Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Evaluating and Identification of Genetic Variation of some of Pomegranate (*Punica granatum*) Genotypes using DNA barcoding (ITS)

Behrouz Moradi Ashour

*Assistant Professor, Horticulture Crops Research Department, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Hamedan, Iran. E-mail address: behmoradi@hsri.ac.ir

Mohammad Rabiei

Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran. E-mail address: k_rabiei@yahoo.com

Behrouz Shiran

Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Shahrekord, Shahrekord, Iran. E-mail address: beshiran45@gmail.com

Mojtaba Nouraein

Associate Professor, Department of Plant Genetics and Production, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, Iran. E-mail address: mojtabanouraein@yahoo.com

Abstract

Objective

Iran is one of the few countries where the origin of pomegranate (*Punica granatum* L.) in the world. About half of the pomegranate genotypes are endangered. Despite the similarity between some genotypes in terms of appearance, there are differences between anthocyanins, phytochemicals, antioxidants, etc., of them that are very much affected by the environment (especially stress) and require DNA barcoding. For this reason, more accurate molecular studies, especially DNA identification, are necessary to aid in classification, identification of the required genotype, non-incorrect naming of genotypes, and identification of cultivars. By performing this research, it is possible to reduce the volume of genotypes and eliminate duplicate and similar genotypes in Saveh pomegranate collection to reduce their maintenance and management costs. Also used to select the best plant barcode to identify, differentiate and determine the diversity of genotypes for use in breeding programs.

Materials and methods

In this study, 58 genotypes in Saveh pomegranate collection were examined by ITS barcode region. After receiving the sequences, first all the sequences blast in the NCBI site for the accuracy of the desired area and after sure of the desired plant area (pomegranate), the quality of the sequences was measured with Chromas software and in addition to deleting the M13 sequence,

the beginning and end sequences and poor–quality sequences were deleted. Then, for multiple alignments by clustalW method, bioinformatics analysis was performed using MEGA software.

Results

The results showed that the success rate of propagation in this area by PCR was 79%. Also, the success rate of sequencing in this area was 74.68%. The GC content of this area was 64.23%. The lowest genetic distance for this region (0.005) was between the genotypes of Malls Tabas with Chatroud Shirin and the Torsh Dorag Rafsanjan with Globland Bafgh and the highest genetic distance (5.314) was between the genotypes of Gol Magasi Taft with Dane Siyah Ardestan, Poost Ghermez Zanjan, Malas Paveh, Peyvndi Ashkzar and Dane Ghermez Zavareh genotypes. The results of phylogenetic tree also showed that wild genotypes of Tamin Khash, Domezeh Bagh Malek Izeh and Dorag Malas Bajestan and Gol Magasi Taft were each in separate groups and other genotypes were in other groups.

Conclusions

In general, Ardestan, Khash, Gol Magasi Taft, Malas Peyvandi Ashkzar, Zanjan, Paveh, Zavareh and Ravar genotypes had the highest genetic diversity and distance with other genotypes that according to other characteristics of genotypes, they can be used as parents for breeding programs. Also, considering that this region, unlike other regions, carries both paternal and maternal genes and due to the facilitation of reproduction and the success of their sequences, was identified as a suitable region to show genetic diversity between genotypes which can be used in future research.

Keywords: Pomegranate, Genetic Variation, Genotype and DNA barcode Region.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Moradi Ashour B, Rabiei M, Shiran B, Nouraein M (2023) Evaluating and Identification of Genetic Variation of some of Pomegranate (*Punica granatum*) Genotypes using DNA barcoding (ITS). *Agricultural Biotechnology Journal* 15 (1), 107-124.

Agricultural Biotechnology Journal 15 (1), 107-124. DOI: 10.22103/jab.2023.19797.1414

Received: November 20, 2022. Received in revised form: December 28, 2022.

Accepted: December 29, 2022. Published online: February 18, 2023.

Publisher: Faculty of Agriculture and TechnologyInstitute of Plant Production, ShahidBahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

ارزیابی و شناسایی تنوع ژنتیکی برخی ژنوتیپ‌های انار (*Punica granatum*) با استفاده از شناسه‌گذاری DNA (ITS)

بهروز مرادی عاشور

*نویسنده مسئول: استادیار، مرکز تحقیقات، آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان، همدان، ایران. رایانامه: behmoradi@hsri.ac.ir

محمد ربیعی

استادیار، گروه اصلاح‌نباتات و بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران. رایانامه: k_rabiei@yahoo.com

بهروز شیران

استاد،گروه اصلاح‌نباتات و بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران. رایانامه: beshiran45@gmail.com

مجتبی نورآئین

دانشیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مراغه، مراغه، ایران. رایانامه: mojtabanouraein@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۲۹ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۱/۱۰/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۰۸

چکیده

هدف: ایران یکی از معدود کشورهایی است که منشأ و مرکز پیدایش انار (*Punica granatum* L.) در دنیا می‌باشد. تقریبا نیمی از ژنوتیپ‌های انار در معرض انقراض هستند. علیرغم وجود مشابهت بین برخی از ژنوتیپ‌ها از لحاظ ظاهری، از نظر آنتوسیانین‌ها، ترکیبات فیتوشیمیایی، آنتی‌اکسیدان‌ها و غیره تفاوت‌هایی میان آنها وجود دارد که بسیار تحت تأثیر محیط (بخصوص تنش‌ها) می‌با شند و نیازمند شنا سه‌گذاری DNA می‌با شند. به‌همین دلیل مطالعات مولکولی دقیق‌تر بویژه شنا سه‌گذاری DNA جهت کمک به طبقه‌بندی، شنا سایی ژنوتیپ مورد نیاز، عدم نام‌گذاری ا شتباه ژنوتیپ‌ها و تعیین ا صالت ارقام ضروری می‌با شد. با اجرای این پژوهش می‌توان با حذف ژنوتیپ‌های تکراری و م شابه در کلک سیون انار ساوه ن سبت به کاهش حجم ژنوتیپ‌ها اقدام نمود تا هزینه‌های نگهداری و مدیریت آنها نیز کاهش یابد. همچنین نسبت به انتخاب بهترین بارکد گیاهی جهت شناسایی، تفکیک و تعیین میزان تنوع ژنوتیپ‌ها جهت استفاده در برنامه‌های اصلاحی استفاده نمود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، ۵۸ ژنوتیپ موجود در کلکسیون انار ساوه توسط ناحیه بارکد ITS[1] مورد بررسی قرار گرفت. پس از توالی‌یابی، ابتدا تمام توالی‌ها در سایت NCBI برای صحت ناحیه مورد نظر بلاست و پس از اطمینان از ناحیه گیاه مورد نظر (انار)، کیفیت توالی‌ها با نرم افزار Chromas سنجیده و علاوه بر حذف توالی M13، ابتدا و انتهای توالی حذف و همچنین توالی‌های بی‌کیفیت حذف گردیدند. پس از آن برای انجام همردیفی چندگانه به روش clustalW با استفاده از نرم افزار MEGA اقدام به آنالیز بیوانفورماتیکی گردید.

نتایج: نتایج نشان داد که میزان موفقیت تکثیر این ناحیه از طریق PCR، ۷۹ در صد بود. همچنین موفقیت توالی یابی این ناحیه ۷۴/۶۸ درصد شد. محتوای GC این ناحیه برابر با ۶۴/۲۳ درصد گردید. کمترین فاصله ژنتیکی برای این ناحیه (۰/۰۰۵) بین ژنوتیپ‌های ملس طبس با چترود شیرین و ترش دورگ رفسنجان با گلوبلند بافق و بیشترین فاصله ژنتیکی (۵/۳۱۴) بین ژنوتیپ‌های گل مگسی تفت با ژنوتیپ‌های دانه سیاه اردستان، پوست قرمز زنجان، ملس پاوه، پیوندی اشکذر و دانه قرمز زواره بود. نتایج درخت فیلوژنتیکی نیز نشان داد که ژنوتیپ‌های وحشی تامین خاش، دومزه باغ‌ملک ایذه و دورگ ملس‌بجستان و گل‌مگسی تفت هرکدام در گروه‌های مجزا و سایر ژنوتیپ‌ها در گروه‌های دیگر قرار گرفتند.

نتیجه‌گیری: بطور کلی ژنوتیپ‌های اردستان، خاش، گل مگسی تفت، ملس پیوندی اشکذر، زنجان، پاوه، زواره و راور بیشترین تنوع و فاصله ژنتیکی را با سایر ژنوتیپ‌ها داشتند که می‌توان با توجه به سایر خصوصیات ژنوتیپ‌ها به عنوان والدین جهت برنامه‌های اصلاحی از آنها استفاده نمود. همچنین با توجه به اینکه این ناحیه برخلاف نواحی دیگر، حامل هر دو ژن پدری و مادری است و نیز بدلیل تسهیل تکثیر و موفقیت توالی آنها، ناحیه مناسبی از نظر توانایی نشان دادن تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها تشخیص داده شد که می‌توان در تحقیقات بعدی از آن استفاده نمود.

کلیدواژه‌ها: انار، تنوع ژنتیکی، ژنوتیپ و ناحیه بارکد DNA.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: مرادی عاشور بهروز، ربیعی محمد، شیران بهروز، نورآئین مجتبی (۱۴۰۲) ارزیابی و شناسایی تنوع ژنتیکی برخی ژنوتیپ‌های انار (*Punica granatum*) با استفاده از شناسه‌گذاری DNA (ITS). *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۵(۱)، ۱۰۷-۱۲۴.

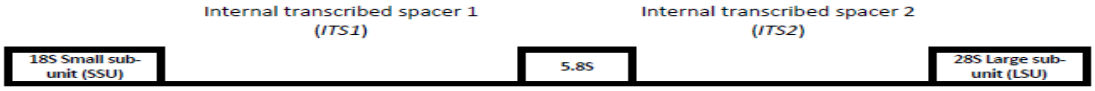
Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, ShahidBahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

[1] Nuclear ribosomal internal transcribed spacer

مقدمه

انار با نام علمی *Punica granatum* L. درخت کوچکی است که در اقلیم‌های خشک و نیمه‌گرمسیری و مدیترانه‌ای دارای رشد و باردهی خوبی می‌باشد. انار با تعداد کروموزوم‌های ۲x=۲n=۱۶ و دگرگشنی ۵۵ درصد، بومی ایران و رشته کوه‌های هیمالیا در شمال هندوستان است که از دوران باستان در نواحی مدیترانه‌ای آسیا، آفریقا و اروپا کشت می‌شده است (Jalikop et al. 1990; Silva 2013). ایران مرکز تنوع انار و به احتمال زیاد مرکز پیدایش آن نیز می‌باشد (Basaki et al. 2016). سطح زیر کشت انار در ایران در سال ۱۴۰۰ شامل هفتاد و پنج هزار هکتار بارور و ده هزار هکتار غیر بارور می‌باشد که پنج استان فارس، مرکزی، خراسان، یزد و اصفهان به ترتیب بیشترین تولید انار را دارا هستند (Ahmadi et al. 2021). خصوصیات مرفولوژیکی، فیزیولوژیکی و زراعی غالبا به منظور ایجاد توصیف‌نامه (Descriptor) و شناسایی ژنوتیپ‌ها در درختان انار استفاده می‌شود. ولی این صفات بسیار متغیر و تحت تاثیر محیط هستند. روش‌های آنالیز DNAی مختلفی جهت شناسایی دقیق ژنوتیپ‌ها به‌کار می‌رود. اخیرا به‌واسطه توسعه سریع و تکنولوژی‌های با کارآیی و سرعت بالا در توالی‌یابی DNA، سیستم جدیدی بر مبنای توالی‌های DNA که شامل انتخاب یک یا چند ناحیه ژنی استاندارد که می‌توانند توالی‌یابی شوند و باعث تشخیص، تفکیک دقیق و شناسایی ژنوتیپ‌ها از یکدیگر در کلکسیون‌ها شوند، به‌وجود آمده است (Castro 2015; Hajiahmadi et al. 2013). شناسه‌گذاری DNA (DNA Barcoding) عبارت است از استفاده از یک توالی کوتاه از یک منطقه استاندارد ژنوم جهت کمک به تشخیص، تمایز گونه‌ها و ژنوتیپ‌ها و تخصیص دادن نمونه‌ها به گونه‌های شناخته شده یا جدید. این حوزه علمی نسبتاً جدید در زمینه مطالعات تاکسونومی، سیستماتیک و تنوع زیستی موجودات مختلف می‌باشد (Chase et al 2007; Hajibabaei et al. 2007; Kress 2005). از آنجائی‌که ناحیه داخلی رونوشت (ITS) سیسترون ریبوزومی هسته‌ای (۱۸S-۵/۸S-۲۸S) (شکل ۱) بسیار بیشتر از ژن‌های کلروپلاستی متغیر است (۳ تا ۴ برابر) بطور وسیعی در فیلوژنی یوکاریوت‌ها مورد استفاده قرار گرفته است (Chase et al. 2007). DNAی هسته‌ای از طریق دانه گرده و بذور گیاهان در مقایسه با DNAی پلاستیدی با وراثت مادری که تنها از طریق بذور منتقل می‌شود، راه‌های انتقال بیشتری دارند. زیرا بذور معمولا در مقایسه با دانه‌گرده بطور ضعیف‌تری پراکنده می‌شوند و این امر نشان‌دهنده اینست که ITS قدرت بالاتری نسبت به نشانگرهای DNAی پلاستیدی دارد (Kress 2017; Vre 2012). بنابراین ITS به عنوان ناحیه شناسه‌گذاری بدلیل تکثیر موفق و قدرت تمایزش می‌تواند در گیاهان گل‌دار مطرح شود.



شکل ۱. ITS1 و ITS2 بین ژنهای رمزکننده زیرواحدهای ریبوزومی ۲۸S - ۵/۸S - ۱۸Sواقع شده‌اند. نواحی موجود در باکس‌ها نمایانگر نواحی رمزکننده و خطوط متصل نمایانگر نواحی رونوشت‌شده داخلی هستند.

Figure 1. ITS1 and ITS2 are located between the coding genes of S28 S-8/5S-18 ribosomal subunits. The regions in the boxes represent the coding regions and the connected lines represent the internal transcribed regions.

Agricultural Biotechnology Journal;Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

در انار نشانگرهای مولکولی مختلفی جهت بررسی ژرم‌پلاسم به‌صورت پراکنده و استفاده از شناسه‌گذاری DNA در تعداد محدودی ژنوتیپ گزارش شده‌است (Hajiahmadi et al. 2013; Pirseyedi et al. 2010). تقریبا نیمی از ژنوتیپ‌های انار در معرض انقراض هستند، با وجود مشابهت ظاهری برخی از ژنوتیپ‌ها، ولی از نظر آنتوسیانین‌ها، ترکیبات فیتوشیمیایی، آنتی‌اکسیدان‌ها و غیره بین آنها تفاوتهایی مشاهده می‌شود که بسیار تحت تاثیر محیط (به‌خصوص تنش‌ها) می‌باشند، به همین دلیل مطالعات مولکولی دقیق‌تر بویژه شناسه‌گذاری DNA جهت کمک به طبقه‌بندی، شناسایی ژنوتیپ مورد نیاز، عدم نام‌گذاری اشتباه ژنوتیپ‌ها و تعیین اصالت ارقام ضروری می‌باشد. با اجرای این پژوهش می‌توان نسبت به کاهش حجم ژنوتیپ‌ها و حذف ژنوتیپ‌های تکراری و مشابه در کلکسیون انار ساوه اقدام نمود تا هزینه‌های نگهداری و مدیریت آنها نیز کاهش یابد. همچنین کارایی بارکد گیاهی جهت شناسایی، تفکیک و میزان تنوع ژنوتیپ‌ها جهت استفاده در برنامه‌های اصلاحی بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در این مطالعه، ۵۸ ژنوتیپ موجود در کلکسیون انار ساوه توسط ناحیه بارکد ITS مورد بررسی قرار گرفت که کد و منشأ آنها در جدول ۱ ارائه شده است.

استخراج DNA ژنومی و تکثیر نواحی: برگ‌های جوان و عاری از هر نوع آلودگی ۵۸ ژنوتیپ انتخاب شده، جدا شده و نمونه‌ها پس از انجماد در ازت مایع تا زمان استخراج DNA در فریزر ۸۰- نگهداری گردید. برای استخراج DNA از کیت استخراج DNA شرکت Bioneer کره جنوبی تحت لیسانس آمریکا مطابق با پروتکل پیشنهاد شده در این کیت استفاده گردید. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA از روش الکتروفورز ژل آگاروز ۰/۸ درصد استفاده شد. کیفیت DNA نمونه‌ها با بررسی میزان کشیدگی DNA و بقایای آلودگی‌های پلی ساکاریدی در چاهک ارزیابی گردید. جهت تعیین کمیت نمونه‌ها از DNA تجاری لامبدا استفاده شد.

طراحی آغازگرها: به منظور تکثیر نواحی ITS بین ژن‌های ۱۸S و ۲۸S رمز کننده مولکول‌های RNA ریبوزومی، آغازگرهای عمومی تکثیر کننده این نواحی تهیه شدند. اختصاصی بودن آغازگرهای طراحی شده با استفاده از ژنوم گیاهان موجود در سایت NCBI که بر اساس مطالعات فیلوژنتیکی قبلی، از لحاظ تکاملی به انار نزدیک‌تر هستند، بررسی شد (Hajiahmadi et al. 2013). نهایتا با استفاده از نرم افزار Oligo، آغازگرهای اختصاصی طراحی شد و توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی ساخته شد. جهت حذف مراحل کلونینگ، توالی عمومی FM۱۳ و RM۱۳ در انتهای ′۵ پرایمرهای اختصاصی تعبیه گردید (جدول ۲).

بیوانفورماتیکی: به منظور بهینه سازی شرایط واکنش PCR، شرایط دمایی مختلف مورد آزمایش قرار گرفت تا بهترین شرایط تکثیر بدست آید. محلول پایه واکنش PCR متناسب با تعداد نمونه‌ها تهیه و به مقدار ۲۱ میکرولیتر (آب ddH2O

۱۶میکرولیتر، بافر ۲/۵ میکرولیتر، کلرید منیزیوم ۰/۷میکرولیتر،dNTP ۰/۵ میکرولیتر، پرایمر هر کدام ۰/۵ میکرولیتر و Taq ۰/۳ میکرولیتر) به همراه ۴ میکرولیتر DNA الگو جمعا ۲۵ میکرولیتر، بین میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتری مخصوص PCR توزیع گردید و با برنامه ۱×۹۴°C/۳′+۳۵×[۹۴°C/۳۰′′+*°C/۴۵′′+۷۲°C/۱′]+۱×۷۲°C/۷′ (* دمای اتصال برای آغازگر با توجه به دمای پیشنهادی از طرف شرکت سنتز کننده، تنظیم شد) در دستگاه Eppendorf تکثیر شد.

جدول ۱. کد و منشأ ژنوتیپ‌های انار مورد مطالعه

Table 1. Code and origin of studied pomegranate genotypes

ردیف No.	کد ژنوتیپ Genotype Code	منشأ Origin	ردیف No.	کد ژنوتیپ Genotype Code	منشأ Origin
1	102	Ardestan	30	717	Ardestan2
2	114	Zanjan	31	802	Shahvar
3	115	Shahdad	32	803	Behabad
4	116	Paaveh1	33	805	Ashkzar
5	117	Ashkzar1	34	808	Ravar2
6	201	Zavvareh	35	1002	Jahrom
7	308	Kashmar	36	1003	Ravar3
8	317	Paveh	37	1112	Ravar4
9	401	Cahtrood1	38	1202	Taft
10	403	Chatrood2	39	1206	Bafgh
11	404	Tabas1	40	1211	Bejestan
12	409	Rafsanjan1	41	1404	Birjand
13	416	Chatrood3	42	1408	Shahdad
14	506	Birjand	43	1414	Ashkzar
15	508	Kerman	44	1502	Shabestar
16	518	Shahdad	45	1504	Kashan
17	607	Abarkooh1	46	1511	Ardestan2
18	608	Paveh2	47	1516	Tabas3
19	613	Taft	48	1601	HajiAbad
20	614	Raavar1	49	1613	Izeh
21	618	Abarkooh2	50	1615	TorbatHeidarieh
22	703	Saveh	51	1616	Minab
23	705	Bejestan	52	1701	Binam
24	706	Paveh3	53	1702	Ashkzar2
25	708	Bafgh	54	1901	Paveh4
26	709	Rafsanjan2	55	1903	Ashkzar3
27	712	Mazandaran	56	1909	Rafsanjan3
28	714	Bejestan	57	2011	Khash
29	715	Tabas2	58	2016	Tabas4

تکثیر قطعات انتخاب شده (با استفاده از آزمون PCR) و تجزیه و تحلیل توالی‌ها و داده‌های: پس از دریافت توالی‌ها از شرکت ماکروژن کره جنوبی، ابتدا تمام توالی‌ها در سایت NCBI برای صحت ناحیه مورد نظر بلاست و پس از اطمینان از ناحیه گیاه مورد نظر (انار)، کیفیت توالی‌ها با نرم افزار Chromas سنجیده و علاوه بر حذف توالی M13، ابتدا و انتهای توالی حذف و همچنین توالی‌های بی‌کیفیت حذف گردیدند. پس از آن به‌روش clustalW با استفاده از نرم افزار MEGA همردیفی چندگانه بررسی شد (Tamura et al. 2011).

جدول ۲. توالی آغازگرهای رفت و برگشت برای تکثیر نواحی ژنی و بین ژنی ITS

Table 2. Sequences of forward and reverse primers for amplification of gene and intergenic regions of ITS

نام جفت آغازگر Name of primer's pair	توالی آغازگر Sequences of primer	GC (٪)	میزان ΔG ΔG level	دمای اتصال (°C) Annealing temp. (°C)
F ITS (18S1F)	5'-TTGTACACACCGCCCGTCGC-3'	57.89	-9.6	50
R ITS (28S1R)	5'-AGTTTCTTTTCCTCCGCTTA-3'	44.74	-6.7	50

نتایج و بحث

محصولات PCR ناحیه ITS در شکل یک نشان داده شده است و درصد موفقیت تکثیر PCR و توالی‌یابی این ناحیه در جدول ۳ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود موفقیت تکثیر ۷۹ درصد و توالی‌یابی مربوط به این ناحیه ۷۴/۶۸ درصد بوده است.

جدول ۳. درصد موفقیت تکثیر PCR و توالی‌یابی بارکد ناحیه ITS در ژنوتیپ‌های انار

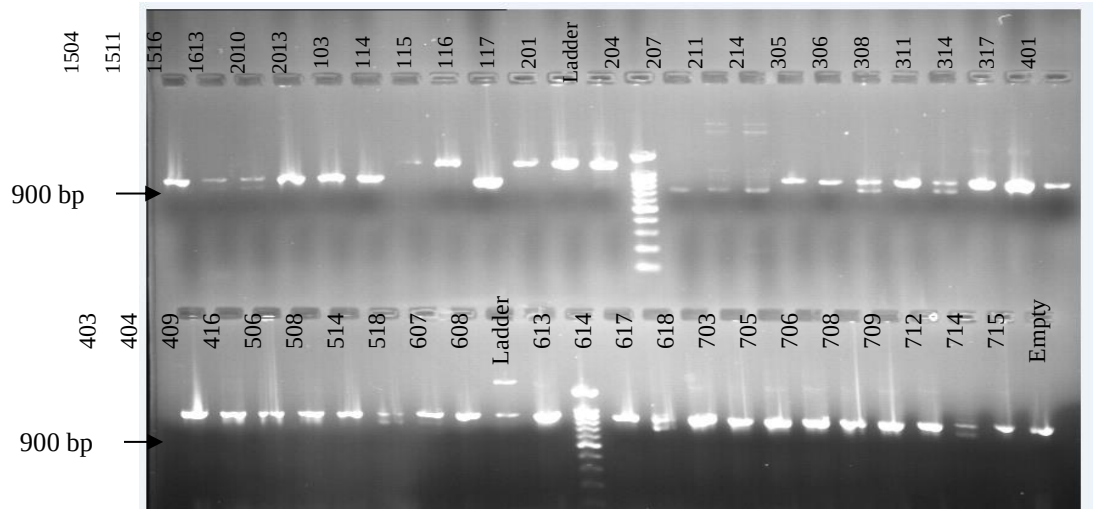
Table 3. Success rate of PCR amplification and ITS barcode sequencing in pomegranate genotypes

ردیف Row	ناحیه بارکد Barcode area	میزان موفقیت PCR (٪) (%) PCR success rate	میزان موفقیت توالی‌یابی (٪) Sequencing success rate (%)
1	ITS	79	74.68

خالص‌سازی محصولات PCR: خالص‌سازی نمونه‌ها با استفاده از کیت جداسازی GeneAll (کره جنوبی) صورت گرفت و پس از اندازه‌گیری کیفیت و کمیت DNA خالص‌سازی شده به میزان ۲ میکرولیتر از آن بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد بارگذاری شد (شکل۲).

توالی‌یابی نواحی بارکد (شناسه) و تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی آنها: پس از ارسال نمونه‌های خالص‌سازی شده این ناحیه و ژنوتیپ‌ها به ماکروژن کره جنوبی انجام توالی‌یابی توسط این شرکت انجام و فایل خروجی را از لینک داده شده

توسط این شرکت، دانلود و تمام توالی‌های نواحی و ژنوتیپ‌ها، در سایت NCBI برای تعیین صحت، نوع ناحیه و گیاه مورد نظر بلاست گردید و پس از اطمینان از ناحیه و گیاه مورد نظر (انار) مراحل بعدی انجام گردید. کیفیت توالی‌ها با نرم افزار Chromas 4.6.2 (2017) سنجیده و ابتدا و انتهای توالی که معمولا کیفیت خوبی ندارند حذف و نیز توالی‌های بی‌کیفیت برخی نمونه‌ها حذف گردیدند. همچنین نمونه‌های توالی‌یابی شده با کیفیت برای هر ژنوتیپ بصورت جداگانه در یک فایل پشت سرهم قرار داده شدند تا همردیفی چندگانه (multiple alignment) نیز بر روی این ترکیبات با استفاده از روش clustalW و نرم افزار MEGA 5.2 انجام و سپس برای آنالیزهای فیلوژنتیکی آماده گردند.



شکل ۲. خالص‌سازی محصولات PCR ناحیه ITS هسته‌ای، بارگذاری‌شده بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد. اندازه نشانگر استفاده شده (DNA Ladder) ۱۰۰ جفت باز و اندازه باندها حدود ۸۰۰-۷۰۰ جفت باز می‌باشد.

Figure 2. Purification of nuclear ITS PCR products, loaded on 1.2% agarose gel. The size of the DNA Ladder is 100 bp and the size of the bands is about 700-800 bp.

جدول ٤. کارایی و بازده بارکد ITS در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

Table 4. Performance and efficiency of ITS barcode in the studied genotypes

ناحیه یا نواحی ژنی Gene region (s)	ITS	تعداد جایگاه متغیر Number of variable positions	553
تعداد ژنوتیپ Number of genotypes	58	تعداد جایگاه حفاظت شده Number of protected regions	168
طول ناحیه توالی‌یابی شده (جفت باز) Sequence area length (bp)	723-726	تعداد جایگاه پارسیمونی Number of parsimony informative positions	483
طول همردیفی (جفت باز) (bp) Alignment length	732	مقدار GC (٪) GC level (%)	64.23
جفت‌های یکسان Same pairs	581	جفت‌های ترانسیژن Transigen pairs	51
جفت‌های ترانسورژن Transorgen pairs	63	نسبت ترانسورژن به ترانسیژن (R) Transorgen to Transigen ratio (R)	0.8

Agricultural Biotechnology Journal;Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

جدول ۵. واگرایی ژنتیکی محاسبه شده بین ژنوتیپ‌ها با استفاده از ناحیه ITS

Table 5. Genetic divergence calculated between genotypes using the ITS region

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
[1]																														
[2]	0.000																													
[3]	3.313	3.313																												
[4]	0.000	0.000	3.313																											
[5]	0.000	0.000	3.313	0.000																										
[6]	0.000	0.000	3.313	0.000	0.000																									
[7]	3.576	3.576	0.055	3.576	3.576	3.576																								
[8]	3.587	3.587	0.033	3.587	3.587	3.587	0.074																							
[9]	3.313	3.313	0.018	3.313	3.313	3.313	0.050	0.042																						
[10]	3.179	3.179	0.013	3.179	3.179	3.179	0.048	0.033	0.015																					
[11]	3.260	3.260	0.016	3.260	3.260	3.260	0.051	0.041	0.005	0.010																				
[12]	3.313	3.313	0.020	3.313	3.313	3.313	0.051	0.037	0.025	0.016	0.023																			
[13]	3.239	3.239	0.010	3.239	3.239	3.239	0.055	0.030	0.021	0.013	0.020	0.016																		
[14]	3.239	3.239	0.010	3.239	3.239	3.239	0.055	0.030	0.021	0.013	0.020	0.016	0.000																	
[15]	3.239	3.239	0.010	3.239	3.239	3.239	0.055	0.030	0.021	0.013	0.020	0.016	0.000	0.000																
[16]	3.323	3.323	0.006	3.323	3.323	3.323	0.053	0.028	0.021	0.013	0.020	0.020	0.010	0.010	0.010															
[17]	3.303	3.303	0.032	3.303	3.303	3.303	0.066	0.048	0.021	0.027	0.023	0.037	0.028	0.028	0.028	0.032														
[18]	3.587	3.587	0.028	3.587	3.587	3.587	0.061	0.044	0.035	0.027	0.033	0.030	0.027	0.027	0.027	0.027	0.044													
[19]	5.314	5.314	0.201	5.314	5.314	5.314	0.246	0.209	0.214	0.203	0.212	0.203	0.195	0.195	0.195	0.197	0.208	0.215												
[20]	3.336	3.336	0.020	3.336	3.336	3.336	0.053	0.042	0.008	0.013	0.003	0.025	0.023	0.023	0.023	0.021	0.027	0.035	0.212											
[21]	3.435	3.435	0.013	3.435	3.435	3.435	0.057	0.039	0.032	0.020	0.030	0.020	0.016	0.016	0.016	0.013	0.042	0.032	0.202	0.032										
[22]	3.424	3.424	0.013	3.424	3.424	3.424	0.057	0.035	0.028	0.020	0.027	0.016	0.016	0.016	0.016	0.013	0.039	0.028	0.205	0.028	0.006									
[23]	3.270	3.270	0.013	3.270	3.270	3.270	0.055	0.041	0.028	0.013	0.023	0.020	0.013	0.013	0.013	0.016	0.039	0.032	0.203	0.027	0.016	0.020								
[24]	3.281	3.281	0.015	3.281	3.281	3.281	0.057	0.037	0.027	0.018	0.025	0.018	0.015	0.015	0.015	0.015	0.037	0.030	0.202	0.028	0.015	0.011	0.018							
[25]	3.198	3.198	0.013	3.198	3.198	3.198	0.048	0.030	0.018	0.010	0.016	0.006	0.010	0.010	0.010	0.013	0.030	0.027	0.198	0.020	0.020	0.016	0.013	0.015						
[26]	3.346	3.346	0.018	3.346	3.346	3.346	0.048	0.033	0.023	0.011	0.021	0.008	0.015	0.015	0.015	0.015	0.035	0.032	0.197	0.025	0.015	0.015	0.015	0.013	0.005					
[27]	3.400	3.400	0.023	3.400	3.400	3.400	0.057	0.039	0.035	0.023	0.033	0.023	0.023	0.023	0.023	0.020	0.046	0.034	0.210	0.037	0.020	0.016	0.023	0.021	0.016	0.015				
[28]	3.736	3.736	0.173	3.736	3.736	3.736	0.213	0.204	0.154	0.169	0.154	0.184	0.176	0.176	0.176	0.173	0.181	0.203	0.344	0.159	0.189	0.184	0.189	0.181	0.174	0.176	0.194			
[29]	3.313	3.313	0.008	3.313	3.313	3.313	0.048	0.030	0.016	0.011	0.015	0.018	0.008	0.008	0.008	0.005	0.027	0.032	0.198	0.018	0.015	0.015	0.015	0.013	0.011	0.013	0.021	0.166		
[30]	3.555	3.555	0.025	3.555	3.555	3.555	0.068	0.039	0.033	0.028	0.035	0.027	0.028	0.028	0.028	0.025	0.044	0.037	0.213	0.035	0.027	0.020	0.025	0.025	0.028	0.032	0.035	0.193	0.027	

```
[ 1] #SabzDaaneSiahArdestan-103-ITS_plate-2_E09-M13F
[ 2] #TarshPaastGhermezZanjan-114-ITS-1_G11
[ 3] #MalasShahdadPaastKaloft-115-ITS-1_H11
[ 4] #MalasSaariPaaveh-116-ITS-1_A12
[ 5] #MalasPeivandiAshkzar-117-ITS-1_B12
[ 6] #KhataaniDaneGhermezZavvare-201-ITS-1_C12
[ 7] #SarkhakRizKashmarTarsh-308-ITS-C01
[ 8] #ZarnarRavansarPaveh-317-ITS-2_E01
[ 9] #DamLakChatraadShirin-401-ITS-2_F01
[10] #ShaahedTarshChatraad-403-ITS-2_G01
[11] #ZaghMashghiTabasMalas-404-ITS-2_H01
[12] #ShirinDaneGhermezRafsanjan-409-ITS-2_A02
[13] #ShaahiDaneGhermezChatraad-416-ITS-2_B02
[14] #NarakShirinAshkzar-506-ITS-2_B02
[15] #ShahvarDadashiDarajeyek-508-ITS-2_B02
[16] #ShirinKhaasShahdad-518-ITS-2_F02
[17] #ShirinPaastNazakAbarkaah-607-ITS-2_G02
[18] #BadTakhmDaneGhermezPaveh-608-ITS-2_H02
[19] #GalmagasiTaft-613-ITS-2_A03
[20] #TarshiRaavar-614-ITS-2_B03
[21] #MeikhashPaastnazakAbarkaah-618-ITS-2_D03
[22] #PaastsiiahSaaveh-703-ITS-2_E03
[23] #ShahvarBejestaanShirin-705-ITS-2_F03
[24] #TarshSaariPaveh-706-ITS-2_G03
[25] #GhorsGalaBalandBafgh-708-ITS-2_H03
[26] #TarshDaragRafsanjaan-709-ITS-2_A04
[27] #SavenareBehshahrMazandaran-712-ITS-2_B04
[28] #DaragBejestaanMalas-714-ITS-2_C04
[29] #GhermezKaahiTabasTarsh-715-ITS-2_D04
[30] #BihasteArdestaan-717-ITS-2_E04
```

ادامه جدول۵. واگرایی ژنتیکی محاسبه شده بین ژنوتیپ‌ها با استفاده از نا حیه ITS

Continuation of Table 5. Genetic divergence calculated between genotypes using the ITS region

.030
.030 0.006
.356 3.168 3.313
.030 0.006 0.006 3.229
.028 0.025 0.025 3.260 0.023
.033 0.010 0.003 3.390 0.010 0.025
.089 0.059 0.059 3.251 0.063 0.082 0.061
.030 0.028 0.025 3.694 0.028 0.027 0.025 0.082
.030 0.006 0.000 3.313 0.006 0.025 0.003 0.059 0.025
.035 0.035 0.032 3.587 0.034 0.020 0.032 0.094 0.027 0.032
.030 0.037 0.037 3.356 0.037 0.030 0.037 0.094 0.027 0.037 0.027
.030 0.006 0.000 3.313 0.006 0.025 0.003 0.059 0.025 0.000 0.032 0.037
.102 0.074 0.070 3.565 0.074 0.096 0.074 0.135 0.096 0.070 0.108 0.110 0.070
.032 0.025 0.025 3.303 0.023 0.023 0.028 0.081 0.027 0.025 0.030 0.030 0.025 0.096
.037 0.037 0.034 3.746 0.035 0.032 0.034 0.096 0.028 0.034 0.025 0.032 0.034 0.110 0.028
.032 0.032 0.032 3.460 0.030 0.006 0.032 0.090 0.023 0.032 0.027 0.033 0.032 0.104 0.027 0.028
.027 0.003 0.003 3.198 0.003 0.021 0.006 0.059 0.025 0.003 0.032 0.034 0.003 0.070 0.021 0.034 0.028
.032 0.005 0.008 3.158 0.008 0.027 0.008 0.063 0.030 0.008 0.037 0.039 0.008 0.076 0.027 0.039 0.034 0.005
.035 0.025 0.025 3.356 0.023 0.020 0.025 0.081 0.027 0.025 0.020 0.030 0.025 0.096 0.023 0.032 0.027 0.021 0.027
.023 0.027 0.027 3.435 0.025 0.021 0.030 0.084 0.023 0.027 0.028 0.035 0.027 0.098 0.015 0.020 0.021 0.023 0.028 0.021
.033 0.037 0.037 3.514 0.034 0.027 0.037 0.096 0.030 0.037 0.034 0.027 0.037 0.110 0.041 0.039 0.030 0.033 0.039 0.032 0.035
.030 0.006 0.003 3.281 0.006 0.025 0.006 0.063 0.025 0.003 0.032 0.037 0.003 0.074 0.025 0.034 0.032 0.003 0.008 0.025 0.027 0.037
.030 0.003 0.006 3.168 0.006 0.025 0.010 0.063 0.025 0.006 0.032 0.034 0.006 0.074 0.021 0.037 0.032 0.003 0.005 0.025 0.027 0.037 0.006
.028 0.005 0.002 3.270 0.005 0.023 0.005 0.057 0.023 0.002 0.033 0.035 0.002 0.068 0.023 0.035 0.030 0.002 0.006 0.023 0.025 0.035 0.005 0.005
.072 0.059 0.055 3.726 0.063 0.068 0.059 0.105 0.065 0.055 0.072 0.074 0.055 0.123 0.063 0.076 0.076 0.059 0.065 0.070 0.065 0.080 0.059 0.059 0.057
.157 0.150 0.150 1.651 0.148 0.148 0.155 0.219 0.160 0.150 0.164 0.155 0.150 0.239 0.153 0.167 0.155 0.148 0.148 0.157 0.160 0.164 0.148 0.148 0.148 0.192
.028 0.011 0.011 3.293 0.011 0.023 0.011 0.065 0.020 0.011 0.030 0.030 0.011 0.080 0.020 0.028 0.027 0.008 0.010 0.023 0.021 0.035 0.011 0.011 0.010 0.061 0.153

[31] #MalasKhasShahvar-802-ITS-2_F04
[32] #MalasShahvarBahabadBafgh-803-ITS-2_G04
[33] #MalasGardanBalandAshkzar-805-ITS-4_G12
[34] #ShirinPoostKalaftRavar-808-ITS-2_H04
[35] #AtabakiKhafrJahram-1002-ITS-2_C05
[36] #AbdandanRavarShirin-1003-ITS-2_D05
[37] #ShirinPoostGhermezRavar-1112-ITS-2_H05
[38] #GalmagasiTaft-1202-ITS-2_C06
[39] #ShirinPoostNazakBafgh-1206-ITS-2_E06
[40] #BejestaanAbdandanMalas-1211-ITS-2_F06
[41] #TarshPoostKalaftBirjand-1404-ITS-2_G06
[42] #ShirinHasteRizShahdad-1408-ITS-2_H06
[43] #DadashiPostkalaftAshkzar-1414-ITS-2_B07
[44] #MeikhashTesaojShabestar-1502-ITS_ITS-2_D
[45] #AnbariRizKashan-1504-ITS-2_E07
[46] #SabzDaaneGhermezArdestan-1511-ITS-2_F07
[47] #GhermezKaahiTabas-1516-ITS-2_G07
[48] #KhareshiTarshHajiabad-1601-ITS-2_H07
[49] #DamazeBaghmalekIzeh-1613-ITS-2_A08
[50] #MalasAghdaeTarbatHeidaire-1615-ITS-2_B08
[51] #TarshMinab-1616-ITS-2_C08
[52] #Binaam-1701-ITS-2_D08
[53] #ZaghPoostSefidAshkzar-1702-ITS-2_E08
[54] #ShirinNarPaveh-1901-ITS-2_F08
[55] #DadashiPeivandiAshkzar-1903-ITS-2_G08
[56] #MeikhashSoratiRafsanjan-1909-ITS-2_H08
[57] #VahshiTaminKhash-2011-ITS-2_A09
[58] #KaahiSeiediTabas-2016-ITS-2_D09

همانطور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود طول توالی محدوده‌ای بین ۷۲۳ تا ۷۲۶ جفت باز از ژنوتیپی به ژنوتیپ دیگر متفاوت بود که پس از همردیفی چندگانه تمامی توالی‌های ژنوتیپ‌های مربوط به ناحیه ITS، ۷۳۲ جفت باز به همراه حذف و اضافه‌های (indels) موجود بر روی توالی، تشخیص داده شد. تعداد جایگاه متغیر و حفاظت‌شده و واجد اطلاعات حداقلی[۲] parsimony informative برای این ناحیه به ترتیب ۵۵۳، ۱۶۸ و ۴۸۳ جفت باز می‌باشد که نشان‌دهنده تعداد جایگاه متغیر بیشتری نسبت به جایگاه حفاظت‌شده می‌باشد. جایگاه parsimony informative، جایگاهی است که حداقل دو نوع نوکلئوتید متفاوت دارای حداقل فراوانی، باید بر روی توالی‌های متفاوت DNA نمونه‌های مورد بررسی قرار گرفته باشند. نتایج برآورد الگوی جایگزینی و درصد جایگزینی انتقال[۳] و تبدیل[۴] برای تمامی ژنوتیپ‌ها (جداول ۴ و ۶) نشان داد فراوانی نوکلئوتیدها برابر با ۲۱/۴۲ درصد برای باز A، ۱۷/۹۵ درصد برای T/U، ۲۹/۶۹ درصد برای C و ۳۰/۹۳ درصد برای باز G است. نسبت جایگزینی انتقال به تبدیل (R) که نشان‌دهنده نسبت بین تعداد نوکلئوتید ترانسیژن به ترانسورژن برای یک جفت توالی می‌باشد نیز محاسبه گردید. اگر این اعداد برای هرکدام مساوی باشد، مقدار R برابر ۰/۵ در نظر گرفته می‌شود، لازم به ذکر است که این مقدار نباید با نرخ ترانسیژن و ترانسورژن اشتباه گرفته شود ($k=\alpha/\beta$). مقدار R برای این ناحیه ۱/۰۳۸ تخمین زده شد. این مقدار از رابطه زیر محاسبه می‌گردد:

$$R=[A*G*k_1 + T*C*k_2]/[(A+G)*(T+C)]$$

k_1 به مقدار ۲/۰۱ و k_2 به میزان ۲/۳۶۵ برآورد گردید. کل جایگاه‌ها پس از حذف فاصله و داده‌های از دست‌رفته ۶۲۴ موقعیت می‌باشد.

جدول ٦. برآورد الگوی جایگزینی نوکلئوتیدی ناحیه ITS به روش حداکثر درست‌نمایی

Table 6. Estimation of ITS region nucleotide replacement pattern by maximum likelihood method

G	C	T	A	Nocleotide نوکلئوتید
14.27	7.39	4.29	-	A
7.1	**17.48**	-	5.12	T
7.1	-	**10.15**	5.12	C
-	7.39	4.29	**10.3**	G

هر عدد نشان‌دهنده احتمال جایگزینی(r) از یک باز (ردیف) به باز دیگر(ستون) است. برای سادگی، مجموع مقادیر r برابر ۱۰۰ می‌باشد. مقادیر مختلف جایگزینی ترانسیژن با بولد نشان داده شده است و اعداد معمولی بدون بولد جایگزین‌های ترانسورژن را نشان می‌دهد.

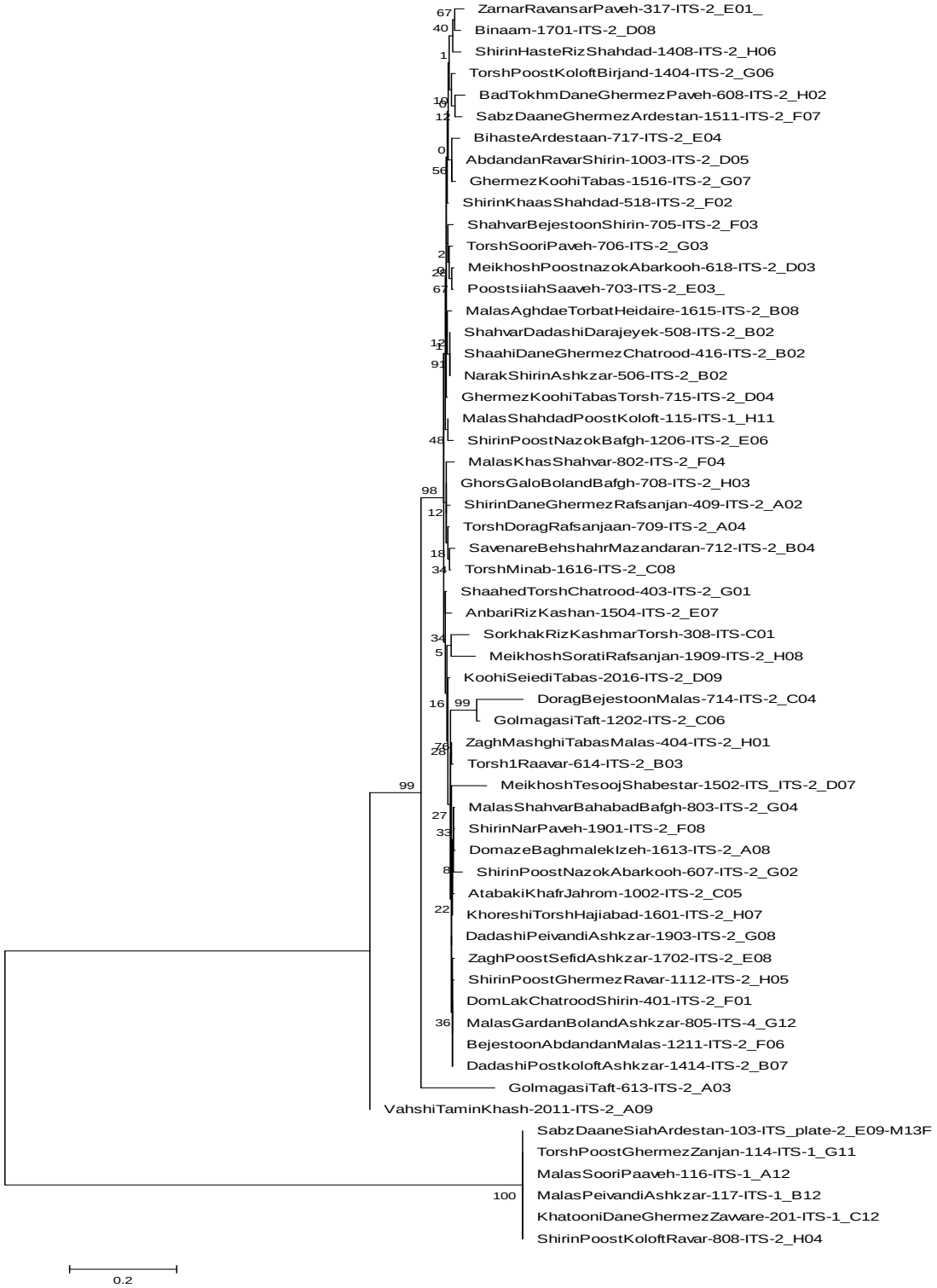
Each number indicates the probability of replacement (r) from one base (row) to another base (column). For simplicity, the sum of the values of r is 100. Different values of transitional replacement are shown with bold and ordinary numbers without bold represent transversional alternatives.

[۲] Parsimony informative
[۳] Transition
[٤] Transversion

محتوای GC این ناحیه برابر با ۶۴/۲۳ درصد می‌باشد (جدول ۴). بیشترین واگرایی بین گل‌مگسی تفت با سبز دانه سیاه اردستان (۵/۳۱)، سبز دانه‌قرمز اردستان با سایر ژنوتیپ‌ها (۳/۷۵)، دورگ ملس بجستان با سایر ژنوتیپ‌ها (۳/۷۴) و میخوش تسوج شبستر با ترش قرمز زنجان (۳/۵۷) مشاهده گردید (جدول ۵). در حالیکه واگرایی کمتری بین سایر ژنوتیپ‌ها نسبت به ژنوتیپ‌های فوق مشاهده گردید. بنابراین می‌توان از این ژنوتیپ‌ها خارج از مناطق جغرافیایی مشابه یا متفاوت، با توجه به سایر خصوصیات مرفولوژیکی آنها در برنامه‌های بعدی اصلاحی جهت ایجاد و تولید ارقام امیدبخش از آنها استفاده نمود. در یک بررسی Liu et al. (2016) نیز گونه‌های جنس *Gentiana* را با استفاده از ناحیه ITS، psbA-trnH، rbcL و matK جهت بررسی تنوع مورد آزمایش قرار داده و نتیجه گرفتند که قدرت تمایز ITS بهتر بوده و گونه‌ها را بهتر تفکیک می‌نماید در نتیجه استفاده از این ناحیه را توصیه نمودند. همچنین Yao et al. (2017) ناحیه ITS را بهترین بارکد جهت شناسایی و تمایز گونه‌های *Poaceae* معرفی نمودند. از طرفی Asadi et al. (2016) این ناحیه را به عنوان بهترین ناحیه جهت طبقه بندی گیاهان دارویی معرفی نمودند. پس از محاسبه واگرایی ژنتیکی و پارامترهای آماری مختلف برای این ناحیه نیز با استفاده از نرم افزار MEGA 5.2 درخت فیلوژنتیکی رسم گردید. نتایج درخت فیلوژنتیکی به دو روش حداکثر درست‌نمایی (ML=Maximum Likelihood) و اتصال‌همسایه (NJ=Neighbour Joining) تاییدکننده نتایج جدول واگرایی و فواصل ژنتیکی می‌باشد.

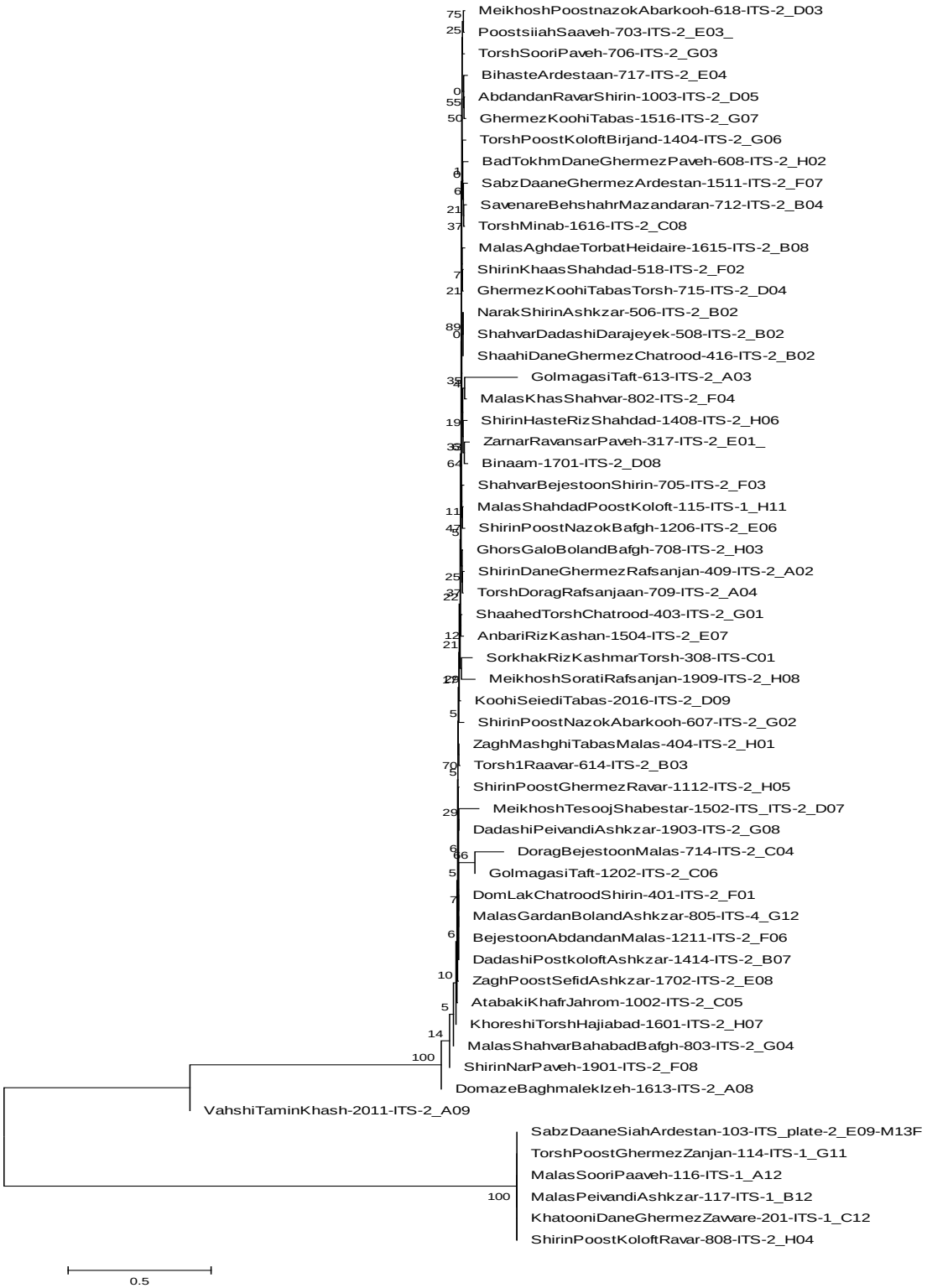
نتیجه‌گیری: بطور کلی براســاس نتایج این تحقیق، گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اســاس داده‌های مولکولی اکثراً مســتقل از طبقه‌بندی جغرافیایی و تشابهات نامی بود. همانطور که در شکل‌های ۳ و ۴ مشاهده می‌شود هر دو روش ML و NJ ژنوتیپ‌ها رو به ۵ گروه مجزا تق سیم نمودند که ژنوتیپ‌های سبز دانه سیاه ارد ستان، ترش پو ست‌قرمز زنجان، ملس سوری پاوه، ملس‌پیوندی اشکذر، خاتون دانه‌قرمز زواره و شیرین پوست‌کلفت راور مجموعا ۶ ژنوتیپ در یک گروه مجزا، وحشی تامین خاش گروه دوم، دومزه باغ‌ملک ایذه در گروه سـوم، دورگ ملس‌بجسـتان و گل‌مگسـی تفت در گروه چهارم، و سـایر ژنوتیپ‌ها در گروه پنجم قرار گرفتند. همچنین نتایج این مطالعه، تنوع ژنتیکی بالا و اختلاط شدید ژنتیکی را در کلکسیون پایه انار ایران در ساوه نشان داد. وجود چنین تنوعی در کلکسیون انار ساوه انجام برنامه‌های اصلاحی بعدی را تا حدی تضمین و تشکیل کلکسیون هسته‌ای (Brown 1995) یا مرکزی (Core Collection) از کلکسیون انار ساوه را نیز تقویت نمود.

سپا سگزاری: از معاونت محترم پژوه شی مرکز تحقیقات ک شاورزی ا ستان همدان و دان شگاه شهرکرد به خاطر حمایت معنوی در اجرای پژوهش حاضر و از داوران محترم به خاطر ارائه نظرهای ساختاری و علمی سپاسگزاری می‌شود.



شکل۳. درخت فیلوژنتیکی حاصل از ناحیه ITS با روشML (حداکثر درست‌نمایی). اعداد روی گره‌ها مربوط به درصد مشابهت درون‌گروهی حاصل از ۱۰۰۰ مرتبه نمونه‌گیری می‌باشد

Figure 3. The phylogenetic tree obtained from the ITS region with the ML (maximum likelihood) method. The numbers on the nodes correspond to the percentage of intra-group similarity obtained from 1000 times of sampling



شکل ٤. درخت فیلوژنتیکی حاصل از ناحیه ITS با روشNJ (اتصال‌همسایه). اعداد روی گره‌ها مربوط به درصد مشابهت درون‌گروهی حاصل از ۱۰۰۰ مرتبه نمونه‌گیری می‌باشد

Figure 4. Phylogenetic tree obtained from ITS region by NJ (neighbor-joining) method. The numbers on the nodes correspond to the percentage of intra-group similarity obtained from 1000 times of sampling

منابع

احمدی کریم، عبادزاه حمیدرضا، حاتمی فرشاد و همکاران (۱۴۰۰). آمارنامه کشاورزی (جلد سوم). وزارت جهاد کشاورزی.

اسدی فاطمه، دژستان سارا، قهرمانزاده رباب و همکاران (۱۳۹۴). بارکد گذاری DNA برخی از گیاهان دارویی. فصلنامه علمی زیست فناوری گیاهان زراعی ۵، ۴۰-۳۱.

References

Ahmadi K, Ebadzadeh HR, Hatami F, et al. (2021) Agricultural statistics (3rd Vol.). Ministry of Agriculture-Jahad, Iran (In Persian).

Asadi F, Dezhestan S, Ghahremanzadeh R, et al. (2016) DNA barcoding of some local medicinal plants of Ardabil province. Crop Biotech 10, 31-40 (In Persian).

Basaki T, Khayam Nekouei M, Choukan R, Mardi M (2016) Evaluation of Iranian pomegranate collection using simple sequence repeat and morphological traits. Crop Breed J 6, 67-78.

Brown AHD (1995) The core collection at the crossroads. In: Hodkin T, Brown AHD. Van Hintum TJL et al. (Eds.), Core collections of plant genetic resources. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). John Wiley and Sons, Chichester, pp. 3-19.

Castro C (2015) DNA barcodes in Fig cultivars (*Ficus carica* L.) using ITS regions of ribosomal DNA, the psbA-trnH spacer and the matK coding sequence. Am J Plant Sci 6, 95-102.

Chase MW. Cowan RS. Hollingsworth PM, et al. (2007) A proposal for a standardized protocol to barcode all land plants. Taxon 56, 295-299.

Hajibabaei M, Singer GAC, Hebert PDN, Hickey DA (2007) DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. Trends Genet 23, 167-172.

Hajiahmadi Z, Talebi M, Sayed-Tabatabaei BE (2013) Studying genetic variability of pomegranate (*Punica granatum* L.) based on chloroplast DNA and barcode genes. Mol Biotechnol 55, 249-259.

Jalikop SH, Sampath Kumar P (1990) Use of a gene marker to study the mode of pollination in pomegranate (*Punica granatum* L.). J Hortic Sci 65, 221-223.

Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, et al. (2005) Use of DNA barcodes to identify flowering plants. Proc Natl Acad Sci USA 102, 8369-8374.

Kress WJ (2017) Plant DNA barcodes: applications today and in the future. J Syst Evol 55, 291-307.

Liu J, Yan HF, Ge XJ (2016) The use of DNA barcoding on recently diverged species in the genus Gentiana (*Gentianaceae*) in China. Plos One 11(4): 1-14.

Pirseyedi SM, Valizadehgan S, Mardi M, et al. (2010) Isolation and characterization of novel microsatellite markers in pomegranate (*Punica geranatum* L.). Int J Mol Sci 11, 2010-2016.

Teixeira da Silva JA, Rana TS, Narzary D, et al. (2013) Pomegranate biology and biotechnology: A review. Sci Hortic-Amsterdam160, 85-107.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol 28, 2731-2739.

De Vere N, Rich TCG, Ford CR, et al. (2012) DNA barcoding the native flowering plants and conifers of wales. Plos One 7(6), e37945.

Yao PC, Gao HY, Wei YN, et al. (2017) Evaluating sampling strategy for DNA barcoding study of coastal and inland halo tolerant Poaceae and Chenopodiaceae: A case study for increased sample size. Plos One 12(9), e0185311.

Agricultural Biotechnology Journal;Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500