تنوع ژنتیکی ارقام نخل خرما در استان‌های سیستان و بلوچستان و هرمزگان با ریزماهواره

حسام الدین تقی‌نژاد[۱]، لیلا فهمیده[۱*]، داوود صمصام پور[۲] و مجید عسکری سیاهویی[۳]

[۱] زابل، دانشگاه زابل، دانشکده کشاورزی، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی

[۳] بندرعباس، دانشگاه هرمزگان، گروه باغبانی

[۴] بندر عباس، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان هرمزگان

تاریخ دریافت: ۹۶/۹/۲ تاریخ پذیرش: ۹۷/۴/۱۰

چکیده

با توجه به اهمیت اقتصادی خرما، در این پژوهش تنوع ژنتیکی ۱۴ رقم نر و ۲۶ رقم ماده نخل خرما با استفاده از آغازگر SSR مورد ارزیابی قرار گرفت. استخراج DNA به روش CTAB انجام شد و با استفاده از ۱۰ جفت آغازگر SSR تکثیر گردید. محصولات تکثیر شده با استفاده از ژل اکریل آمید ۸٪ و رنگ‌آمیزی با نیترات نقره مشاهده شدند. با استفاده از نرم افزار Gene Alex6.3 نتایج مربوط به تعداد آلل مشاهده شده، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و محتوای اطلاعات چند شکلی محاسبه شد. از روش تجزیه خوشه‌ای Nearest joining برای گروه‌بندی استفاده شد و فاصله ژنتیکی بین ارقام از طریق ضریب تشابه نی محاسبه گردید. نتایج نشان داد که محتوای اطلاعات چند شکلی از ۶۳٪ برای آغازگر HQ542225 تا ۸۵٪ برای آغازگر HQ542208 و با متوسط ۷۷٪ متغیر بود. تعداد آلل در هر جایگاه از ۶ تا ۹ متغیر و با میانگین ۷/۶ بدست آمد. از ۱۰ جفت آغازگر مورد استفاده در مجموع ۷۶ آلل شناسایی شد که آغازگرهای HQ542208 و HQ542224 با ۹ آلل بیشترین و آغازگرهای DP169 و HQ542225 با ۶ آلل کمترین تعداد آلل را نشان دادند. بیشترین تشابه ژنتیکی بین ارقام آلمهتری و خنیزی و کمترین میزان تشابه بین رقم ابونارنجا و سایر ارقام بود. با توجه به یافته‌های حاصل از این پژوهش، تصویر جامع‌تری از ساختار ژنتیکی ارقام نر و ماده نخل خرما بدست آمده است که استفاده از آن‌ها را برحسب مورد در برنامه بهنژادی ارقام نخل خرما ممکن می‌سازد.

واژه‌های کلیدی: ارقام نر و ماده، تنوع ژنتیکی، تجزیه خوشه‌ای، نخل خرما، آغازگر SSR.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۵۴۳۱۲۳۲۱۲۴ ، پست الکترونیکی: l.fahmideh@uoz.ac.ir

مقدمه

نخل خرما با نام علمی *Phoenix dactyliferal* گیاهی چند ساله و دو پایه است که در طول ادوار مختلف تاریخ بعنوان یک گیاه ارزشمند مطرح بوده و میوه آن بعنوان یک غذای مفید همواره مورد توجه انسان قرار گرفته است. در حال حاضر نیز نخل خرما یکی از محصولات باغی مهم و پر سود کشور ایران بشمار می‌آید. توزیع نخل خرما تابع فاکتورهای محیطی و اکوسیستم‌های متنوع موجود در اقلیم‌های کم آب در بسیاری از کشورهای جهان می‌باشد (۱۲). اولین قدم در اصلاح این گیاه شناسایی ارقام و دسته بندی آن‌ها است که روش‌های مولکولی امکان تفکیک ارقام را فراهم آورده‌اند. آغازگرهای مولکولی می‌توانند بعنوان ابزاری قوی برای تشخیص افراد از منابع اصلاحی مختلف که از نظر ژنتیکی با هم شباهت دارند، مورد استفاده قرار گیرند (۱۶). تنوع ژنتیکی با افزایش هتروزیگوسیتی باعث افزایش مقاومت گیاه به آفات و بیماری‌ها می‌شود و از فرسایش ژن‌های مفید جلوگیری می‌کند. آغازگرهای SSR ویژگی‌هایی مانند همبارزی را نشان داده‌اند. با این وجود این آغازگرها در نخل خرما کمتر مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

خالد المیر و همکاران (۲۰۱۱) از ۳۰ مارکر جدید ریز ماهواره جهت ارزیابی و تشخیص تنوع ژنتیکی ۱۱ ژنوتیب مختلف نخل خرما از نقاط مختلف قطر استفاده کردند.

نتایج بدست آمده از ۳۰ آغازگرنشان داد که ۷ آغازگر هیچ تکثیری را در PCR نداشتند و ۱۳ آغازگر الگوی باندی تک شکلی را نشان داده و ۱۰ آغازگر چند شکلی بالایی را نشان دادند. در مجموع ۷۷ آلل مشاهده شدند که بطور متوسط در هر لوکوس ۷/۷ آلل وجود داشت (۹). در پژوهشی، بررسی تنوع ژنتیکی۲۳ رقم نر و ۲۳ رقم ماده نخل خرما با استفاده از ۱۱ آغازگرهای ریزماهواره SSR در دانشگاه منابع طبیعی رامین خوزستان صورت گرفت. نتایج مشخص نمود که بیشترین تشابه ژنتیکی بین ارقام سعمران، برحی و کلون‌های حاصله از کشت بافت آنها و کمترین میزان تشابه بین ارقام دگل- نور و آلمهتری بدست آمد (۱۰).

احمد و همکاران (۲۰۰۹) از ۶۱ آغازگر ریزماهواره جهت بررسی تنوع ژنتیکی و نسبت‌های خویشاوندی ۱۵ رقم نخل خرمای قطر استفاده کردند و ارقامی را که از نظر ژنتیکی شبیه هم و آن‌هایی را که با هم فاصله زیادی داشتند، مشخص کردند (۳).

عرب نژاد و همکاران (۲۰۰۹) با استفاده از آغازگرهای جدید SSR غنی از تکرارهای AG و AGG بر اساس توالی DNA کلون شده از نخل خرما، ۲۵ جفت آغازگر طراحی کردند و تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌هایی که از مناطق مختلف جغرافیایی جمع‌آوری شده بودند را بررسی کردند که فقط ۲۲ آغازگر توانستند چند شکلی را در ۱۶ رقم نخل خرما نشان دهند (۵).

اصلاح نخل خرما بسیار مشکل است چرا که دارای چرخه زندگی طولانی بوده و میزان هتروزیگوسیتی آن در طبیعت بالاست. روش‌های اصلاح نخل خرما شامل وارد کردن ارقام جدید، انتخاب، تلاقی برگشتی و کشت بافت می-باشند. بعد از عملیات قرنطینه، می‌توان در صورت سازگاری با محیط، آنها را بطور مستقیم در محل اصلی کاشت و یا در برنامه‌های دورگ گیری مورد استفاده قرار داد. باید توجه داشت چون والد نر نیز در کمیت و کیفیت خرما موثر است، باید به وارد کردن والد نر مناسب هر رقم نیز اقدام شود. جهت معرفی و اصلاح گیاهان غیر مشهور ولی دارای توان ژنتیکی بالا، شرط اصلی وجود تنوع ژنتیکی در جمعیت پایه می باشد تا شانس انتخاب افزایش یافته و امکان پیدا کردن صفات مطلوب بیشتر گردد. با توجه به کشت ارقام محدود و تجاری خرما بصورت گسترده توسط کشاورزان در سال‌های اخیر سایر ارقام با وجود داشتن صفات خوب که می‌توانند در اصلاح نباتات از آنها استفاده شوند به فراموشی سپرده شده‌اند و از طرفی با توجه به اینکه تکثیر درخت خرما بصورت غیر جنسی و از طریق پاجوش انجام می‌گیرد و این امر خود خطر از بین رفتن ارقام فراموش شده را افزایش می‌دهد. لذا لزوم بررسی ژنتیکی ارقام مختلف خرمای کشور و استفاده از صفات خوب آنها ضروری بنظر می‌رسد.

تنوع و انتخاب دو رکن اصلی هر برنامه اصلاحی بوده و انجام انتخاب منوط به وجود تنوع مطلوب است. براساس پژوهش‌های گذشته گزارش شد که آغازگرهای ریزماهواره قادر هستند چند شکل بالایی را بین ارقام خرما نشان دهند و از این رو ابزار مفید برای انگشت نگاری ارقام و دسته‌بندی آنها در گروه مختلف به‌شمار می‌روند، همچنین می‌توانند برای مدیریت ذخایر توارثی از طریق شناسایی نمونه‌های تکرار و هم‌نام هم مورد استفاده قرار بگیرند. لذا هدف از انجام این تحقیق، بررسی تنوع موجود در ارقام نر و ماده نخل خرمای استان‌های سیستان و بلوچستان و هرمزگان با استفاده از آغازگر SSR بود تا بتوان از طریق تعیین فاصله ژنتیکی ارقام، والدین مناسب را جهت انجام تلاقی‌های آتی انتخاب و به اصلاح این گیاه ارزشمند و مهم کمک نمود.

مواد و روشها

تهیه مواد گیاهی: مواد گیاهی مورد استفاده شامل برگ-های جوان ۱۴ رقم نخل خرمای نر و ۲۶ رقم نخل خرمای ماده بود که نام و مشخصات آن در جدول های ۱ و ۲ آورده شده است.

جدول ۱- نام ارقام نر نخل خرما

نام ارقام (Cultivars name)	محل انتخاب (Location name)	نام ارقام (Cultivars name)	محل انتخاب (Location name)
1. جرویس Jervis	میناب (هرمزگان) (Hormozgan) Minab	8. محلی Mahalli	حاجی‌آباد (هرمزگان) (Hormozgan) Hajiabad
2. نردوم Naredowom	فین (هرمزگان) (Hormozgan) Fin	9. 2006	میناب(هرمزگان) (Hormozgan) Minab
3. 2005	میناب(هرمزگان) (Hormozgan) Minab	10. 2008	میناب(هرمزگان) (Hormozgan) Minab
4. 2003	میناب(هرمزگان) (Hormozgan) Minab	11. 2009	میناب (هرمزگان) (Hormozgan) Minab
5. فرد Fard	میناب(هرمزگان) (Hormozgan) Minab	12. 2007	میناب(هرمزگان) (Hormozgan) Minab
6. 2002	میناب(هرمزگان) (Hormozgan) Minab	13. فنوج Fanooj	ایرانشهر(سیتان و بلو چستان) (Sistan and Baluchistan) Iranshahr
7. 2004	میناب(هرمزگان) (Hormozgan) Minab	14. مسکوتان Maskootan	ایرانشهر (سیتان و بلو چستان) (Sistan and Baluchistan) Iranshahr

استخراج **DNA** : استخراج DNA از برگ‌های جوان نخل خرما به روش CTAB سمبروک (۱۹۹۸) با اندکی تغییرات انجام شد (۲۰) و DNA حاصل با استفاده از ۱۱ جفت آغازگر SSR تکثیر گردید. نمونه‌های برگی (از هر درخت به‌طور تصادفی ۳ نمونه برگ تازه و جوان توسط تیغ استریل بریده شد و سپس نمونه‌ها در کیسه نایلونی بسته-بندی و بر روی یخ خشک نگهداری شدند و به آزمایشگاه مولکولی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی بندرعباس منتقل شد) ارقام انتخابی نخل خرما از ایستگاه تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی شهرستان میناب و حاجی آباد و روستای فین از توابع شهرستان بندرعباس در استان هرمزگان و مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی شهرستان ایرانشهر واقع در استان سیستان و بلوچستان تهیه شدند. سپس نمونه‌ها در کیسه نایلونی بسته‌بندی و بر روی یخ خشک نگهداری شدند و به آزمایشگاه مولکولی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی بندرعباس منتقل شد. برگ‌ها با استفاده از ازت مایع پودر شدند و حدود ۰/۳ گرم از برگ‌های پودر شده به میکروتیوپ ۲ میلی‌لیتری منتقل شدند.

PCR و الکتروفورز محصولات **PCR** : واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه ترموسایکلر توسط ۱۰ آغازگر SSR (جدول۳) انجام شد. چرخه دمایی مورد نیاز جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نیز در جدول ۴ آورده شده است. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توسط دستگاه الکتروفورز عمودی ساخت شرکت APELEX و با استفاده از ژل آکریل آمید ۸٪ در مدت زمان ۳ ساعت و توان ۲۰۰ وات، بصورت باندهایی تفکیک شدند.

رنگ آمیزی باندها: رنگ آمیزی باندها توسط نیترات نقره به روش باسام و همکاران (۱۹۹۳) انجام شد. پس از رنگ آمیزی، اندازه‌گیری طول باندها بر اساس خط‌کش مولکولی روی ژل آکریل آمید ۸٪، انجام شد (۶).

تجزیه و تحلیل‌های آماری: برای تجزیه داده‌ها بایستی ماتریس تشابه بین ارقام را تشکیل داد. با استفاده از نرم افزار Gene Alex6.3 نتایج مربوط به تعداد آلل مشاهده شده و هتروزیگوسیتی مشاهده شده و محتوای اطلاعات چند شکلی محاسبه شد.

جدول۲- نام ارقام ماده نخل خرما

Table 2- Name of female cultivars date palm

نام ارقام (Cultivars name)	محل انتخاب (Location name)	نام ارقام (Cultivars name)	محل انتخاب (Location collection)
1.کبکاب Kabkab	حاجی‌آباد (هرمزگان) (Hormozgan) Hajiabad	14.نلسون Nalason	فین (هرمزگان) (Hormozgan) Fin
2.خاصویی Khasooi	حاجی‌آباد (هرمزگان) (Hormozgan) Hajiabad	15.بگشی Bagashi	فین (هرمزگان) (Hormozgan)Fin
3.برهی Berhi	میناب (هرمزگان) (Hormozgan) Minab	16.ابومعان Aboomaan	ایرانشهر (سیتان و بلو چستان) (Sistan and Baluchistan) Iranshahr
4.هلیلی Halili	فین (هرمزگان) (Hormozgan) Fin	17.کوش‌زباد Koshzebad	ایرانشهر (سیتان و بلو چستان) (Sistan and Baluchistan) Iranshahr
5.مجول Majool	میناب (هرمزگان) (Hormozgan) Minab	18.گرم‌بیت Gerambit	ایرانشهر (سیتان و بلو چستان) (Sistan and Baluchistan) Iranshahr
6.توری Toori	حاجی‌آباد (هرمزگان) (Hormozgan) Hajiabad	19.نباتسیف Nabatsif	ایرانشهر (سیتان و بلو چستان) (Sistan and Baluchistan) Iranshahr
7.پیارم Pyarom	حاجی‌آباد (هرمزگان) (Hormozgan) Hajiabad	20.خلوزرد Yellow Kholoo	فین (هرمزگان) (Hormozgan) Fin
8.خنیزی Khanizi	میناب (هرمزگان) (Hormozgan) Minab	21.ابونارنجا Abonarenja	ایرانشهر (سیتان و بلو چستان) (Sistan and Baluchistan) Iranshahr
9.آلمهتری Almehtari	میناب (هرمزگان) (Hormozgan) Minab	22.گچخواه GachKhah	ایرانشهر (سیتان و بلو چستان) (Sistan and Baluchistan) Iranshahr
10.زاهدی Zahedi	فین (هرمزگان) (Hormozgan) Fin	23.مرداسنگ Mordaseng	میناب (هرمزگان) (Hormozgan) Minab
11.دیری Deyri	حاجی‌آباد (هرمزگان) (Hormozgan) Hajiabad	24.ربی Rabbi	ایرانشهر (سیتان و بلو چستان) (Sistan and Baluchistan) Iranshahr
12.شاهانی Shahani	حاجی‌آباد (هرمزگان) (Hormozgan) Hajiabad	25.فرد Fard	ایرانشهر (سیتان و بلو چستان) (Sistan and Baluchistan) Iranshahr
13.کلگلی Kalgeli	ایرانشهر (سیتان و بلو چستان) Sistan and) Iranshahr (Baluchistan	26.رعناطلا Ranatala	ایرانشهر (سیتان و بلو چستان) (Sistan and Baluchistan) Iranshahr

برای تعیین کارآیی و مقایسه نشانگرها در تفکیک ژنوتیپ-های مورد مطالعه، از معیار میزان اطلاعات چند شکلی (PIC) استفاده شد (۸). میزان اطلاعات چند شکلی از رابطه $\Sigma in\text{-}1\Sigma jnPIC= 1 -\Sigma pin\ pi^2 -۲pj^2pi^2$ بدست می‌آید (i=1 و j=1+1) و pi فراوانی الل i ام و pj فراوانی الل i+1 است. احتمال شناسایی ازرابطه $\Sigma pi^4-\Sigma\Sigma(2pipj)^۲$ بدست آمد (i=1 و j=1+1) و pi فراوانی الل i ام و pj فراوانی الل i+1 است (۸، ۱۴). در نهایت با استفاده از نرم‌افزار DARVIN5.0 و به روش Neighbor joining تجزیه خوشه‌ای ارقام انجام شد.

جدول ۳- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در تحقیق

نام آغازگر	کد بانک ژن	توالی تکراری	توالی آغازگرها	دمای اتصال °C	منبع آغازگر
HQ542208	PDAG1006	(CT)22	F: GCCACAGGAAGCACATTTAG R:CCACACCTTAATCACAAACTCC	51	Arabnezhad et al.2011
HQ542205	PDAG1002	(AGGG)4	F: GGACATAGTTTTGGCTGGCTAC R: ACCAGTTTACCACTTGCTCCA	54	Arabnezhad et al.2011
HQ542207	PDAG1005	(AG)10	F: GTATGTTCCATGCCGTTCTAC R: AGCCACATCACTTGGTTCA	51	Arabnezhad et al.2011
HQ542224	PDAAG1023	(AAG)10	F: AGACGCTCACCTTGGAACTT R: ACCCCGCTCATGAATTAGG	54	Arabnezhad et al.2011
HQ542225	PDAAG1025	(AAG)15-A6-(AAG)3	F: CTTCTCCACTGGCATCTTCC R: CACCCGTTGGGCATCTTA	53	Arabnezhad etal.2011
DP169	-	(AAT)12	F:GCATGGACTTAATGCTGGGTA R: GGTTTTCCTGCCAACAACAT	54	Elmeer et al.2011
DP172	-	(AGG)11	F: GGTGTTTGGGCCTATTTCCT R: GTCCTCCTCCTCCTCTGTCC	56	Elmeer et al.2011
PDCAT8	EF015866	(TC)16	F: GCTTAAGTGGTTAGTTGCCAA R: GTTTGGCAGAAGTATTGAAA AGTTGA	58	Akkak et al. 2009
PDCAT14	EF015872	(TC)19(TC)16	F:TGCTGCAAATCTAGGTCACGA R: TTTACCCCTCGGCCAAATGTAA	57	Akkak et al. 2009
mPdCIR044	AJ571679	$(GA)_{19}$	F: ATGCGGACTACACTATTCTAC R: GGTGATTGACTTTCTTTGAG	47	BiIlotte et al.2004

جدول ۴- چرخه‌های دمایی واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)

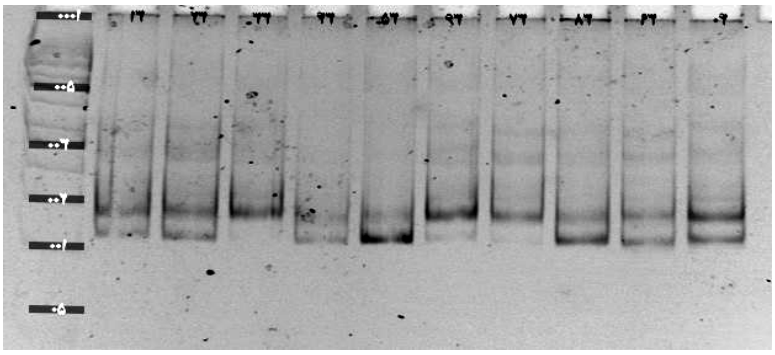
Table 4- temperature cycles polymerase chain reaction

دما (Temperature)	زمان (Time)	مراحل (Steps)	تعداد دور (The number of rounds)
95	4 دقیقه	واسرشت اولیه	1
95	30 ثانیه	واسرشت سازی	35
دمای هر آغازگر	30 ثانیه	اتصال	
72	30 ثانیه	بسط	
72	10 دقیقه	بسط نهایی	1
4	10 دقیقه	نگهداری در ترموسایکلر	1

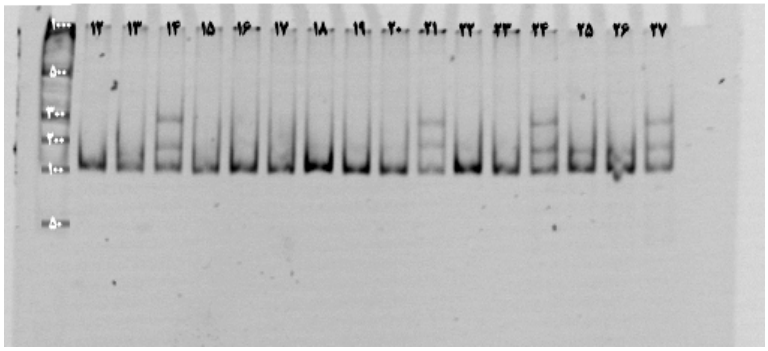
نتایج و بحث

پس از نمره‌دهی باندها بر اساس طول باندها روی ژل آکریل آمید ۸٪، وجود چند شکلی و تشابه ژنتیکی در تمامی ارقام مورد اندازه‌گیری و بررسی قرار گرفت و از ۱۰ جفت آغازگر مورد استفاده در مجموع ۷۶ آلل شناسایی شد که آغازگرهای HQ542208 و HQ542224 با ۹ آلل بیشترین (شکل ۱) و آغازگرهای DP169 و HQ542225 با ۶ آلل کمترین تعداد آلل را نشان دادند (شکل ۲). میانگین

تعداد آلل در کل جایگاه‌ها برابر ۷/۶ بود که از تعداد آلل مورد مطالعه توسط اکاک و همکاران (۲۰۰۹) با متوسط ۶/۴۱۲ بیشتر بود (۴) ولی از تعداد آلل مشاهده شده در مطالعه بایلوت و همکاران با متوسط ۱۱/۰۲۵ آلل کمتر بود (۷).



شکل ۱- الگوی باندی تولید شده توسط آغازگر HQ542208



شکل ۲- الگوی باندی تولید شده توسط آغازگر DP169

محتوای اطلاعات چند شکلی با متوسط ۷۷٪، از ۶۳٪ برای آغازگر HQ542225 تا ۸۵٪ برای HQ542208 در نوسان بود (جدول ۵). در مورد محتوای اطلاعات چند شکلی، نتایج این تحقیق بطور متوسط از دامنه محتوای اطلاعات چند شکلی ۱۵٪ تا ۸۳٪ تحقیق اکاک و همکاران (۲۰۰۹) برتر بود (۴). این برتری را شاید بتوان مربوط به وجود ارقام نر در این تحقیق دانست زیرا در تحقیقات قبل فقط ارقام ماده وجود داشته است و یا اینکه تعداد ارقام نر خیلی کمتر از ارقام ماده مورد مطالعه در این تحقیق، بوده است. از نتایج بالا می‌توان استنباط نمود که محتوای اطلاعات چند شکلی نمی‌تواند عدد ثابتی باشد و به عواملی مثل تعداد آغازگرها، تعداد آلل تولیدی توسط هر جایگاه، تعداد و نوع ارقام مورد استفاده در تحقیق بستگی دارد. میزان هتروزیگوسیتی ارقام ماده از ۴۰٪ در رقم پیارم تا ۹۰٪ در رقم ربی متغیر بوده است (جدول ۶) و میزان هتروزیگوسیتی ارقام نر از ۴۰٪ در رقم ۲۰۰۸ تا ۱۰۰٪ در رقم جرویس متغیر بوده است (جدول ۷).

جهت انجام تجزیه خوشه‌ای ارقام نر و ماده نخل خرما از روش Neighbor joining و برای تشکیل ماتریس تشابه، از ضریب تشابه نی (۱۹۷۳) استفاده شد (۱۳، ۱۷). مقدار تشابه ژنتیکی ارقام ماده بین صفر تا ۸۵٪ متغیر بود که بیشترین تشابه ژنتیکی ارقام ماده بین دو رقم خنیزی و آلمهتری استان هرمزگان (۸۵٪) و کمترین تشابه ژنتیکی بین رقم ابونارنجای استان سیستان و بلوچستان و سایر ارقام صفر بود. تشابه ژنتیکی ارقام نر بین صفر تا ۴۷٪ برآورد شد که حداکثر تشابه ژنتیکی ارقام نر بین دو رقم ۲۰۰۹ و ۲۰۰۷ استان هرمزگان (۴۷٪) و کمترین تشابه ژنتیکی ارقام نر بین دو رقم جرویس و نر دوم استان هرمزگان (۲۵٪) بود.

جدول ۵- شاخص آغازگرهای مورد مطالعه در تحقیق

آغازگر (primer)	تعداد آلل (The number of alleles)	هتروزیگوسیتی (Heterozygosity)	اطلاعات چندشکلی (Polymorphism information)
DP172	8	629%	781%
HQ542205	8	759%	829%
PDCAT14	7	933%	756%
PDCAT8	7	933%	824%
HQ542225	6	838%	633%
DP169	6	838%	738%
HQ542208	9	890%	854%
HQ542207	8	672%	834%
HQ542224	9	975%	828%
mPdCIR044	7	411%	753%
میانگین	7/6	774%	787%

جدول ۶- میزان هتروزیگوسیتی ارقام ماده

نام ارقام (Cultivars name)	هتروزیگوسیتی (Heterozygosity)	نام ارقام (Cultivars name)	هتروزیگوسیتی (Heterozygosity)
توری (Toori)	60%	ربی(Rabbi)	90%
هلیلی (Halili)	60%	برحی (Berhi)	80%
خنیزی (Khanizi)	60%	کبکاب (Kabkab)	80%
دیری (Deyri)	60%	خاصویی (Khasooi)	80%
شاهانی (Shahani)	60%	مجول (Majool)	80%
کلگلی (Kalgely)	60%	بگشی (Bagashi)	80%
ابومعان (Aboomaan)	60%	خلوزرد (Yellow kholoo)	80%
آلمهتری (Almehtary)	50%	مرداسنگ (Mordaseng)	80%
زاهدی (Zahedi)	50%	نباتسیف (Nabatsif)	70%
نلسون (Nalason)	50%	ابونارنجا (Abonarenja)	70%
گرمبیت (Gerambit)	50%	گچخواه (Gachkhah)	70%
کوش‌زباد (Kooshzebad)	50%	فرد (Fard)	70%
پیارم (Pyarom)	40%	رعناطلا (Ranatala)	70%

جدول ۷- میزان هتروزیگوسیتی ارقام نر

Table 7- The male cultivars of heterozygosity

نام ارقام (Cultivars name)	هتروزیگوسیتی (Heterozygosity)	نام ارقام (Cultivars name)	هتروزیگوسیتی (Heterozygosity)
2006	60%	جرویس	100%
2007	60%	مسکوتان	90%
2002	50%	نر دوم	70%
محلی	50%	2003	70%
فنوج	80%	فرد	70%
2005	40%	2004	70%
2008	40%	2009	70%

بر اساس تجزیه خوشه‌ای ارقام ماده (محل برش در فاصله ۰ تا ۰/۱) در ۳ گروه قرار گرفتند. خوشه گروه اول ارقام ماده از بالا به پایین شامل ارقام آلمهتری، خنیزی، پیارم، خلوزرد، مجول، ابونارنجا، شاهانی، دیری، رعنا طلا، بگشی، کلگلی و نلسون می‌باشد که ارقام ابونارنجا، رعناطلا و کلگلی مربوط به استان سیستان و بلوچستان می‌باشند. گروه دوم از ارقام ماده شامل گچخواه، کبکاب، برحی، خاصویی، ربی، مرداسنگ، قصب (زاهدی) و هلیلی می‌باشد که دو رقم گچخواه و ربی مربوط به استان سیستان و بلوچستان می‌باشند. گروه سوم از ارقام ماده شامل ارقام گرم‌بیت، ابومعان، کوش زباد، فرد ماده، نباتسیف و توری می‌باشد که رقم توری مربوط به استان هرمزگان می‌باشد (شکل ۳).

ارقام نر نیز بر اساس دندوگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای، در ۳ گروه قرار گرفتند. گروه اول ارقام نر از بالا به پایین شامل ارقام نر دوم، جرویس، مسکوتان، فنوج، نر ۲۰۰۲ و نر ۲۰۰۵ می‌باشد. دو رقم مسکوتان و فنوج از گروه اول ارقام نر، مربوط به استان سیستان و بلوچستان می‌باشند (ارقام دارای هتروزیگوسیتی بالا شامل جرویس، مسکوتان و فنوج در گروه اول قرار گرفته‌اند). گروه دوم ارقام نر از بالا به پایین شامل ارقام نر محلی، نر ۲۰۰۴، نر ۲۰۰۶، نر فرد و نر ۲۰۰۳ می‌باشد گروه سوم از بالا به پایین به دو زیر گروه تقسیم شده است که در زیر گروه یک دو رقم ۲۰۰۷ و ۲۰۰۹ قراردارند و در زیر گروه دوم از گروه سوم رقم ۲۰۰۸ قرار دارد که تمامی ارقام این گروه مربوط به استان هرمزگان می‌باشند (شکل ۴).

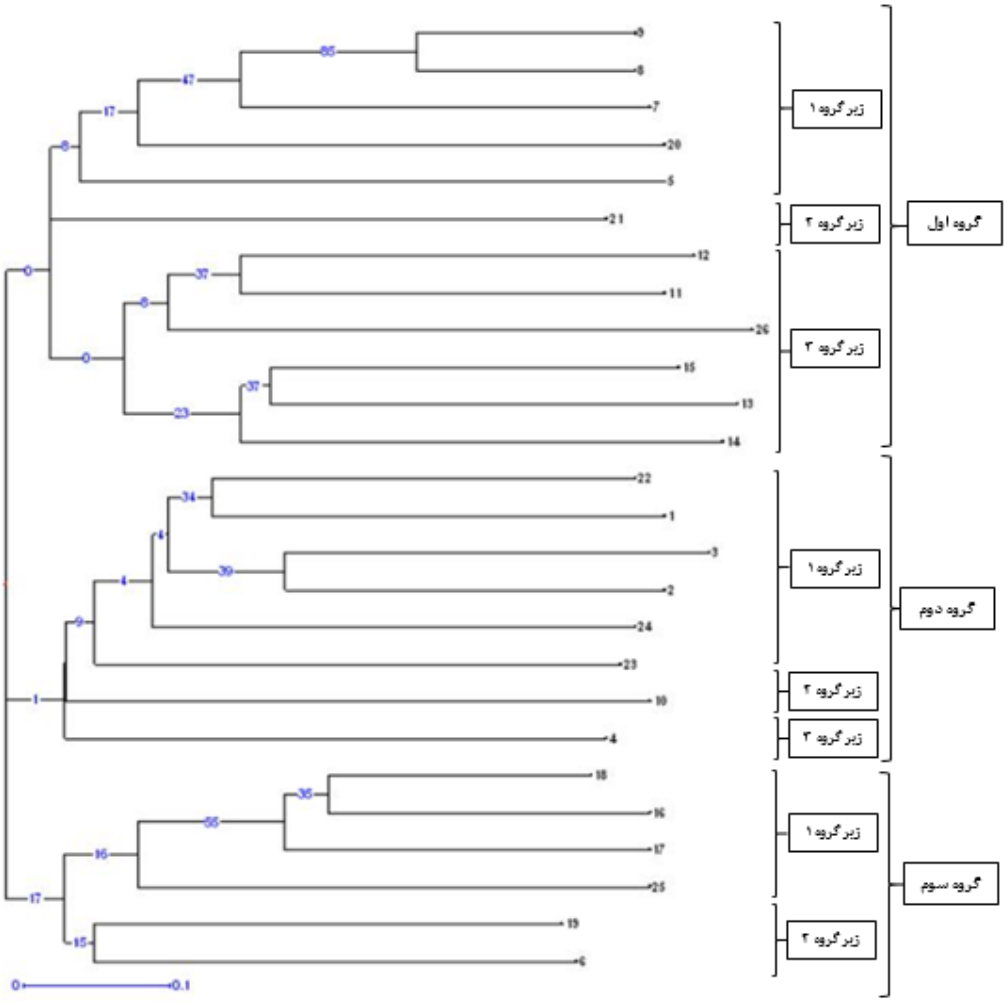
برای داشتن دیدگاه بهتر راجع به تشابه ژنتیکی ارقام، تجزیه به مختصات اصلی نیز مکمل روش تجزیه خوشه‌ای انجام شد که گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای را در بر گرفت که این مساله نشان دهنده قطع نمودار تجزیه خوشه‌ای از محل مناسب می‌باشد (شکل ۵).

نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای ارقام نر و ماده را از راست به چپ به ۳ گروه تقسیم کرد. گروه اول شامل دو رقم (شماره ۱۱ و ۱۲) نر ۲۰۰۲ و توری می‌باشد که هر دو رقم مربوط به استان هرمزگان می‌باشند. گروه دوم به دو زیر گروه و هر زیر گروه به دو شاخه و هر شاخه به دو زیر شاخه تقسیم شده است که در شاخه یک ارقام (شماره ۸، ۱۰، ۹، ۲۴، ۳۸، ۲۲، ۲۱، ۲۳، ۱۸، ۱۶ و ۱۷) مجول، فردنر، نر۲۰۰۳، نر ۲۰۰۶، فردماده، نلسون، کلگلی، بگشی، نر محلی، نر ۲۰۰۴، قصب (زاهدی) و در شاخه دوم ارقام (شماره ۳۲، ۶، ۷، ۳، ۲، ۳۶، ۱، ۲۵، ۳۵، ۳۷، ۴ و ۵) نبات-سیف، هلیلی، نر ۲۰۰۵، نر دوم، نر جرویس، مرداسنگ، کبکاب، نر ۲۰۰۸، گچخواه، ربی، خاصویی و برحی قرار دارند. گروه سوم شامل دو زیر گروه است که در زیر گروه یک فقط رقم ابونارنجای سیستان و بلوچستان به تنهایی قرار دارد و زیر گروه دوم به دو شاخه و هر شاخه به دو زیر شاخه تقسیم شده است که در زیر شاخه یک ارقام (شماره ۱۹، ۲۰، ۳۹، ۴۰، ۳۳، ۱۳، ۱۴ و ۱۵) دیری، شاهانی، نرمسکوتان، رعناطلا، خلوزرد، پیارم، خنیزی و آلمهتری و در زیر شاخه دوم ارقام (شماره ۳۱، ۲۶، ۳۰، ۲۹، ۲۷ و ۲۸) نر فنوج، نر ۲۰۰۹، گرم‌بیت، کوش‌زباد، نر ۲۰۰۷ و ابومعان قرار گرفته‌اند (شکل ۶). گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای این تحقیق تا حد زیادی با شرایط اقلیمی محل کشت ارقام نر و ماده دو استان سیستان و بلوچستان و هرمزگان مطابقت دارد و بخوبی نشان می-دهد که نشانگرهای SSR حتی اگر تعدادشان هم کم باشند مشابهت و اختلاف‌های ارقام نخل خرما را نشان دادند. در مجموع با توجه به یافته‌های حاصل از این تحقیق تصویر جامع‌تری از ساختار ژنتیکی ارقام نر و ماده نخل خرما بدست آمده است که استفاده از آن‌ها را برحسب مورد در برنامه بهنژادی ارقام نخل خرما ممکن می‌سازد.

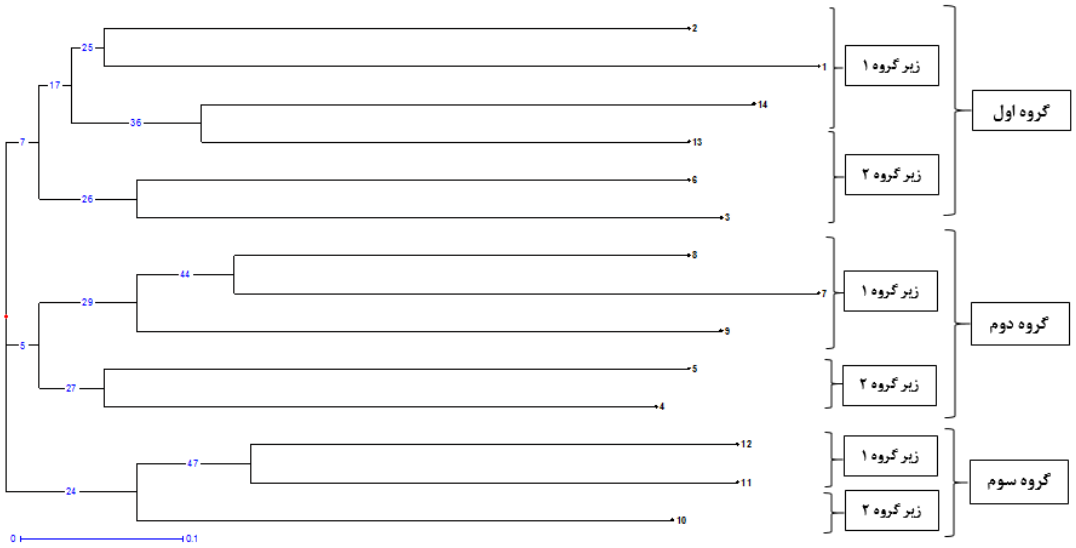
آغازگرهای SSR قابلیت بیان چند شکلی بین ارقام مختلف نخل خرما را دارند. میانگین تعداد آلل در کل جایگاه‌ها برابر ۷/۶ بود که از تعداد آلل مورد مطالعه توسط اکاک و همکاران (۲۰۰۹) با متوسط ۶/۴۱۲ بیشتر بود (۴) ولی از تعداد آلل مشاهده شده در مطالعه بایلوت و همکاران

(۲۰۰۴) با متوسط ۱۱/۰۲۵ آلل کمتر بود (۷). نتایج پژوهش بررسی تنوع ژنتیکی ارقام نخل خرمای کشور عربستان با استفاده ضریب تشابه نی مشخص نمود که بیشترین تشابه بین دو رقم شکری و خنیزی و کمترین تشابه بین ارقام برحی با هر یک از ارقام خصاب، شاهیل، خنیزی و شکری بود (۹). نژاد حبیب (۲۰۱۳) با استفاده از ۱۱ آغازگرهای ریزماهواره ۴۶ رقم نر و ماده نخل خرما را در دانشگاه منابع طبیعی رامین خوزستان مورد ارزیابی قرار دادند. براساس دندروگرام، ۴۶ رقم مورد مطالعه در ۴ گروه قرار گرفتند که بررسی آنها نشان‌دهنده وجود تنوع زیاد بین ارقام مورد آزمایش بود. به طوری که ارقام بر اساس یک پراکنش جغرافیایی و بازار پسندی در گروه مختلف قرار گرفتند. که تأییدکننده کارایی بالایی این نشانگر در دسته‌بندی گونه‌های مختلف می‌باشد (۱۰).

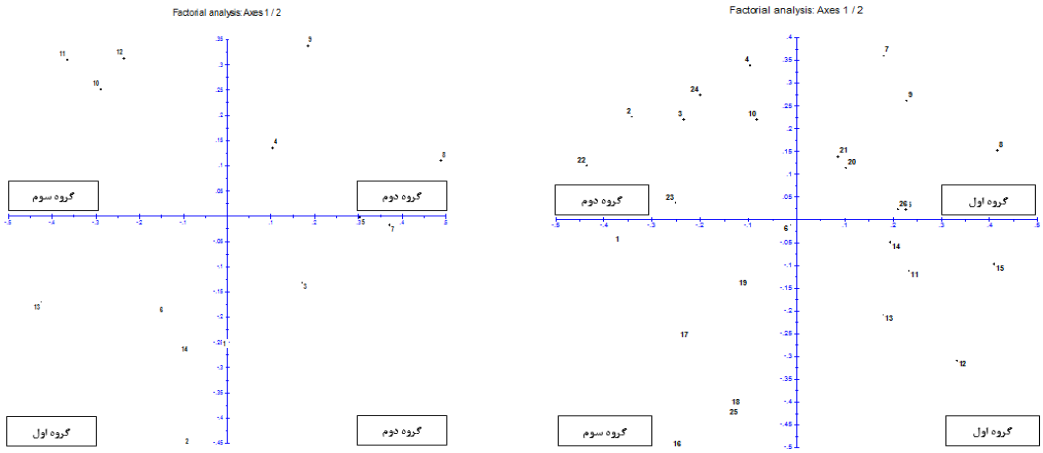
در تحقیقی با طراحی ۱۶ پرایمر چندشکلی در سراسر ژنوم مختلف نخل خرما از کشورهای (آمریکا، عراق، عمان، الجزایر، تونس، سودان، عربستان سعودی و مراکش) نشان داده شد و میزان چند شکلی در حدود ۷۶ درصد و تعداد آلل در هر لوکوس حدود ۱۴ برآورد گردید. تاکور و همکارن (۲۰۱۶) تنوع ژنتیکی را در ۴۰ رقم نخل خرما بررسی کرده و قرابت آنها را با ۱۴ گونه دیگر نخل تعیین کردند و مشاهده کردند که در برخی از این گونه‌ها، دارای خویشاوندی نزدیک و در برخی از آنها دارای خویشاوندی‌های دور می‌باشند (۷ ، ۲۲).



شکل ۳- تجزیه خوشه‌ای ارقام ماده رسم شده براساس روش Neighbor joining و ضریب تشابه نی



شکل۴- تجزیه خوشه‌ای ارقام نر رسم شده بر اساس روش Neighbor joining و ضریب تشابه نی

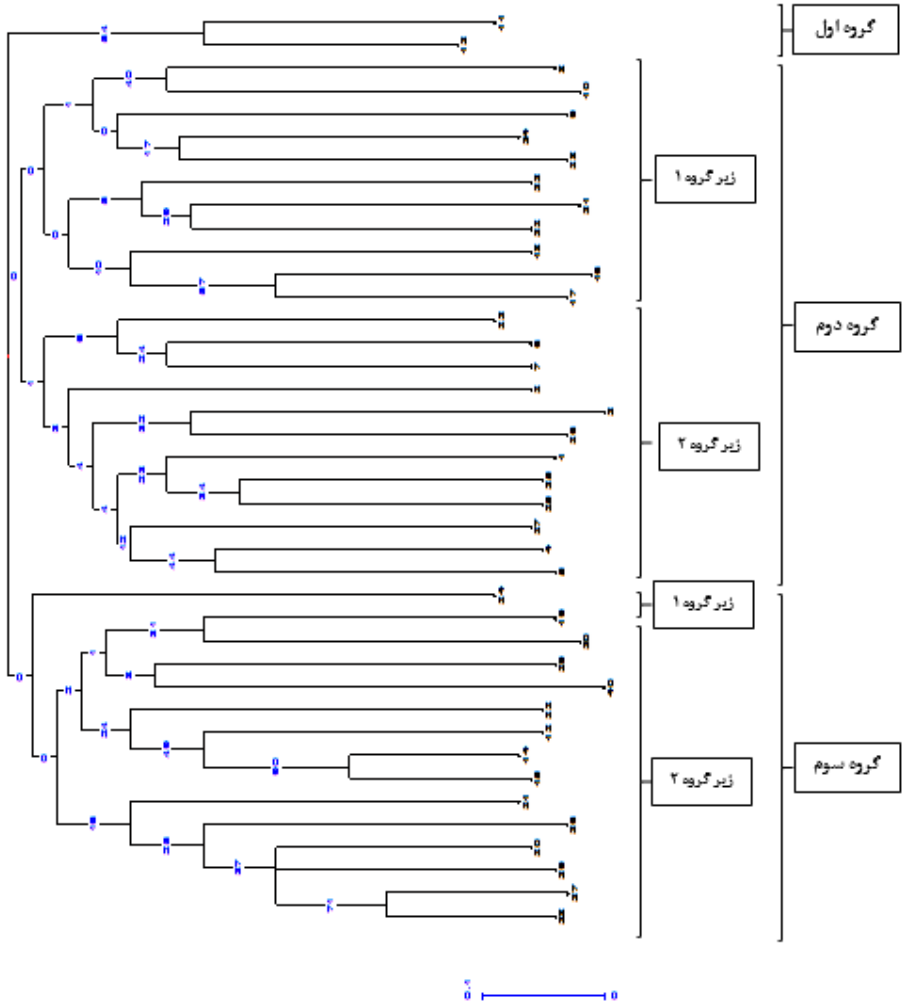


شکل ۵- نمودار تجزیه به مختصات اصلی ارقام نر (سمت راست) و ماده (سمت چپ) نخل خرما

جانی‌پور و همکاران (۲۰۱۸) با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR جمعیت‌های مختلف گیاه دارویی زیره سبز را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج مشخص نمود که زیره سبز سبزوار بعنوان مرکز تنوع این گیاه بر اساس جمعیت‌های مورد بررسی پیشنهاد و دورترین جمعیت‌ها جهت تلاقی های احتمالی و ایجاد تنوع جدید و مفیدتر زیره سبز سبزوار و زیره سبز کاشان معرفی می‌شوند (۲).

در پژوهشی بررسی تنوع ژنتیکی ۱۵ رقم از ارقام نخل خرمای کشور قطر با استفاده از ضریب تشابه جاکارد مورد مطالعه قرار گردید نتایج مشخص نمود که میزان تشابه بین صفر تا ۱٪ بود و بیشترین تشابه بین ارقام شیشه‌ای و قصب (زاهدی)، حتمی و ابومعان، هلیلی و شیشه‌ای مشاهده شده است (۳). همچنین گزارش شده است که از آغازگرهای ریزماهواره جهت تجزیه تنوع ژنتیکی و نسبت-های خویشاوندی در میان ۱۵ رقم نخل خرمای قطر استفاده شد، ضریب خویشاوندی در میان ۱۵ رقم نخل خرما محاسبه و بر اساس آنها دندروگرام ترسیم گردید که نتایج نشان داد که این مار کر توانست ارقامی را که از نظر ژنتیکی شبیه هم و آنهایی را که با هم فاصله زیادی دارند را مشخص کند (۳ و ۱۹). در پژوهشی، نتایج نشان داد که

با استفاده از آغازگرهای جدید SSR غنی از تکرارهای AG و AGG بر اساس توالی DNA کلون شده از نخل خرما ۲۵ جفت پرایمر طراحی کردند و تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ-هایی که از مناطق مختلف جغرافیایی (ایران، عراق و آفریقا) جمع‌آوری شده بودند را بررسی کردند که فقط ۲۲ پرایمر توانستند چند شکلی را در ۱۶ رقم نخل خرما نشان دهند. آغازگرهای SSR انتخاب شده بطور کلی ۱۶ آلل، با میانگین ۴/۸ آلل در هر لوکوس را نشان دادند (۵، ۱۱).



شکل ۶. تجزیه خوشه‌ای ارقام نر و ماده رسم شده بر اساس روش Neighbor joining و ضریب تشابه نی

در پژوهشی از آغازگرهای SSR با استفاده از روش Fiasco با کمی تغییر شروع به طراحی پرایمرهای جدید در نخل خرما کردند و توانستند ۹ پرایمر جدید که تعداد آلل‌های آن در هر لوکوس ۲ تا ۴ و بطور میانگین ۲/۵ آلل در هر لوکوس می باشد را طراحی کنند که قادر بود تا حدود ۶۹ درصد چند شکلی را در نخل خرما نشان دهد. میانگین هتروزیگوستی مشاهده شده بین ۱ تا ۱۱ درصد و مورد انتظار ۱۰ تا ۷۴ درصد بود (۱۵، ۲۳). در پژوهشی ۴۱ توالی تکراری از دو ریزماهواره در کتابخانه ژنی نخل خرما مورد مطالعه قرار گرفتند که به این نتیجه دست یافتند که در مجموع ۳۱ رقم نخل خرما که از الجزایر و کالیفرنیا جمع‌آوری شده بود که همگی سطح بالایی از چند شکلی را نشان دادند (۴ ، ۱۸).

در پژوهشی از نشانگر مولکولی ISSR برای بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های علف باغ *Dactylis glumerata* استفاده نمودند. آغازگرهای ISSR در مجموع توانستند ۹۰ مکان را

تکثیر کنند که از این تعداد ۶۷ باند چند شکل مشاهده شد. آغازگر IS5 بیشترین تعداد باند (۱۲) و آغازگرهایIS7، IS12، IS10 و IS15 کمترین تعداد باند (۵) را داشتند. میانگین درصد چند شکلی و محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC)بترتیب برابر ۷۵/۴۵٪ و ۰/۳۳ بود. آغازگرهایIS10 و IS9 بیشترین میزان محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) را داشتند. تجزیه خوشه‌ای برای اکوتیپ‌ها بر اساس ضریب تشابه دایس صورت گرفت که اکوتیپ‌های مورد بررسی در ۴ گروه قرار گرفتند که تنوع ژنتیکی با تنوع جغرافیایی تطابق نداشت. همچنین این نتایج تا حدودی با تجزیه به مختصات اصلی (PCo) مطابقت داشت (۱).

در مطالعه‌ی از آغازگرهای ریزماهواره جهت غربالگری و تجزیه تنوع ژنتیکی موجود در ژنوتیپ‌های محلی نخل خرما حاصل شده از جنین‌های سوماتیک در عمان استفاده نمودند و با ۱۰ آغازگر ریزماهواره مورد ارزیابی قرار گرفتند که این پرایمرها اندازه باندهای مورد نظر را ظاهر کردند و همچنین سطح بالایی از چند شکلی را نشان دادند (۲۱). مارصفری و مهرابی (۲۰۱۰) تنوع و ارتباط ژنتیکی ۷۵ نمونه از ۱۵ جمعیت درخت خرمای ایران با استفاده از آغازگر *ISSR* ارزیابی کرد. در مجموع ۱۶۲ باند با استفاده از ۱۴ آغازگر ۱۷ و ۱۸ نوکلئوتیدی *ISSR* تولید شد که از این میان ۱۵۵ باند چندشکل بودند. بیشترین تعداد الل‌های تکثیر شده و تعداد الل‌های چندشکل مربوط به آغازگر UBC ۸۸۶، بیشترین شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) مربوط به UBC ۸۸۴ و بیشترین شاخص آغازگر (*MI*) مربوط به UBC ۸۴۰ است. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از روش NJ و ماتریس عدم تشابه دایس انجام گرفت و ۱۵ جمعیت را به دو گروه اصلی تفکیک نمود. جمعیت‌های فرسی، عویدی، گنتار، کبکاب و دگلتنور در یک دسته و سایر جمعیت‌ها در دسته دیگر قرار گرفتند. جمعیت‌های عویدی و گنتار بترتیب با بیشترین (۳۵/۶۲) و کمترین (۴۶/۲۳) درصد مکان‌های ژنی چندشکل بترتیب بیشترین و کمترین تنوع ژنتیکی را نشان دادند. بیشترین و کمترین تشابه ژنتیکی نیز بترتیب بین ارقام دیری و گنتار (۹۹۴/۰) و کبکاب با هر یک از ارقام دیری و گنتار (۹۴۱/۰) مشاهده شد. آغازگر *ISSR* به دلیل سادگی، سرعت، هزینه پایین و نیز نشان دادن چندشکلی بالا و پوشش دادن تمام ژنوم خرما تکنیکی قدرتمند در تعیین تنوع و ارتباط ژنتیکی جمعیت‌های خرما است (۱۳).

نتیجه‌گیری کلی

در هیچ یک از جایگاه مورد بررسی در ارقام نخل خرما در محدوده باندی مورد نظر بیش از دو آلل دیده نشده است. با توجه به میزان هتروزیگوسیتی، ارقامی که هتروزیگوسیتی بالاتری دارند در دامنه وسیع‌تری کشت شده‌اند همچنین با توجه به همبارزی و قدرت تفکیک بالای آغازگرهای SSR می‌توان نتیجه گرفت که این دسته از آغازگرهای مولکولی بدلیل قابلیت بیان چند شکلی بین ارقام مختلف نخل خرما جهت بررسی تنوع ژنتیکی مفید هستند. در پروژه های اصلاحی هر چه فاصله ژنتیکی والدین بیشتر باشد، در نسل‌های تفکیک بعد از دورگ-گیری نیز تنوع بیشتری ایجاد می‌شود. همچنین تلاقی بین ارقام یا ژنوتیپ‌های دور نتایج مطلوب تری را در برخواهد داشت و نتاج حاصل دارای هتروزیس بیشتری نسبت به دو ژنوتیپی هستند که در یک خوشه قرار دارند. بدین ترتیب امکان جمع آوری ژنهای مطلوب‌تر در نتاج فراهم می شود (۱۲). بطور کلی، بررسی تنوع ژنتیکی ۱۴ رقم نر و ۲۶ رقم ماده نخل خرما با استفاده از آغازگرهای SSR نشان دادند که بر اساس تجزیه خوشه‌ای ارقام نر و ماده در ۳ گروه قرار گرفتند. از میان تمام ارقام مورد مطالعه، بیشترین تشابه ژنتیکی بین ارقام آلمهتری و خنیزی و کمترین میزان تشابه بین رقم ابونارنجا و سایر ارقام بدست آمد. با توجه به یافته‌های حاصل از این پژوهش، تصویر جامع‌تری از ساختار ژنتیکی ارقام نر و ماده نخل خرما بدست آمده است که استفاده از آن‌ها را برحسب مورد در برنامه بهنژادی ارقام نخل خرما ممکن می‌سازد.

منابع

۱. رحمتی ه. و شیروانی ه. ۱۳۹۷. بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ‌های *Dactylis glumerata* با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران)، جلد ۳۱. شماره ۱. ص ۶۷-۷۸.

۲. جانی‌پور ل.، فهمیده ل.، فاضلی نسب ب. ۱۳۹۷. ارزیابی ژنتیکی جمعیت‌های مختلف گیاه دارویی زیره سبز با استفاده از نشانگرهای مولکولی DNA. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران)، جلد ۳۱. شماره ۱. ص ۱۶-۳۲.

3. Ahmed A., Asmaa, A., and Al-Qaradwi, V. 2009. Molecular phylogeny of Qatari date palm genotypes using simple sequence repeats marker. Biotechnology, 8: 1. 126-131.

4. Akkak, A., Scariot, V., TorelloMarinoni, D., Boccacci, P., Beltramo, C., and Botta, R. 2009. Development and evaluation of microsatellite markers in *Phoenix dactyl feral* and their transferability to other *Phoenix* species. Biologia Plant arum, 53: 1. 164–166.

5. Arabnezhada, H., Bahara, M., Mohammadia, H., Horticulturae, R., and Latifian, M. 2009. Development, characterization and use of microsatellite markers for germplasm analysis in date palm (*Phoenix dactyl feral* L). Sciatica Horticulture, 134: 150–156.(In Persian).

6. Bassam, BJ., and Caetano-Anollés, G. 1993. Silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Applied biochemistry and biotechnology, 42: 181-188.

7. Billotte, N., Marseillac, N., Brottier, P., Noyer, J.L., Jacquemoud-Collet, J.P., Moreau, C., Couvreur, T., Chevallier, M.H., Pintaud, J.C., and Risterucci, A.M. 2004. Nuclear microsatellite markers for the date palm (*Phoenix dactyl fera*l L): characterization and utility across the genus *Phoenix* and in other palm genera. Molecular Ecology Notes, 4: 256-258.

8. Botstein, D., White, RL., Skolmick, M. and Davis, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. Am. J. Hum. Genet, 32: 314 - 32.

9. 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 dactyl fera*l L). Biotechnology, 1: 91–97.

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

11. Garris, A.J., Tai, T.H., Coburn, J., Kresovich, S., and Mccouch, S. 2005. Genetic structure and diversity in *Oryza sativa L.*Genetics, 24: 6. 163: 169.

12. Hamwieh, A., Farah, J., Moussally, S., Al-Sham, K., Almer, K., Khierallah, H., Udupa, S., Lababidi, S., Malek, J.A., Aaouine, M., and Baum, M. 2010. Development of 1000 microsatellite markers across the date palm (*Phoenix dactyl fera*l L) genome. Acta Horticulturae, 882: 43. 269-277.

13. 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. (In Persian).

14. Mohammadi, SA. and Prasanna, BM. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants: Salient statistical tools and considerations. Crop Sci, 43: 1235 - 48.

15. Mirbabaee, S.A., Mardi, M., Mahmoodi, P., Pirseyedi, S.M., Abbasi, A., Farsi, M., Soleimani, H., Bakhshikhaniki, X.,

Mohajeri-Naraghi, S., Zeinolabedini, M., and KHayam-Nekouei, S.M. 2011. Development of now microsaellit marker from an enriched genomic library of date palm (*Phoenix dactylifera*L).*Horticultural Science and Biotechnology*, 86(5): 539.

16. Naqavi, M.R., Qarehyazi, B., and Salkadeh, Q.H. 2007. Molecular Markers. University of Tehran press., Iran. 300p. (In Persian).

17. Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences,70: 4. 3301-3321.

18. Khanam, S., Sham, A., Bennetzen, J.L., and Aly –Mohammed, A.M. 2012. Analysis of molecular marker-based characterization and genetic variation in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). AJCS, 6: 8.1236-1244.

19. Salamini, F., Ozkan, H., Brandolini, A., Schafer-Pregl, R., and Martin, W. 2002. Genetics and geography of wild cereal domestication in the Near East. *Nature Reviews Genetics*, 3: 429-441.

20. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

21. Tar'an, B., Zhang, C., Warkentin, T., Tullu, A., and Vandenberg, A. 2005. Genetic diversity among varieties and wild species accessions of pea (*Pisum sativum L.*) based on molecular markers, and morphological and physiological characters. *Genome*, 48: 4. 257-272.

22. Thakur, v, v., Tiwari, Sh., Tripathi, N., Tiwari, G. and Sapre, S. 2016. DNA barcoding and phylogenetic analyses of mentha species using rbcL sequences. Biotechnology Centre, Jawaharlal Nehru Agriculture University, Jabalpur-482004, Madhya Pradesh, India Annals of Phytomedicine, 5: 1. 59-62.

23. Vettori, C., Vendramin, G. G., Anzidei, M., Pastorelli, R., paffetti, D. and Giannini, R. 2004. Geographic distribution of chloroplast variation in Italian populations of beech (*Fagus sylvatica* I) Theuretical and Applied Genetics, 109: 1-9.

Genetic diversity of date palm cultivars in Sistan and Baluchestan and Hormozgan provinces using microsatellite

Taghinejad H.[1], Fahmideh L.[1], Samsampoor D.[2] and Askaryesyahooi M.[3]

[1] Plant Breeding and Biotechnology Dept., University of Zabol, Zabol, I.R. of Iran

[2] Horticulture Dept., University of Hormozgan, Bandarabbas, I.R. of Iran

[3] Institute Agricultural and Natural Resources of Hormozgan. , I.R. of Iran

Abstract

Considering the Economic importance of date palm, in this study, 14 varieties of male and 26 female cultivars of date palm were evaluated using SSR primer. DNA of young leaves of date palm was extracted by CTAB method and it was propagated by 10 pairs of SSR primers. The propagated products were observed by 8% acrylamide gel and coloring with $AgNO_3$. Using the software Gene Alex6.3 results of alleles and observed heterozygosity and polymorphism information content were calculated. Genetic relationships among cultivars were represented by a dendrogram based on the Nei's Genetic similarity coefficient and Nearest joining method which was considered for cluster analysis. The results showed that polymorphism information content was calculated for all pairs of primers which varied from 63% for HQ542225 to 85% for HQ542208 (mean = 77%). The number of alleles in each individual locus varied in the range of 6-9 with the mean of 7.6. The 10 primers used a total of 76 alleles were detected primers and primers HQ542208 and HQ542224 with 9 alleles most HQ542225 6 DP169 and allele showed the lowest number of alleles. The highest genetic similarity was found between Almehtary and Khanizi and the lowest one between Abonarenja and other cultivars. According to the results of this study, a more comprehensive picture of the genetic structure of male and female date palm varieties has been obtained, which makes it possible to use them according to the case study of palm date cultivars.

Key words: Male and female cultivars, Genetic diversity, Cluster analysis, Date palm, SSR primer.