Sari Agriculture Sciences and Natural Resources University

Journal of Crop Breeding Vol. 18, Issue 2, 2026 p: 173-184

OPEN ACCESS

Research Paper

Phylogenetic Classification of Some Date Palm Cultivars in Sistan and Baluchestan Province Based on the *matK* Chloroplasty Gene

Fatemeh Raeisi[1], Leila Fahmideh[2], Barat Ali Fakheri[3] and Mojtaba Keykhasaber[4]

1- M.Sc. Student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran

2- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Plant Production Faculty, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran,
(Corresponding author: l.fahmideh@gau.ac.ir)

3- Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran

4- Associate Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran

Received: 05 October, 2025 Revised: 28 December, 2025 Accepted: 02 February, 2026

Extended Abstract

Background: The date palm (*Phoenix dactylifera* L.) is a monocotyledonous plant from the Palmaceae, which is cultivated in many countries from tropical and subtropical regions, including Iran. Today, owing to the progress of technology, molecular identification methods have special importance in systematic studies. One of these methods is DNA barcoding, which is species identification based on the sequences of conserved DNA regions that provide a valuable tool for assessing phylogenetic relationships. In this method, the comparison of the sequences of special conserved DNA fragments is used to study the diversity of populations and determine the relationships between different species. Accordingly, different regions of nuclear DNA (*ITS, ITS2*) and chloroplast (*rbcL, matK, trnH-psbA, atpF-atpH, nhdJ,* and *psbK-psbI*) have been suggested as important barcodes in plants. The *matK* chloroplast gene, which has a high evolutionary speed at the nucleotide and amino acid levels, is one of the most suitable chloroplast genes for the analysis of phylogeny and evolutionary relationships in a range of taxonomic levels from species to genus, phylum and even super phylum, in Angiosperms in particular. This gene can be used individually or together with other genes to identify and introduce unknown species. Examining the genetic diversity of the available germplasm reserves is essential for the improvement and propagation of cultivars with desirable traits, and the first step in this process is to identify the existing cultivars and classify them. Due to the importance of producing dates in Iran, browsing for new cultivars, breeding existing cultivars, and studying the existing diversity between different cultivars are among important strategies to improve the quantity and quality of date palm production. However, there are not enough studies on the investigation of the relationship or genetic distance of different date palm cultivars using suitable genetic markers. Therefore, the main objective of this research was to determine the capability of the *matK* marker for the analysis of genetic diversity and phylogenetic relationships of the studied date palm cultivars.

Methods: In this research, the chloroplast gene *matK* was used to investigate the genetic diversity among 15 local date varieties from Saravan and Jalgh, Nahok, and Sinokan regions of Sistan and Baluchistan Province. DNA was extracted from young leaves of different cultivars using the Dellaporta (1993) method, and then the quality and quantity of DNA was determined using 1.5% agarose gel electrophoresis and a spectrophotometer. PCR was performed using specific primers of the *matk* gene, and a fragment of about 900 bp was amplified and sent for sequencing. The quality of the sequencing results was examined and then aligned using BioEdit software, and the regions with low sequencing quality were removed from the 3' and 5' ends. Next, the sequences were blasted for alignment with other sequences in the NCBI database to examine the degree of similarity with other registered sequences. After sequence alignment, key genetic parameters, including the total number of mutations, nucleotide diversity, the number of mutation sites, and the extent of their variation, were comprehensively analyzed. Then, MEGA7 software was used to determine the relationships and genetic distance between the studied cultivars, and the UPGMA method was also used to draw a phylogeny tree.

Results: The comparison of the sequences showed a high homology between these sequences and the sequences of *P. dactylifera* species available in the gene bank. Sequencing results of the investigated cultivars were registered in the NCBI database. The results of the current research showed that a total of 1019 positions were identified for the *matk* marker used in this study, 672

Copyright ©2026. Raeisi et al. Published by Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non-Commercial 4.0 Unported License, which allows users to read, copy, distribute, and make derivative works for non-commercial purposes from the material, as long as the author of the original work is cited properly.

positions of which included deletions and additions, and 347 positions were without deletions or additions. Fifteen haplotypes and four conserved DNA regions were identified in this population. The numerical value dN/dS was 0.169, and the genetic distance ranged from 0.019 to 1.238. The highest genetic distance (1.238) was observed between the samples of Halile20 from Saravan and Pimazo16 from Jalgh. After drawing the phylogeny tree, the studied cultivars were divided into three branches, in which Halileh 20 from Saravan was located in the first branch. The Pimazo 16 variety from Jalgh was placed in the second branch. The third branch was divided into two sub-branches, in which there were a total of six numbers in the first sub-branch and a total of seven numbers in the second sub-branch. According to this classification, Halileh 20 of Saravan is the most distant from the other varieties.

Conclusion: Based on the obtained results, it can be concluded that the use of the *matk* marker has been useful and suitable for studying and understanding the diversity and intraspecies relationships of date palms. Therefore, it is possible to suggest the use of this barcode in addition to other suitable molecular in future date palm studies to investigate genetic diversity.

Keywords: Data palm, DNA barcoding, Genetic distance, *matK* marker, Phylogenetic relationships

How to Cite This Article: Raeisi, F., Fahmideh, L., Fakheri, B. A., & Keykhasaber, M. (2026). Phylogenetic Classification of Some Date Palm Cultivars in Sistan and Baluchestan Province Based on the *matK* Chloroplasty Gene. *J Crop Breed,* 18(2), 173-184. DOI: 10.61882/jcb.2026.1588

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

مقاله پژوهشی

طبقه‌بندی فیلوژنتیکی برخی ارقام نخل خرمای استان سیستان و بلوچستان بر اساس ژن کلروپلاستی *matK*

فاطمه رئیسی[۱]، لیلا فهمیده[۲]، براتعلی فاخری[۳] و مجتبی کیخاصابر[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۲- دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران، (نویسنده مسوول: l.fahmideh@gau.ac.ir)
۳- استاد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
۴- دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۷/۱۳ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۴/۱۰/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۱۳
صفحه ۱۷۳ تا ۱۸۴

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: نخل خرما با نام علمی (*Phoenix dactylifera* L) گیاهی تک‌لپه از خانوادهٔ Palmaceae است که کشت آن در دنیا و همچنین در ایران از یک سابقه طولانی برخوردار بوده است و در نواحی گرمسیری و نیمه‌گرمسیری و بسیاری از کشورها از جمله ایران پرورش می‌یابد. امروزه با پیشرفت علم، روش‌های شناسایی مولکولی در مطالعات سیستماتیک جایگاه ویژه‌ای پیدا کرده‌اند. یکی از این روش‌ها بررسی و مقایسه ساختار ژن‌ها و قطعات DNA دارای توالی‌های محافظت شده‌ای است که طی فرایندهای تکاملی در گونه‌ها و ارقام مختلف ساختار منحصر به‌فرد خود را حفظ نموده‌اند که به اصطلاح DNA بارکدینگ نامیده می‌شوند. DNA بارکدینگ یک ابزار ارزشمند برای ارزیابی روابط فیلوژنتیک فراهم آورده است. در این روش، بخش کوچکی از ژنوم گیاه توالی‌یابی شده و برای مطالعه تنوع جمعیت‌ها و تعیین روابط خویشاوندی بین گونه‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد. بر همین اساس، در گیاهان نواحی مختلف از DNA هسته‌ای (ITS، ITS2) و کلروپلاستی (*rbcL*، *matK*، *trnH-psbA*، *atpF-atpH*، *nhdJ*، *psbK-psbI*) به‌عنوان بارکد پیشنهاد شده است. ژن کلروپلاستی *matK* که دارای سرعت تکاملی بالا در سطوح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی است، یکی از مناسب‌ترین ژن‌های کلروپلاستی برای حل روابط فیلوژنی و تکاملی در گستره‌ای از سطوح تاکسونومیک از سطح گونه تا جنس، تیره و حتی فراتیره‌ای در میان گیاهان به‌ویژه نهان‌دانگان است. این ژن می‌تواند به‌صورت تکی یا همراه با ژن‌های دیگر برای شناسایی و معرفی گونه‌های ناشناخته استفاده شود. بررسی تنوع ژنتیکی ذخایر ژرم‌پلاسم موجود جهت اصلاح و تکثیر ارقام دارای صفات مطلوب امری ضروری است و اولین قدم در این فرایند شناسایی ارقام موجود و دسته‌بندی آن‌ها است. با توجه به اهمیت تولید خرما در کشور، جستجوی ارقام جدید، اصلاح ارقام موجود و بررسی تنوع موجود بین ارقام مختلف از راهکارهای مهم برای بهبود کمی و کیفی تولید خرما است. از آنجا که مطالعات زیادی در زمینه بررسی و تعیین میزان قرابت یا فاصله ژنتیکی ارقام مختلف خرما با استفاده از نشانگرهای ژنتیکی مناسب، صورت نگرفته‌اند، لذا هدف از این پژوهش تعیین فاصله ژنتیکی، تعیین شباهت و دسته بندی ارقام نخل خرمای مورد مطالعه با استفاده از نشانگر *matK* بود تا با ترسیم درخت فیلوژنتیکی و مقایسه آنها با یکدیگر، مناسب بودن این نشانگر برای بررسی تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی ارقام مذکور مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی موجود بین ۱۵ رقم محلی خرما از شهرستان سراوان و بخش‌های جالق، ناهوک و سینوکان استان سیستان و بلوچستان، از ژن کلروپلاستی *matK* استفاده شد. استخراج DNA از برگ‌های جوان ارقام مختلف با استفاده از روش دلاپورتا (۱۹۹۳) انجام شد و در ادامه کیفیت و کمیت DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز یک و نیم درصد و دستگاه اسپکتوفتومتر تعیین گردید. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *matK*، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد که قطعه حدود ۹۰۰ bp تکثیر گردید. سپس محصولات PCR جهت توالی‌یابی ارسال شدند. کیفیت نتایج حاصل از تعیین توالی بررسی شد و سپس با استفاده از نرم‌افزار BioEdit همتراز و نواحی دارای کیفیت توالی‌یابی پایین از دو انتهای '۳ و '۵ حذف شدند. توالی‌ها پس از ثبت، جهت همترازی با سایر توالی‌های موجود در پایگاه داده NCBI بلاست شدند و میزان تشابه با سایر توالی‌های ثبت شده مورد بررسی قرار گرفت. بعد از هم ردیف کردن توالی‌ها، برخی پارامترهای ژنتیکی مانند تعداد جهش‌ها، تنوع نوکلئوتیدی، تعداد جایگاه‌هایی که در آنها جهش اتفاق افتاده بود و همچنین تنوع آنها مورد بررسی قرار گرفتد. در ادامه، جهت تعیین روابط خویشاوندی و فاصله ژنتیکی بین ارقام مورد مطالعه از نرم‌افزارهای MEGA7 و همچنین برای ترسیم درخت فیلوژنی از روش خوشه‌بندی UPGMA استفاده شد.

یافته‌ها: مقایسه توالی‌ها همولوژی بالایی را بین این توالی‌ها با توالی‌های گونه *Phoenix dactylifera* موجود در بانک ژن نشان داد. نتایج توالی‌یابی ارقام مورد بررسی در پایگاه داده NCBI ثبت گردید. برای این نشانگر در مجموع ۱۰۱۹ موقعیت شناسایی شد که ۶۷۲ جایگاه دارای حذف و اضافه، و ۳۴۷ جایگاه بدون حذف و اضافه بودند. در این جمعیت، ۱۵ هاپلوتایپ و همچنین چهار ناحیه حفاظت‌شده DNA برای نشانگر *matK* شناسایی شدند. مقدار عددی نسبت جایگزینی (dN/dS) برابر ۰/۱۶۹ بود و فاصله ژنتیکی نیز در دامنه ۰۱۹ /۰ تا ۱/۲۳۸ مشاهده شد. بیشترین فاصله ژنتیکی (۱/۲۳۸) بین نمونه‌های هلیله ۲۰ از سراوان و پیمازو ۱۶ از جالق مشاهده شد. پس از ترسیم درخت فیلوژنتیکی، ارقام مورد مطالعه به سه شاخه تقسیم شدند که در شاخه اول رقم هلیله ۲۰ که از شهرستان سراوان جمع‌آوری شده بود، قرار گرفت. در شاخه دوم، رقم پیمازو ۱۶ از جالق قرار گرفت. شاخه سوم خود به دو زیرشاخه تقسیم شد که در زیر شاخه فرعی اول در مجموع شش رقم و در زیر شاخه فرعی دوم در مجموع هفت رقم قرار گرفتند. بر اساس این تقسیم‌بندی، رقم هلیله ۲۰ از سراوان بیشترین فاصله را با سایر ارقام دارد.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج حاصله می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از نشانگر *matK* برای مطالعه و شناخت تنوع و روابط درون‌گونه‌ای خرما مفید و مناسب است. بنابر این، در مطالعات آتی بررسی تنوع ژنتیکی خرما، می‌توان استفاده از این بارکد را در کنار سایر نشانگرهای مولکولی مناسب پیشنهاد نمود.

واژه‌های کلیدی: بارکدینگ DNA، روابط فیلوژنتیک، فاصله ژنتیکی، نخل خرما، نشانگر *matK*

مقدمه

نخل خرما با نام علمی (*Phoenix dactylifera* L) گیاهی است تک‌لپه از خانواده Palmaceae، که کشت آن در دنیا و همچنین در ایران از یک سابقه طولانی برخوردار بوده است (Raeisi *et al*., 2021). ایران با داشتن حدود ۴۰۰ رقم خرما غنی‌ترین ژرم‌پلاسم خرمای دنیا را در بین کشورهای خرماخیز جهان دارا است. یازده استان خوزستان، فارس، بوشهر، کرمان، هرمزگان، سیستان و بلوچستان، یزد، خراسان، اصفهان، و

کرمانشاه از مهمترین مناطق تولید خرمای ایران هستند (Pejman, 2007). رتبه سوم تولید جهانی خرما با حدود ۱/۶ میلیون تن مربوط به ایران است. همچنین از نظر صادرات خرما، ایران با ۱۱۸ میلیون دلار صادرات در جایگاه ششم جهان قرار دارد (FAO, 2021).

بررسی تنوع ژنتیکی ذخایر ژرم‌پلاسم موجود جهت اصلاح و تکثیر ارقام دارای صفات مطلوب امری ضروری است و اولین قدم در این فرایند، شناسایی ارقام موجود و دسته‌بندی آن‌ها است (Fahmideh *et al*., 2024). در این راستا، روش‌های مولکولی مانند DNA بارکدینگ (بررسی یک ناحیه استاندارد DNA که در بین تمامی ارقام و گونه‌های مختلف تغییرپذیری و تنوع نسبتاً بالایی را نشان می‌دهد) یک ابزار ارزشمند را برای ارزیابی روابط فیلوژنتیک فراهم آورده است (Pang *et al*., 2012). ژن کلروپلاستی *matK*[1] که دارای سرعت تکاملی بالا در سطوح نوکلئوتیدی و آمینواسیدی است، یکی از مناسب‌ترین ژن‌های کلروپلاستی برای حل روابط فیلوژنی و تکاملی در گستره‌ای از سطوح تاکسونومیک از سطح گونه تا جنس، تیره و حتی فراتیره‌ای در میان گیاهان به‌ویژه نهان‌دانگان است. این ژن به عنوان DNA بارکد، سطوح بالای تمایز را در میان گونه‌های نهان‌دانگان نشان داده است که می‌تواند به‌صورت تکی یا همراه با ژن‌های دیگر برای شناسایی و معرفی گونه‌های ناشناخته استفاده شود (Kazempour Osaloo *et al*., 2014).

خدایاری و همکاران (Khodayari *et al*., 2016) به‌منظور بررسی موقعیت تاکسونومیکی و تبارزایی قبیله Mentheae با تاکید بر گیاه دارویی مورخوش با نام علمی *Zhumeria majdae Rech. F. & Wendelbo* که از گونه‌های انحصاری استان هرمزگان است، از توالی‌یابی ژن کلروپلاستی *matk* استفاده کردند. طبق نتایج آنها، قبیله Mentheae متشکل از سه تبار تک‌نیای مجزا شامل زیرطایفه‌های Salviinae، Menthinae و Nepetinae است و گیاه مورخوش همراه با *Salvia aegyptiaca* یک گروه خواهری را در زیرطایفه Salviinae تشکیل می‌دهد. جوانمردی (Javanmardi, 2015) روند تکامل صفات ریخت‌شناسی گونه‌های *Astragalus dictyolobus* و *A. tawilicus* و گونه *A. victoriae* را با سایر گونه‌های *Alopecuroidei* بر اساس داده‌های حاصل از تبارزایی توالی کلروپلاستی *matK* مورد ارزیابی قرار داد و ۱۲ صفت ریخت‌شناسی رویشی و زایشی انتخاب و حالت‌های مختلف آنها را در قالب تبارزایی داده‌های حاصل از توالی کلروپلاستی *matK* بررسی کرد. در تحقیق دیگری، رابطه فیلوژنی *Lathyrus* با *Pisum* بر اساس ژن *matK* مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. در آن مطالعه، از روش‌های چندگانه برای ارزیابی مونوفیلی و ارتباط درون جنس *Lathyrus* بر اساس تاکسون‌هایی که در ایران رشد می‌کنند، استفاده شد. بر اساس نتایج مطالعه، Pisum در بین گونه‌های *Lathyrus* قرار دارد (Oskoueiyan *et al*., 2014). اربابی و همکاران (Arbabi *et al*., 2021; Arbabi *et al*., 2022; Arbabi *et al*., 2023) با بررسی روابط فیلوژنتیکی چند ژنوتیپ بومی و غیربومی لوفا با استفاده از نشانگرهای *ITS*، *trnH-psbA* و *rbcl* به این نتیجه رسیدند که استفاده از این بارکدها برای بررسی تنوع درون‌گونه‌ای این گونه گیاهی مناسب بود. نتایج مطالعه مشابه دیگری که با ژنوتیپ‌های خرما موجود در مطالعه حاضر با استفاده از نشانگر *rbcL* توسط رئیسی و همکاران (Raeisi *et al*., 2021) انجام شد، نشان دادند که نشانگر *rbcL* برای بررسی تنوع و روابط درون‌گونه‌ای مفید بود اما در خصوص ارقام خرمای مورد آزمون در این تحقیق، فاصله ژنتیکی کمی برآورد شد (فاصله ژنتیکی۰ تا ۰/۰۳۷). لذا پیشنهاد شد که از سایر بارکدهای DNA و همچنین سایر نشانگرهای مولکولی مناسب نیز استفاده شود. با وجود تنوع بالای ارقام بومی و غیر بومی نخل خرما در ایران، مطالعات زیادی در زمینه بررسی و تعیین میزان قرابت یا فاصله ژنتیکی آنها با استفاده از نشانگرهای ژنتیکی مناسب صورت نگرفته‌اند. لذا هدف از این پژوهش، تعیین فاصله ژنتیکی، تعیین شباهت و دسته‌بندی ارقام نخل خرمای مورد مطالعه این‌بار با استفاده از نشانگر *matK* بود تا با ترسیم درخت فیلوژنتیکی و مقایسه آنها با یکدیگر، مناسب بودن این نشانگر برای بررسی تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی ارقام مذکور مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های برگ‌های‌تازه و جوان پانزده رقم مختلف نخل خرمای کشت شده از استان سیستان و بلوچستان (بخش‌های مرکزی شهرستان سراوان، ناهوک، سینوکان و جالق) جمع‌آوری و برای بررسی فیلوژنتیکی به آزمایشگاه منتقل شدند (جدول ۱). پس از درج مشخصات کامل نمونه‌های برگی که شامل نوع رقم، محل جمع‌آوری، طول و عرض جغرافیایی بود، نمونه‌ها در شرایط سرد حمل و به منظور استخراج DNA در فریزر ۸۰- درجه پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی دانشگاه زابل منتقل شدند.

1. Megakaryocyte-Associated Tyrosine Kinase

جدول ۱- نام ارقام نخل خرمای مورد مطالعه و مشخصات محل نمونه‌برداری
Table 1. Names of date palm cultivars studied and characteristics of the sampling location

شماره Number	نام رقم Cultivar Name	کد شناسایی Identification Code	محل جمع‌آوری Location	طول جغرافیایی Longitude	عرض جغرافیایی Latitude	ارتفاع از سطح دریا (متر) Height above the sea level (m)
1	شندشکند (Shand Shekand)	Jm10	سراوان (Saravan)	65° 20'	27° 22'	1155
2	سبزو (Sabzoo)	Jm13	جالق (Jalgh)	62° 30'	27° 20'	857
3	کلوط (Kaloot)	Jm15	جالق (Jalgh)	62° 30'	27° 20'	851
4	پیمازو (Peymazo)	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	سبزو (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 (Peymazo)	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 مورد استفاده در این تحقیق برای تکثیر ژن *matK*
Table 2. Primer sequences used in this study for amplifying the *matK* gene

آغازگر Primer	توالی Sequence	اندازه Size (bp)	منبع Reference
matK-F	5'-CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG-3'	25	Robinson *et al*., 2001
matK-R	5'-ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC-3'	27	

جدول ۳- برنامه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با آغازگرهای ژن *matK*
Table 3. Polymerase Chain Reaction Program with the *matK* primer

مرحله واکنش Reaction stage	سیکل Cycle	دما (سانتی‌گراد) Temperature (°C)	زمان (دقیقه و ثانیه) Time (Minutes and Seconds)
واسرشت‌سازی اولیه (Initial denaturation)	1	94	6 M
واسرشت‌سازی (Denaturation)		94	45 S
اتصال آغازگر (Annealing)	35	60	45 S
توسعه آغازگر (Primer extension)		72	50 S
توسعه نهایی (Final extension)	1	72	15 M
نگهداری (Maintenance)	-	4	-

استخراج DNA، انجام PCR و توالی‌یابی محصولات PCR

استخراج DNA از نمونه‌های جمع‌آوری شده به‌روش دلاپورتا و همکاران (Dellaporta *et al*., 1993) انجام شد و سپس کیفیت و کمیت DNA استخراج‌شده با استفاده از دو روش اسپکتروفتومتری (با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر مدل Unico USA UV-2100) و الکتروفورز بر روی ژل آگارز یک درصد بررسی شد (Lewin *et al*., 1994). در ادامه، PCR با استفاده از آغازگر ژن *matK* (جدول ۲) و براساس برنامه زمان‌بندی و حرارتی (جدول ۳) با استفاده از دستگاه Eppendorf (22331 Humburg) انجام شد. سپس الکتروفورز محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز یک و نیم درصد انجام شد. پس از رنگ‌آمیزی با ژل رد، عکس‌برداری با دستگاه ژل داک (vilber lourmat E- Box- VX2- 20m) صورت گرفت. محصولات PCR به‌دست آمده جهت انجام توالی‌یابی به شرکت پیشگام ارسال شدند و سپس خالص‌سازی و توالی‌یابی ناحیه مورد نظر توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی انجام شد.

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از نتایج توالی‌یابی

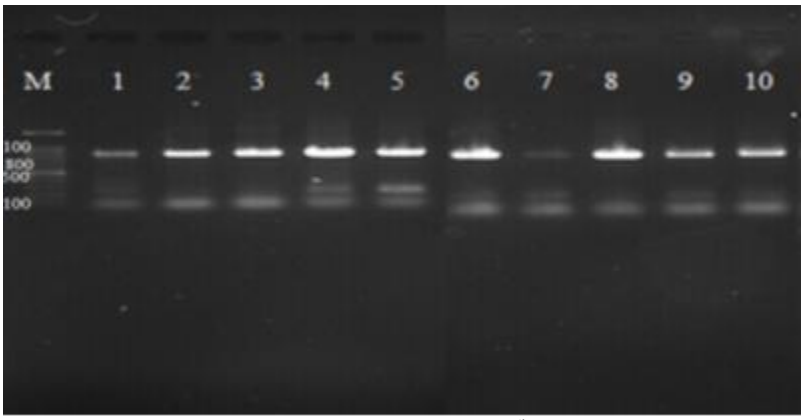
کیفیت نتایج حاصل از تعیین توالی با استفاده از نرم‌افزار Chromas version v.2.4.1 بررسی شد. سپس با استفاده از نرم‌افزار BioEdit همتراز و نواحی دارای کیفیت توالی‌یابی پایین از دو انتهای '۳ و '۵ حذف شدند.

توالی‌های حاصل جهت همترازی با سایر توالی‌های موجود در پایگاه داده NCBI در قسمتNucleotide BLAST، بلاست شدند و میزان تشابه با سایر توالی‌های ثبت‌شده مورد

بررسی قرار گرفت. در ادامه، با استفاده از نرم‌افزارهای DNAsp v5 و MEGA7، برخی پارامترهای ژنتیکی مانند تعداد جهش‌ها، تنوع نوکلئوتیدی، تعیین روند انتخاب طبیعی (dN/dS)، تعداد جایگاه‌هایی که در آنها جهش اتفاق افتاد و همچنین تنوع آنها مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین، به منظور تعیین روابط خویشاوندی و مشخص کردن فاصله ژنتیکی بین ارقام مورد مطالعه، از نرم‌افزارهای MEGA7 استفاده شد و در ادامه درخت فیلوژنی با روش خوشه‌بندی UPGMA ترسیم گردید.

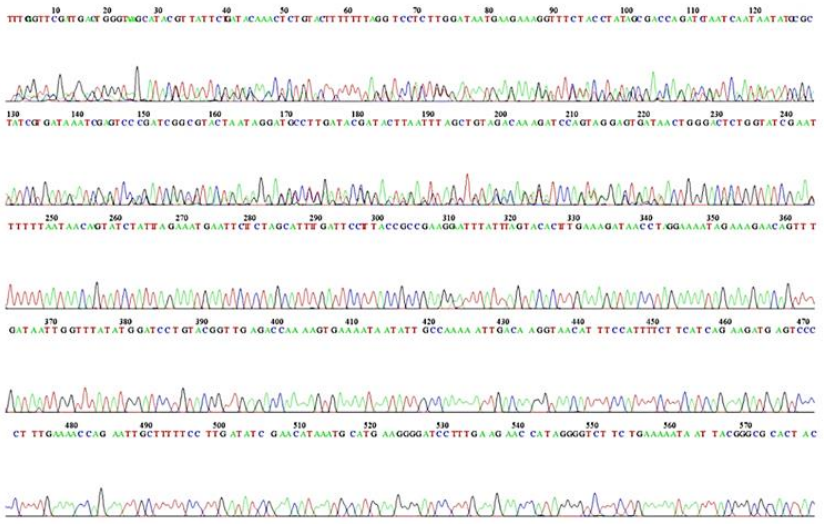
نتایج و بحث

پس از انجام واکنشPCR، محصولات PCR بر روی ژل آگارز یک و نیم درصد بررسی شدند. با مقایسه باندهای تولید شده با DNA مارکر ۱۰۰bp مشخص شد که آغازگرهای ژن *matK* قطعه حدود ۹۰۰ bp را تکثیر کردند (شکل ۱).



شکل ۱- محصولات PCR با آغازگرهای ژن *matK* برای ارقام ۱ تا ۱۰ خرمای مورد مطالعه.
Figure 1. PCR products of *matK* primers for 1-10 cultivars of the studied date palm.

پس از دریافت نتایج تعیین توالی، کیفیت نتایج حاصله با استفاده از نرم‌افزار Chromas version 2. 4. 1 مورد بررسی قرار گرفت. کیفیت گراف‌های توالی‌یابی میزان دقت در تعیین توالی را نشان داد. نمونه‌ای از گراف‌های حاصل از توالی‌یابی ژن *matK* در خرمای سبزو به عنوان نمونه در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲- گراف حاصل از نتایج توالی‌یابی ژن *matK* در خرمای سبزو به عنوان نمونه
Figure 2. A sample graph of the sequencing results of the *matK* gene in Sabzoo date palm

همترازی و آنالیز توالی‌های ژن *matK*

توالی‌های به‌دست آمده پس از BLAST با توالی‌های ثبت‌شده موجود در پایگاه دادهNucleotide NCBI مورد مقایسه قرار گرفتند. مقایسه توالی‌ها هم‌ولوژی بالایی را بین این توالی‌ها با توالی‌های گونه *Phoenix dactylifera* موجود در بانک ژن نشان داد. در ادامه، نتایج توالی‌یابی ارقام مورد بررسی در پایگاه داده NCBI ثبت گردید. مشخصات ثبت و شماره دسترسی هر کدام از توالی‌های ثبت‌شده در پایگاه داده NCBI در جدول ۴ آورده شده‌اند.

جدول ۴- مشخصات ثبت و شماره دسترسی ناحیه توالی‌یابی شده ژن *matK* ارقام نخل خرما در پایگاه داده NCBI
Table 4. Access numbers of the *matK gene* sequenced region of date palm cultivars in the NCBI database

شماره رقم Cultivar Number	نام فارسی Farsi Name	کد شناسایی Identification Code	شماره دسترسی Accession Number
1	شندشکند (Shand Shekand)	Jm10 Shand Shekand	LC388005
2	سبزو (Sabzoo)	Jm13 Sabzoo	LC388006
3	کلوط (Kaloot)	Jn3 Kaloot	LC388007
4	پیمازو (Peymazo)	Jn9 Peymazo	LC388008
5	صدگنج (Sad-Ganj)	Jm18 Sad-Ganj	LC388009
6	ماکیلی (Makili)	Jm19 Makili	LC388010
7	هلیله (Holeileh)	Jn12Holeileh	LC388011
8	سبزو (Sabzoo)	Jn1 Sabzoo	LC388012
9	کلوط (Kaloot)	Jm15 Kaloot	LC388013
10	سعودی (Saudi)	Jn6 Saudi	LC388014
11	زردان (Zardan)	Jn8 Zardan	LC388015
12	پیمازو (Peymazo)	Jm16 Pymazo	LC388016
13	گازالو (Gozalo)	Jn11 Gozalo	LC388017
14	هلیله (Holeileh)	Jm20 Holeileh	LC388018
15	ربی (Rabbi)	Jn13 Rabbi	LC388019

نتایج آنالیز توالی‌های به‌دست آمده برای نشانگر *matK* به‌کمک نرم‌افزار DNAsp نشان دادند که در مجموع ۱۰۱۹ جایگاه شناسایی شده،۶۷۲ جایگاه دارای حذف و اضافه (۱۵۴ مونومورف و ۵۱۸ پلی مورف) و ۳۴۷ جایگاه بدون حذف و اضافه بودند. در این جمعیت، ۱۵ هاپلوتایپ (شاخص هاپلوتیپی ۱) مشاهده شدند.

همچنین چهار ناحیه حفاظت‌شده DNA برای نشانگر *matK* شناسایی شدند: ناحیه ۱ (۲۰۸-۳۸۹)، (شکل۳)، ناحیه ۲ (۵۵۱-۶۴۴)، (شکل۴)، ناحیه ۳ (۵۵۵-۶۴۶)، (شکل۵) و ناحیه ۴ (۷۷۳-۸۵۰) (شکل۶).

SBBYYTTYYYGRRAAAWWWYHYAMGGSAAAATTTTSGCMSKDWYTWWTWM
CVMTKTWYBVWAWTAAAYWYYGGGAAAAAYMHWATWRRAARTBK

شکل ۳- ناحیه حفاظت‌شده ۱
Figure 3. Conserved region 1

YTTYYYGRRAAAWWWYHYAMGGSAAAATTTTSGCMSKDWYTWWTWMCVMT
KTWYBVWAWTAAAYWYYGGGAAAAAYMHWATWRRAARTBKKY

شکل ۴- ناحیه حفاظت‌شده ۲
Figure 4. Conserved region 2

AMCHYTWAVVMWTWWATWWYBSGRMAACMYSRRDWTWCYYYYAATYTTTW
WWTTTYTCCYYYWTTKRRRRRARRRRAA

شکل ۵- ناحیه حفاظت‌شده ۳
Figure 5. Conserved region 3

AMCHYTWAVVMWTWWATWWYBSGRMAACMYSRRDWTWCYYYYAATYTTTW
WWTTTYTCCYYYWTTKRRRRRARRRRAA

شکل ۶- ناحیه حفاظت‌شده ۴
Figure 6. Conserved region 4

علاوه بر چهارنماد T، G، C، و A از نمادهای دیگری در توالی‌یابی DNA برای نشان دادن ابهام (هنگامی‌که در یک جایگاه دو پیک خوانده شود و در مورد نوع باز آن جایگاه تردید وجود داشته باشد) نیز استفاده می‌شود (شکل ۷).

R: G-A B: T-C-G
Y: T-C D: A-T-G
K: T-G H: A-C-T
M: A-C V: A-C-G
S: C-G N: A-C-T-G
W: T -A

شکل ۷- نمادهایی در توالی یابی DNA برای نشان دادن ابهام، هنگامی که بیش از یک باز در یک مکان می‌تواند قرار گیرد.

Figure 7. Symbols used in sequencing to explain nucleotide substitutions

آنالیز جانشینی‌های نوکلئوتیدی از نوع انتقالی[2] و متقاطع[3] بر اساس الگوی Tamura-Nei (Tamura *et al*., 1993)، model، نشان داد که بیشترین جانشینی‌ها از نوع انتقالی (۵۶/۱۸ درصد) بودند و تنها ۴۳/۸۲ درصد جانشینی‌ها از نوع متقاطع بودند. درصد انواع جانشینی‌های انتقالی و متقاطع به تفکیک پورینی و پریمیدینی در جدول ۵ آمده است.

جدول ۵- جانشینی نوکلئوتیدی در ناحیه توالی‌یابی‌شده ژن *matK* به صورت میزان جانشینی‌های نوع انتقالی و متقاطع. جانشینی‌های انتقالی به‌صورت پررنگ مشخص شده‌اند.

Table 5. Nucleotide replacement as a transition and transversion in the sequenced region of the *matK* gene. Transitional substitutions are shown in bold

	A	T/U	C	G
A	-	6.87	3.29	**10.94**
T/U	7.8	-	**7.63**	3.94
C	7.8	**15.95**	-	3.94
G	**21.66**	6.87	3.29	-

نسبت نوکلئوتیدهای مختلف به کل نوکلئوتیدها در توالی ژن *matK* نیز محاسبه شد و به‌طور میانگین نسبت تیمین ۳۰/۵، سیتوزین ۱۵/۲، آدنین ۳۶/۲ و گوانین ۱۸/۰ درصد مشخص شد (جدول ۶).

جدول ۶- نسبت نوکلئوتیدهای مختلف به کل نوکلئوتیدها در ناحیه توالی‌یابی شده ژن *matK*.

The ratio of different nucleotides to total nucleotides in the sequenced region of the *matK* gene Table 6.

Total	G	A	C	T(U)	Genotype
865	18.6	35	15.6	30.8	jm10ShandShekand
920	13.8	38.9	17	30.3	jm13 Sabzoo
839	17.6	36.6	15.5	30.3	jm15 Kaloot
773	20.1	32.2	16.3	31.4	jm16 Peymazo
785	17.7	36.6	15.7	30.1	jm18 Sad Ganj
817	19	36.8	14.2	30	jm19 Makili
1004	18.7	33.2	17	31.1	jm20 Holeileh
795	17.7	36.7	15.5	30.1	jn1 Sabzoo
860	18.1	36.5	14.7	30.7	jn3 Kaloot
796	18.3	37.4	14.3	29.9	jn6 Saudi
851	18	37.8	13.7	30.4	jn8 Zardan
842	17.5	37.2	14.8	30.5	jn9 Peymazo
828	18.7	36.1	14.5	30.7	jn11 Gozloo
791	19.2	35.5	14.9	30.3	jn12 Holeileh
893	17.9	36.6	14.6	30.9	jn13 Rabbi
843.9	**18**	**36.2**	**15.2**	**30.5**	Avg.

تعیین روند انتخاب طبیعی (dN/dS)

در این تحقیق، مقدار عددی نسبت جایگزینی (dN/dS) برای توالی ژن *matK* محاسبه شد که مقدار عددی این نسبت برابر ۰/۱۶۹ بود. نتایج حاصل از تغییرات نوکلئوتیدی که باعث تغییر اسیدهای آمینه شده‌اند (dN) به تغییرات نوکلئوتیدی که تاثیری در اسیدآمینه حاصله نداشته‌اند (dS)، یک روش مفید و بسیار کارآمد جهت تشخیص روند انتخاب طبیعی در طول تکامل برای ژن‌ها است. اگر این نسبت بیشتر از یک باشد انتخاب مثبت، اگر کمتر از یک باشد انتخاب خالص و اگر برابر با یک باشد انتخاب خنثی را در طی تکامل این ژن‌ها نشان می‌دهد (Dasmeh *et al*., 2014).

نتایج مقایسه داده‌های ژنتیکی میان جفت نواحی

ماتریس فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های بررسی شده نشان داد که فاصله ژنتیکی در میان نمونه‌های بررسی‌شده با استفاده از نشانگر *matK* از ۰/۰۱۹ (بین رقم سبزو و صدگنج) تا ۱/۲۳۸ (بین رقم پیمازو و هلیله) بود که در مقایسه با نتایج تحقیق مشابه قبلی که با استفاده از آغازگرهای *rbcL* به منظور بررسی فاصله ژنتیکی همین ۱۵ رقم خرمای مورد مطالعه انجام شده بود، بیشتر بود (در تحقیق قبلی فاصله ژنتیکی ۰ تا ۰/۰۳۷ محاسبه شده بود). این یافته شاید بیانگر آن بود که نشانگر *rbcL* مورد استفاده قادر به شناسایی سطح وسیعی از تنوع درون‌گونه‌ای در گیاه خرما نبود (Raeisi *et al*., 2021) در حالی که نتایج پژوهش حاضر با نشانگر *matK* توانست نتایج قابل قبول‌تری را برای نشان دادن فاصله ژنتیکی بین ارقام نسبت به نشانگر *rbcL* ارائه دهد. در آن تحقیق، بیشترین فاصله ژنتیکی ۰/۰۳۷ بین نمونه‌های سبزو (Jm13_sabzoo) از جالق و ماکیلی (Jm19_Makili) از ناهوک مشخص شده بود، در حالیکه در مطالعه حاضر بیشترین فاصله ژنتیکی ۱/۲۳۸ بین نمونه‌های jm20_Holeileh از سراوان و Jm16_peymazo از جالق مشاهده شد (جدول۷).

2. Transition

3. Transversionsal

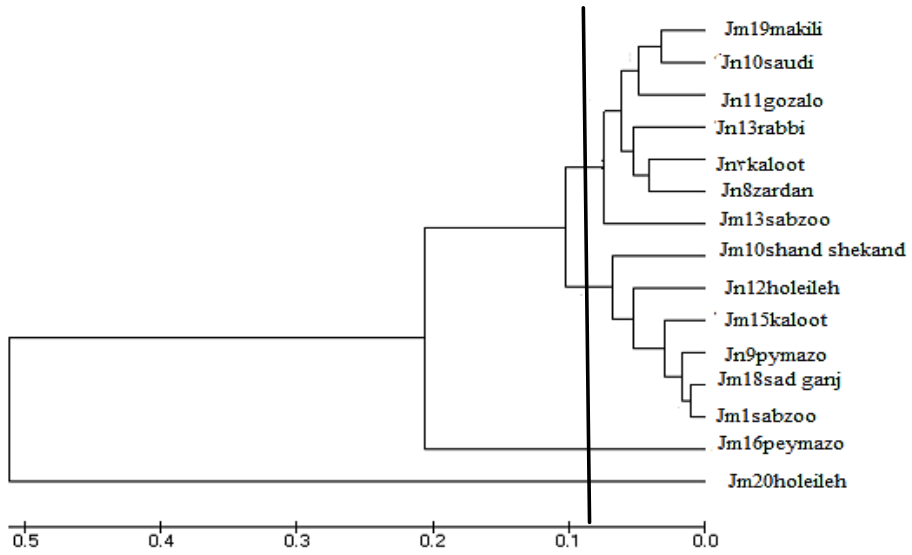
جدول ۷- فاصله ژنتیکی ارقام خرمای مورد مطالعه

Table 7. Genetic distance of the studied date palm cultivars

ژنوتیپ Genotyp	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1-jm10_Shand	1														
2- jm13_Sa	0.238	1													
3- jm15_Ka	0.124	0.25	1												
4- jm16_Pey	0.455	0.45	0.433	1											
5- jm18_Sad	0.1265	0.29	0.065	0.473	1										
6-jm19_M	0.188	0.158	0.121	0.353	0.178	1									
7- jm20_Ho	1.03	1.05	0.981	1.238	1.047	0.973	1								
8- jn1_Sab	0.117	0.278	0.049	0.457	0.019	0.161	1.047	1							
9- jn3_Ka	0.169	0.15	0.164	0.375	0.212	0.09	0.959	0.202	1						
10-jn6_Sa	0.247	0.153	0.173	0.385	0.226	0.064	1.012	0.215	0.129	1					
11-jn8_Za	0.197	0.114	0.175	0.335	0.232	0.082	0.986	0.218	0.082	0.09	1				
12-jn9_Pey	0.126	0.283	0.063	0.465	0.028	0.177	1.038	0.036	0.214	0.222	0.226	1			
13- jn11_G	0.176	0.184	0.105	0.36	0.145	0.08	0.959	0.132	0.117	0.113	0.123	0.14	1		
14- jn12_Hc	0.18	0.25	0.114	0.372	0.104	0.136	1.024	0.094	0.174	0.168	0.176	0.107	0.12	1	
15- jn13_R	0.243	0.128	0.243	0.426	0.296	0.134	0.979	0.286	0.113	0.144	0.097	0.295	0.179	0.238	1

بررسی روابط فیلوژنتیکی نمونه‌های خرمای مورد بررسی

پس از ویرایش و همترازی توالی‌های به‌دست آمده توسط نرم‌افزارهای Cromas و BioEdite، با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 و بر اساس روش خوشه‌بندی UPGMA درخت فیلوژنتیکی رسم شد (شکل ۶). برای نشانگر *matK* ارقام به سه شاخه تقسیم شدند که در شاخه اول رقم هلیله ۲۰ که از شهرستان سراوان جمع‌آوری شده بود، قرار گرفت. در شاخه دوم رقم پیمازو ۱۶ از جالق قرار گرفت. شاخه سوم خود به دو زیرشاخه تقسیم شد که در زیر شاخه فرعی اول ارقام سبزو ۱ از سراوان، صدگنج ۱۸ از سینوکان، پیمازو ۹ از سراوان، کلوط ۱۵ از جالق، هلیله ۱۲ از سراوان و شندشکند ۱۰ از سراوان (در مجموع ۶ رقم) قرار گرفتند. در زیر شاخه فرعی دوم ارقام سبزو ۱۳ از جالق، زردان ۸ از سراوان، کلوط ۳ از سراوان، ربی ۱۳ از سراوان، گوزلو ۱۱ از سراوان، سعودی ۱۰ از سراوان و ماکیلی ۱۹ از ناهوک (در مجموع ۷ رقم) قرار گرفتند. بر اساس این تقسیم‌بندی، رقم هلیله ۲۰ سراوان بیشترین فاصله را با سایر ارقام دارد.



شکل ۶- درخت فیلوژنتیکی ۱۵ رقم خرمای مورد مطالعه با استفاده از نشانگر *matK* بر اساس روش گروه‌بندی UPGMA

Figure 6. The phylogenetic tree of 15 date palm cultivars studied based on the sequencing results of the *matK* region based on the UPGMA method

بر اساس داده‌های تعیین توالی شده ژن *matK*، رابطه فیلوژنتیکی ژنوتیپ‌های خرمای مورد آزمایش با ژنوتیپ‌های خرمای برخی کشورهای دیگر مورد ارزیابی قرار گرفت. در این بررسی، رقم سبزو ایران در یک شاخه مجزا و سایر ارقام ایرانی و غیر ایرانی مطالعه‌شده در شاخه‌ای مجزا قرار گرفتند. همچنین، دندوگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای نشان می‌دهد که نزدیک‌ترین ارقام به خرماهای مورد مطالعه مربوط به کشورهای پاکستان و مصر است (شکل ۷).

بر اساس پژوهش‌هایی که با کمک نشانگرهای مولکولی جهت بررسی تنوع درون‌گونه‌ای در *Phoenix dactylifera* L انجام شده‌اند، درخت خرما از تنوع درون‌گونه‌ای قابل‌توجهی برخوردار است (Elmeer *et al*., 2011; Nejad Habib, 2013; Taghinejad *et al*., 2018; Marsefri and Mehrabi, 2010). در تحقیقی، ۳۴ اکوتیپ عناب را به‌منظور ارزیابی فیلوژنتیکی تنوع ژنومی بر اساس ژن کلروپلاستی *matK* و نشانگر مولکولی RAPD مورد ارزیابی قرار دادند که با استفاده ازآن مارکرها، تنوع ژنتیکی بین اکوتیپ‌های عناب به‌خوبی ارزیابی شد (Abbasi *et al*., 2012). همچنین، در تحقیقی رابطه فیلوژنی ۵۲ گونه از ۳۸ گونه *Lathyrus*، سه گونه *Pisum* و چهار گونه *Vicia* و *Lens* با استفاده از توالی *matk* مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج مطالعه نشان دادند که *Pisum* در بین گونه‌های *Lathyrus* قرار داشت (Oskoueiyan *et al*., 2014). این تحقیق اولین بررسی استفاده از بارکد *matK* برای گیاه خرما بود. لذا هدف اولیه بررسی کارایی استفاده از این بارکد در گیاه خرما نسبت به بارکد *rbcL* استفاده شده قبلی بود که با بررسی نتایج حاصله و مقایسه نتایج تحقیق حاضر با نتایج تحقیق قبلی، شاید بتوان این نشانگر را برای شناسایی تنوع درون‌گونه‌ای گیاه خرما نسبت به نشانگر *rbcL* مناسب‌تر دانست. بررسی کارآیی استاندارد بارکد گیاهی *rbcL* و *matK* در شناسایی برخی گیاهان متعلق به مناطق دهر قاضی خان، پنجاب و پاکستان نشان داد که که ترکیب دو بارکد (*rbcl* + *matK*) توانست درخت منوفیلتی مناسبی را ارائه نماید (Khan *et al*., 2016).



شکل ۷- درخت فیلوژنتیکی مقایسه ۱۵ رقم خرمای مورد مطالعه با خرمای برخی کشورهای دیگر بر اساس نتایج تعیین توالی ژن *matK*.
Figure 7. The phylogenetic tree of 15 date palm genotypes studied and date palm genotypes from some other countries, based on the sequencing results of the *matK* gene.

در تحقیق حاضر نیز با استفاده از آغازگرهای *matK* تفکیک و دسته‌بندی ۱۵ رقم خرمای بومی ایران از مناطق سراوان، جالق، سینوکان و ناهوک استان سیستان و بلوچستان و بررسی روابط فیلوژنتیک آنها با یکدیگر و همچنین بررسی روابط فیلوژنتیک آنها با ارقام نخل خرما در سایر نقاط دنیا به خوبی انجام شد که کارایی مناسب بارکد *matK* در شناسایی و بررسی روابط فیلوژنتیکی درون‌گونه‌ای ارقام گیاهی خرما را نشان می‌دهد. بررسی تنوع موجود در توالی ژن *matK* مشخص می‌کند که بین جمعیت‌های مختلف از یک گونه تنوع زیادی وجود دارد. وجود تنوع درون‌گونه‌ای در *P. dactylifera* L از مناطق مختلف دنیا در تحقیقات دیگران نیز با استفاده از نشانگرهای RAPD (Akkak *et al*., 2009)، ریزماهواره (Elmeer *et al*., 2011; Nejad Habib, 2013; Taghinejad *et al*., 2018; Marsefri and Mehrabi 2010) و rbcl (Raeisi *et al*., 2021) به اثبات رسیده است و مشخص شده است که درخت خرما از تنوع درون‌گونه‌ای قابل توجهی برخوردار است. همچنین، در این تحقیق بررسی قرابت‌ها نشان داد که با مقایسه فاصله ژنتیکی ارقام با اسم محلی مشابه که از دو منطقه جمع آوری شدند، مانند ارقام پیمازو ۹ و کلوط ۳ جمع‌آوری شده از سراوان با ارقام مشابه آن‌ها در شهرستان جالق که شامل پیمازو ۱۶ و کلوط ۱۵ هستند به‌نظر می‌رسد که پراکندگی جغرافیایی ارقام نخل خرما باعث ایجاد تغییرات در ژنوم ارقام مشابه شده است و در نتیجه ارقام جدید تولید گردیده‌اند که با وجود خصوصیات ظاهری مشابه، دارای ژنوتیپ‌های متفاوت هستند. همچنین، برخی ارقام با اسامی محلی مشابه در یک منطقه وجود دارند، مانند هلیله ۲۰ و ۱۲ از سراوان و کلوط ۳ و ۱۵ از جالق که علی‌رغم مشابه بودن اسامی به‌لحاظ ژنتیکی با هم فاصله دارند.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج تحقیق حاضر که از تحلیل مولکولی ژن کلروپلاستی *matK* بین ۱۵ رقم خرمای مورد مطالعه از استان سیستان و بلوچستان حاصل شدند، نشان دادند که برای آغازگر *matK* در مجموع ۱۰۱۹ جایگاه شناسایی شدند که ۶۷۲ جایگاه دارای حذف و اضافه، و ۳۴۷ بدون حذف و اضافه بودند. مقدار عددی نسبت جایگزینی (dN/dS) برابر۰/۱۶۹، فاصله ژنتیکی از ۰/۰۱۹ تا ۱/۲۳۸ و بیشترین تنوع درون منطقه‌ای مربوط به رقم هلیله ۲۰ بود. کمتر از یک بودن مقدار عددی dN/dS برای آغازگر *matK* نشان می‌دهد که انتخاب خالص برای این ژن اتفاق افتاده است و باعث تغییرات کلیدی نشده است. تعداد زیاد جایگاه‌های حذف و اضافه نشان دهنده تغییرات بالا بین ارقام مختلف است و توانایی آغازگر *matK* در تفکیک ارقام شاید به همین دلیل باشد. بر اساس نتایج حاصله، می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از آغازگر *matK* برای مطالعه و شناخت تنوع و روابط درون‌گونه‌ای خرما مفید و مناسب است. لذا در مطالعات آتی خرما جهت بررسی تنوع ژنتیکی، علاوه بر سایر نشانگرهای مولکولی مناسب، استفاده از این بارکد را هم می‌توان پیشنهاد نمود.

References

Abbasi, S., Malekzadeh Shafarudi, S., Ghous, K., Shahriari, F. (2012). Investigation of genetic diversity of Iranian jujube ecotypes (*Ziziphus* spp.) Using RAPD molecular marker. *Iranian Agricultural Research, 10(3),* 583 590. [In Persian]

Akkak, A., Scariot, V., TorelloMarinoni, D., Boccacci, P., Beltramo, C., & Botta, R. (2009). Development and evaluation of microsatellite markers in *Phoenix dactylifera* and their transferability to other Phoenix species. *Biologia Plant Arum*, 53(1), 164–166.

Arbabi, H., Keikhasaber, M., Fahmideh, L., & Ghasemi Omran, V. (2022). Phylogenetic Analysis of Some Indigenous and Non-Indigenous Luffa (*Luffa cylindrica*) Genotypes using ITS Marker. *Journal of Crop Breeding, 14(43),* 126-134. [In Persian]

Arbabi. H., Keykhasaber, M., Fahmideh, L., & Ghasemi Omran, V. (2021). Analysis of Genetic Variation and Phylogenetic Relations of Some Indigenous and Non-Indigenous Luffa Genotypes Using Rbcl Molecular Marker. *Agricultural Biotechnology, 11(1),* 23-31. [In Persian]

Arbabi. H., Keykhasaber, M., Fahmideh, L., & Ghasemi Omran, V. (2023). Phylogenetic Analysis of Some Luffa Genotypes Based on the sequence of intergenic region of trnH-psbA. *Plant Genetic Researches, 9 (2),* 83-94. [In Persian]

Dasmeh, P., Serohijos, A.W., Kepp, K. P., Shakhnovich, E.I. (2014). The Influence of Selection for Protein Stability on dN/dS Estimaitions. *Genome Biology and Evolution,* 6(10), 2956-2967.

Dellaporta, S.L., Wood, J., Hicks, J.B. (1993). A plant DNA minipreparation: version II. *Plant Molecular Biology Reporter, 1,* 19-22.

Elmeer, K.H., Sarwath, J., Malek, J., Baum, M., & Hamwieh, A. (2011). New microsatellite markers for assessment of genetic diversity in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Biotechnology, 1,* 91-97.

Fahmideh, L., Rajabi, A., Dehestani, A., & Khorasaninejad, S. (2024). Investigating the Genetic Diversity of Tomato (Solanum lycopersicum L.) Genotypes based on Yield and Morpho-Physiological Traits. *Journal of Crop Breeding, 16*(1), 46-60. [In Persian]

FAO. (2021). Food and Agriculture Organizition. http://faostat. Fao.org/site/567/default.aspx#ancor

Javanmardi, F. (2015). The evolutionary process of morphological traits of *Astragalus dictyolobus*, *A. tawilicus*, and *A. victoriae* species based on the genealogy of data obtained from *matK* chloroplast sequence. *Iranian Plant Biology, 7(26),* 13-26. [In Persian]

Kazempour Osaloo, S., Kaveh, A., & Amirahmadi, A. (2014). A perspective on the chloroplast gene *matK. Modares Journal of Biotechnology*, 5(1), 1-10 [In Persian].

Khan, S., Khan, Z., Ashfaq, M., Nisa, Z. (2016). Identification of the grass family (Poaceae) by using the plant dna barcodes *rbcl* and *matK*. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences, 8(5),* 175-186.

Khodayari, H., Khalili, E., Sanjarian, F., & Asri, Y. (2016). Examines the genealogy of the *matK* chloroplasty gene of some species belonging to the Mentheae tribe of the mint genus with emphasis on the medicinal plant. *Echo Phytochemistry of Medicinal Plants.* 2. [In Persian]

Lewin, G. R., Rueff, A., & Mendell, L. M. (1994). Peripheral and Central Mechanisms of NGF-induced Hyperalgesia. *European Journal of Neuroscience, 6(12),* 1903-1912.

Marsefri, M., & Mehrabi, A. (2010). Evaluation of Genetic Diversity of Some Iranian Date Populations Using Fingerprint Identification (ISSR), National Conference and Iranian Scientific Date Festival, Kerman, Shahid Bahonar University of Kerman. [In Persian]

Nejad Habib, R. (2013). Evaluation of Genetic Diversity Within and Between Male and Female Date Palms Using Microsatellite Markers. Master's thesis on biotechnology in agriculture. Faculty of Agriculture, University of Zabol. [In Persian]

Oskoueiyan, R., Kazempour Osaloo, S., & Amirahmadi, A. (2014). Molecular Phylogeny of the Genus Lathyrus (Fabaceae-Fabeae) Based on cpDNA matK Sequence in Iran. *Iranian Journal of Biotechnology, 12(2),* 41-48. [In Persian]

Pang, X., Luo, H., & Sun, C. (2012). Assessing the potential of candidate DNA barcodes for identifying non-flowering seed plants. *Plant Biology, 14,* 839-844.

Pejman, H. (2007). Date guide (planting, holding, harvesting). Agricultural Education and Extension, P. 266. [In Persian]

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. [In Persian]

Robinson, J.P., Harris, S.A., & Juniper, B.E. (2001). Taxonomy of the genus Malus Mill. (Rosaceae) with emphasis on the cultivated apple (*Malus domestica* Borkh). *Plant Systematics and Evolution,* 226, 35–58.

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. [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.