

بررسی تنوع ژنتیکی ژن *rbcL* در برخی ارقام نخل خرماي استان سيستان و بلوچستان

فاطمه رئیسی^۱، لیلا فهمیده^{۲*}، براتعلی فاخری^۳ و مجتبی کیخصابر^۴

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

۲- دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان

۳- دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل

۴- استاد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل

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

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۳۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۱۲)

چکیده

با توجه به اهمیت تولید خرما در کشور، معرفی ارقام جدید، بهبود ارقام موجود و بررسی تنوع ژنتیکی موجود بین ارقام مختلف برای بهبود کمی و کیفی تولید خرما ضروری است. در این تحقیق تنوع ژنتیکی بین ۱۵ رقم مختلف محلی خرما از شهرستان سراوان و بخش‌های جالق، ناهوک و سینوک استان سیستان و بلوچستان بررسی شد. به این منظور DNA از بافت برگ نمونه‌ها با استفاده از روش دلاپورتا استخراج و کیفیت و کمیت DNA استخراجی با استفاده از ژل آگارز یک درصد و دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین شد. واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rbcL* بر اساس شرایط مورد نیاز انجام شد و محصول‌های PCR جهت توالی‌یابی ارسال گردید. پس از تعیین توالی، تجزیه و تحلیل‌ها و ترسیم دندروگرام روابط فیلوژنتیک و ماتریس تشابه توالی‌ها با نرم‌افزارهای Bioedit و MEGA7 انجام شد تا روابط خویشاوندی و فاصله ژنتیکی بین ارقام تعیین شود. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که برای این نشانگر در مجموع ۵۵۳ جایگاه مختلف وجود دارد که ۵۰۵ جایگاه دارای حذف و اضافه و ۴۸ جایگاه بدون حذف و اضافه بود. فاصله ژنتیکی از ۰ تا ۰/۰۳۷ و بیشترین تنوع درون منطقه‌ای مربوط به رقم Jm13_sabzoo بود. براساس دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای، ارقام مورد بررسی به دو شاخه تقسیم شدند که در شاخه اول رقم سبز و از جالق قرار گرفت و سایر ارقام در زیرشاخه‌های مختلف شاخه دوم قرار گرفتند. اگرچه استفاده از نشانگر *rbcL* برای بررسی تنوع و روابط درون‌گونه‌ای مفید است اما در خصوص ارقام خرماي مورد آزمون در این تحقیق، فاصله ژنتیکی کمی برآورد شد. بنابراین پیشنهاد می‌شود در مطالعات آینده جهت بررسی تنوع ژنتیکی خرما از سایر بارکدهای DNA و همچنین سایر نشانگرهای مولکولی مناسب استفاده شود.

واژگان کلیدی: تنوع ژنتیکی، خرما، روابط فیلوژنتیک، نشانگر *rbcL*

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: l.fahmideh@gau.ac.ir

مقدمه

نخل خرما (*Phoenix dactylifera*) گیاهی تک‌لپه از خانواده پالماسه (Palmaceae) است که در این خانواده تقریباً ۲۰۰ جنس و ۴۰۰۰ گونه وجود دارد و اغلب در مناطق گرم و مرطوب می‌رویند. این گیاه در طول ادوار مختلف تاریخ به‌عنوان یک گیاه ارزشمند و زیربنای ایجاد تمدن بشری مطرح بوده است. سابقه کشت این درخت در دنیا مربوط به ۵۰۰۰ سال پیش است اما موطن اصلی این گیاه به‌درستی مشخص نیست. بعضی از دانشمندان مبدأ اصلی آن را در آسیا و کرانه‌های خلیج فارس می‌دانند و گروهی دیگر نیز معتقدند زیستگاه اصلی خرما، شمال آفریقا و شبه‌قاره‌ی هند و یا شبه‌جزیره عربستان می‌باشد. اعراب خرما را با خود به اسپانیا بردند، بعدها به‌تدریج خرما از آسیا و عمدتاً خاورمیانه به استرالیا و قاره آمریکا نیز برده شد (Hashempour, 1999).

نخل خرما در حال حاضر یکی از محصولات مهم و پرسود کشور به‌شمار می‌آید و ۱۱ استان خوزستان، فارس، بوشهر، کرمان، هرمزگان، سیستان و بلوچستان، یزد، خراسان، اصفهان و کرمانشاه از مهم‌ترین مناطق تولید خرما در ایران می‌باشند (Pejman, 2001). ایران با داشتن حدود ۴۰۰ رقم خرما غنی‌ترین ژرم‌پلاسم خرما در دنیا را در بین کشورهای خرماخیز جهان داراست، ضمن اینکه از سال ۱۳۶۵ تاکنون ۱۴ رقم از بهترین ارقام تجاری دنیا از جمله مجول (Majhool)، دگلت نور (Deglet Noor) و توری (Thoori) وارد کشور شده و در برنامه‌های تحقیقاتی خرما مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Hashempour, 1999). بهره‌برداری از ژرم‌پلاسم نخل خرما در کشور، با توجه به تنوع صفات ژنتیکی و مورفولوژیکی، به‌ویژه در برنامه‌های تحقیق و توسعه و اصلاح و احیاء نخلستان‌های کشور بسیار مفید و مؤثر خواهد بود.

اصلاح و تکثیر ارقام مطلوب و استفاده از پاجوش‌های مرغوب به‌منظور خالص‌سازی نخلستان‌ها از عوامل افزایش ظرفیت و کیفیت تولید خرما می‌باشد. از آنجا که استفاده بهینه از هر گیاه نیازمند درک صحیح و منطقی از سطح تنوع

ژنتیکی آن محصول در طبیعت و همچنین آشنایی با روابط فیلوژنتیک آن گیاه دارد؛ در راستای اصلاح چنین گیاهی، اولین قدم شناسایی ارقام موجود و دسته‌بندی آن‌ها است (Hosseini et al., 2018). بررسی تنوع ژنتیکی، متخصصین اصلاح‌نباتات را در شناسایی ظرفیت ژنتیکی صفات مرتبط با اهداف اصلاحی مهم یاری می‌کند و به این منظور ارزیابی ذخایر ژرم‌پلاسم ضروری به‌نظر می‌رسد (Gupta et al., 1999; Varma et al., 1980). تشخیص تنوع از روی صفات مورفولوژیک به‌دلیل اینکه بسیاری از این صفات در مرحله بلوغ و میوه‌دهی ظهور می‌کنند و تفکیک با استفاده از آن‌ها می‌تواند زمان‌بر باشد، لذا روش‌های جدید مولکولی امکان تشخیص به‌موقع و تفکیک ارقام را فراهم آورده‌اند. امروزه با توجه به گسترش روزافزون علم زیست‌فناوری و ترکیب آن با سایر علوم زیستی از جمله بیوانفورماتیک و همچنین پررنگ شدن نقش نشانگرها در انعکاس اختلافات ارثی در توالی‌های DNA همولوگ بین افراد، روند صعودی استفاده از نشانگرهای مولکولی در موضوعات تحقیقاتی گیاهی مانند اصلاح سریع‌تر ارقام، به‌خوبی دیده می‌شود (MirMohammadi Maibody and Golkar, 2019). بارکدینگ یک ابزار ارزشمند برای ارزیابی روابط فیلوژنتیک است. در این فن از بررسی یک ناحیه استاندارد DNA که در بین تمامی ارقام و گونه‌های مختلف تغییرپذیری و تنوع نسبتاً بالایی نشان می‌دهد استفاده می‌شود (Pang et al., 2012). ژن *rbcL* که در کلروپلاست‌های بیشتر موجودات فتوسنتزکننده یافت می‌شود و تغییرپذیری نسبتاً مناسبی دارد به‌عنوان یکی از بارکدهای مناسب جهت بررسی‌های فیلوژنتیکی مورد استفاده قرار گرفته است (Geilly and Taberlet, 1994; Pang et al., 2012).

هاشمی سیستانی (Hashemi Sistani, 2018) به بررسی ۲۹ رقم مختلف انبه جمع‌آوری شده از شهرستان‌های منوجان، عنبرآباد، فاریاب، جیرفت و رودان با استفاده از توالی‌یابی ژن *rbcL* پرداخت. همچنین تاکور و همکاران (Thakur et

از پاجوش‌های درختانی که ارتفاع خیلی بلند داشتند جمع‌آوری گردید و به‌صورت جداگانه در پلاستیک‌های مخصوص بسته‌بندی و مشخصات کامل شامل نوع رقم، محل و تاریخ نمونه‌برداری، طول و عرض جغرافیایی بر روی آن درج گردید. نمونه‌های برگ‌ی در شرایط سرد حمل و تا زمان استخراج DNA در فریزر ۸۰- درجه پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی دانشگاه زابل نگهداری شدند.

استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز: استخراج DNA از نمونه‌های جمع‌آوری شده به روش دلاپورتا و همکاران (Dellaporta et al., 1993) صورت گرفت. برای تعیین کیفیت و کمیت DNA، از دو روش اسپکتروفتومتری (با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Unico USA UV-2100) و الکتروفورز بر روی ژل آگارز یک درصد استفاده شد (Lewin et al., 1994). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از آغازگر ژن *rbcL* (جدول ۲) و طبق برنامه زمان‌بندی و حرارتی (جدول ۳) با استفاده از دستگاه Eppendorf (22331Humburg) انجام شد. محصولات PCR پس از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با استفاده از ژل‌رشد (DNA Gel stain, ZandBio) رنگ‌آمیزی شد و جهت نمایان شدن باندها و عکس‌برداری از دستگاه ژل‌داک (vilber) (lourmat E- Box- VX2- 20m) تحت تأثیر نور ماوراءبنفش استفاده شد.

توالی‌یابی محصول PCR و تجزیه و تحلیل داده‌ها: محصولات به‌دست آمده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز جهت انجام توالی‌یابی به شرکت پیشگام ارسال و توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی خالص‌سازی و سپس توالی‌یابی ناحیه مورد نظر انجام گردید و کیفیت نتایج حاصل از تعیین توالی با استفاده از نرم‌افزار Chromas version v.2.4.1 مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار BioEdit هم‌تراز شد و نواحی دارای کیفیت توالی‌یابی پایین از دو انتهای ۳' و ۵' حذف شد. توالی‌ها سپس جهت هم‌ترازی و بررسی میزان تشابه علیه سایر توالی‌های ثبت شده مربوط به ژن *rbcL* موجود در پایگاه بلاست شدند. بعد از هم‌ردیف کردن توالی‌ها، جهت مقایسه و اطلاع از

(al., 2016) به‌منظور شناسایی گونه‌های مختلف *Mentha* و ارزیابی واکنش ژنتیکی داخل و بین گونه‌ها با توجه به تغییرات مورفولوژیکی گسترده آن از بارکد *rbcL* DNA استفاده کردند. در آن بررسی تمام گونه‌های *Mentha* مورد مطالعه به‌جز گونه‌های هیبرید *M. piperit* خوشه مونوفیلتیک (Monophyletic) تشکیل دادند که نشان‌دهنده کارایی بالای آغازگرهای *rbcL* برای طبقه‌بندی گونه‌های *Mentha* بود. خان و همکاران (Khan et al., 2016) در تحقیقی کارایی بارکدهای گیاهی *rbcL* و *matK* در ارزیابی تنوع ژنتیکی برخی گل‌ها را مورد آزمایش قرار داد. گیاهان مورد آزمایش متعلق به مناطق دهر قاضی‌خان، پنجاب و پاکستان بودند که تاکنون مطالعه روی آن‌ها انجام نگرفته بود. در آن مطالعه ۵۴ نمونه متعلق به ۲۴ گونه *Poaceae* مورد بررسی قرار گرفت که در آن کارایی *rbcL* و *matK* به‌ترتیب ۱۰۰ و ۶۷/۶۶ درصد بود.

علی‌رغم وجود تنوع بالای ارقام بومی و غیربومی نخل خرما که در مناطق مختلف ایران کشت و کار می‌شوند، در زمینه بررسی روابط خویشاوندی بین ژنوتیپ‌های مختلف نخل موجود در کشور و همچنین تعیین میزان قرابت و نزدیکی آن‌ها با کاربرد نشانگرهای ژنتیکی مناسب کار چندانی صورت نگرفته است. در این تحقیق تنوع موجود در تعدادی از ارقام نخل خرما جمع‌آوری شده از نخلستان‌های سطح شهرستان سراوان و بخش‌های جالقی ناهوک و سینوکان استان سیستان و بلوچستان از طریق ارزیابی ژن کلروپلاستی *rbcL* مورد بررسی قرار گرفت. هدف از این پژوهش تعیین فاصله ژنتیکی ارقام نخل مورد بررسی، تعیین شباهت و دسته‌بندی ارقام براساس توالی ژن *rbcL* همچنین ترسیم درخت فیلوژنتیکی ارقام مورد مطالعه و مقایسه آن‌ها با یکدیگر بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: در این تحقیق ۱۵ رقم نخل خرما از استان سیستان و بلوچستان (بخش‌های مرکزی شهرستان سراوان، ناهوک، سینوکان و جالقی) جمع‌آوری و نمونه‌برداری شدند (جدول ۱). برگ‌های تازه از مرکز تاج درخت و یا در مواردی

پارامترهای ژنتیکی از قبیل تعداد جهش‌ها، تنوع نوکلئوتیدی، تعداد جایگاه‌هایی که در آن‌ها جایگزینی اتفاق افتاده و همچنین تنوع آن‌ها از نرم‌افزارهای DNAsp v.5 و MEGA7 استفاده شد. به‌منظور ترسیم درخت فیلوژنتیک از نرم‌افزار MEGA7 استفاده شد و روابط خویشاوندی و فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها تعیین و درخت فیلوژنی با استفاده از روش UPGMA ترسیم گردید.

جدول ۱- مشخصات ارقام نخل خرماي مورد مطالعه

Table 1. Characteristics of studied date palm genotypes

شماره Number	نام Name	کد شناسایی Identification code	محل جمع‌آوری 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 مورد استفاده در این تحقیق برای تکثیر ژن *rbcL*

Table 2. Primer sequences used in this study for amplification of *rbcL* gene

آغازگر Primer	توالی Sequence	اندازه (جفت‌باز) Size (bp)
<i>rbcL</i> -F	5'-ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC-3'	26
<i>rbcL</i> -R	5'-GAAACGGTCTCTCCAACGCAT-3'	21

جدول ۳- پارامترهای استفاده شده در برنامه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

Table 3. The cycle parameters used in polymerase chain reaction program

مرحله واکنش Reaction stage	چرخه Cycle	دما (سانتی‌گراد) Temperature (°C)	زمان (ثانیه) Time (sec)
واسرشت‌سازی اولیه (Initial denaturation)	1	94	360
واسرشت‌سازی (Denaturation)		94	45
اتصال آغازگر (Annealing of primer)	35	56.8	45
توسعه آغازگر (Primer extension)		72	50
توسعه نهایی (Final extension)	1	72	900
نگهداری (Maintenance)	-	4	-

نتایج و بحث

تکثیر و تعیین توالی ژن *rbcL* پس از استخراج DNA و اطمینان از خلوص و عدم شکستگی آن، واکنش PCR نمونه‌ها انجام گردید و محصولات بر روی ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفتند. با مقایسه با DNA نشانگر ۱۰۰ جفت‌باز مشخص شد که آغازگرهای ژن *rbcL* قطعه حدود ۶۰۰ جفت‌باز را تکثیر کردند (شکل ۱). سپس قطعات تکثیر شده تعیین توالی شدند. کیفیت گراف‌های توالی‌یابی نشان‌دهنده میزان دقت در تعیین توالی بود (شکل ۲).

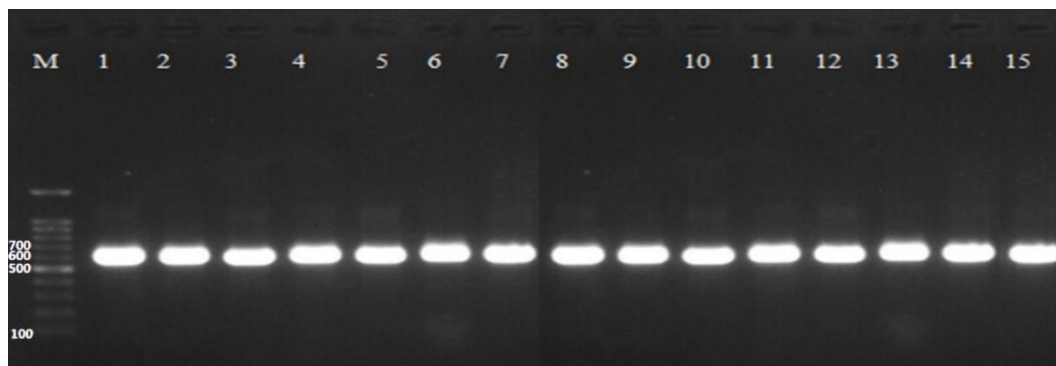
همترازی و آنالیز توالی‌های ژن *rbcL* توالی‌های به‌دست آمده سپس توسط برنامه تحت وب BLAST با توالی‌های ثبت شده موجود در پایگاه داده NCBI با مقادیر پیش‌گزیده مورد مقایسه قرار گرفتند. مقایسه توالی‌ها نشان داد که همولوژی بالایی (تشابه ۹۹/۴۶-۱۰۰ درصد و E-value = 0) بین این

توالی‌ها با توالی‌های گونه *Phoenix 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 هرکدام از توالی‌های ثبت شده در جدول ۴ آورده شده است.

تجزیه و تحلیل توالی‌های به‌دست آمد به کمک نرم‌افزار DNAsp نشان داد در مجموع ۵۵۳ جایگاه و ۲۵۹ سینگلتن (Singleton) شناسایی شد. از مجموع ۵۵۳ جایگاه، ۵۰۵ جایگاه دارای حذف و اضافه (۲۴۵) مونومورف و ۲۶۰ پلی‌مورف) و ۴۸ جایگاه بدون حذف و اضافه بودند. در این جمعیت ۵ هاپلو تیپ (شاخص هاپلو تیپی ۰/۵۶) وجود داشت. همچنین دو ناحیه حفاظت‌شده در توالی تکثیر شده ژن *rbcL* شناسایی شد

مورد نوع باز آن جایگاه تردید وجود داشته باشد) نیز استفاده می‌شود (شکل ۴).

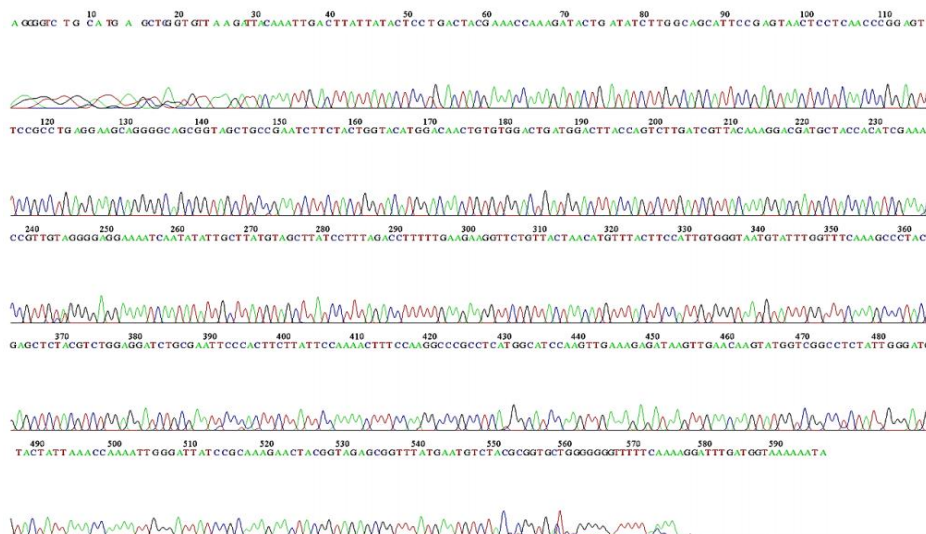
(شکل ۳). علاوه بر چهار نماد G، T، C و A، از نمادهای دیگری در توالی‌یابی DNA برای نشان دادن ابهام (هنگامی که در یک جایگاه دو پیک خوانده شود و در



شکل ۱- محصولات PCR با آغازگرهای ژن *rbcL* برای ۱۵ رقم خرمای مورد مطالعه

Figure 1. PCR products from *rbcL* primers for 15 date palm genotypes
بانداز از شماره ۱-۱۵ به ترتیب مربوط به نمونه‌های با کد شناسایی Jm10، Jm13، Jm15، Jm16، Jm18، Jm19، Jm20، Jm1، Jn3، Jn10، Jn8، Jn9، Jn11، Jn12، Jn13، می‌باشند.

Lanes 1-15 correspond to samples with identification codes of Jm10، Jm13، Jm15، Jm16، Jm18، Jm19، Jm20، Jm1، Jn3، Jn10، Jn8، Jn9، Jn11، Jn12، Jn13، respectively.



شکل ۲- ناحیه توالی‌یابی شده ژن *rbcL* در خرمای سبز و به عنوان نمونه

Figure 2. The sequenced region of *rbcL* gene in Sabzoo date palm, as a sample

A: 3'-TKATTATAYWCCTGASWRCGAAACMAAAGRTWCWGMTWYYTTGKSMKYAT
TYCGAGTRRYCYCAACCCGRMGTKCKYCYGACGGAAGSRGGGSAKC
RGWAKSYGCCRAATMTYCTRCTCGRTASRTGGRSAACTSTGTGGWYTKR-5'
B: 3'-RAGTATSKTYGGYCTCTAKTRGMYGKASTATWAAAMSMAARTTGGGATTATM
YGYWAASAMCYRCKKTAGW-5'

شکل ۳- نواحی حفاظت شده A و B در توالی تکثیر شده ژن *rbcL*

Figure 3. Conserved regions A and B in amplified sequence of *rbcL* gene

جدول ۴- مشخصات ثبت و شماره دسترسی ناحیه توالی‌یابی شده ژن *rbcl* ژنوتیپ‌های نخل خرما در پایگاه داده NCBI

Table 4. Access numbers of *rbcl* sequenced region of date palm genotypes in the NCBI database

شماره ژنوتیپ Genotype Number	نام فارسی Farsi Name	کد شناسایی Identification code	شماره دسترسی Accession
1	شندشکند (Shand Shekand)	Jm10	LC388020
2	سبز (Sabzoo)	Jm13	LC388021
3	کلوط (Kaloot)	Jm15	LC388022
4	پیمازو (Peymazo)	Jm16	LC388023
5	صدگنج (Sad-Ganj)	Jm18	LC388024
6	ماکیلی (Makili)	Jm19	LC388025
7	هلیله (Holeileh)	Jm20	LC388026
8	سبز (Sabzoo)	Jm1	LC388027
9	کلوط (Kaloot)	Jn3	LC388028
10	سعودی (Saudi)	Jn10	LC388029
11	زردان (Zardan)	Jn8	LC388030
12	پیمازو (Peymazo)	Jn9	LC388031
13	گوزلو (Gozalo)	Jn11	LC388032
14	هلیله (Holeileh)	Jn12	LC388033
15	ربی (Rabbi)	Jn13	LC388034

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 ۴- نمادهایی در توالی‌یابی DNA برای نشان دادن ابهام، هنگامی که بیش از یک باز در یک مکان می‌تواند قرار گیرد.

Figure 4. Symbols used in sequencing to explain nucleotide substitutions

کمتر از یک می‌باشد و نشان‌دهنده این است که انتخاب خالص برای ژن مورد بررسی اتفاق افتاده است.

مقایسه داده‌های ژنتیکی میان جفت نواحی: ماتریس فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های بررسی شده نشان‌دهنده این بود که فاصله ژنتیکی میان نمونه‌های بررسی شده با استفاده از نشانگر *rbcL* از ۰ تا ۰/۰۳۷ بود. بیشترین فاصله ژنتیکی ۰/۰۳۷ بین نمونه‌های سبز (Jm13_sabzoo) از جالق و ماکیلی (Jm19_Makili) از ناهوک مشخص گردید (جدول ۷).

بررسی روابط فیلوژنتیکی نمونه‌های خرمای مورد بررسی: پس از ویرایش و همترازی توالی‌های به‌دست آمده توسط نرم‌افزارهای Chromas و BioEdit، درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار MEGA7 بر اساس روش UPGMA ترسیم گردید (شکل ۵).

آنالیز جانشینی‌های نوکلئوتیدی از نوع انتقالی (Transitions) و متقاطع (Transversion) براساس الگوی Tamura-Nei model (Tamura and Nei, 1993)، نشان داد که بیشترین جانشینی‌ها از نوع متقاطع (۷۴/۵۲ درصد) بود و تنها ۲۵/۴۸ درصد جانشینی‌ها از نوع انتقالی بود. درصد انواع جانشینی‌های انتقالی و متقاطع به تفکیک پورینی و پرمیدینی در جدول ۵ آمده است.

نسبت نوکلئوتیدهای مختلف به کل نوکلئوتیدها در توالی ژن *rbcL* نیز محاسبه شد و به‌طور میانگین نسبت تیمین ۲۹، سیتوزین ۲۲/۳، آدنین ۲۸ و گوانین ۲۰/۷ درصد مشخص شد (جدول ۶).

تعیین روند انتخاب طبیعی (dN/dS): در این تحقیق روند انتخاب طبیعی (dN/dS) برای توالی *rbcL* محاسبه شد که مقدار عددی این نسبت برابر ۰/۱۳۳ بود. این مقدار عددی

جدول ۵- جانشین‌های نوکلئوتیدی انتقالی (به‌صورت پررنگ شده) و متقاطع در ناحیه توالی‌یابی شده ژن *rbcL*

Table 5. Nucleotide transition (bold) and transversion replacements in *rbcL* sequenced region.

From \ to	A	T/U	C	G
A	-	10.72	8.47	1.39
T/U	10.29	-	9.82	7.78
C	10.29	12.43	-	7.78
G	1.84	10.72	8.47	-

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

Table 6. The ratio of different nucleotides to total nucleotides in *rbcL* sequenced region

ژنوتیپ Genotype	T(U)	C	A	G	مجموع Total
Jm10_Shand_Shekand	28.9	22.4	28	20.7	550
Jm13_Sabzoo	29.3	22.5	27.6	20.6	543
Jm15_Kaloot	29	22.2	28.1	20.8	549
Jm16_Peymazo	28.9	22.4	28	20.7	550
Jm18_Sad_Ganj	29	22.2	28.1	20.8	549
Jm19_Makili	29.2	22.3	27.4	21.1	551
Jm20_Holeileh	28.8	22.3	28.1	20.8	548
Jm1_Sabzoo	28.8	22.4	28.1	20.8	549
Jn3_Kaloot	28.7	22.4	28.2	20.7	550
Jn10_Saudi	29	22.3	28.1	20.6	548
Jn8_Zardan	29	22.2	28.1	20.8	549
Jn9_Peymazo	29.1	22.2	28.1	20.6	549
Jn11_Gozloo	28.9	22.4	28	20.7	550
Jn12_Holeileh	28.9	22.1	28.1	20.9	551
Jn13_Rabbi	29.1	22.4	28	20.5	550
میانگین (Average)	29	22.3	28	20.7	549.1

جدول ۷- فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌های نخل خرمای مورد مطالعه

Table 7. Genetic distance of date palm genotypes

ژنوتیپ Genotype	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1-m10_Shand_Shekan	1														
2-Jm13_Sabzoo	0.029	1													
3-Jm15_Kaloot	0.007	0.033	1												
4-Jm16_Peymazo	0.007	0.033	0.000	1											
5-Jm18_Sad_Ganj	0.007	0.033	0.000	0.000	1										
6-Jm19_Makili	0.013	0.037	0.017	0.017	0.017	1									
7-Jm20_Holeileh	0.011	0.033	0.004	0.004	0.004	0.021	1								
8-Jm1_Sabzoo	0.007	0.033	0.000	0.000	0.000	0.017	0.004	1							
9-Jn3_Kaloot	0.011	0.033	0.004	0.004	0.004	0.021	0.002	0.004	1						
10-Jn10_Saudi	0.004	0.029	0.004	0.004	0.004	0.013	0.007	0.004	0.007	1					
11-Jn8_Zardan	0.007	0.033	0.000	0.000	0.000	0.017	0.004	0.000	0.004	0.004	1				
12-Jn9_Peymazo	0.009	0.031	0.002	0.002	0.002	0.019	0.002	0.002	0.002	0.006	0.002	1			
13-Jn11_Gozloo	0.007	0.033	0.000	0.000	0.000	0.017	0.004	0.000	0.004	0.004	0.000	0.002	1		
14-Jn12_Holeileh	0.011	0.035	0.011	0.011	0.011	0.021	0.015	0.011	0.015	0.007	0.011	0.013	0.011	1	
15-Jn13_Rabbi	0.009	0.031	0.002	0.002	0.002	0.019	0.002	0.002	0.002	0.006	0.002	0.000	0.002	0.013	1

علف‌هرز *Myriophyllum* با استفاده از نشانگرهای *matk* ITS و *rbcL* و *tmH-psbA* نشان دادند که ناحیه بین‌ژنی غیرکدکننده *tmH-psbA* و مکان‌ژنی کدکننده *rbcL* توانایی بیشتری برای تفکیک گونه‌های بومی و غیربومی دارند و بیان کردند به دلیل درصد تکثیر و قدرت تفکیک بالا در بین گونه‌های گیاهی می‌توانند به‌عنوان بارکد عمومی برای گیاهان استفاده شود.

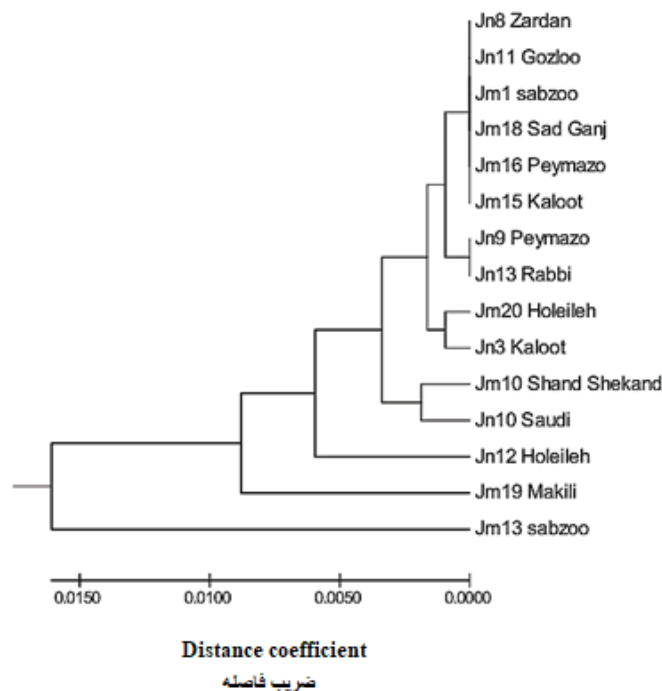
در تحقیق‌هایی که با کمک نشانگرهای RAPD (Akak et al., 2009) و ریزماهوره (Elmeer et al., 2011; Nejad Habib, 2009) انجام شده است مشخص شد که درخت خرما از تنوع درون‌گونه‌ای قابل‌توجهی برخوردار است. در تحقیق حاضر با استفاده از آغازگرهای *rbcL* تفکیک و دسته‌بندی ۱۵ ژنوتیپ خرمای بومی ایران از مناطق سراوان، جالق، سینکان و ناهوک استان سیستان و بلوچستان و بررسی روابط فیلوژنتیک آن‌ها انجام شد.

از آنجا که این تحقیق اولین بررسی استفاده از این بارکد برای گیاه خرما بود، لذا هدف اولیه بررسی کارایی استفاده از این بارکد در گیاه خرما بوده و با توجه به کم بودن فاصله ژنتیکی، شاید این امر می‌تواند بیانگر این مورد باشد که نشانگر مورد استفاده قادر به شناسایی سطح وسیعی از تنوع درون‌گونه‌ای در گیاه خرما نبوده است. با این حال، با توجه به خروجی کلیه تجزیه‌های انجام شده، این نشانگر توانست گروه‌بندی قابل قبولی را در ارزیابی ژنوتیپ‌های خرمای مورد مطالعه ارائه دهد.

برش دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای بیشترین تنوع ارقام خرمای مورد بررسی را نمایان ساخت و ارقام به دو شاخه تقسیم شدند که در شاخه اول رقم سبز و که از جالق جمع‌آوری شده بود قرار گرفت. شاخه دوم خود به دو زیرشاخه تقسیم شد که در زیرشاخه اول رقم ماکیلی (جمع‌آوری شده از ناهوک) قرار گرفت و در زیرشاخه دوم سایر ارقام قرار گرفتند. در این زیرشاخه رقم هلیله سراوان در شاخه‌ای مجزا از سایر ارقام قرار گرفت. بر اساس این تقسیم‌بندی رقم سبز (Jm13_sabzoo) از جالق، بیشترین فاصله را با سایر ارقام دارد.

بر اساس داده‌های تعیین توالی ژن *rbcL* رابطه فیلوژنتیکی ژنوتیپ‌های خرمای مورد آزمایش با ژنوتیپ‌های خرمای برخی کشورهای دیگر مورد ارزیابی قرار گرفت. در این بررسی رقم شندشکند ایران در یک شاخه مجزا و سایر ارقام ایرانی و غیر ایرانی مطالعه شده در شاخه‌ای مجزا قرار گرفتند. همچنین، برش دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای نشان داد که نزدیک‌ترین ارقام به خرمای مورد مطالعه به‌ترتیب مربوط به کشورهای امارات، تانزانیه، پورتوریکو و هند می‌باشند (شکل ۶).

در تحقیقی به‌منظور شناسایی و ارزیابی واکنش ژنتیکی داخل و بین‌گونه‌ای افراد جنس نعنای (*Mentha*) از آغازگرهای *rbcL* استفاده شد. نتایج مطالعات اثبات کرد که نشانگر *rbcL* برای طبقه‌بندی گونه‌های *Mentha* مناسب است (Thakur et al., 2016). در مطالعه‌ای قهرمان‌زاده و همکاران (Ghahramanzadeh et al., 2012) با ارزیابی برخی از گونه‌های مهاجم و بومی



شکل ۵- آنالیز خوشه‌ای ۱۵ رقم نخل خرما با استفاده از روش UPGMA بر اساس نواحی توالی‌یابی شده ژن *rbcL*

Figure 5. Cluster analysis of 15 date palm genotypes using UPGMA method, on the basis of *rbcL* sequenced region

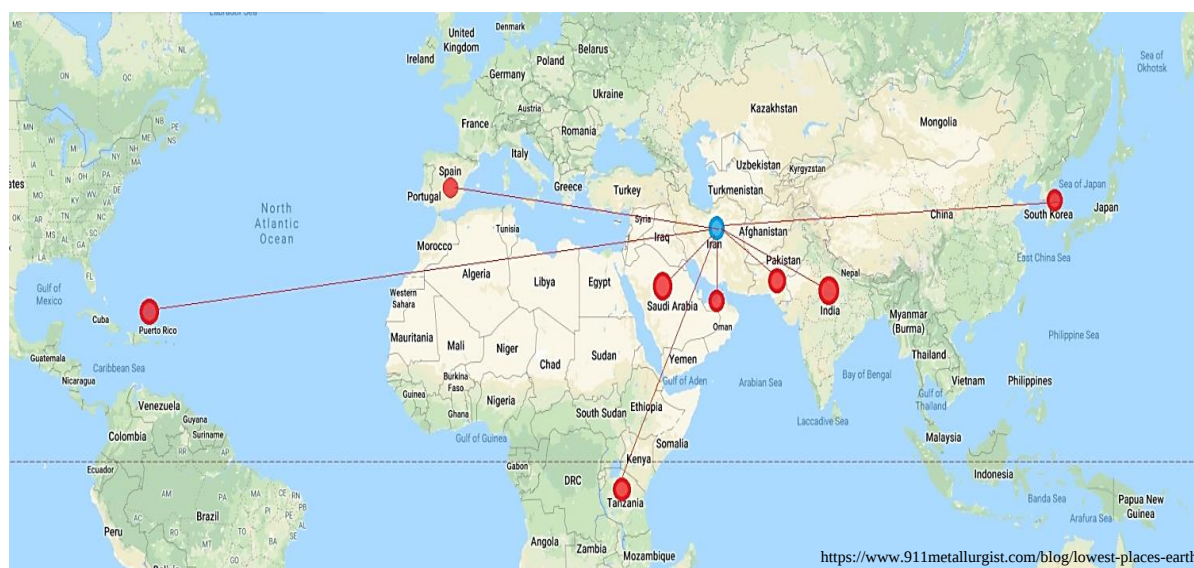


شکل ۶- آنالیز خوشه‌ای ۱۵ رقم خرمای مورد مطالعه و ژنوتیپ‌های نخل خرمای برخی کشورهای دیگر بر اساس ناحیه توالی‌یابی شده ژن *rbcL*

Figure 6. Cluster analysis of 15 studied date palm genotypes and date palm genotypes from other countries, based on the *rbcL* sequenced region available in NCBI database

نشان دهنده این است که انتخاب خالص برای ژن مورد بررسی اتفاق افتاده و باعث تغییرات کلیدی نشده است. با توجه به نتایج تجزیه و تحلیل توالی ژن *rbcL* در این تحقیق، برخی ارقام با اسامی محلی مشابه در یک منطقه یا مناطق مختلف وجود دارند مانند هلیله Jm20 و Jn12 از سراوان و کلوط Jn3 و Jm15 از جالق و نیز سبزو Jm13 از جالق و سبزو Jm1 از سراوان که علی‌رغم مشابه بودن اسامی به لحاظ ژنتیکی با هم فاصله دارند. از طرف دیگر ارقامی با اسامی مشابه در مناطق مختلف وجود دارند مانند، پیمازو Jn9 از جالق و پیمازو Jm16 از سراوان که فاصله ژنتیکی زیادی با هم ندارند؛ بنابراین، ضمن لزوم بررسی‌های ژنتیکی و مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی بیشتر لازم است به لحاظ شناسایی و طبقه‌بندی دقیق‌تر ارقام محلی، اسامی ژنوتیپ‌ها به‌صورت قابل‌تمایزی مورد بررسی بیشتر قرار گیرد. در بررسی رابطه فیلوژنتیکی ژنوتیپ‌های خرمای مورد آزمایش با ژنوتیپ‌های خرمای برخی کشورهای دیگر با توجه به نزدیکی جغرافیایی امارات به ایران تشابه ژنتیکی بین ارقام نخل خرمای این دو کشور طبیعی به نظر می‌رسد (شکل ۷).

بررسی قرابت‌ها نشان داد که برخی از ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در یک منطقه با سایر ژنوتیپ‌های آن منطقه رابطه خویشاوندی دوری دارند درحالی‌که با برخی ژنوتیپ‌های مناطق دیگر رابطه نزدیکی دارند. به‌عنوان مثال ارقام زردان، گزلو، پیمازو و سبزو از سراوان با ارقام صدگنج از سینوکان و کلوط از جالق رابطه خویشاوندی نزدیک‌تری نسبت به شندشکند، سعودی و هلیله از سراوان دارند. این نشان می‌دهد که در بین ارقام کشت شده در این مناطق احتمالاً اختلاط ژنوتیپی اتفاق افتاده که باعث شده بتوان این ژنوتیپ‌ها را بر اساس منطقه جغرافیایی طبقه‌بندی کرد. در توضیح این مطالب باید گفت 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 است. 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. 2008). با توجه به اینکه در این پژوهش نسبت dN/dS، ۰/۱۳۳ محاسبه شد، کمتر از یک بودن مقدار عددی dN/dS برای نشانگر *rbcL*



شکل ۷ - نقشه جهانی انتشار ارقام مورد مقایسه قرار گرفته با ارقام مورد مطالعه

Figure 7. The world distribution map of date palm genotypes that were compared with studied genotypes

ژنوتیپ‌ها به‌وسیله دیگر بارکدهای DNA نظیر *ITS* و *matK* و همچنین سایر نشانگرهای مولکولی مناسب بررسی شود تا بتواند با نتایج تحقیق حاضر مورد مقایسه قرار گیرد.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی دانشگاه زابل با شماره گرنت UOZ-GR-9517-43 انجام شده است. بدین وسیله از حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه زابل جهت انجام تحقیق حاضر قدردانی می‌شود.

وجود فاصله ژنتیکی بین ارقام ایرانی و ارقام کره‌جنوبی و اسپانیا به‌دلیل فاصله جغرافیایی بین این کشورها با ایران قابل توجه است؛ اما فاصله نسبتاً زیاد بین ژنوتیپ‌های ایرانی و برخی ژنوتیپ‌های هندی، پاکستانی و عربستانی که فاصله جغرافیایی کمی دارند و فاصله نسبتاً کمتر بین ژنوتیپ‌های ایرانی و تانزانیا و پورتوریکو که نسبتاً فاصله جغرافیایی زیادی از هم دارند، می‌تواند بیانگر این باشد که برای حصول اطلاعات جامع‌تر، نیاز به انجام تحقیقات بیشتری است. لذا پیشنهاد می‌شود که تنوع این

References

- Akkak, A., Scariot, V., TorelloMarinoni, D., Boccacci, P., Beltramo, C. and Botta, R. (2009). Development and evaluation of microsatellite markers in *Phoenix dactylifera* and their transferability to other *Phoenix* species. *Biologia Plant Arum*, **53**: 164-166.
- Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B. (1993). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, **1**: 19-22.
- Elmeer, K.H., Sarwath, J., Malek, J., Baum, M. and Hamwieh, A. (2011). New microsatellite markers for assessment of genetic diversity in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Biotechnology*, **1**: 91-97.
- Geilly, L. and Taberlet P. (1994). The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus *rbcL* sequences. *Molecular Biology and Evolution*, **11**: 769-777.
- Ghahramanzadeh, R., Marashi S.H., Wael, C. and Malekzadeh, S. (2012). Separation of invasive species of aquatic herb *Myriophyllum* (*Myriophyllum* spp.) From its native relatives using DNA barcode. *Plant Protection Quarterly*, **26**: 101-109.
- Gupta, P., Varshney, R., Sharma, P. and Ramesh, B. (1999). Molecular markers and their application in wheat breeding. *Plant Breeding*, **118**: 360-390.
- Hashempour, M. (1999). *Date Treasure*. Agricultural Education affiliated with the Office of Educational Technology Services of the Ministry of Jihad Agriculture, Tehran, IR (In Persian).
- Hashemi Sistani, M. (2018). Molecular analysis of some *Mango* genotypes by using the sequencing of the *rbcL* gene. M.Sc. Thesis, Faculty of Agriculture, Higher Education Complex of Shirvan, Shirvan, Iran (In Persian).
- 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 Researches*, **5(2)**:17-28 (In Persian).
- Khan, S., Khan, Z., Ashfaq, M. and 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**: 175-186.
- Lewin, G.R., Rueff, A. and Mendell, L.M. (1994). Peripheral and central mechanisms of NGF-induced hyperalgesia. *European Journal of Neuroscience*, **6**: 1903-1912.
- Li, J., Bi, H., Li, Z. and Feng, J. (2008). Genetic analysis of *Ziziphus Jujube* Huizao using ISSR markers. *1th International Jujube Symposium*, Baoding, China.
- Marsefri, M. and 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, Kerman, Iran (In Persian).
- MirMohammadi Maibody, S.A.M. and Golkar, P. (2019). Application of DNA molecular markers in plant breeding. *Plant Genetic Researches*, **6(1)**:1-30 (In Persian).
- Nejad Habib, R. (2013). Evaluation of genetic diversity within and between male and female date palms using microsatellite markers. M.Sc. Thesis, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran (In Persian).

- Pang, X., Luo, H. and Sun, C.** (2012). Assessing the potential of candidate DNA barcodes for identifying non-flowering seed plants. *Plant Biology*, **14**: 839-844.
- Pejman, H.** (2001). *Date Guide (Planting, Holding, Harvesting)*. Agricultural Education and Extension, Tehran, IR (In Persian).
- Taghinejad, H., Fahmideh, L., Samsampoor, D. and Askaryesyahooi, M.** (2018). Genetic diversity of date palm cultivars in Sistan and Baluchistan and Hormozgan provinces using microsatellite. *Journal of Molecular and Cellular Research*, **31**: 221-231 (In Persian).
- Tamura, K. and Nei, M.** (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology Evolution*, **10**: 512-526.
- Thakur, V., Tiwari, S.H.T., Tripathi, N., Tiwari, G. and Sapre, S.** (2016). DNA barcoding and phylogenetic analyses of *Mentha* species using *rbcL* sequences. *Annals of Phytomedicine*, **5**: 59-62.
- Varma, P., Talwar, S. and Gary, G.** (1980). Chemical investigation of *Silybum marianum*. *Palm Medica*, **38**: 377-378.

Studying of Genetic Diversity of *rbcL* Gene in Some Date Palm Cultivars in Sistan and Baluchistan Province, Iran

Fatemeh Raeisi¹, Leila Fahmideh^{2,3,*}, Barat Ali Fakheri⁴ and Mojtaba Kikhasaber⁵

- 1- M.Sc. Students, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran
- 2- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
- 3- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran
- 4- Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran
- 5- Assistant Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran

(Received: April 19, 2020 – Accepted: January 31, 2021)

Abstract

Due to the importance of date palm production in Iran, introduction of new cultivars, improvement of current cultivars and studying the genetic diversity among available cultivars is essential for improvement the quantity and quality of date palm production. In this research, 15 different local genotypes of date palm collected from Saravan, Jalgh, Nahook and Sinokan regions of Sistan and Baluchistan province were used for diversity analysis. To this end, DNA was extracted from leaves using Delaporta method and DNA quality and quantity were determined using spectrophotometer and 1% gel electrophoresis. PCR was performed using specific *rbcL* primers under determined conditions and the amplicons were sequenced. To study the relationships and genetic distances between genotypes, the results of sequencing were analyzed and dendrogram of phylogenetic relationships as well as sequence similarity matrix were generated using Bioedit, and MEGA7 software. The results of the present study showed that there were a total of 553 different residues for this marker of which 505 residues contained deletion and addition, and 48 residues were without deletion and addition. The genetic distance ranged from 0.0 to 0.037 and the highest intra-regional diversity was related to cultivar Jm13_sabzoo. Based on the dendrogram obtained from cluster analysis, the studied cultivars were divided into two branches, in which the first branch contained cultivar Sabzoo from Jalgh region and the other cultivars were grouped in different sub-branches of second branch. Although the *rbcL* marker is useful for studying and recognizing diversity of intraspecific relationships, a low genetic distance was estimated for the studied date palm genotypes. However, it is suggested that the other DNA barcodes as well the other appropriate molecular markers could be used for future studies of date palm genetic diversity.

Keywords: Genetic diversity, Date palm, Phylogenetic relationships, *rbcL* markers

* Corresponding Author, E-mail: l.fahmideh@gau.ac.ir