

Allelic variation, population structure and genetic diversity in different genotypes of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) using ISSR marker

Fatemeh Ebrahimi 

Assistant Professor, Research & Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran. Tel: +989133970869, Email: fa.ebrahimi@uk.ac.ir

Abstract

Objective

Date palm is one of the most important trees in arid and tropical regions with very valuable fruit as a good food source. Therefore, the aim of this study was to investigate allelic diversity, the population structure and genetic diversity of important date palm genotypes using ISSR molecular marker for applying in genomic studies.

Materials and Methods

Genomic DNA was extracted from leaf tissue of 68 date palm genotypes by Zhang method. The quantitative and qualitative evaluation of the extracted DNA was performed by using a spectrophotometer. For qualitative evaluation, DNA samples were visualized on 2% agarose gel. Polymerase chain reaction was performed using 10 ISSR primers.

Results

In this study, 74 polymorphic bands were created that showed an average of 65.78% polymorphism. Based on the results of this experiment, (AG)₈YC', (TC)₈C and (GA)₈C are suitable markers in the study of genetic diversity of date palm. Structural analysis divided the study population into three sub-structures. The results of analysis of molecular variance between and within the three subpopulations showed that the share of variance within and between subpopulations was 79 and 21% of the total variance, respectively. The principle component analysis based on the Euclidean square distance matrix showed that the first ten components

explained 54.57% of the total changes and diagram of the principal component analysis based on the first two principal components divided population into four groups. In addition, cluster analysis based on complete linkage clustering method and the Euclidean distance divided 68 date palm genotypes into four groups.

Conclusions

The ISSR marker can be useful as a suitable marker for studying the differentiation and structure of the date palm population. High genetic diversity within and between subpopulations makes it possible to select parents for suitable traits in future breeding programs of date palm.

Keywords: ISSR primer, cluster analysis, date palm, subpopulation.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Ebrahimi F (2022) Allelic variation, population structure and genetic diversity in different genotypes of date palm using ISSR marker. *Agricultural Biotechnology Journal* 14 (1), 135-154.

Agricultural Biotechnology Journal 14 (1), 135-154.

DOI:10.22103/jab.2022.18768.1368

Received: January 18, 2022.


Accepted: February 9, 2022

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



© the authors

تنوع آلی، ساختار جمعیت و تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف خرما (*Phoenix dactylifera*) (L) با استفاده از نشانگر آی. اس. اس. آر

فاطمه ابراهیمی 

استادیار، پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، ایران. تلفن: ۰۹۱۳۳۹۷۰۸۶۹، رایانامه: fa.ebrahimi@uk.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۲۸

چکیده

هدف: نخل خرما یکی از مهمترین درختان مناطق خشک و گرمسیری با میوه بسیار ارزشمند به عنوان یک منبع غذایی خوب می‌باشد. لذا هدف از این مطالعه بررسی ساختار جمعیت و تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مهم خرما با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR جهت استفاده در مطالعات ژنومیک است.

مواد و روش‌ها: DNA ژنومی از بافت برگ ۶۸ ژنوتیپ خرما با استفاده از روش ژانگ و همکاران استخراج شد. ارزیابی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد به منظور ارزیابی کیفی، نمونه‌های DNA روی ژل آگارز ۲ درصد نیز مورد بررسی قرار گرفتند. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از ۱۰ نشانگر ISSR انجام شد.

نتایج: در این مطالعه ۷۴ باند چند شکل ایجاد شد که به طور متوسط ۶۵/۷۸ درصد چند شکلی نشان دادند. بر اساس نتایج این آزمایش نشانگرهای '(AG)⁸YC'، '(TC)⁸C' و '(GA)⁸C' به عنوان نشانگرهای مناسب در بررسی تنوع ژنتیکی خرما می‌باشند. تجزیه ساختار جمعیت مورد بررسی را به سه زیر ساختار تقسیم نمود. نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی بین و داخل سه زیرجمعیت نشان داد که سهم واریانس درون و بین زیر جمعیت‌ها به ترتیب ۷۹ و ۲۱ درصد از واریانس کل بود. تجزیه به مولفه‌های اصلی بر پایه ماتریس فاصله مربع اقلیدسی نشان داد که ده مؤلفه اول در مجموع ۵۴/۵۷ درصد از کل تغییرات را توجیه نمود و دیاگرام پراکنش جمعیت‌ها بر اساس دو مؤلفه اول جمعیت را به چهار گروه تقسیم نمود. تجزیه خوشه‌ای نیز بر اساس روش الگوبندی اتصال کامل و معیار فاصله اقلیدسی ۶۸ ژنوتیپ خرما به چهار گروه تقسیم‌بندی کرد.

نتیجه‌گیری: نشانگر ISSR می‌تواند به عنوان نشانگر مناسب جهت مطالعه در تمایز یابی و تجزیه ساختار جمعیت خرما مفید واقع شود. تنوع ژنتیکی بالا درون و بین زیر جمعیت‌ها امکان انتخاب والدین اصلاحی در برنامه‌های به‌نژادی خرما برای صفات مناسب را فراهم می‌کند.

کلیدواژه‌ها: آغازگر ISSR، تجزیه خوشه‌ای، خرما، زیر جمعیت.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: ابراهیمی فاطمه (۱۴۰۱) تنوع آلی، ساختار جمعیت و تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف خرما با استفاده از نشانگر آی. اس. اس. آر. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۴(۱)، ۱۳۵-۱۵۴.

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



© the authors

مقدمه

خرما (*Phoenix dactylifera* L.) گیاهی تک لپه و دو پایه متعلق به خانواده Palmaceae و از جنس Phoenix می‌باشد. این جنس دارای ۱۴ گونه است که تنها این گونه دارای میوه خوراکی است (Alalawi et al. 2017). این گیاه اساس کشاورزی در نواحی خشک و بیابانی را تشکیل می‌دهد و بطور گسترده در نواحی خشک خاورمیانه و شمال آفریقا کشت می‌شود. خرما علاوه بر تامین بخشی از نیاز غذایی بشر در تهیه بسیاری از لوازم زندگی آن‌ها نقش بسزایی داشته است. سهم ایران در مقیاس آسیا با تولید یک میلیون تن در سال بالغ بر ۲۵٪ و نسبت به کل جهان ۱۶٪ است. در طی مطالعاتی بر روی توالی ژن میتوکندری خرما در مقایسه با ۱۵ همولوگ گونه‌ای دیگر به این نتیجه رسیده‌اند که این جنس در خوشه (cluster) اصلی تک لپه‌ای‌ها قرار دارد (Fang et al. 2012). از نقطه نظر سیتولوژیکی همه گونه‌های جنس Phoenix شامل یک ژنوم هسته‌ای دیپلوئیدی هستند که از ۳۶ کروموزوم تشکیل شده‌اند (Beal 1937).

آگاهی از میزان تنوع ژنتیکی ذخایر توارثی گونه‌های گیاهی در برنامه‌های اصلاح نبات از اهمیت خاصی برخوردار است. شناخت دقیق میزان تنوع ژنتیکی واقعی موجود و پتانسیل به‌نژادی در گزینش و ایجاد ژنوتیپ‌های مطلوب و برتر و نیز از جهت ضمانت مالکیت ارقام و ژنوتیپ‌های بومی برای کشور یک اقدام بسیار مهم و اساسی به شمار می‌آید. تنوع ژنتیکی با افزایش هتروزیگوسیتی باعث افزایش مقاومت گیاه به آفات و بیماری‌ها می‌شود و از فرسایش ژن‌های مفید جلوگیری می‌کند. تنوع و انتخاب دو رکن اصلی هر برنامه اصلاحی بوده و انجام انتخاب منوط به وجود تنوع مطلوب است. تخمین میزان تنوع ژنتیکی به عنوان یکی

از گام‌های پایه‌ای و اساسی در نگهداری و حفاظت مواد ژنتیکی در بانک‌های ژن و اجرای برنامه‌های به‌نژادی است. جهت دستیابی به ارقام با عملکرد بالا، کیفیت بهتر، تحمل بیشتر به تنش‌های زیستی و غیرزیستی از قبیل مقاومت به آفات و بیماری‌ها، وجود تنوع ژنتیکی ضروری است (Laurentine 2009). اگرچه مقدار زیادی از تنوع در میان ژرم پلاسم نخل خرما وجود دارد، اما یافته‌های علمی نشان می‌دهند که نقش ماهیت بیولوژیکی درخت، جداسازی در اثر فاصله جغرافیایی و اثرات زیست محیطی بر ژنوم نخل خرما، به شدت تحت تأثیر دخالت‌های انسانی بوده است (Chao & Krueger 2007). فرآیندهای پیچیده تبادل ژرم پلاسم در درختان خرما در جهان در پی انتخاب ارقام و یا دانه‌گرده، همراه با توزیع تصادفی عناصر پراکندگی اشاره می‌کنند که در میان عوامل دیگر، دخالت انسان احتمالاً حداکثر تأثیر بر ساختار ژنوم خرما در سراسر جهان را داشته است. از این‌رو، اولین قدم در اصلاح این گیاه شناسایی ارقام و دسته‌بندی آن‌ها است که روش‌های مولکولی امکان تفکیک ارقام را فراهم آورده‌اند (Elshibli & Korpelainen 2008).

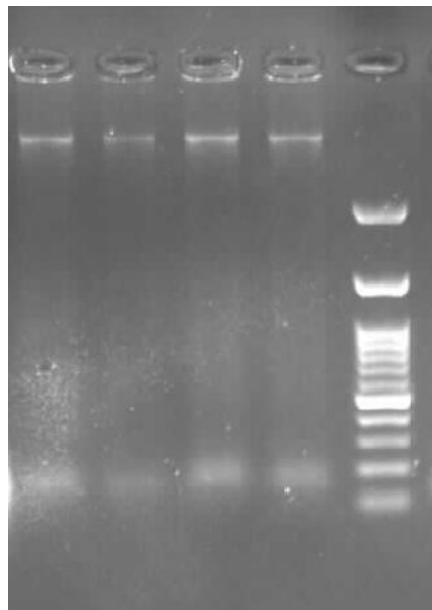
اصلاح خرما به دلیل طولانی بودن سیکل نسل‌ها، دو پایه بودن و هتروزیگوسی بالا با روش‌های سنتی بسیار مشکل بوده و با محدودیت‌هایی مواجه است (Bekheet et al. 2008). بنابراین در سال‌های اخیر پتانسیل قابل توجه بیوتکنولوژی در حل بسیاری از مسائل اساسی در خصوص اصلاح خرما مورد توجه قرار گرفته است. نشانگرهای مولکولی می‌توانند به عنوان ابزاری قوی جهت اصلاح و تشخیص افراد از منابع اصلاحی مختلف که از نظر ژنتیکی با هم شباهت دارند مورد استفاده قرار گیرند. در بین نشانگرهای مولکولی، نشانگر ISSR شامل تکثیر قطعه‌های DNA موجود در فواصل بین دو ناحیه تکراری ریزماهوره‌هایی است که در دو سوی آن قرار دارند (Li et al. 2008). نشانگر ISSR مانند RAPD یک نشانگر غالب است، اما نسبت به RAPD تکثیرپذیری و تنوع پذیری بالاتری دارد (Mohammadabadi et al. 2021). این نشانگرها نیاز کم به DNA الگو دارند (Bahador et al. 2016) و تکرارپذیری نشانگرهای ریزماهوره (SSR) را به دلیل طولیل بودن طول نشانگرهایشان دارا می‌باشند (Mohammadabadi et al. 2017). در واقع این تکنیک اغلب مزایای ریزماهوره‌ها را دارد و روش‌های AFLP و RAPD را در هم می‌آمیزد (Ghasemi et al. 2010). آغازگرهای آن غیراختصاصی و این تکنیک ساده، سریع و نیازی به کاربرد مواد رادیواکتیو و هزینه ساختن کتابخانه ژنومی ندارد (Mohammadabadi & Askari 2012). این نشانگرها در دامنه وسیعی از گیاهان و جانوران، از جمله گاو، گوسفند، بز، ماهی و زنبور عسل برای تعیین تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفته است (Askari et al. 2010; Ghasemi et al. 2010; Askari et al. 2011; Mohammadabadi & Askari 2012; Zamani et al. 2015; Bahador et al. 2016; Mohammadabadi et al. 2017; Mohammadabadi et al. 2021). در بررسی تنوع ژنتیکی ۳۴ رقم ایرانی خرما با استفاده از ۱۲ نشانگر ISSR تعداد ۱۱۲ قطعه چند شکل حاصل گردید. بر اساس نتایج حاصل در این تحقیق ارقام در هشت گروه اصلی گروه‌بندی شدند و نشانگر ISSR جهت تمایز ارقام مختلف خرما مفید واقع شد (Hassanzadeh Khankahdani & Bagheri 2019). در مطالعه‌ای جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی ۲۶ رقم خرما تونسی از هفت نشانگر مولکولی ISSR و پنج نشانگر SSR استفاده شد. نتایج بیانگر چندشکلی بالا در بین همه نشانگرها

بود. هفت نشانگر ISSR در مجموع ۴۳ قطعه DNA چند شکل از ۲۵۰ تا ۲۵۰۰ جفت باز با متوسط ۱/۶ قطعه در هر نشانگر تولید کردند (Hamza et al. 2013). اگر چه تنوع ژنتیکی خرما در برخی ارقام انجام شده است اما در ژرم پلاسما ارقام مهم مناطق مختلف خرماخیز ایران بندرت انجام شده است. لذا هدف این مطالعه بررسی قرابت و تشابه ژنتیکی این ارقام جهت استفاده در مطالعات ژنومیک و برنامه‌های به‌نژادی خرما است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در این آزمایش از ۶۸ ژنوتیپ خرما جمع آوری شده از استان‌های کرمان، سیستان و بلوچستان، خوزستان و هرمزگان استفاده شد (جدول ۱). نمونه‌گیری از برگ‌های جوان هر ژنوتیپ انجام شد و تا زمان استخراج DNA در فریزر -۸۰ نگهداری شد.

استخراج DNA: DNA ژنومی از بافت برگ با استفاده از روش ژانگ و همکاران (Zhang et al. 1998) استخراج شد. نمونه‌های DNA تا غلظت ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شدند. به منظور ارزیابی کیفی، نمونه‌های DNA روی ژل آگارز ۲ درصد مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۱). همچنین ارزیابی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده دستگاه اسپکتروفوتومتر (ساخت شرکت Bio RAD) در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر انجام شد.



شکل ۱. الکتروفورز نمونه‌های DNA استخراج شده از ژنوتیپ‌های خرما بر روی ژل آگارز

Figure 1. Electrophoresis of the extracted DNA samples from date palm genotypes on agarose gel

جدول ۱. ژنوتیپ‌های خرما مورد استفاده در این مطالعه

Table 1. Date palm genotypes used in this study

نام ژنوتیپ Genotype name	شماره Number	نام ژنوتیپ Genotype name	شماره Number	نام ژنوتیپ Genotype name	شماره Number	نام ژنوتیپ Genotype name	شماره Number
بریمی Barimi	52	شاهانی Shahani	35	دقل تاس Dagol tas	18	سنگ شکن سیستان Sang shekan sistan	1
نیک‌الدینی Nikadini	53	آل قبا Al ghaba	36	نلسون Nalason	19	بستکی Bastaki	2
زرک Zark	54	سهلکی Sahlaki	37	پهلوی Pahlavi	20	خاصویی Khasoei	3
مچول Mejool	55	حامرون hameron	38	موصلی Mosalla	21	خلی گت Khali get	4
خالص Khalas	56	کبکاب Kabkab	39	زاهدی Zahedi	22	هلیله‌ای زودرس Early halileh	5
ابونارنجا Abonarenja	57	درویش احمد Darvish ahmad	40	شهری shahri	23	بوتهاری Botehari	6
کوش زاباد Koosh zabad	58	کلجی Kalagi	41	کلک سرخ Kalk sorkh	24	خارو Kharo	7
فرد (ماده) Fard	59	شاخونی Shakhoni	42	نصفه‌ای nesfehee	25	گندگره Gandgorbeh	8
ابومعان Abomaan	60	زامردان Zamardan	43	اصناف Asnaf	26	تک شل Tak shel	9
نبات سیف Nabat seif	61	نرمه چاهی Narmeh chahi	44	کلک Kalak	27	خارو دریایی Kharo dariaie	10
اشرسی Ashresi	62	خانیزی Khanizi	45	سبزرس Sabzras	28	آلی جت Ali jet	11
برحی Barhi	63	هلیله‌ای جیرفت Halileh Jiroft	46	تخم مرغی Tokhme morghi	29	خشخراک Khoshkhorak	12
پیارم Piarom	64	گردک Gherdek	47	خوریک Khorik	30	هفتادگری haftadgazi	13
هلیله‌ای زرد بم Bam yellow halileh	65	سهردنگ Sahrdang	48	شیشه‌ای Shishehee	31	سنگ شکن بم Sang shekan bam	14
کروت Karoot	66	زردونی Zardoni	49	کمالی Kamali	32	آزار Azar	15
خرما سفید Sefid date	67	المهتری Almehtri	50	خارک Kharak	33	توری Thoory	16
مضافتی Mozafati	68	قلمی Ghalami	51	مرداسنگ Mardasang	34	کل حاجی Kal haji	17

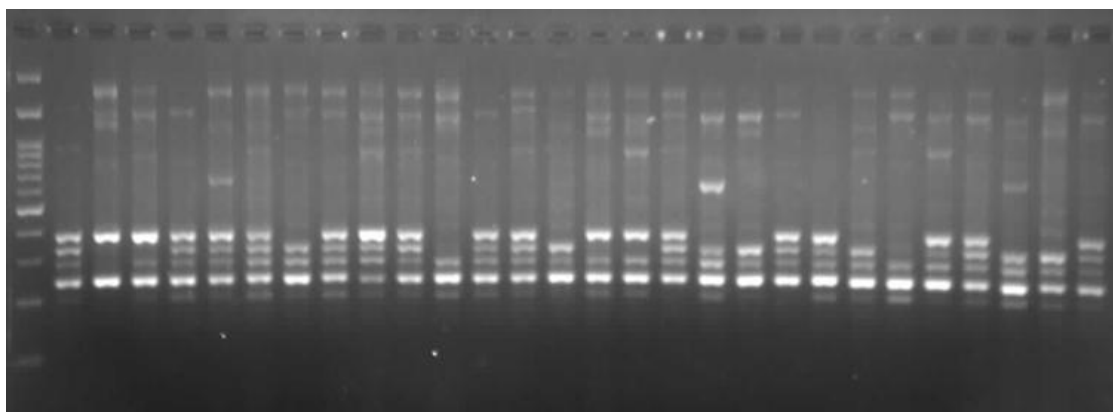
واکنش زنجیره‌ای پلیمرز: جهت بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه تعداد ۱۰ نشانگر ISSR انتخاب شده بر اساس حداکثر تعداد باند چند شکل از بین ۱۵ آغازگر انجام شد. نام، توالی، دمای اتصال و سایر خصوصیات تمام آغازگرها در جدول ۲ آورده شده است. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد که شامل: ۱۲/۵ میکرولیتر Taq 2x Master Mix (شرکت Ampliqon)، ۲ میکرولیتر DNA ژنومی با غلظت ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر، ۳ میکرولیتر آغازگر با غلظت ۱۰ پیکومول و ۷/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل بود. مواد مورد استفاده از شرکت سیناژن تهیه شدند. تکثیر در دستگاه ترموسایکلر Bio Rad (PCR System, USA) طی چرخه‌های PCR بدین شرح انجام شد: یک چرخه واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۴ - ۴۸ درجه سانتی‌گراد (بسته به نوع آغازگر) به مدت ۵۰ ثانیه، مرحله بسط به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و یک چرخه بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد.

جدول ۲. توالی و دمای اتصال آغازگرهای ISSR مورد استفاده در مطالعه

Table 2. Sequence and annealing temperature of ISSR primers used in this study

آغازگر primer	توالی آغازگرها Sequence primers	دمای اتصال Annealing temperature (°C)
(GA)8C	5' GAGAGAGAGAGAGAC3'	C54°
(GACA)4	5'GACAGACAGACAGACA3'	C48°
(GAC)5	5'GACGACGACGAC3'	C48°
(GA)8YG	5'GAGAGAGAGAGAGAYG3'	C53°
(TC)8C	5'TCTCTCTCTCTCTCC3'	C54°
(AC)8G	5'ACACACACACACACG3'	C50°
(GA)8RC	5'GAGAGAGAGAGAGARC3'	C50°
(AG)8YC'	5AGAGAGAGAGAGAGAYC'3'	C52°
(AC)8C	5'ACACACACACACACC3'	C50°
HVH(TCC)5	5HVHTCCTCCTCCTCC3'	C52°

الکتروفورز، مشاهده نوارهای تکثیر شده و تحلیل داده‌ها: جهت آشکارسازی چندشکلی بین نمونه‌ها محصولات حاصل از PCR روی ژل آگارز ۲ درصد با ولتاژ ثابت ۱۰۰ ولت در بافر TBE 0.5x به مدت ۶۰ دقیقه الکتروفورز شدند. همچنین جهت رنگ‌آمیزی ژل از DNA Green Viewer استفاده شد و به منظور مشاهده و بررسی نمونه‌ها، ژل در دستگاه UV Gel document قرار گرفت و عکس‌برداری از آن انجام شد (شکل ۲).



شکل ۲. الکتروفورز محصولات PCR ژنوتیپ‌های مختلف خرما برای نشانگر ISSR بر روی ژل آگارز

Figure 2. Electrophoresis of PCR products from different genotypes of date palm for ISSR marker on agarose gel

باند‌ها به صورت ماتریس صفر (عدم حضور باند) و یک (حضور باند) مشخص شدند. برای بررسی محتوای اطلاعات چند

شکلی (PIC) $PIC = 1 - p^2 - q^2$ (Weising et al. 2005)، شاخص نشانگر (MI) $MI = PIC \times (MI)$

number of polymorphic loci (Powell et al. 1996)، شاخص شانون (H) $H = -1 \times (p \times (H))$

(Shannon 1948) $ln(p) + q \times ln(q)$ از نرم افزار GenAlEx 6.5b3 استفاده شد (Peakall & Smouse 2012).

در معادلات فوق p و q به ترتیب فراوانی آلل غالب و مغلوب هستند.

ساختار جمعیت بر اساس داده‌های حاصل از نشانگر ISSR در حالت مخلوط^۱ با ۱۰۰۰۰ طول دوره^۲ و تعداد تکرار (MCMC)

(^۳) ۱۰۰۰۰۰ با استفاده از نرم افزار STRUCTURE 2.3.4 بررسی شد مقادیر مختلف K از ۲ تا ۱۰ (۵ تکرار برای هر K) بررسی

شد و عدد K بهینه (تعداد زیر جمعیت احتمالی) بر اساس حداکثر میزان ΔK طبق روش اوانو و همکاران (Evanno et al. 2005)

با استفاده از سایت STRUCTURE HARVESTER تعیین گردید. میزان ΔK در روش اوانو بر اساس فرمول زیر بدست

1. Admixture

2. Burn-in

3. Markov Chain Monte Carlo

می‌آید. در معادله زیر $m|L''(K)|$ میانگین قدر مطلق لگاریتم احتمال داده‌ها در مقادیر K پشت سر هم و $s[L(K)]$ انحراف استاندارد لگاریتم احتمال داده‌ها برای تکرارهای مختلف در هر K می‌باشد.

$$\Delta K = m |L''(K)|/s[L(K)]$$

سپس ماتریس Q (ماتریس ساختار جمعیت) از نتایج ساختار جمعیت بر اساس K بهینه حاصل شد. در واقع ماتریس Q ماتریسی است که میزان احتمالی که هر فرد می‌تواند به هر زیرجامعه نسبت داده شود را بیان می‌کند و تعداد سطر آن برابر تعداد افراد جامعه و تعداد ستون آن برابر با زیرگروه‌های جامعه (تعداد K بهینه) است. تجزیه واریانس بین و داخل سه زیرجمعیت حاصل از تجزیه ساختار جمعیت با استفاده از نرم افزار GenAIEx 6.5b3 انجام شد. جهت انجام تجزیه به مولفه‌های اصلی و تجزیه خوشه‌ای داده‌های مولکولی از نرم‌افزار XISTAT 2018 استفاده شد.

نتایج و بحث

تنوع آلی: تعداد کل باندهای حاصل از ۱۰ آغازگر ISSR استفاده شده در این مطالعه ۱۱۱ باند بود که ۷۴ عدد از این باندها چند شکل بودند. بیشترین درصد چند شکلی در نشانگرهای (GA)8C، (TC)8C و (AG)8YC به ترتیب با ۸۴/۶۱، ۸۱/۸۲ و ۸۰ درصد و کمترین درصد چند شکلی در نشانگر (GA)8RC با مقدار ۴۱/۶۶ درصد مشاهده گردید (جدول ۳). درصد بالای چند شکلی بیانگر این است که این نشانگرها می‌توانند به عنوان یک ابزار قدرتمند در شناسایی، تفکیک ژنوتیپ‌های خرما و در برنامه‌های اصلاحی خرما سودمند باشند. محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) در نشانگرهای غالب از صفر تا نیم متغیر است و هرچه این عدد بزرگتر باشد نشان دهنده فراوانی بیشتر چند شکلی برای آن جایگاه و قدرت تفکیک بالاتر آغازگر مورد استفاده می‌باشد (Wei et al. 2005). میانگین محتوای اطلاعات چند شکل در آغازگرهای مورد بررسی برابر ۰/۴۱ بود. بیشترین محتوای اطلاعات چند شکلی مربوط به آغازگر (AG)8YC و کمترین این پارامتر مربوط به آغازگر (GA)8YG بود. آغازگرهایی که مقادیر PIC آنها بین ۰/۲۵ تا ۰/۵ باشد سودمند هستند و آن‌هایی که کمتر از ۰/۲۵ هستند حاوی اطلاعات سودمند اندکی می‌باشند (Ditta ۲۰۱۸ et al.). بیشترین میزان شاخص نشانگر (MI) نیز مربوط به نشانگر (AG)8YC بود. در این میان نشانگر (GA)8RC کمترین میزان شاخص مذکور را نشان داد. بیشترین و کمترین مقدار شاخص شانون به ترتیب در آغازگرهای (GAC)5 و (GA)8YG مشاهده شد (جدول ۳). در مجموع، با توجه به این نتایج کلیه آغازگرهای مورد استفاده از کارایی قابل قبولی برخوردار بودند. بر اساس نتایج این پارامترها نشانگرهای (AG)8YC، (TC)8C و (GA)8C به عنوان نشانگرهای مناسب در بررسی تنوع ژنتیکی خرما می‌باشند. این نتایج با گزارش‌های قبلی در خصوص نشانگرهای ISSR به عنوان نشانگر مناسب جهت مطالعه در تمایز یابی خرما مطابقت دارد (Gholami et al. 2014; Hamza et al. 2013).

جدول ۳. شاخص‌های مولکولی برای ۱۰ آغازگر ISSR در ژنوتیپ‌های مختلف خرما

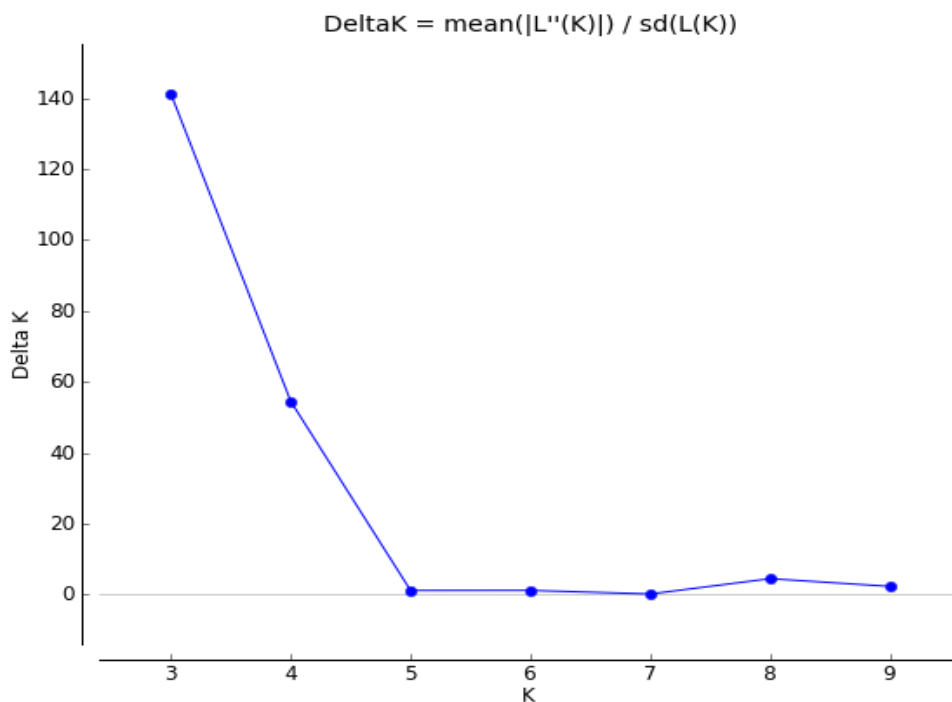
Table 3. Molecular indexes for 10 ISSR primers in different genotypes of date palm

آغازگر Primer	شاخص شانون Shannon Index	تعداد باند چند شکل Polymorphic bands	تعداد کل باند Total Band	درصد چند شکلی Polymorphic percentage	شاخص نشانگر (MI) Marker index	محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) Polymorphic information content
(GA)8C	0.59	11	13	84.61	4.43	0.40
(GACA)4	0.58	5	8	62.50	1.97	0.39
(GAC)5	0.65	6	10	60	2.76	0.46
(GA)8YG	0.49	6	11	54.54	1.94	0.32
(TC)8C	0.62	9	11	81.82	3.85	0.43
(AC)8G	0.61	8	11	72.72	3.42	0.43
(GA)8RC	0.55	5	12	41.66	1.85	0.37
(AG)8YC'	0.63	12	15	80	5.25	0.44
(AC)8C	0.59	6	10	60	2.43	0.40
HVH(TCC)5	0.60	6	10	60	2.49	0.41
میانگین Mean	0.51	7.4		65.78	3.04	0.41

ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها: با توجه به تغییرات مقدار Δk به ازای تعداد مختلف گروه‌ها K و بیشترین مقدار Δk در

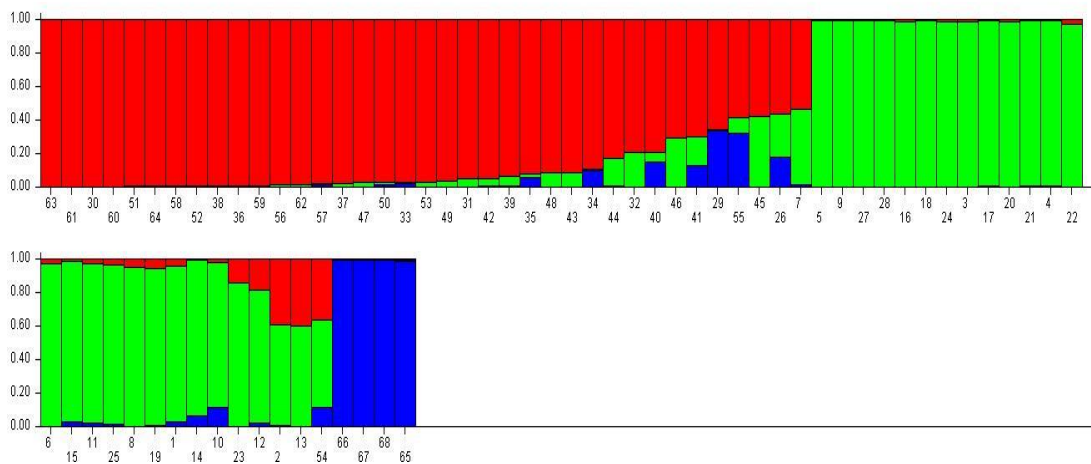
$K=3$ ، بهترین مقدار K برای جمعیت مورد بررسی برابر با سه انتخاب شد (شکل ۳) (Evanno et al. 2005). بنابراین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بر اساس حد آستانه 0.75 به سه زیر جمعیت تقسیم شدند (شکل ۴). به طوری که اعداد محور افقی کد ژنوتیپ‌ها و اعداد محور عمودی ضریب عضویت هر فرد به زیر جمعیت‌ها را نشان می‌دهند و ژنوتیپ‌های با رنگ یکسان متعلق به یک زیر جمعیت می‌باشند. $14/71$ درصد (10 ژنوتیپ از جمله ژنوتیپ‌های بستکی، هفتاد گزی و زرک) دارای نسبت احتمالی کمتر از حد آستانه بودند و لذا به عنوان توده‌های مختلط شناخته شدند. $85/29$ درصد (58 رقم) دارای مقادیر بالای 0.75 بودند و به یک زیر جمعیت خاص تعلق گرفتند. یکی از دلایل ایجاد توده‌هایی که به عنوان مختلط شناخته می‌شود، ایجاد پدیده شارش ژن^۱ بین توده‌های مناطق مختلف است. عواملی نظیر انتقال دانه گرده توسط باد و فعالیت‌های انسانی، همچنین مهاجرت و یا تبار مشترک مشابه می‌تواند دلیل ایجاد توده‌های مختلط در این جمعیت‌ها باشد (Mousavi Derazmahalleh et al. 2014). در این مطالعه در هر یک از زیر ساختارها ۱، ۲ و ۳ به ترتیب دارای ۳۷، ۲۷ و ۴ ژنوتیپ بودند.

¹ gene flow



شکل ۳. نتایج روش اوانو (Evanno's method) در انتخاب K بهینه

Figure 3. The result of Evanno's method in optimal K selection



شکل ۴. بارپلات تجزیه ساختار داده‌های حاصل از ۱۰ آغازگر ISSR در ژنوتیپ‌های مختلف خرما توسط نرم‌افزار STRUCTURE 2.3.4، اعداد محور افقی و عمودی به ترتیب بیانگر ژنوتیپ و ضریب تعلق هر فرد به هر کلاستر می‌باشد. افراد دارای رنگ مشابه به گروهی مشابه تعلق دارند

Figure 4. Bar plot of structural analysis of 10 ISSR primers in different genotypes of date palm by STRUCTURE software. The numbers on horizontal and vertical axes correspond to the genotypes and the membership coefficient of each individual, respectively. People of the same color type belong to the same group

پارامترهای ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها: برای بررسی تنوع ژنتیکی موجود در درون زیرجمعیت‌های حاصل از تجزیه ساختار ژنتیکی، پارامترهای تعداد آلل موثر، شاخص شانون، هتروزیگوسیتی و میزان چند شکلی در هر زیر جمعیت محاسبه گردید (جدول ۴). بیشترین میزان تعداد آلل مشاهده شده و درصد چند شکلی در زیر جمعیت دوم به ترتیب برابر با ۱/۹۱ و ۹۰/۵۴ درصد مشاهده شد. همچنین زیر جمعیت دوم بالاترین مقدار پارامترهای دیگر تنوع ژنتیکی از جمله تعداد آلل موثر، شاخص شانون و میزان هتروزیگوسیتی را به ترتیب با مقادیر ۱/۶۴، ۰/۵۳ و ۰/۳۶ دارا بود.

جدول ۴. پارامترهای تنوع ژنتیکی برآورد شده درون جمعیت‌های خرما با استفاده از نشانگر ISSR

Table 4. Estimated genetic variation parameters within subpopulations of date palm using ISSR markers

زیر جمعیت (تعداد) Subpopulation (N)	تعداد آلل‌های مشاهده شده Number of observed alleles	تعداد آلل‌های موثر Number of effective alleles	شاخص شانون Shannon Index	هتروزیگوسیتی Heterozygosity	درصد چند شکلی Polymorphic percentage
Pop1 (37)	1.88±0.04	1.61±0.04	0.51±0.03	0.35±0.02	89.19%
Pop2 (27)	1.91±0.03	1.64±0.04	0.53±0.02	0.37±0.02	90.54%
Pop3 (4)	1.05±0.09	1.24±0.04	0.19±0.03	0.13±0.03	32.43%

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی بین و داخل سه زیرجمعیت حاصل از تجزیه ساختار جمعیت در جدول ۵ نشان داد که سهم واریانس درون و بین زیر جمعیت‌ها به ترتیب ۷۹ و ۲۱ درصد از واریانس کل بوده و آماره PhiPT (آنالوگ شاخص تثبیت) بسیار معنی دار بود. بنابراین تفاوت ژنتیکی بین زیر جمعیت‌ها بسیار معنی دار بود. وجود تنوع ژنتیکی بالا درون جمعیت‌ها علاوه بر اینکه نشان دهنده هتروزیگوسیتی زیاد آنها می‌باشد بیانگر ناهمگنی اختلاف ژنتیکی زیاد افراد درون جمعیت از لحاظ مکان ژنی تکثیر یافته است. به طور کلی ناهمگنی بالا درون جمعیت می‌تواند به دلایل زیادی از جمله ماهیت دگرگشتی، تلاقی مختلف بین ارقام مختلف، تعدد مکان‌های مورد بررسی، موقعیت باندی و ژنوتیپی جمعیت، بزرگ بودن ژنوم و اندازه جمعیت باشد (Mahjoob et al. 2014). تنوع ژنتیکی در جمعیت‌ها به دلیل دخالت چندین عامل از جمله پیوستگی، تلاقی خویشاوندی، مهاجرت و تفاوت‌های موجود در افراد تشکیل دهنده جمعیت‌ها دارای پیچیدگی‌هایی است. نتایج این تحقیق نشان داد که وجود تنوع ژنتیکی بیشتر در درون جمعیت‌های خرما حکایت از پایه ژنتیکی قوی آنها برای سازگاری با شرایط محیطی داشته و ممکن است سازگاری کوتاه مدت به تغییرات اقلیمی را تسهیل نماید (Jump et al. 2006). یکی از مزایای تنوع ژنتیکی بالا درون زیر جمعیت‌ها می‌تواند امکان انتخاب والدین اصلاحی در برنامه‌های به‌نژادی خرما برای صفات مناسب را فراهم سازد. مقادیر PhiPT بین جفت زیر جمعیت‌ها نیز تفاوت ژنتیکی بسیار معنی‌داری را در بین کلیه جفت زیرجمعیت‌ها نشان داد (جدول ۶). این نتایج نشان داد که مارکر ISSR برای تجزیه ساختار جمعیت مفید واقع شد.

جدول ۵. تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) برای سه زیرجمعیت (زیرگروه) حاصل از تجزیه ساختار ژنوتیپ‌های مختلف خرما با استفاده از نشانگر ISSR

Table 5. Analysis of molecular variance (AMOVA) for three subpopulations derived from structural analysis in different genotypes of date palm using ISSR markers

PhiPT	درصد تنوع Variation percentage	انحراف استاندارد Standard deviation	میانگین مجموع مربعات Mean sum of square	درجه آزادی Degree of freedom	منبع تغییر Source of variation
0.21**	21%	2.91	64.51	2	بین جمعیت‌ها Between populations
	79%	10.81	10.81	65	درون جمعیت‌ها Within populations
	100%			67	کل Total

** بیانگر معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد.

جدول ۶. مقادیر PhiPT در بین جفت زیر جمعیت‌های حاصل از تجزیه ساختار ژنوتیپ‌های مختلف خرما با استفاده از نشانگر ISSR

Table 6. PhiPT values among pairs of subpopulations resulting from structural analysis of different genotypes of date palm using ISSR marker

زیر جمعیت سوم The third subpopulation	زیر جمعیت دوم The second subpopulation	زیر جمعیت اول The first subpopulation
		0.00
	0.00	13**
0.00	0.44**	0.42**

** بیانگر معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد.

تجزیه به مولفه‌های اصلی داده‌های مولکولی: تجزیه به مولفه‌های اصلی بر پایه ماتریس فاصله مربع اقلیدسی انجام

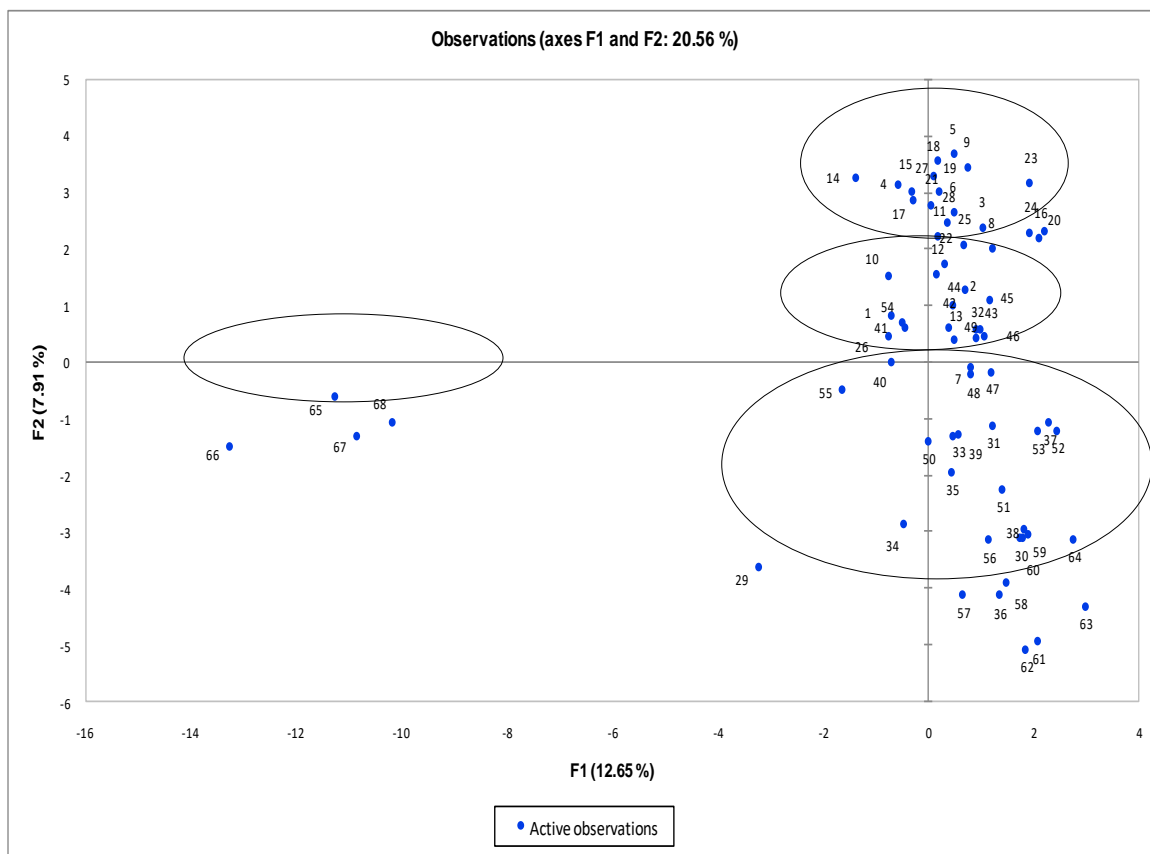
شد و نتایج نشان داد که ده مؤلفه اول در مجموع ۵۴/۵۷ درصد از کل تغییرات را توجیه نمود. سهم مؤلفه اول و دوم به ترتیب ۱۲/۶۴ و ۷/۹۱ می‌باشد (جدول ۷). در ضمن دیاگرام پراکنش جمعیت‌ها بر اساس مولفه اول و دوم رسم شد که جمعیت را به چهار گروه تقسیم نمود (شکل ۵). تجمع افراد در یک نقطه از پلات نشان‌دهنده تشابه ژنتیکی آن‌ها است. در صورتی که نشانگرها از قسمت‌های مختلف ژنوم انتخاب شوند و پیوستگی آنها کم باشد، تعداد مؤلفه بیشتری جهت توجیه کل تغییرات لازم است. بهترین حالت آن است

که نشانگرها توزیع یکنواخت و مناسبی در ژنوم داشته باشند و بتوانند از تمام ژنوم نمونه برداری کنند. اطلاعات بدست آمده بیانگر این است که ترکیبات آغازگری نشانگر ISSR به کار رفته در این تحقیق پراکندگی نسبتاً خوبی در سطح ژنوم دارند.

جدول ۷. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی ژنوتیپ‌های مختلف خرما با استفاده از نشانگر ISSR

Table 7. The principle component analysis in different genotypes of date palm using ISSR marker

Component مؤلفه											
10	9	8	7	6	5	4	3	2	1		
2.85	3.49	3.63	4.01	4.20	4.58	5.34	5.88	7.91	12.64	درصد	
										Percent	
54.57	51.71	48.21	44.58	40.57	36.37	31.78	26.44	20.55	12.64	درصد تجمعی	
										Additive percent	

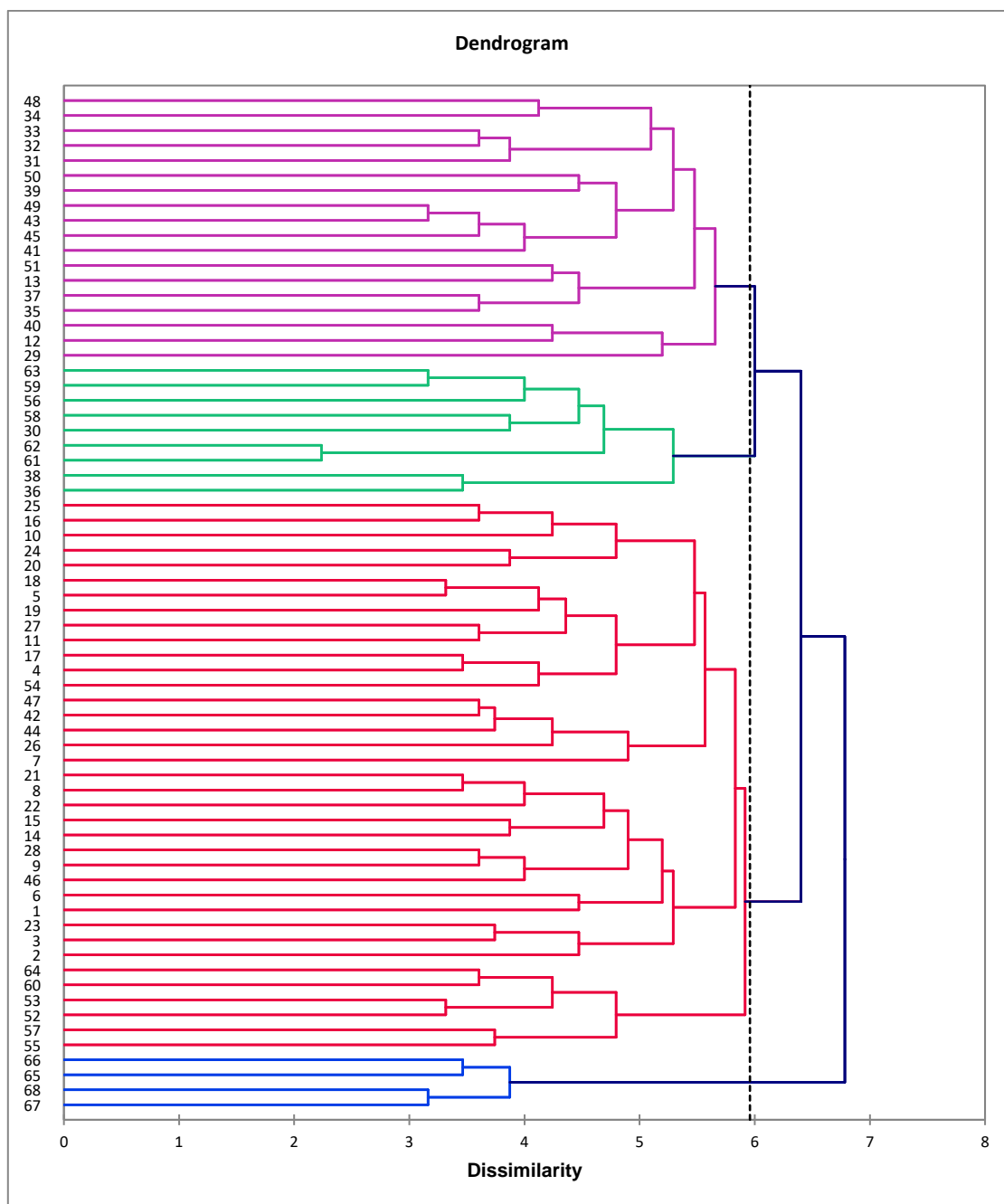


شکل ۵: نمایش دو بعدی تجزیه مولفه اصلی بر اساس دو مولفه اول در ژنوتیپ‌های مختلف خرما با استفاده از نشانگر ISSR

Figure 5. Biplot diagram of the principal component analysis based on the first two principal components in the different genotypes of date palm using ISSR marker

تجزیه خوشه‌ای داده‌های مولکولی: جهت انتخاب روش خوشه‌ای، ضریب همبستگی کوفنتیک بر اساس معیار مربع فاصله اقلیدسی و جاکارد و دو روش الگوی خوشه‌بندی اتصال متوسط (UPGMA) و اتصال کامل (Complete linkage) محاسبه گردید. بیشترین ضریب همبستگی کوفنتیک (۰/۸۱) بر اساس روش الگو بندی اتصال کامل و معیار فاصله اقلیدسی بدست آمد. تجزیه خوشه‌ای بر اساس روش الگو بندی اتصال کامل و معیار فاصله اقلیدسی ۶۸ ژنوتیپ خرما به چهار گروه تقسیم‌بندی کرد. (شکل ۶). خوشه اول شامل ۳۷، خوشه دوم شامل ۱۸ و خوشه سوم و چهارم به ترتیب ۹ و ۴ ژنوتیپ را در خود جای دادند. تفاوت ژنتیکی کم بین ژنوتیپ‌ها و قرار گرفتن آنها در یک گروه می‌تواند ناشی از نزدیک بودن زمان پیدایش، مبدأ جغرافیایی یکسان، قرابت‌های ژنتیکی، خویشاوندی‌های احتمالی و داشتن اجداد مشترک باشد (Amini et al. 2008; Mahasi et al. 2009). ارقام سهرنگ و خرما سفید بیشترین فاصله (کمترین میزان شباهت) را نشان دادند. تلاقی بین ارقامی که بیشترین فاصله را دارند، بهترین نتیجه را در دستیابی به هیبریدها و یا دستیابی به حداکثر تفکیک در نسل‌های پس از F1 خواهد داشت (Esposito et al. 2013). بررسی قرابت‌ها نشان داد که برخی از ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در یک منطقه با سایر ژنوتیپ‌های آن منطقه رابطه خویشاوندی دوری دارند در حالی که با برخی ژنوتیپ‌های مناطق دیگر رابطه نزدیکی دارد. به عنوان مثال خرما بستکی متعلق به استان هرمزگان با خرما سنگ شکن بم و سیستان در یک گروه قرار گرفتند. این نشان می‌دهد که در بین ارقام کشت شده در این مناطق احتمالاً اختلاط ژنوتیپی اتفاق افتاده است که باعث شده نتوان این ژنوتیپ‌ها را بر اساس منطقه جغرافیایی طبقه‌بندی نمود. بر اساس نتایج حاصل از تجزیه ساختار هم رقم بستکی به عنوان توده‌های مختلط شناخته شد. البته برخی ژنوتیپ‌ها مثل هلیله‌ای زرد بم، کروت، خرما سفید و مضافتی که از شهرستان بم جمع‌آوری شدند بر اساس نتایج تجزیه خوشه‌ای نیز در یک گروه قرار گرفتند. به عبارتی در خصوص برخی ژنوتیپ‌ها تنوع ژنتیکی با تنوع جغرافیایی تطابق داشت. نتایج تجزیه خوشه‌ای به نوعی تأییدی بر نتایج تجزیه به مولفه‌های اصلی بود.

نتیجه‌گیری: به طور کلی نشانگر ISSR می‌تواند به عنوان نشانگر مناسب جهت تمایزیابی و تجزیه ساختار جمعیت به منظور استفاده در مطالعات ژنومیک خرما مفید واقع شود. تنوع ژنتیکی بالا درون و بین زیر جمعیت‌ها امکان انتخاب والدین در برنامه‌های اصلاحی خرما برای صفات مناسب را فراهم می‌کند. درصد بالای چند شکلی نشانگرهای مورد استفاده در این مطالعه بیانگر این است که این نشانگرها می‌توانند به عنوان یک ابزار قدرتمند در شناسایی، تفکیک ژنوتیپ‌های خرما و برنامه‌های اصلاحی خرما سودمند باشند و نشانگرهای (AG)8YC، (TC)8C و (GA)8C به عنوان نشانگرهای مناسب در بررسی تنوع ژنتیکی خرما می‌باشند.



شکل ۶. تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های مختلف خرما با استفاده از نشانگر ISSR بر اساس روش الگوبندی اتصال کامل.

Figure 6. Cluster analysis of different genotypes of date palm using ISSR marker based on complete linkage clustering method.

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید باهنر کرمان و ریاست محترم پژوهشکده فناوری تولیدات گیاهی

دانشگاه شهید باهنر کرمان به خاطر حمایت مالی و معنوی در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

منابع

- بهادر یاسر، محمدآبادی محمدرضا، خضری امین، اسدی مهدیه، مدحتی لیلا (۱۳۹۵) مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های زنبور عسل استان کرمان با استفاده از نشانگرهای ISSR. فصلنامه پژوهش‌های تولیدات دامی ۷، ۱۹۲-۱۸۶.
- عسکری ناهید، باقی زاده امین، محمدآبادی محمدرضا (۱۳۸۹) مطالعه تنوع ژنتیکی در چهار جمعیت بز کرکی راینی با استفاده از نشانگرهای ISSR. مجله ژنتیک نوین ۵، ۴۹-۵۶.
- عسکری ناهید، محمدآبادی محمدرضا، باقی زاده امین (۱۳۹۰) نشانگرهای ISSR برای ارزیابی چندشکلی DNA و خصوصیات ژنتیکی جمعیت‌های گاو، بز و گوسفند. مجله بیوتکنولوژی ایران ۹، ۲۲۹-۲۲۲.
- موسوی دراز محله سیده مهسا، زین العابدینی مهرشاد، مردی محسن و همکاران (۱۳۹۲) بررسی تنوع ژنتیکی و تجزیه ساختار جمعیت ژرمپلاسم انار شیرین ایران با استفاده از نشانگرهای SSR. مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۵، ۱۵۰-۱۳۷.

References

- Alalawi RA, Almashiqri JH, Alnadabi JSM et al. (2017) Date palm tree (*Phoenix dactylifera* L.): natural products and therapeutic options. *Front Plant Sci* 8, 845-857.
- Amini F, Saeidi G, Arzani A (2008) Study of genetic diversity in safflower genotypes using agromorphological traits and RAPD markers. *Euphytica* 163, 21-30.
- Askari N, Baghizadeh A, Mohammadabadi MR (2010) Study of genetic diversity in four populations of Raeini cashmere goat using ISSR markers. *Mod Genet J* 5, 49-56 (In Persian).
- Askari N, Mohammadabadi MR, Baghizadeh A (2011) ISSR markers for assessing DNA polymorphism and genetic characterization of cattle, goat and sheep populations. *Iran J Biotechnol* 9, 222-229 (In Persian).
- Bahador Y, Mohammadabadi MR, Khezri A et al. (2016) Study of genetic diversity in honey bee populations in kerman province using ISSR markers. *Res Anim Prod* 7, 186-192 (In Persian).
- Beal JM (1937) Cytological studies in the genus *Phoenix*. *Bot gaz* 99, 400-407.
- Bekheet SA, Taha HS, Hanafy MS, Solliman ME (2008) Morphogenesis of sexual embryos of date palm cultured in vitro and early identification of sex type. *J Appl Sci Res* 4, 345-352.
- Chao CT, Krueger RR (2007) The date palm (*Phoenix dactylifera* L.): overview of biology, uses and cultivation. *HortScience* 42, 1077-1082.
- Ditta A, Zhou Z, Cai X et al. (2018) Assessment of genetic diversity, population structure, and evolutionary relationship of uncharacterized genes in a novel germplasm collection of

- diploid and allotetraploid *Gossypium* accessions using EST and genomic SSR markers. *Int J Mol Sci* 19, 2401- 2422.
- Elshibli S, Korpelainen H (2008) Microsatellite markers reveals high genetic diversity in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) germplasm from Sudan. *Genet* 134, 251-260.
- Esposito MA, Gatti I, Cravero VP et al. (2013) Combining abilities and heterotic groups in *Pisum sativum* L. *Aust J Crop Sci* 7, 1634-1641.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. *J Mol Ecol* 14, 2611- 2620.
- Fang Y, Wu H, Zhang T et al. (2012) A complete sequence and transcriptomic analyses of date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) mitochondrial genome. *PLoS ONE* 8(3), e59997.
- Ghasemi M, Baghizadeh A, Mohammadabadi MR (2010) Determination of genetic polymorphism in Kerman Holstein and Jersey cattle population using ISSR markers. *Aust J Basic Appl Sci* 4, 5758–5760.
- Hamza H, Abederrahim M, Elbekkay M, Ferchichi A (2013) Comparison of the effectiveness of ISSR and SSR markers in determination of date palm agronomic traits. *AJCS* 7, 763- 769.
- Hassanzadeh Khankahdani H, Bagheri A (2019) Identification of genetic variation of male and female date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars using morphological and molecular markers. *Int J Hortic Sci* 6, 63-76.
- Jump AS, Hunt JM, Penuelas J (2006) Rapid climate change-related growth decline at the southern range edge of *Fagus sylvatica*. *Glob Change Biol* 12, 2163–2174.
- Laurentine H (2009) Data analysis for molecular characterization of plant genetic resources. *Genet Resour Crop Evol* 56, 277-292.
- Li Q, Liu QC, Zhai H et al. (2008) Genetic diversity in main parents of sweet potato in China as revealed by ISSR markers. *Acta Agron Sin* 34, 972-977.
- Mahasi MJL, Wachira FN, Pathak RS, Riungu TC (2009) Genetic polymorphism in exotic safflower (*Carthamus tinctorius* L.) using RAPD markers. *J Plant Breed Crop Sci* 1, 008-012.
- Mahjoob BH, Najafi-Zarini Hashemi SHR (2014) Assessment of genetic relationships among 36 Brassica genotypes using ISSR molecular markers. *J Crop Breed* 6, 96- 106.
- Mohammadabadi MR, Askari N (2012) Characterization of genetic structure using ISSR-PCR markers: cattle, goat and sheep populations. LAP LAMBERT Academic Publishing, Saarbrusken, Germany. 120pp.
- Mohammadabadi MR, Esfandyarpoor E, Mousapour A (2017) Using inter simple sequence repeat multi-loci markers for studying genetic diversity in Kermani sheep. *J res dev* 5, 154-158.

- Mohammadabadi MR, Oleshko V, Oleshko O et al. (2021) Using inter simple sequence repeat multi-loci markers for studying genetic diversity in guppy fish. Turkish J Fish Aquat Sci 21, 603-613.
- Mousavi Derazmahalleh SM, Zeinalabedini M, Mardi M et al. (2014) The survey of genetic diversity & population structure analysis of Iranian sweet pomegranate (*Punica granatum* L.) germplasm using SSR markers. J Agric Biotech 4, 139-150 (in Persian).
- Peakall R, Smouse P (2012) GenAIEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. J Bioinform 1, 6- 8.
- Powell W, Morgante M, Andre C et al. (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSRP (microsatellite) markers for germplasm analysis. Mol Breeding 2, 225- 238.
- Shannon CE (1948) The mathematical theory of communication. Bell Syst Tech 27, 379- 423.
- Wei YM, Hou YC, Yan ZH et al. (2005) Microsatellite DNA polymorphism divergence in Chinese wheat landraces highly resistant to Fusarium head blight. J Theor Appl Genet 46, 3-9.
- Weising K, Nybom H, Wolff K, Kahl G (2005) Applications of DNA fingerprinting in plant sciences. In 'DNA fingerprinting in plants. Principles, methods and applications'. Weising K, Nybom H, Pfenninger M, Wolff K, Kahl G (eds). pp. 235- 276.
- Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR (2015) Associations of inter-simple sequence repeat loci with predicted breeding values of body weight in sheep. Small Rumin Res 132, 123–127.
- Zhang YP, Uyemoto JK, Kirkpatrick BC (1998) A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytoplasmas for PCR assay. J Virol Methods 71, 45-50.