

بررسی پایداری ژنتیک گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت برخی از رقم‌های خرما با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره

احسان شهبازی^۱، خلیل عالمی سعید^۲، افشین صلواتی^۳، نسیم غلامی^۴ و پوران دخت گلکار^{۵*}

۱. استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

۲ و ۴. استادیار و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، خوزستان

۳. دانشجوی سابق دکتری، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

۵. استادیار، پژوهشکده زیست‌فناوری و مهندسی زیستی، دانشگاه صنعتی اصفهان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۲ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۳/۲۲)

چکیده

خرما با نام علمی *Phoenix dactylifera* گیاهی تک‌لپه، دو پایه و با عمر طولانی و چندساله است که اهمیت اقتصادی بالایی در کشور ایران دارد. افزایش درختان آن با استفاده از پاجوش کند و هزینه‌بر است، به همین دلیل امروزه از روش‌های افزایش دیگری از جمله کشت بافت استفاده می‌شود. روش کشت بافت منجر به تنوع همسانه بدنی (سوماکلونال) می‌شود که ناشی از تنوع اپی‌ژنتیک غیر قابل وراثتی است که در نتیجه تغییرپذیری پدیدگانی (فنونوبی) موقت به وجود می‌آید. لذا نبود ثبات ژنتیک نهال‌های کشت بافتی باعث تمایل نداشتن نخل‌داران در استفاده از این نوع نهال‌ها است. در این پژوهش بررسی ثبات ژنتیک، ده نژادگان (ژنوتیپ) از خرمای پاجوشی و کشت بافتی ناشی از اندام‌زائی مستقیم در رقم‌های ایرانی با استفاده از بیست جفت آغازگر ریز ماهوره‌ای ارزیابی شد. نتایج نشان داد، از بین جفت آغازگرهای مورد استفاده، چهار آغازگر PDAAG1023، DP172، PDAAG1025 و mPdCIR044 قادر به تمایز بین رقم‌ها و بیان چندشکلی بودند. برابر با این نتایج در مجموع ۳۸ آلل با میانگین ۱/۹ آلل در هر مکان ژنی افزایش و امتیازبندی شد. هیچ‌کدام از آغازگرها تفاوتی بین نمونه کشت بافتی و پاجوشی درون هر رقم نشان ندادند. نتایج تجزیه خوشه‌ای با استفاده از روش Ward رقم‌ها را به دو گروه اصلی تقسیم کرد. نتایج این بررسی نشان داد، درختان خرمای به‌دست‌آمده از روش افزایش کشت بافت (اندام‌زائی مستقیم) از لحاظ ژنتیک مانند گیاهان مادری بوده است، لذا روش افزایش سریع نمونه‌های خرما به‌منظور تولید نهال با استفاده از اندام‌زائی مستقیم در شرایط درون شیشه‌ای توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: پایداری، تنوع ژنتیکی، سوماکلونال، نشانگر.

Evaluation of genetic stability of plantlets from tissue culture Date Palm using microsatellite markers

Ehsan Shahbazi¹, Khalil Alami seaid², Afshin Salavati³, Nasim Gholami⁴ and Pooran Golkar^{5*}

1. Assistance professor, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran

2, 4. Assistant Professor, Former M. Sc. Student, Faculty of Agriculture, Ramin Agriculture and Natural Resources of Khuzestan, Iran

3. Former Ph.D. Student, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

5. Assistant Professor, Research Institute for Biotechnology and Bioengineering, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

(Received: Dec. 23, 2015 - Accepted: Jun. 11, 2016)

ABSTRACT

Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) is a dioecious and long life plant which has high economic important in Iran. Date palm is propagated traditionally through the off shoot that is more laborious and expensive. So, other amplification methods, such as tissue culture are used for its multiplication. Plant tissue culture is leading to somaclonal variation, due to epigenetic non-inherited variation which is a temporary phenotypic effect. However, in some cases, these genetic instability caused reduction at the tendency of farmers to cultivate tissue- culture based genotypes of palm. Genetic stability of ten Iranian genotypes of date palm (originated by tissue culture via direct organogenesis and off-shoot) was evaluated by 20 primers of SSR (Simple Sequence Repeat). Four primers (mPdCIR044, PDAAG1023, DP172 and PDAAG1025) were polymorphic. According to obtained results, total of 38 alleles were detected, resulting a mean number of 1.9 allele per locus. No microsatellite DNA variation was observed among tissue culture and their offshoots in each cultivar. According to WARD cluster analysis, the genotypes were grouped into two main groups. The results of this study showed that identical genetic structure for date palm originated by two methods of tissue culture and off-shoot, in each cultivar. Hence, the plant tissue culture method is advised for rapid propagation in date palm genotypes.

Keywords: Genetic diversity, marker, somaclonal, stability.

* Corresponding author E-mail: golkar@cc.iut.ac.ir

مقدمه

خرما با نام علمی (*Phoenix dactylifera*) گیاهی تک‌لپه، دو پایه و چندساله و متعلق به خانواده *Palmaceae* است که شمار کروموزوم‌های آن $2n=36$ است (Khanam *et al.*, 2012). مبدأ این گیاه را گروهی آسیا و کرانه خلیج فارس و گروهی شمال آفریقا یا شبه‌قاره هند می‌دانند (Jain, 2007). درخت خرما در سراسر خاورمیانه، شمال آفریقا و ساحل جنوبی، ناحیه شرق و جنوب آفریقا و حتی در بخش‌های خاصی از اروپا و ایالات متحده آمریکا در سطح جهان پراکندگی بسیاری دارد و ایران یکی از مراکز عمده تولید این محصول است (Gurevich *et al.*, 2005; Jain, 2007). خرما منبع خوبی از انرژی و غنی از مواد غذایی از جمله آهن، پتاسیم، کلسیم، میزان کمی سدیم و چربی است (Dayani *et al.*, 2012). میوه خرما از ۷۰ درصد کربوهیدرات، اغلب به صورت قند و ۱۵ تا ۳۰ درصد آب تشکیل شده است و میوه مطلوبی در درمان کم‌خونی‌ها است (Dayani *et al.*, 2012). بنابر آمار سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد در سال ۲۰۱۲ سطح زیر کشت خرما در جهان ۱۱۰۴۵۹۶ هکتار با میزان تولید بیش از ۷ میلیون تن و میانگین عملکرد ۶۸۳۴۱ کیلوگرم در هکتار برآورد شده است (FAO, 2012). در این میان کشور ایران بنابر آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی در سال ۱۳۹۳ سطح زیر کشت درختان بارور ۱۹۸۵۱۰ هکتار با تولید ۱۰۴۲۲۷۸ تن و میانگین عملکرد ۵۲۵۰٫۵ کیلوگرم در هکتار داشته است (FAO, 2012). افزایش درختان خرما با استفاده از سه روش بذری، پاجوش و کشت بافتی است (Jain, 2007). در افزایش جنسی خرما با توجه به دو پایه بودن آن، تشخیص پایه نر و ماده تا چندین سال پس از کشت قابل تشخیص نیست (Jain, 2007) و افزون بر این، کیفیت میوه تولیدشده توسط درختان ماده ناشی از کشت نهال‌های بذری پایین است. افزایش خرما با استفاده از روش پاجوش نیز، بسیار پرزحمت و گران است، زیرا شمار پاجوش‌ها در هر درخت محدود است (Jain, 2007). به همین دلیل امروزه از روش افزایش کشت بافت (Zaid & De Wet, 2002; Askari & Al-Khalifah, 2003) استفاده می‌شود. این روش چندین برتری از جمله افزایش شمار زیاد نهال، بی‌تأثیر بودن فصل روی روش افزایش، تولید گیاهان

یکنواخت از نظر ژنتیکی یعنی همانند به پایه مادری و تولید گیاه بدون بیماری و آفات (Al-Wasel, 2005; Kriaa *et al.*, 2007) دارد.

به‌منظور افزایش خرما با روش کشت بافت به‌طور کلی از دو روش جنین‌زائی بدنی (سوماتیکی)^۱ و اندام‌زائی^۲ استفاده می‌شود (Bekheet, 2013). از روش جنین‌زائی بدنی در خرما به‌عنوان روشی سریع در جهت تولید گیاهان خرما در شرایط درون شیشه‌ای استفاده شده است که تولید پینه (کالوس)‌های جنین‌زا و باززائی از پینه، منجر به تولید گیاهان جدید می‌شود. توانائی تولید حجم انبوهی از رقم (واریته)‌های برجسته مورد نظر در کمترین زمان، نیاز کمتری به فضای افزایشی، امکان مبادله ذخائر توارثی (ژرم‌پلاسما) بدون آفات و بیماری‌ها، امکان تولید ذخائر توارثی متحمل به تنش‌های محیطی، از ویژگی‌های مطلوب این روش ریززادیدی در خرما است (Al-Khayri, 2003; AlKhateeb, 2008). اما نبود یکنواختی ژنتیکی در گیاهان باززادیده نسبت به پایه مادری (امکان وجود جهش و ناهنجاری‌های کروموزومی در حین تولید گیاهچه) از عیب‌های مهم این روش افزایشی است. جنین‌زائی بدنی در خرما از ریزنمونه‌های مختلف مانند جوانه‌های انتهائی ساقه، گل آذین نابالغ و جنین‌های بالغ صورت می‌گیرد (AlKhateeb, 2008). روش اندام‌زائی مستقیم چهار مرحله اصلی: (۱) آغازش جوانه‌های رویشی، (۲) افزایش جوانه، (۳) طویل شدن ساقه و (۴) ریشه‌دهی دارد (Abahmane, 2011). این روش افزایشی که تولید جوانه از ریز نمونه‌های مختلف بدون عبور از مرحله تولید پینه است، کمترین تنوع‌های همسانه بدنی (سوماکلونال) و بیشترین همسانی به پایه مادری را در گیاهچه‌های تولیدشده دارد (Bekheet, 2013; Khan & Bi, 2012; AlKhateeb, 2008). مشاهده‌های اندکی در زمینه اندام‌زائی مستقیم در خرما گزارش شده است که مختص به نژادگان‌های خاصی است (AlKhateeb, 2008; Bekheet, 2013). به‌طور کلی، گیاهان کشت بافتی ویژگی‌های همسانی با گیاهان افزایش‌شده از راه کشت پاجوش دارند و با این حال، یکی از مشکلات اصلی افزایش با کشت بافت تنوع همسانه

1. Somatic embryogenesis
2. Organogenesis

بدنی است (Jain, 2007). هر اندازه یاخته‌ها به مدت طولانی‌تر در کشت باقی بمانند به همان اندازه ناپایداری کروموزومی آن‌ها هم افزایش می‌یابد، بنابراین انتخاب ریزنمونه مناسب و محیط کشت مطلوب می‌تواند پایداری کروموزومی کشت را افزایش دهد. نبود پایداری ژنتیک در نهال‌های کشت بافتی باعث شده است این نوع نهال‌ها مورد استقبال کشاورزان قرار نگیرند (Gurevich *et al.*, 2005). گزارش‌های مربوط به اختلال‌های رشد در گیاهان خرمای تولیدی از کشت بافت مانند تولید میوه‌های بکر بار (بی‌هسته)، زالی برگ‌ها، پاکوتاهی درختان، برچه‌های چندگانه، خمیدگی جوانه انتهایی، خشکی جوانه انتهایی است (Al-Wasel, 2005; Al-Kaabi *et al.*, 2005). فراوانی تنوع همسانه بدنی در خرمای کشت بافتی می‌تواند گاهی بالا باشد اما علل این تغییرها به‌طور قطعی مشخص نیست (Gurevich *et al.*, 2005). از نشانگرهای مختلف به‌منظور بررسی میزان تنوع ژنتیکی نژادگان‌های مختلف در خرما استفاده شده است. نشانگرهای رپید^۱ برای شناسایی و انگشت‌نگاری DNA رقوم‌های درخت خرمای متعلق به مناطق مختلف جغرافیایی از جمله مصر (Ebtissam *et al.*, 2008) عربستان سعودی (Askari & Al-Khalifah, 2003) و الجزایر و کالیفرنیا (Akkak *et al.*, 2009) و شناسایی نشانگرهای ویژه جنسیت (Younis *et al.*, 2008) به کار گرفته شده‌اند و اگرچه چندشکلی اندکی دیده شد ولی نتایج به‌دست‌آمده به علت ماهیت تصادفی و تکرارناپذیر بودن و سطح چندشکلی کم این نوع نشانگر معتبر نیست (Khanam *et al.*, 2012). از نشانگرهای ریز ماهواره^۲ در جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی در ذخائر توارثی خرمای متعلق به کشورهای مختلف از جمله تونس (Zehdi *et al.*, 2004) سودان (Korpelainen & Elshibli, 2008) و قطر (Hamwieh *et al.*, 2010) استفاده شده است و میزان بالایی از تنوع ژنتیکی مشاهده شد. برای غربال‌گری و بررسی تنوع ژنتیکی میان نژادگان‌های خرمای مشتق‌شده از روش جنین‌زایی بدنی، نشانگرهای ریز ماهواره برای تشخیص تنوع بین نژادگان‌های مختلف از عمان، بحرین، عراق و مراکش استفاده شد.

(Al-Ruqaishi *et al.*, 2007). در پژوهشی پایداری ژنتیکی گیاهان خرمای ریززادیدی شده در ۲۷ گیاه انتخاب‌شده تصادفی با استفاده از ۱۶ آغازگر ریز ماهواره بررسی شد ولی هیچ‌کدام از ریز ماهواره‌ها در گیاهان مورد بررسی تنوعی بین خرمای ریززادیدی شده و پایه مادری آن نشان ندادند، این نتایج نشان داد، جنین‌زایی بدنی برای ریززادیدی خرما، ثبات ژنتیکی حتی پس از دوره ۱۶۸ هفته‌ای را حفظ می‌کند (Kumar *et al.*, 2010). همچنین Bekheet (2013) به‌منظور شناسایی چندشکلی میان رقم کشت بافتی زغلول و پایه مادری آن از چهار آغازگر رپید استفاده کردند. با وجود تولید شمار ۳۱ قطعه، سه آغازگر A11، A6 و A13 چندشکلی نشان ندادند و تنها دو قطعه چندشکل توسط آغازگر A12 مشاهده شد و سطح بالایی از همسانی بین خرمای ریززادیدی شده و پایه مادری رقم یادشده وجود داشت. در پژوهشی با استفاده از ۱۰ آغازگر رپید ثبات ژنتیکی میان گیاهچه‌های خرمای باززایی شده از ریزنمونه‌های برگچه رقم‌های خرمای برحی و ناشناخته را بررسی کردند (Moghaieb *et al.*, 2011). از نظر ژنتیکی اختلافی بین نمونه‌های پاجوشی و کشت بافتی مشاهده نشد، لذا ناهنجاری‌های مشاهده‌شده در نمونه‌های کشت بافتی ممکن است در اثر تنوع همسانه بدنی باشد. در پژوهشی دیگر (Chaluvadi *et al.*, 2014) که روی هشت نمونه خرمای پرورشی در امارات متحده عربی گردآوری شده از سراسر جهان با استفاده از ۲۱ نشانگر ریز ماهواره انجام گرفت، میانگین شمار آلل‌ها در هر مکان ژنی ۱۹، ناخالصی (هتروزیگوتی) مورد انتظار ۰/۷ و ناخالصی مشاهده‌شده ۰/۲۵ برآورد شد. با توجه به اطلاعات اندکی که در زمینه بررسی میزان تنوع اپی‌ژنتیکی نمونه‌های خرمای تولیدی از کشت بافت در نژادگان‌های ایرانی وجود دارد، لذا این بررسی به‌منظور ارزیابی کارایی نشانگرهای SSR^۳ در آشکارسازی تغییر ناشی از کشت بافت و بررسی پایداری ژنتیک گیاهچه‌های ناشی از کشت بافت خرمای ایرانی انجام شد.

1. Random Amplification of Polymorphic DNA
2. Microsatellite

مواد و روش‌ها

استخراج و افزایش DNA

نژادگان‌های مورد بررسی در این آزمایش شامل گیاهچه‌های به‌دست‌آمده از روش افزایش پاجوشی و کشت بافتی حاصل از اندام‌زائی مستقیم از ریز نمونه پاتاکی (مریستمی) در رقم‌های ایرانی پیارم، دیری، زاهدی و برحی بود، که از مؤسسه تحقیقات خرما و میوه‌های گرمسیری کشور تهیه شد. این بررسی در آزمایشگاه گروه بیوتکنولوژی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان در سال ۱۳۹۲ انجام شد. نمونه‌های برگ‌ی پس از شستشو با آب مقطر، در کیسه بسته‌بندی و در دمای ۸۰- درجه سلسیوس تا زمان استخراج DNA در فریزر نگهداری شدند. از برگ‌های جوان تازه DNA ژنگانی (ژنومی) به روش CTAB تغییر یافته (Doyle & Doyle, 1990) استخراج شد. ترکیب‌های بافر استخراج شامل ۱۰۰ میلی‌مولار (pH=8) Tris-HCl، ۲۰ میلی‌مولار (pH=8) Na₂EDTA، ۱/۴ مولار NaCl، ۲ درصد وزنی- حجمی از CTAB، ۰/۵ درصد از PVP و ۷ میکرولیتر مرکاپتواتانول بود.

پس از استخراج DNA و پیش از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز^۱ غلظت DNA مورد آزمایش با استفاده از دستگاه نانودراپ (Thermo2000) اندازه‌گیری شد و کیفیت DNA استخراج‌شده با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد به مدت ۵۰ دقیقه و با ولتاژ ۹۰ ولت در دستگاه GEL XL صورت گرفت. در این بررسی شمار بیست جفت آغازگر SSR توسط شرکت تکاپوزیست تهیه شد (جدول ۱) که توالی‌های مربوط به این آغازگرها از بررسی‌های پیشین در زمینه بررسی آغازگرهای SSR روی درخت خرما انتخاب شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از مواد تهیه‌شده از شرکت سینا ژن و در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR 10X، ۰/۵ میکرولیتر dNTP MIX، ۱ میکرولیتر MgCl₂، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت ۱۰ میکرو مولار، ۰/۲ واحد از آنزیم Taq و ۲ نانوگرم DNA ژنگانی در دستگاه چرخه گرمایی انجام شد. برای بهینه‌سازی شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

چرخه‌های گرمایی مختلف، به روش شیب گرمایی آزمایش شد. الگوی دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به این شرح بود: الف) یک چرخه واسرشت اولیه به مدت پنج دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، ب) ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی در دمای ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، ج) اتصال آغازگر به الگو در دمای ۶۱-۴۶ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، د) بسط در دمای ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و ه) یک چرخه بسط نهایی به مدت ده دقیقه در دمای ۷۲ درجه. ۲ میکرولیتر از نمونه DNA ژنگانی در ریزلوله (میکروتیوپ)های پی‌سی‌آر قرار داده شد و میزان ۲۳ میکرولیتر از محلول اصلی به آن اضافه شد، سپس همه ریزلوله‌ها به دستگاه ترموسایکلر مدل Bio-Rad منتقل شدند. پس از افزایش DNA با استفاده از دستگاه الکتروفورز و ژل پلی اکریل آمید ۶ درصد برای جداسازی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استفاده شد و پس از پایان الکتروفورز، رنگ‌آمیزی ژل روی نیترا نقره انجام شد و قطعه‌های افزایش‌شده تحت تأثیر نور فرابنفش (با طول موج ۲۵۴ نانومتر) دستگاه ژل‌داک (UVI TEC Cambridge) مشاهده شد و عکس ژل ثبت شد. در کنار نمونه‌های مورد بررسی به‌منظور برآورد طول قطعه تکثیرشده، ۰/۸ میکرولیتر نشانگر (مارکر) با طول استاندارد ۱۰۰ جفت بازی شرکت فرمنتاز^۲ استفاده شد. پس از ثبت عکس ژل‌ها، آل‌ها به‌صورت وجود (۱) و نبود (۰) ثبت شدند و با استفاده از نرم‌افزار (Gene Alex6.3)، (Peakall & Smouse, 2012) نتایج مربوط به ۶ آماره آل مؤثر، شمار آل مورد انتظار، ناخالصی مشاهده‌شده، ناخالصی مورد انتظار، ضریب خویش‌آمیزی و ضریب شانون به دست آمد. پس از آن با استفاده از نرم‌افزار HET نتایج مربوط به محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)^۲ محاسبه شد. تجزیه خوشه‌ای نژادگان‌ها نیز با روش Ward و با استفاده از ضریب همسانی نی و با استفاده از نرم‌افزار NTSYS version 2.02 انجام شد.

جدول ۱. ویژگی‌های جفت آغازگرهای مورد استفاده در جهت تشخیص تنوع ژنتیکی برای نژادگان‌های پاجوشی و کشت بافتی در خرما
Table 1. The SSR primers characteristics for genetic diversity detection in genotypes derived by off- shoot and tissue culture in *Palm date*

Primer	Repeated sequence	Forward sequence	Backward sequence	Annealing temperature
PDAG1006	(CT)22	GCCACAGGAAGCACATTAG	CCACACCTTAATCACAAACTCC	51
PDAG1002	(AGGG)4	GGACATAGTTTGGCTGGCTAC	ACCAGTTTACCCTTGTCTCCA	54
PDAG1005	(AG)10	GTATGTTCCATGCCGTTCTAC	AGCCACATCACTTGGTTCA	57
PDAAG1023	(AAG)10	AGACGCTCACCTTGGAACTT	ACCCCGCTCATGAATTAGG	57
PDAAG1025	(TTC)6-GTC-(TTC)4	ATCCCGTCTCTCTTTCCA	CATGCATACATATACGCAAAGAA	55
DP169	(AAT)12	GCATGGACTTAATGCTGGGTA	GGTTTTCTCGCAACAACAT	54.3
DP172	(AGG)11	GGTGTGTTGGGCCTATTTCT	GTCTCTCTCTCTCTGTCC	54.5
PDCAT8	(TC)16	GCTTAAGTGGTT	GTTTGGCAGAAGTAT	58.2
PDCAT14	(TC)19(TC)16	TGCTGCAAATCTAGGTCACGAG	TTTACCCTCGGCCAAATGTAA	56
mPdCIR044	(GA)19	ATGCGGACTACACTATTCTAC	GGTGATTGACTTCTTTGAG	47
mPdCIR085	(GA)29	GAGAGAGGGTGGTGTATT	TTCATCCAGAACCACAGTA	49.4
PDCAT6	(CA)14(GA)23	AATCAGGGAACCACAGCCA	GTTTAAAGCCTTCTCAAGATAGCCTCAG	61
mPdCIR010	(GA)22	ACCCGGACGTGAGGTG	CGTCGATCTCTCTTTGTCTC	55.5
mPdCIR032	(GA)19	CAAACTCTTGGCCGTGAG	GGTGTGGAGTAATCATGTAGTAG	50
mPdCIR035	(GA)15	ACAAACGGCGATGGGATTAC	CCGACGCTACCTCTTCTAT	51
mPdCIR050	(GA)21	CTGCCATTCTCTGAC	CACCATGCACAAAATG	48
mPdCIR078	(GA)13	CCCCTATTAGGATTCTAC	GCACGAGAAGGCTTATAGT	50
mPdCIR093	(GA)17	GAGAGAGGGTGGTGTATT	TTCATCCAGAACCACAGTA	46.4
mPdCIR025	(GA)22	GCACGAGAAGGCTTATAGT	CCCCTATTAGGATTCTAC	49.3
PDCAT18	(CT)13G(CT)8CG(CT)3CG(CT)3	CAGCGGAGGGTGGGCCTCGTT	TTCTCCATCTCCCTTTTCTCTGCTACTC	61

$$I = - \sum_{i=1}^n p_i \ln p_i$$

ناخالصی یا تنوع ژنی

ناخالصی مشاهده شده برای یک جایگاه با رابطه مقابل محاسبه می‌شود:

$$H_o = \frac{\sum_{ij} N_{ij}}{N}$$

که در آن N_{ij} ($i \neq j$) شمار افراد ناخالص و N شمار کل افراد در جمعیت مورد بررسی است (Hedrick, 1999).

ناخالصی مورد انتظار برای یک جایگاه نیز از رابطه زیر محاسبه می‌شود:

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$$

فاصله ژنتیکی

فاصله ژنتیکی بر پایه تابع فاصله اقلیدسی^۱ بنابر رابطه زیر محاسبه می‌شود:

$$d_{ij} = \sqrt{\sum_{k=1}^p (p_{ik} - p_{jk})^2}$$

که p_{ik} فراوانی آللی نشانگر مورد نظر در رقم i برای آلل k و p_{jk} فراوانی آللی همان نشانگر در رقم j برای آلل k است.

محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)

محتوای اطلاعات چندشکلی یک فراسنج (پارامتر) نشان دهنده میزان چندشکلی یک نشانگر است که می‌تواند از صفر تا یک متغیر باشد (Nei, 1983). با استفاده از فراوانی آللی، PIC برای هر جایگاه ریزماهواره با استفاده از رابطه‌های زیر محاسبه شد:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^k (p_i)^2 - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2(p_i^2 p_j^2)$$

$$= 1 - H - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2(p_i^2 p_j^2)$$

P_j فراوانی آلل‌های i برای هر جایگاه و k شمار آلل‌ها است.

فراوانی آلل غالب

فراوانی آللی که در بین همه آلل‌های مشاهده شده برای آن جایگاه، بیشترین فراوانی را دارد (Nei, 1983).

شمار آلل مؤثر

این معیار بیانگر شمار آلل‌هایی است که انتظار می‌رود در هر جایگاه مشاهده شود و اندازه نمونه به شدت بر آن تأثیرگذار است و تنها برای نشانگرهای هم‌بارز قابل محاسبه است و از رابطه زیر محاسبه شد (Nei, 1983):

$$A_e = 1 / \sum p_i^2$$

شاخص شانون

شاخص شانون معیاری برای اندازه‌گیری میزان آلل‌های چندشکل است (Nei, 1983):

2. Euclidean distance function

نتایج و بحث

در فرآیند انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، همه بیست جفت آغازگر ریز ماهواره مورد استفاده توانستند مکان ژنی مورد نظر را در ده نمونه نخل خرما پاجوشی و کشت بافتی افزایش کنند (جدول ۲).

جدول ۲. فراوانی آللی و طول قطعه‌های افزایش شده در هر مکان ژنی برای بیست ریزماهواره استفاده شده در نژادگان‌های خرما

Table 2. Microsatellite allele frequency distribution revealed by 20 microsatellites loci in evaluated genotypes of palm date

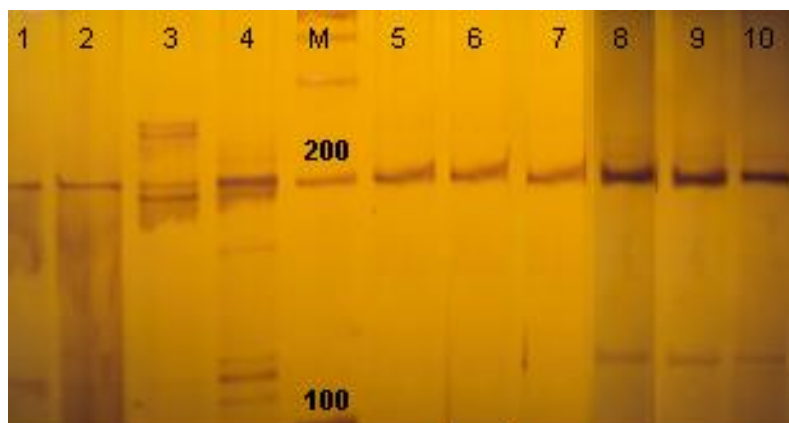
Loci	Allel		Segments length
	1	2	
DP172	0.125	0.875	190-207
DP169	0.5	0.5	220-225
PDAAG1005	0.5	0.5	350-375
MPdCIR035	0.5	0.5	189-197
MPdCIR044	0.375	0.625	280-330
MPdCIR078	1	0	215
MPdCIR032	0.5	0.5	320-336
PDAAG1023	0.875	0.125	190-205
MPdCIR085	0.5	0.5	189-197
MPdCIR025	0.5	0.5	207-220
PDAAG1025	0.625	0.375	206-220
PDCAT14	0.5	0.5	150-160
MPdCIR050	0.5	0.5	220-240
MPdCIR010	0.5	0.5	180-190
PDCAT6	0.5	0.5	150-170
PDAAG1002	1	0	115
MPdCIR093	0.5	0.5	180-190
PDCAT8	0.5	0.5	215-230
PDAAG1006	0.5	0.5	195-210
PDCAT18	0.5	0.5	110-125

این شمار آغازگر در مجموع ۳۸ آلل تولید کردند. برای دو آغازگر mPdCIR078 و PDAG1002 تنها یک آلل مشاهده شد و دیگر آغازگرها دو آلل نشان دادند. درحالی که در بررسی دیگر (Racchi *et al.*, 2014) شمار آلل‌ها برای جایگاه PDCAT1، چهار و برای جایگاه mPdCIR078، ۱۱ بود. میزان ناخالصی مورد انتظار برای جایگاه mPdCIR010 برابر ۰/۴۶ و برای جایگاه‌های mPdCIR078 و mPdCIR085 برابر ۰/۸۵ گزارش شده بود. در بررسی‌های دیگری نیز شمار ۱۷ و ۱۲ آلل برای جایگاه mPdCIR078 گزارش شده است (Elsafi, 2014; Elshibli & Korpelainen, 2008). در بررسی‌های Arabnezhad *et al.* (2012) نیز شمار شش آلل برای جایگاه PDAAG1002 گزارش شده بود. در این تحقیق میانگین آلل مشاهده شده در هر جایگاه ۱/۹ برآورد شد.

در تحقیقی که به منظور تعیین مکان‌های ژنی چند شکل در درخت خرما صورت گرفت، شمار آلل‌های مشاهده شده بین ۹-۲ آلل و با میانگین ۶/۴۱۲ در هر جایگاه گزارش شد (Akkak *et al.*, 2009). بنابر گزارش Barrow (1998) شمار آلل افزایش شده به ازای هر مکان ژنی تأثیر مستقیمی بر بازدهی آن در تظاهر ناخالصی، فراوانی نژادگانی (ژنوتیپی) و محتوای چندشکلی دارد، به طوری که بالا بودن شمار آلل‌های افزایش شده در یک مکان سبب افزایش کارایی و میزان اطلاع‌رسانی آن مکان برای تعیین تنوع رقم‌های می‌شود. در تحقیقی با استفاده از نشانگر ای اف ال پی تنوع ژنتیکی روی ۲۹ نمونه خرما برحی و ۲۸ نمونه خرما مجول پاجوشی و کشت بافتی با استفاده از پنج آغازگر مختلف بررسی شد، و در کل شمار ۳۱۷ نوار به دست آمد (Gurevich *et al.*, 2005). بخش اعظم این سطح بالا از تنوع ژنتیکی، مربوط به اختلاف بین دو رقم خرما برحی و مجول تشخیص داده شده بود. شمار ۵۰ نوار (۱۵/۸ درصد) درون نمونه‌های برحی و شمار ۸۴ نوار (۲۶/۵ درصد) بین نمونه‌های مجول چندشکل بودند. در این بررسی، هیچ کدام از آغازگرها تفاوتی بین نمونه‌های کشت بافتی و پاجوشی رقم‌های نشان ندادند. در این بررسی پایه مادری نمونه‌های پاجوشی و کشت بافتی هر رقم یکسان بود و همچنین با توجه به اینکه یکی از برتری‌های افزایش به روش کشت بافت تولید گیاهان همانند به پایه مادری است لذا بایستی بین نمونه‌های پاجوشی و کشت بافتی هر رقم تفاوتی مشاهده نشود. از بین آغازگرهای استفاده شده ۴ آغازگر mPdCIR044، PDAAG1023، DP172 و PDAAG1025 توانستند تفاوت بین رقم‌های برحی، دیری و زاهدی را نشان دهند. در رقم دیری از آغازگر DP172 نوارهای ۱۹۰ و ۲۰۷ جفت باز به صورت ناخالص بودند درحالی که در مورد سه رقم دیگر نوار ۲۰۷ جفت باز تنها به صورت خالص (هموزیگوت) بود. در رقم زاهدی از آغازگر PDAAG1025 نوار ۲۰۶ جفت باز به صورت هموزیگوت بود درحالی که در مورد سه رقم دیگر نوارهای ۲۰۶ و ۲۲۰ جفت باز به صورت ناخالص مشاهده شدند. در رقم برحی از آغازگر mPdCIR044 نوار ۳۳۰ جفت باز به صورت هموزیگوت بود درحالی که در مورد سه رقم دیگر نوارهای ۲۸۰ و ۳۳۰ جفت باز

توان تمایز هر ریزماهوره با در نظر گرفتن شمار و فراوانی نسبی آلل‌ها است، بنابراین اگرچه برخی از ریزماهوره‌ها شمار آلل همسان دارند، ولی به‌واسطه اینکه فراوانی این آلل‌ها متفاوت است، محتوای اطلاعات چندشکلی مختلفی را نشان دادند. تفاوت در فراوانی آلل‌ها به‌عنوان یک معیار با ارزش برای هر ریزماهوره در ژنتیک جمعیت در نظر گرفته می‌شود. زیرا بنا بر نتایج گزارش شده شمار آلل‌های افزایش‌شده به ازای هر مکان تأثیر مستقیمی بر بازدهی آن جایگاه در تظاهر محتوای اطلاعات چندشکلی، شاخص چندشکلی و فراوانی نژادگانی دارد، به‌طوری‌که بالا بودن آلل‌های تولیدشده در یک جایگاه سبب افزایش کارایی و میزان اطلاع‌رسانی آن جایگاه برای تعیین تنوع جمعیت‌ها می‌شود (Bell, 1996). محتوای اطلاعات چندشکلی در این تحقیق بین ۰ تا ۰/۵ مشاهده شد (جدول ۳)، صفر بودن محتوای اطلاعات چندشکلی ناشی از تک آللی در مکان‌های mPdCIR078 و PDAAG1002 بود (جدول ۳). در جایگاه‌های DP172 و PDAAG1023 محتوای اطلاعات چندشکلی ۰/۲۱ و در جایگاه mPdCIR025 به میزان ۰/۲۵ مشاهده شد (جدول ۳).

به‌صورت ناخالص مشاهده شد و از آغازگر PDAAG1023 نوارهای ۱۹۰ و ۲۰۵ جفت باز به‌صورت ناخالص مشاهده شد در حالی‌که در رقم‌های دیگر نوار ۱۹۰ جفت باز به‌صورت هموزیگوت دیده شد. بیشترین فراوانی مربوط به آلل ۲۱۵ جفت بازی جایگاه mPdCIR078 و آلل ۱۱۵ جفت باز جایگاه PDAAG1002 بود که با فراوانی ۱ مشاهده شدند، و کمترین فراوانی آلل مربوط به آلل ۱۹۰ جفت باز جایگاه DP172 و آلل ۲۰۵ جفت بازی جایگاه PDAAG1023 بود که با فراوانی ۰/۱۲۵ مشاهده شد (جدول ۲). در بررسی دیگری نیز کمترین فراوانی آللی را در جایگاه PDAG1023 گزارش شد (Arabnezhad *et al.*, 2012). در بیشتر جایگاه‌ها میزان ناخالصی مشاهده‌شده بیش از ناخالصی مورد انتظار بود (جدول ۳). با توجه به زیاد بودن میزان ناخالصی مشاهده‌شده نسبت به مورد انتظار به نظر می‌رسد که ناخالصی در این گیاه مورد انتخاب خرماکاران بوده است. شکل ۱، نتایج به‌دست‌آمده از الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روی ژل پلی‌اکریل آمید ۶ درصد درصد برای جایگاه PDAAG1025، را نشان می‌دهد. محتوای اطلاعات چندشکلی به‌عنوان برآوردی از



شکل ۱. الگوی نواری ژل در ده نمونه خرما برای آغازگر SSR با نام PDAAG1025.

(M) خط‌کش مولکولی (Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder, fermentas.).

(۱) Z_k: زاهدی کشت بافتی، (۲) Z_p: زاهدی پاجوشی، (۳) D_k: دیری کشت بافتی، (۴) D_p: دیری پاجوشی، (۵) P_k: پیارم کشت بافتی، (۶) P_p: پیارم پاجوشی، (۷) B_{kr}: برخی کشت بافتی ایرانی، (۸) B_{kv}: برخی کشت بافتی وارداتی، (۹) B_{kvm}: برخی کشت بافتی وارداتی مشکل‌دار، (۱۰) B_p: برخی پاجوشی.

Figure 1. Gel profile of 10 date palm genotypes using SSR primer named PDAAG1025. (M) Molecular ladder (Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder, fermentas.).

Z_k: Zahidi (tissue culture derived); Z_p: Zahidi (off shoot derived); D_k: Deiri (tissue culture derived); D_p: Deiri (off shoot derived); P_k: Piarem (tissue culture derived); P_p: Piarem (off shoot derived); B_{kr}: Barhee (Iranian tissue culture derived); B_{kv}: Barhee (Non- Iranian tissue culture derived); B_{kvm}: Barhee (Non-Iranian tissue culture derived: out type); B_p: Barhee (off shoot derived).

جدول ۳. شاخص‌های تنوع در جایگاه‌های ژنی ریزماهورهای استفاده‌شده در نژادگان‌های خرمای ایرانی
Table 3. Genetic diversity indices in microsatellite loci for evaluated Iranian genotypes of *Palm date*

Loci	Na	Ne	I	Ho	He	PIC
DP172	1.25	1.25	0.17	0.5	0.125	0.21
DP169	2	2	0.69	0.75	0.5	0.5
PDAAG1005	2	2	0.69	1	0.5	0.5
MPdCIR035	2	2	0.69	1	0.5	0.5
MPdCIR044	1.75	1.75	0.51	0.75	0.375	0.46
MPdCIR078	1	1	0	0	0	0
MPdCIR032	2	2	0.69	0.75	0.5	0.5
PDAAG1023	1.25	2.25	0.17	0.5	0.125	0.21
MPdCIR085	2	2	0.69	0.75	0.5	0.5
MPdCIR025	2	2	0.69	1	0.5	0.25
PDAAG1025	1.75	1.75	0.51	0.75	0.375	0.46
PDCAT14	2	2	0.69	1	0.5	0.5
MPdCIR050	2	2	0.69	1	0.5	0.5
MPdCIR010	2	2	0.69	1	0.5	0.5
PDCAT6	2	2	0.69	1	0.5	0.5
PDAAG1002	1	1	0	0	0	0
MPdCIR093	2	2	0.69	0.75	0.5	0.5
PDCAT8	2	2	0.69	1	0.5	0.5
PDAAG1006	2	2	0.69	1	0.5	0.5
PDCAT18	2	2	0.69	1	0.5	0.5

PIC: محتوای اطلاعات چندشکلی، H_e : ناخالصی مورد انتظار، H_o : ناخالصی مشاهده‌شده، I : ضریب شانون، N_e : شمار آل مؤثر، N_a : شمار آل غالب.
PIC: Polymorphism information content; H_e : Expected heterozygosity; H_o : Observed heterozygosity; I : Shannon index; N_e : Number of effective allele; N_a : Number of dominance allele.

نژادگان‌های ارزیابی‌شده است. شمار آل غالب از یک (MPdCIR078) تا دو (در چهارده مکان ژنی) متغیر بود و شمار آل مؤثر نیز از ۱ (MPdCIR078) تا ۲/۲۵ (PDAAG1023) تنوع نشان داد (جدول ۳).

برآورد فاصله و همسانی ژنتیک بر پایه ضریب همسانی نی

تعیین رابطه ژنتیک مهم‌ترین مسئله در بررسی روابط و همسانی رقم‌ها با یکدیگر است (Nei, 1983). فاصله ژنتیکی رقم‌ها بر پایه ضریب همسانی نی بین ۰ تا ۰/۰۶۶ متفاوت بود (جدول ۴). فاصله ژنتیکی بین نمونه‌های پاجوشی و کشت بافتی هر رقم صفر بود، پس از آن فاصله ژنتیکی رقم‌های زاهدی و پیارم ۰/۰۲۰، فاصله ژنتیکی رقم‌های پیارم و دیری ۰/۰۲۱، پس از آن رقم‌های زاهدی و دیری فاصله ژنتیکی ۰/۰۴۲، فاصله ژنتیکی رقم‌های پیارم و برحی ۰/۰۴۳، بین رقم‌های زاهدی و برحی فاصله ژنتیکی ۰/۰۶۳ و بیشترین فاصله ژنتیکی ۰/۰۶۶ بین دیری و برحی بود. همسانی ژنتیکی نیز بین ۹۳ تا ۱۰۰ درصد متغیر بود (جدول ۴). با توجه به محاسبه‌های صورت گرفته بیشترین همسانی ژنتیکی بین رقم‌های پاجوشی و رقم‌های به‌دست‌آمده از کشت بافت آن‌ها است که میزان همسانی بین آن‌ها ۱۰۰ درصد است. به‌عبارت‌دیگر رقم‌های حاصل از کشت بافت با رقم‌های اصل از نظر ژنگانی هیچ تفاوتی ندارند و کامل همسان هم هستند و پس از آن‌ها بیشترین

در جایگاه‌های mPdCIR044 و PDAAG1025 محتوای اطلاعات چندشکلی ۰/۴۶ بود. محتوای اطلاعات چندشکلی در دیگر جایگاه‌ها ۰/۵ مشاهده شد (جدول ۳). بنابر نتایج تحقیق دیگری روی ۳۰ نژادگان خرمای عراقی بیشترین PIC مربوط به جایگاه PDCAT18 و کمترین آن مربوط به جایگاه mPdCIR093 بود (Khierallah *et al.*, 2011). در حالت کلی هرچه شمار آل بیشتر باشد تنوع ژنی و PIC بالایی نیز وجود خواهد داشت ولی فراوانی آل آن نشانگر پایین خواهد بود (Mohammadi & Prasanna, 2003) محتوای اطلاعات چندشکلی نمی‌تواند عدد ثابتی داشته باشد و به عامل‌هایی مانند شمار آل تولیدی توسط هر جایگاه، طول توالی تکراری، تکرارهای دی‌نوکلئوتیدی نسبت به تکرارهای تری و تترا بستگی دارد و در صورتی که هیچ آل خالصی وجود نداشته باشد حداکثر به ناخالصی مشاهده‌شده می‌رسد (Sefc *et al.*, 2000). کمترین میزان ناخالصی مشاهده‌شده (صفر) متعلق به مکان‌های ژنی MPdCIR078 و PDAAG1002 و بالاترین ناخالصی مشاهده‌شده (۱) متعلق به ده مکان ژنی مختلف (جدول ۳) بود. مکان‌های با میزان ناخالصی بالا می‌توانند در بررسی‌های تنوع ژنتیکی مؤثر واقع شوند و از این مکان‌ها برای تجزیه تنوع در ذخائر توارثی خرما استفاده شود. شاخص تنوع شانون از ۰ تا ۰/۶۹ متغیر بود (جدول ۳).

میزان PIC و ضریب شانون بیانگر میزان تنوع بین

تجزیه خوشه‌های نژادگان‌ها

نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه خوشه‌ای وارد نژادگان‌ها را به سه گروه جداگانه تقسیم کرده است (شکل ۲). به‌طوری‌اگر با محل برش ۰/۱۳، پایه‌های این چهار رقم را می‌توان در سه گروه جای داد که دسته اول مربوط به رقم برخی با فاصله بیش از ۰/۸ از دو دسته دیگر کامل جدا است. در دسته دوم پایه‌های رقم دیری دیده می‌شوند که خرماي آن خشک است و در دسته سوم پایه‌های رقم‌های نیمه‌خشک زاهدی و پیارم دیده می‌شوند. بنابراین به‌نظر می‌رسد نشانگرهای چندشکلی به‌دست‌آمده می‌توانند رقم‌های خرما را بر پایه نوع میوه از هم جداسازی کنند.

همسانی بین دو رقم زاهدی و پیارم است که میزان همسانی بین آن‌ها ۰/۹۸ است. دو رقم دیگر که بیشترین همسانی را دارند پیارم و دیری بوده که میزان همسانی آن‌ها ۰/۹۷ محاسبه شده است. همسانی بین رقم‌های زاهدی و پیارم ۰/۹۵ بود. همچنین همسانی بین رقم‌های پیارم و برخی ۰/۹۵ بود. کمترین همسانی ژنتیکی بین دو رقم زاهدی و برخی است که برابر ۰/۹۳ برآورد شد، همچنین همسانی ژنتیکی بین رقم‌های دیری و برخی ۰/۹۳ بود. میزان همسانی ژنتیکی بین رقم‌های مورد بررسی در این پژوهش با نتایج *Gurevich et al.* (2005) همخوانی داشت.

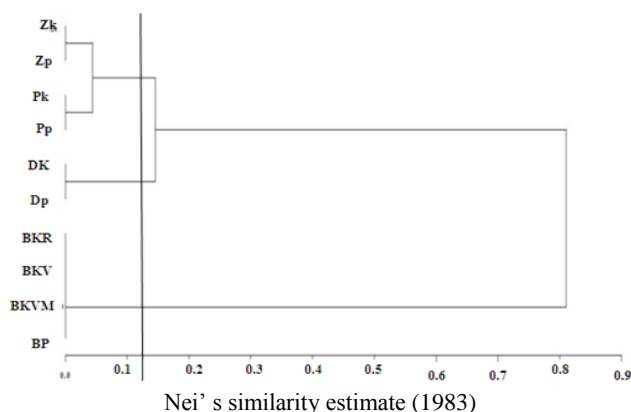
جدول ۴. ماتریس همسانی (مثلث پایین) و فاصله ژنتیکی (مثلث بالا) نمونه‌های پاجوشی و کشت بافتی بر پایه ضریب همسانی نی (۱۹۸۳)

Table 4. Nei's Similarity matrix (down triangular) and genetic distance (up triangular) for different genotypes of Palm date (off shoot and tissue culture -derived)

	Z _k	Z _p	P _k	P _p	D _k	D _p	B _{kr}	B _{kv}	B _{kvm}	B _p
Z _k										
Z _p	1									
P _k	0.98	0.98								
P _p	0.98	0.98	1							
D _k	0.95	0.95	0.97	0.97						
D _p	0.95	0.95	0.97	0.97	1					
B _{kr}	0.93	0.93	0.95	0.95	0.93	0.93				
B _{kv}	0.93	0.93	0.95	0.95	0.93	0.93	1			
B _{kvm}	0.93	0.93	0.95	0.95	0.93	0.93	1	1		
B _p	0.93	0.93	0.95	0.95	0.93	0.93	1	1	1	

Z_k: زاهدی کشت بافتی، Z_p: زاهدی پاجوشی، D_k: دیری کشت بافتی، D_p: دیری پاجوشی، P_k: پیارم کشت بافتی، P_p: پیارم پاجوشی، B_{kr}: برخی کشت بافتی ایرانی، B_{kv}: برخی کشت بافتی وارداتی، B_{kvm}: برخی کشت بافتی وارداتی مشکل‌دار، B_p: برخی پاجوشی.

Z_k: Zahidi (tissue culture derived); Z_p: Zahidi (off shoot derived); D_k: Deiri (tissue culture derived); D_p: Deiri (off shoot derived); P_k: Piarem (tissue culture derived); P_p: Piarem (off shoot derived); B_{kr}: Barhee (Iranian tissue culture derived); B_{kv}: Barhee (Non-Iranian tissue culture derived); B_{kvm}: Barhee (Non-Iranian tissue culture derived: out type); B_p: Barhee (off shoot derived).



شکل ۲. دندروگرام به‌دست‌آمده از روش Ward با استفاده از ضریب همسانی ژنتیکی نی (۱۹۸۳) برای ۱۰ نژادگان نخل خرما با نشانگرهای SSR. Z_k: زاهدی کشت بافتی، Z_p: زاهدی پاجوشی، D_k: دیری کشت بافتی، D_p: دیری پاجوشی، P_k: پیارم کشت بافتی، P_p: پیارم پاجوشی، B_{kr}: برخی کشت بافتی ایرانی، B_{kv}: برخی کشت بافتی وارداتی، B_{kvm}: برخی کشت بافتی وارداتی مشکل‌دار، B_p: برخی پاجوشی.

Figure 2. Ward-based dendrogram showing genetic relationship among 10 date palm genotypes based on Nei's similarity estimates obtained for SSR markers.

Z_k: Zahidi (tissue culture derived); Z_p: Zahidi (off shoot derived); D_k: Deiri (tissue culture derived); D_p: Deiri (off shoot derived); P_k: Piarem (tissue culture derived); P_p: Piarem (off shoot derived); B_{kr}: Barhee (Iranian tissue culture derived); B_{kv}: Barhee (Non-Iranian tissue culture derived); B_{kvm}: Barhee (Non-Iranian tissue culture derived: out type); B_p: Barhee (off shoot derived).

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به اینکه روش سنتی افزایش پاجوشی خرما زمان‌بر و گران است، امروزه از کشت بافت گیاهی برای افزایش استفاده می‌شود. از برتری‌های افزایش به روش کشت بافت می‌توان به امکان تولید انبوه نهال همسان به گیاه مادری و در مدت‌زمان کوتاه اشاره کرد. نهال‌های حاصل از روش کشت بافت با استفاده از روش اندام‌زائی مستقیم شبکه ریشه‌ای قوی دارند و امکان کشت این نهال‌ها در هر فصلی از سال امکان‌پذیر است. در این آزمایش از نمونه‌های پاجوشی و کشت بافتی حاصل از اندام‌زائی مستقیم رقم‌های دیری، زاهدی، پیارم و برحی استفاده شد. این بررسی نشان داد که درختان مشتق‌شده از این روش کشت بافت از لحاظ ژنتیکی عادی هستند و هیچ‌گونه ناهنجاری ژنتیکی ندارند و با رقم‌های پاجوشی خود اختلافی نداشتند. با توجه به اینکه چهار آغازگر PDAAG1023، mPdCIR044 و DP172 و PDAAG1025 تفاوت بین رقم‌های نرم و خشک خرما را نشان دادند، پیشنهاد می‌شود در برنامه‌های بهنژادی رقم‌های خرمای نرم از آغازگرهای PDAAG1023، mPdCIR044 و

بهنژادی رقم‌های خشک خرما از آغازگرهای DP172 و PDAAG1025 استفاده شود. اگرچه در سال‌های اخیر شماری درخت کشت بافتی غیرعادی شناسایی شده است، این بررسی نشان داد که درختان تولیدشده از کشت بافت از لحاظ ژنتیکی به‌احتمال عادی هستند و با رقم‌های پاجوشی خود هیچ اختلافی ندارند. اگرچه در بین ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی نژادگان غیرعادی (برحی) وجود داشت، بنابراین دو احتمال قابل پیش‌بینی است: ۱- اختلال‌های مشاهده‌شده به‌جامانده از اثر ترکیب‌ها یا شرایط محیط کشت در طی مراحل آزمایشگاهی کشت بافت است، و یا اینکه درختان کشت بافتی حاصل از دیگر روش‌های کشت بافت مانند اندام‌زائی غیرمستقیم یا ناشی از پینه‌باعث ناهنجاری می‌شوند، ۲- بین نمونه‌های پاجوشی و کشت بافتی تفاوت وجود دارد ولی نشانگرهای SSR قادر نبوده‌اند آن را نشان دهند، زیرا رقم برحی مشکل‌دار با رقم پاجوشی آن در یک گروه قرار گرفته است و بنابراین ضرورت دارد در بررسی‌های بعدی از شمار نمونه‌های بیشتری از درون رقم‌های کشت بافتی و دیگر نشانگرهای اختصاصی ژنگان مانند SNP و EST-SSR استفاده شود.

REFERENCES

1. Abahmane, L. (2011). Date palm micropropagation via organogenesis. In: Jain SM, Al-Khayri JM, Johnson DV (Ed). *Date Palm Biotechnology*. (pp. 69-90). Springer Science.
2. Akkak, A., Scariot, V., Torello Marinoni, D., Boccacci, P., Beltramo, C. & Botta, R. (2009). Development and evaluation of microsatellite markers in *Phoenix dactylifera* L. and their transferability to other *Phoenix* species. *Biologia Plantarum*, 53(1), 164-166.
3. Al Kaabi, H. H., Zaid, A. & Ainsworth, C. (2005) Plant-off types in tissue culture-derived date palm (*Phoenix Dactylifera* L.). In: *Proceedings of International Workshop on True-to-Typeness of Date Palm Tissue Culture-Derived Plants*. 23-25 May, National Institute of Agronomic Research, Morocco, pp.14-26.
4. AlKhateeb, A. A. (2008). The problems facing the use of tissue culture technique in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Scientific Journal King Faisal University (Basic and Applied Sciences)*, 9, 85-104.
5. Al-Khayri, J. M. (2003). *In vitro* germination of somatic embryos in date palm: effect of auxin concentration and strength of MS salts. *Current Science*, 84:680-683.
6. Al-Ruqaishi, I. A., Davey, M., Alderson, P. & Mayes, S. (2007). Genetic relationships and genotype tracing in date palms (*Phoenix dactylifera* L.) in Oman based on microsatellite markers. *Plant Genetic Resources*, 6(1), 70-72.
7. Al-Wasel, A. S. (2005). Survey Study On: Somaclonal variations in in-vitro derived date palm trees. In: *Proceedings of International Workshop on True-to-typeness of Date Palm Tissue Culture-Derived Plants*. 23-25 May, National Institute of Agronomic Research, Morocco, p. 44.
8. Arabnezhad, H., Bahar, M., Mohammadi, H. R. & Latifian, M. (2012). Development, characterization and use of microsatellite markers for germplasm analysis in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Scientia Horticulturae*, 134, 150-156.
9. Askari, E. & Al-Khalifah, N. S. (2003). Molecular phylogeny of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars from Saudi Arabia by DNA fingerprinting. *Genetics*, 107, 1266-1270.

10. Barrow, S. (1998). A monograph of *Phoenix* L. (Palmae: Coryphoideae). *Kew Bull*, 53, 513-575.
11. Bassam, B. J. & Caetano-Anolles, G. (1993). Silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 42, 181-188.
12. Bekheet, S. (2013). Direct organogenesis of Date palm (*Phoenix dactylifera* L.) for propagation of true-to-type plants. *Scientia Agriculturae*, 4(3), 85-92.
13. Bell, G. I. (1996). Evolution of simple sequence repeats. *Computational Chemistry*, 20(1), 41-48.
14. Chaluvadi, S. R., Khanam, S., Aly, M. A. & Bennetzen, J. L. (2014). Genetic diversity and population structure of native and introduced date palm (*Phoenix dactylifera* L.) germplasm in the United Arab Emirates. *Tropical Plant Biology*, 7, 30-41.
15. Dayani, O., Khezri, A. & Moradi, A. A. (2012). Determination of nutritive value of date palm by-products using *in vitro* and *in situ* measurements. *Small Ruminant Research*, 105, 122-125.
16. Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissues. *Focus*, 12, 11-15.
17. Ebtissam, H. A., Adawy, S., Ismail, S. E. & El-Itriby, H. A. (2008). Molecular characterization of some Egyptian date palm germplasm using RAPD and ISSR markers. *Biotechnology*, (1), 83-98.
18. Elsafi, M. (2014). *Study on the on-farm diversity of local date palm (Phoenix dactylifera L.) genetic resources grown in Northern region of Sudan*. Ph.D. Thesis, University of Swedish, Swedish.
19. Elshibli, S. & Korpelainen, H. (2008). Microsatellite markers reveal high genetic diversity in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) germplasm from Sudan. *Genetica*, 134, 251-260.
20. Food and Agriculture Organization. (2012). Date palm production, from <http://www.fao.org>.
21. Gurevich, V., Lavi, U. & Cohen, Y. (2005). Genetic variation in date palms propagated from offshoots and tissue culture. *Horticultural Science*, 130(1), 46-53.
22. Hamwiah, A., Farah, J., Moussally, S., Al-Sham, K., Almer, K., Khierallah, H., Udupa, S., Lababidi, S., Malek, J. A., Aaouine, M. & Baum, M. (2010). Development of 1000 microsatellite markers across the date palm (*Phoenix dactylifera* L.) genome. *Acta Horticulture*, 882, 269-277.
23. Hedrick, P. W. (1999). *Genetic of Populations* (2nd ed.). Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, MA, USA.
24. Jain, M. (2007). Recent advances in date palm tissue culture and mutagenesis. *Acta Horticulture*, 736, 205-211.
25. Khan, S. & Bi, T. B. (2012). Direct shoot regeneration system for date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Dhakki as a means of micropropagation. *Pakistan Journal of Botany*, 44(6), 1965-1971.
26. Khanam, S., Sham, A., Bennetzen, J. & Aly, M. (2012). Analysis of molecular marker-based characterization and genetic variation in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Crop Science*, 6(8), 1236-1244.
27. Khierallah, H., Bader, S., Baum, M. & Hamwiah, A. (2011). Genetic diversity of Iraqi date palms revealed by microsatellite polymorphism. *Horticulture Science*, 136(4), 282-287.
28. Kriaa, W., Masmoudi, F. & Drira, N. (2007). *In vitro culture of date palm using mature female flower explants*. In: *Proceedings of the fourth Symposium on Date Palm*, 5-8 May, Saudi Arabia, King Faisal University, Al-Hassa. p.146.
29. Kumar, N., Singh, A.S., Modi, A., Patel, A. R., Gajera, B. & Subhash, N. (2010). Genetic stability studies in 21. Micropropagated date palm (*Phoenix dactylifera* L.) plants using microsatellite marker. *Forest Science*, 26, 31-36.
30. Moghaieb, R. E., Abdel-Hadi, A. A. & Ahmed, M. R. (2011). Genetic stability among date palm plantlets regenerated from petiole explants. *Biotechnology*, 10, 14311-14318.
31. Mohammadi, S. & Prasanna, B. M. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants-salient statistical tools and consideration. *Crop Science*, 43, 1235-1248.
32. Nei, M. (1983). Genetic polymorphism and the role of mutation in evolution. *Genetics*, 165-190.
33. Peakall, R. & Smouse, P. E. (2012). Gen AIX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research an update. *Bioinformatics*, 28, 2537-2539.
34. Racchi, M., Bove, M., Turchi, A., Bashir, G., Battaglia, M. & Camussi, A. (2013). Genetic characterization of Libyan date palm resources by microsatellite markers. *Biotechnology*, 4, 21-32.
35. Sefc, K. M., Lopes, M. S., Lefort, F., Botta, R., Roubelakis-Angelakis, K. A., Ibanez, J., Pejic, I., Wanger, H. W., Glossl, J. & Steinkellner, H. (2000). Microsatellite variability in grapevine cultivars from different European regions and evaluation of assignment testing to assess the geographic origin of cultivar. *Theoretical and Applied Genetics*, 100, 498-505.
36. Younis, R. A., Ismail, O. M. & Soliman, S. S. (2008). Identification of sex-specific DNA markers for date palm (*Phoenix dactylifera* L.) using RAPD and ISSR techniques. *Agriculture & Biology Science*, 4, 287-184.
37. Zaid, A. & De Wet, P. F. (2002). *Date Palm propagation*. Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome 73-105.
38. Zehdi, S., Trifi, M., Billotte, N., Marakchi, M. & Pintaud, J. C. (2004). Genetic diversity of Tunisian date palms (*Phoenix dactylifera* L.) revealed by nuclear microsatellite polymorphism. *Hereditas*, 141, 278-287.