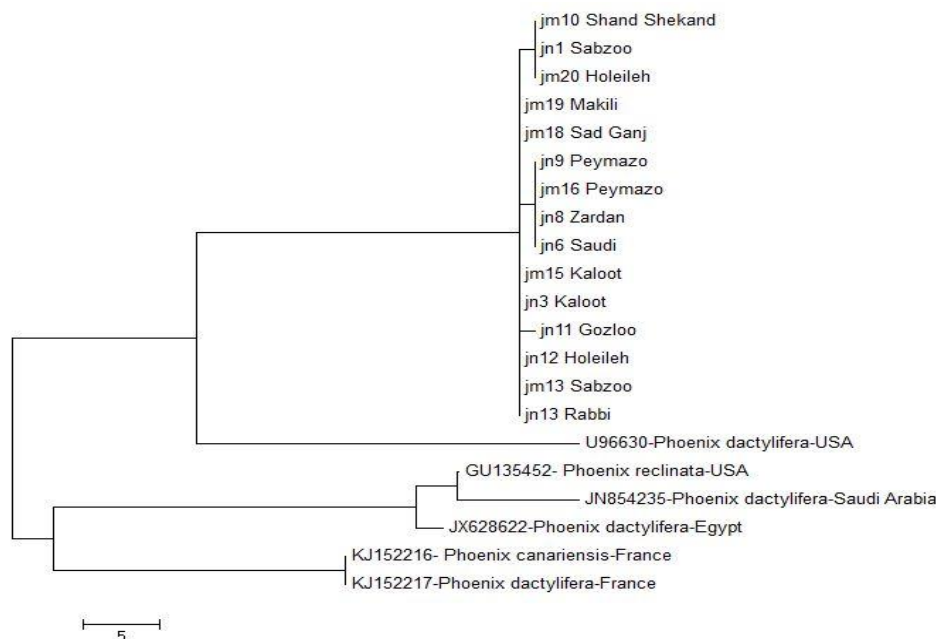
ژنوتیپ Genotype	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1-Jm10_Shand_Shekand	1														
2-Jm13_Sabzoo	0.013	1													
3-Jm15_Kaloot	0.015	0.002	1												
4-Jm16_Peymazo	0.017	0.005	0.007	1											
5-Jm18_Sad_Ganj	0.017	0.003	0.002	0.005	1										
6-Jm19_Makili	0.015	0.005	0.003	0.007	0.002	1									
7-Jm20_Holeileh	0.015	0.005	0.003	0.007	0.002	0.003	1								
8-Jm1_Sabzoo	0.015	0.005	0.003	0.007	0.002	0.003	0.000	1							
9-Jn3_Kaloot	0.017	0.003	0.002	0.005	0.000	0.002	0.002	0.002	1						
10-Jn10_Saudi	0.018	0.005	0.003	0.003	0.002	0.003	0.003	0.003	0.002	1					
11-Jn8_Zardan	0.018	0.005	0.003	0.003	0.002	0.003	0.003	0.003	0.002	0.000	1				
12-Jn9_Peymazo	0.018	0.005	0.003	0.003	0.002	0.003	0.003	0.003	0.002	0.000	0.000	1			
13-Jn11_Gozloo	0.046	0.039	0.037	0.039	0.036	0.037	0.037	0.037	0.036	0.038	0.038	0.038	1		
14-Jn12_Holeileh	0.017	0.003	0.002	0.005	0.000	0.002	0.002	0.002	0.000	0.002	0.002	0.002	0.036	1	1
15-Jn13_Rabbi	0.017	0.003	0.002	0.005	0.000	0.002	0.002	0.002	0.000	0.002	0.002	0.002	0.036	0.000	0.000



شکل ۸. درخت فیلوژنتیکی ژنوتیپ‌های خرما مورد مطالعه براساس نتایج تعیین توالی ناحیه *trnH*-

psbA به روش UPGMA

Figure 8. The phylogenetic tree of palm genotypes studied based on the results of sequencing of *trnH-psbA* region by UPGMA method



شکل ۹. درخت فیلوژنتیکی ارقام خرما مورد مطالعه در مقایسه با گونه‌های دیگر گیاهی براساس

نتایج تعیین توالی ناحیه *trnH-psb*

Figure 9. The phylogenetic tree of Palm genotypes studied compared to other plant species based on the results of sequencing of *trnH-psbA* region

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از بررسی‌های انجام شده در این مطالعه برای ۱۵ رقم نخل خرمای مورد مطالعه نشان داد که برای ناحیه بین‌ژنی *trnH-psbA* در مجموع ۷۸۷ جایگاه شناسایی شد که ۱۷۴ جایگاه دارای حذف و اضافه و ۶۱۳ جایگاه بدون حذف و اضافه بود. مقدار متوسط عددی جایگزینی‌های مترادف و غیرمترادف (dN/dS) حدود ۰/۲۵ بود که نشان‌دهنده گزینش‌های مثبت و خالص در روند انتخاب طبیعی ارقام مورد مطالعه بوده و باعث تغییرات کلیدی نشده است. همچنین نتایج نشان داد که از نظر ناحیه بین‌ژنی *trnH-psbA* ژنوتیپ‌های گزالو ۱۱ و شندشکند ۱۰ از سراوان با ضریب ۰/۴۶ دارای بیشترین فاصله ژنتیکی از یکدیگر بودند. براساس دندوگرام حاصل از تجزیه کلاستر، ارقام در ۴ گروه مختلف قرار گرفتند. رقم گزالو ۱۱ از سراوان در گروه اول، شندشکند ۱۰ از سراوان در گروه دوم، پیمازو ۱۶ از جالق در گروه سوم و بقیه ۱۲ ژنوتیپ خرمای مورد بررسی در گروه چهارم قرار گرفتند. با این حال به‌نظر می‌رسد، برای حصول اطلاعات جامع‌تر، نیاز به انجام تحقیقات بیشتری است. لذا پیشنهاد می‌شود که تنوع این ارقام به‌وسیله دیگر بارکدهای DNA نظیر *ITS* و *matk* و همچنین سایر نشانگرهای مولکولی مناسب بررسی شود تا بتواند با نتایج تحقیق حاضر مورد بررسی قرار گیرد. از آنجایی که ارقام گزالو سراوان و شندشکند سراوان در دو گروه جداگانه قرار گرفتند که این نشان‌دهنده وجود تنوع بین ارقام مذکور است، لذا پیشنهاد می‌شود در برنامه اصلاحی آتی خرما، از ارقام گزالو و شندشکند از سراوان به‌عنوان یکی از پایه‌های پدری یا مادری استفاده شود.

References

- Akbarzadeh, R. F., Hosseinzadeh Colagar, A., & Yousefzadeh, H. (2013). Taxonomic status and genetic variation of the genus *Castanea* (Fagaceae) in Iran based on *psbA* and *trnHpsbA*. *Rostaniha Journal*, 14, 229-237. <https://10.22092/botany.2014.101289> [In Persian]
- Bolson, M. Smidt, E. C., Brotto, M. L., & Silva-Pereira, V. (2015). ITS and trnHpsbA as efficient DNA barcodes to identify threatened commercial woody angiosperms from Southern Brazilian Atlantic rainforests. *PLoS ONE* 10, e0143049. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143049>
- Botstein, D. R., White, R. L., Skolnick, M. & Davis, R. W. (1980). Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Human Genetic Journal*, 32, 314-332. PMC1686077
- Dellaporta, S. L., Wood, J., & Hicks, J. B. (1993). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1, 19-22. <https://doi.org/10.1007/BF02712670>
- Firouzi, S. (2016). Molecular investigation of ribosomal genes and regions between the chloroplast genome using ITS and IGS regions on different olive cultivars. Master's thesis, University of Zabol. pp. 102 [In Persian]
- Hassan, A. H., (2023). DNA Barcode Trnh-Psba Is A Promising Candidate Gene for Efficient Identification of Bitter and Sweet Almond and Related Species. *Egyptian Journal of Desert Research*, 73(1), 265-281. <https://doi.10.21608/ejdr.2023.214645.1144>
- Hassanzadeh Khankahdani, H., & Bagheri, A. (2019). Identification of Genetic Variation of Male and Female Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) Cultivars Using Morphological and Molecular Markers. *International Journal of Horticultural Science and Technology*, 6(1), 63-76. <https://doi.10.22059/ijhst.2019.276013.278>
- Hollingsworth, P. M., Graham, S. W., & Little, D. P. (2011). Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS One*, 6(5), e19254. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019254>
- Kress, W. J., & Erickson, D. L., (2007). A Two-Locus Global DNA Barcode for Land Plants: The Coding *rbcl* Gene Complements the Non-Coding *trnH-psbA* Spacer Region. *PLOS ONE*, 2(6), e508. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000508>
- Kress, W. J., Wurdack, K. J., Zimmer, E. A., Weigt, L. A., & Janzen, D. H. (2005). Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(23), 8369-8374. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503123102>
- Li, J., Bi, H., Li, Z., & Feng, J. (2009). Genetic analysis of *Ziziphus Jujube* Huizao using ISSR markers. Conference: I International Jujube Symposium At: Baoding China Volume: ISHS Acta Horticulturae 2009,840. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.840.15>
- Madras Kia, H., Jalali Javaran, M., Dehghani, H., & Madras Kia, M. (2012). Investigating the

- genetic diversity of some Data Palme cultivars of Kerman province using RAPD molecular markers. 12th Congress of Iranian Genetics Society, Tehran, Iran. [In Persian]
- Maheswaran, M. (2014). Molecular Markers: History, Features and Applications. Advanced Biotech: 1-8 p. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:84727933>
- Marsafari, M., Ashraf Mehrabi, A., Tahmasebi, Z., & Rahnema, A. (2014). Association Analysis of Some Important Morphological Traits with RAPD Markers in 15 Iranian Date Palm. *Journal of Horticultural Science*, 27(4), 480-487. <https://doi.org/10.22067/jhorts4.v0i0.30665> [In Persian]
- Marshall, D. R., & Brown, A. H. D. (1975). Optimum sampling strategies in genetic conservation. *Crop Genetic Resoutces for Today and Tomorrow*. Cambridge university press, London, pp: 53-80.
- Newbury, H. J., & Ford-Lloyd, B.V. (1997). Estimation of genetic diversity. In: Maxted N, Ford-Lloyd BV and Hawkes JG (eds) *Plant Genetic Conservation: The In Situ Approach*. Chapman & Hall, London. pp. 192-206.
- Okoth, P., Muoma, J., Emmanuel, M., Omayio, D. O., Angienda, P. O., & Clabe, W., (2016). The Potential of DNA barcode-based delineation using seven putative candidate loci of the plastid region in inferring molecular diversity of cowpea at sub-species level. *American Journal of Molecular Biology*, 6(4), 138-158. <https://doi.org/10.4236/ajmb.2016.64014>
- Pang, X., Liu, C., Shi, L., Liu, R., Liang, D., Li, H., Cherny, S. S., & Chen, S. (2012). Utility of the trnH-psbA intergenic spacer region and its combinations as plant DNA barcodes: a meta-analysis. *PLoS One*, 7(11), e48833. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048833>
- Raeisi, F., Fahmideh, L., Fakheri, B. A., & Kikhasaber, M. (2021). Studying of Genetic Diversity of *rbcl* Gene in Some Date Palm Cultivars in Sistan and Baluchistan Province, Iran, *Plant Genetic Researches*, 8 (1), 29-42. <https://doi.org/10.52547/pgr.8.1.3> [In Persian]
- Sang T., Crawford, D. J., & Stuessy, T. F. (1977). Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany*, 84, 1120-1136. PMID: 21708667.
- Shirzaie, A., Solouki, M., & Fahmideh, L. (2021). Molecular Analysis of Some Mango Genotypes in Southern Iran Based on *trnhH-psbA* Intergenic Region. *Iranian Journal of Horticultural Science and Technology*, 22 (4), 449-464. <http://journal-irshs.ir/article-1-370-en.html> [In Persian]
- Taghinejad, H., Fahmideh, L., Samsampoor, D., & Askaryesyahooi, M. (2018). Genetic diversity of date palm cultivars in Sistan and Baluchestan and Hormozgan provinces using microsatellite. *Journal of Molecular and Cellular Research*, 31(2), 221-231. DOI: 20.1001.1.23832738.1397.31.2.5.3 [In Persian]

- Tamura, K., & 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(3), 512-526. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023>
- Vahabi, N. (2016). Identification of five medicinal plants using DNA barcoding method. Master's thesis. University of Zabol. pp. 95. [In Persian]
- Whitlock, B. A., Hale, A. M., & Groff, P. A. (2010). Intraspecific inversions pose a challenge for the *trnH-psbA* plant DNA barcode. *PLoS ONE*, 5, e11533. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011533>