مقاله پژوهشی

ارزیابی ثبات ژنتیکی در گیاهان کشت بافتی مشتق از درخت خرما با استفاده از نشانگرهای SSR

آتنا بستاقی[۱]، جعفر احمدی[۲]*، رضا ضرغامی[۳] و مهدی زهراوی[۴]

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۳/۹- تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۱۴)

چکیده

نخل خرما (*Phoenix dactylifera* L.) گیاهی تک‌لپه، دیپلوئید و چندساله با عمر طولانی است که از اهمیت اقتصادی بالایی در ایران برخوردار است. جنین‌زایی غیرجنسی یکی از روش‌های موفق برای تکثیر انبوه در ارقام تجاری نخل خرما و ابزاری امیدوارکننده جهت تکثیر توده‌ای رقم‌های برتر در سطح وسیع محسوب می‌شود. روش کشت بافت در خرما، از جمله جنین‌زایی غیرجنسی می‌تواند منجر به تغییرات سوماکلونال که ناشی از تنوع ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی است، شود. عدم ثبات ژنتیکی در گیاهان مشتق شده از کشت بافت منجر به عدم تمایل باغداران خرما به استفاده از این نوع گیاهان کشت بافتی می‌شود. در این تحقیق، پایداری ژنتیکی ۱۸۰ گیاه کشت بافتی حاصل از جنین‌زایی غیرجنسی در رقم Medjool خرما به همراه گیاه مادری Medjool با استفاده از ۲۴ جفت آغازگر SSR بررسی شد. از شش رقم خرمای شاهد کبکاب، پیارم، استعمران، دیری، زاهدی و برحی جهت غربال آغازگرهای SSR چندشکل استفاده گردید. در بررسی نتایج، هیچ یک از آغازگرها نتوانستند تفاوتی بین نهال‌های حاصل از کشت بافت و گیاه مادری نشان دهند. نتایج این مطالعه نشان داد که گیاهان خرمای تکثیر شده با روش کشت بافت از نظر ژنتیکی مشابه گیاه مادری مجول بودند. بنابراین، جنین‌زائی غیرجنسی به عنوان روش سریع و ارزان برای تکثیر نخل خرمای رقم Medjool برای تولید نهال توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: پایداری، تنوع ژنتیکی، تنوع سوماکلونال، خرما، نشانگر

۱- دانشجوی کارشناسی‌ارشد ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره)، قزوین، ایران.

۲- استاد، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره)، قزوین، ایران.

۳- استادیار پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

۴- استادیار موسسه تحقیقات نهال و بذر کرج، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی. تهران، ایران.

* پست الکترونیک: j.ahmadi@eng.ikiu.ac.ir

مقدمه

نخل خرما (*Phoenix dactylifera* L.) گیاهی دیپلوئید 2n=36، تک‌لپه، دوپایه، دگرگشن و همیشه‌سبز از خانواده Arecaceae می‌باشد. اندازه ژنوم خرما حدود ۶۵۸ مگابیت برآورد شده است (اوتمانی[1] و همکاران، ۲۰۱۰). خرما دومین محصول باغی کشور و ایران دومین تولیدکننده خرما در جهان محسوب می‌شود، اما در حال حاضر به‌دلیل کاهش تولید خرما در ایران، جایگاه کنونی ما به‌خطر افتاده است. تکثیر جنسی نخل خرما توسط بذر است و تکثیر رویشی توسط پاجوش صورت می‌یابد که به‌دلیل معایب این روش‌ها خصوصاً تکثیر در سطح وسیع به کشت بافت روی آورده شده است. کشت بافت تکنیکی است که برای تکثیر سریع تعدادی درختان میوه دائمی از جمله نخل خرما استفاده می‌شود. از مزایای کشت بافت نخل می‌توان به‌تکثیر سریع در سطح وسیع، تکثیر ارقام عاری از بیماری و آفت، تولید گیاهان یکنواخت از لحاظ ژنتیکی، تکثیر گیاهان نر با دانه گرده برتر و همچنین انتقال سریع و آسان مواد گیاهی در نواحی مختلف اشاره کرد. تکثیر درون‌شیشه‌ای جایگزین مؤثر و کارآمد به‌جای تکثیر رویشی معمول است که تکثیر سریع و حفظ ثبات ژنتیکی رقم‌های برتر را تضمین می‌کند (الخیری[2]، ۲۰۰۵ و ۲۰۰۷). تکثیر درون‌شیشه‌ای نخل خرما با دو روش اندام‌زایی مستقیم و جنین‌زایی غیرجنسی انجام می‌گیرد که به‌طور گسترده در مناطقی از جهان که در آن خرما به‌عنوان محصول مهم محسوب می‌شود، پذیرفته شده است (بانسالی[3]، ۲۰۱۰). جنین‌زایی غیرجنسی که رویدادی مورفوژنتیک است در شرایط *in vitro* با استفاده از ریزنمونه‌های بافت گیاهی گوناگون در محیط کشت حاوی تنظیم‌کننده‌های رشد تولید می‌گردد (گارسیا[4] و همکاران، ۲۰۱۹). جنین‌زایی غیرجنسی یکی از روش‌های موفق برای تکثیر انبوه در ارقام بومی و تجاری نخل خرما در سطح وسیع در سرتاسر دنیا محسوب می‌شود (کونرت[5] و همکاران، ۲۰۰۳). در این روش به‌جای تشکیل یک اندام مستقیم از ریزنمونه، یک توده سلول تمایز نیافته به‌نام کالوس تولید می‌شود (الخیری و نایک[6]، ۲۰۱۷). جنین‌زایی غیرجنسی جایگزینی برای تکثیر گیاهان در تعداد بالا و ابزاری امیدوارکننده جهت تکثیر توده‌ای رقم‌های برتر می‌باشد (لیپاوسکا[7] و همکاران، ۲۰۰۴).

تنوع سوماکلونال حاصل طیف وسیعی از جهش‌ها شامل جهش‌های نقطه‌ای، تغییر در آرایش کروموزومی و تغییر در تعداد آن‌ها است. احتمال تغییرات ژنتیکی در هسته سلول‌ها معمولاً با زیاد شدن سن کشت افزایش می‌یابد و این تغییرات به‌شرایط کشت و نیز ترکیبات محیط کشت به‌ویژه تنظیم‌کننده‌های رشدی، نوع ریزنمونه و تعداد دفعات واکشت بستگی دارد. بنابراین تنوع سوماکلونال فرآیندی است که روی ژن‌ها و در نهایت مورفولوژی گیاه اثر می‌گذارد و باعث تغییر در بیان ژن و کنترل آن نیز می‌شود. بسیاری از پدیده‌ها با تغییرات ژنتیکی و در واقع با تغییر الگوی بیان ژن‌ها در ارتباط هستند و می‌توانند سبب ناپایداری ژنتیکی شوند. یکی از این پدیده‌ها که نقش بسیار مهمی در ایجاد این تغییرات در گیاهان ایفا می‌نماید، متیلاسیون DNA است. از سوی دیگر تغییرات محیطی و انواع تنش‌های محیطی می‌تواند تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی را به‌همراه وقوع متیلاسیون در DNA در پی داشته باشد. گزارش‌هایی وجود دارد که بیان می‌کند تنوع سوماکلونال وابسته به‌پدیده متیلاسیون است و عمدتاً با وقوع متیلاسیون در نوکلئوتیدهای سیتوزین روی می‌دهد. مطالعه تنوع فنوتیپی و ژنتیکی برای شناسایی نمونه‌های مشابه جهت حفظ، ارزیابی، تفکیک نمونه‌ها از همدیگر و استفاده از ذخایر ژنتیکی بسیار اهمیت دارد. با توجه به‌اینکه تنوع سوماکلونال بیشتر در اثر وقوع جهش‌ها رخ می‌دهد، بنابراین باید از روش‌های ارزیابی مناسبی برای تشخیص این جهش‌ها در کشت بافت استفاده کرد. تحقیقات متعددی به‌منظور کشف این تنوع انجام شده است که استفاده از آغازگرهای DNA به‌دلیل دقت بالا و امکان بررسی تعداد زیادی نمونه در زمان کوتاه از بهترین روش‌ها می‌باشد. راهکارهای مختلفی جهت بررسی تنوع سوماکلونال در گیاهان حاصل از کشت درون شیشه وجود دارد که استفاده از نشانگرهای ملکولی در مقایسه با دیگر روش‌ها از مزایای بهتری برخوردار است. آغازگرهای مولکولی به‌عنوان ابزار قابل اعتماد، قدرتمند و سریع در تجزیه و تحلیل تغییرات سوماکلونال در جنین‌زایی غیرجنسی گیاهان همیشه سبز و گل‌داران استفاده می‌شوند

1. Othmani
2. Al-Khayri
3. Bhansali
4. Garcia
5. Kunert
6. Al-Khayri and Naik
7. Lipavska

(لوپز[1] و همکاران، ۲۰۰۶).

تاکنون آغازگرهای DNA متفاوتی همچون RFLP[2]، AFLP[3]، ISSR[4] و SSR[5] شناسایی شده‌اند که برای انگشت‌نگاری و ارزیابی ثبات ژنتیکی در گیاهان حاصل از ریزازدیادی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. تحقیقات خانام[6] و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که ریزماهواره‌های هسته‌ای در بین همه آغازگرهای موجود، بیشترین ویژگی‌های مطلوب لازم برای بررسی تنوع و فیلوژنی نخل خرما را دارند. از آغازگرهای ریزماهواره در ارزیابی تنوع ژنتیکی در ذخایر توارثی خرمای متعلق به‌کشورهای مختلف از جمله تونس (هلا[7] و همکاران، ۲۰۰۴)، سودان (الشیبلی و کورپلاینین[8]، ۲۰۱۰) و قطر (مویسالی[9] و همکاران، ۲۰۱۰) استفاده و میزان بالایی از تنوع ژنتیکی گزارش شده است. همچنین از آغازگرهای ریزماهواره برای غربالگری و بررسی تنوع ژنتیکی میان رقم‌های خرمای مشتق شده از روش جنین‌زایی غیرجنسی و تشخیص تنوع بین رقم‌های مختلف از عمان، بحرین، عراق و مراکش استفاده شده است (الروقایشی[10] و همکاران، ۲۰۰۸). در پژوهشی پایداری ژنتیکی گیاهان خرمای ریزازدیادی شده در ۲۷ گیاه انتخاب شدهٔ تصادفی با استفاده از ۱۶ آغازگر ریزماهواره بررسی شد و هیچ کدام از آغازگرها تنوعی بین خرمای ریزازدیادی شده و گیاه مادری را نشان ندادند. این نتایج نشان داد جنین‌زایی غیرجنسی برای ریزازدیادی خرما، ثبات ژنتیکی حتی پس از دورهٔ ۱۶۸ هفته‌ای را حفظ می‌کند (کومار[11] و همکاران، ۲۰۱۰). در پژوهشی با استفاده از ۱۰ آغازگر RAPD ثبات ژنتیکی میان گیاهچه‌های خرمای باززایی شده از ریزنمونه‌های برگچهٔ رقم‌های خرمای برحی و ناشناخته را بررسی کردند. از نظر ژنتیکی اختلافی بین نمونه‌های پاجوشی و کشت بافتی مشاهده نشد (مقیبب[12] و همکاران، ۲۰۱۱).

بررسی ثبات ژنتیکی گیاهچه‌ها و نهال‌های کشت بافتی حاصل از پایه مادری رقم مجول خرما با استفاده از آغازگرهای SSR و نیز تعیین آغازگرهای ریزماهواره‌ای مناسب برای مطالعه پایداری ژنتیکی جمعیت نخل خرما (رقم مجول) از جمله اهداف تحقیق حاضر به شمار می‌آید.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق شامل گیاهچه‌های سال اولی تا نهال‌های چند ساله حاصل از کشت بافت نخل خرما (رقم مجول) موجود در گلخانه پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران به همراه گیاه مادری (رقم مجول) موجود در پژوهشگاه خرما و میوه‌های گرمسیری اهواز بود. گیاهچه‌های کشت بافتی مورد بررسی در این پژوهش از محیط کشت بهینه‌سازی شده حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر BAP برای جنین‌زایی و تیمار ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NOA برای تولید شاخساره و ریشه‌زایی تولید شده بودند. همچنین از شش رقم خرمای شاهد (کبکاب[13]، پیارم[14]، استعمران[15]، دیری[16]، زاهدی[17] و برحی[18]) جهت تشخیص و غربال جفت آغازگرهای SSR که بین ارقام چندشکلی را نشان دهند استفاده گردید.

نمونه‌برداری جهت استخراج DNA

جهت استخراج DNA از برگ گیاهان کشت بافتی و ارقام مادری و شاهد نمونه برداری و توسط ظرف حاوی نیتروژن مایع به‌آزمایشگاه منتقل گردیدند. در آزمایشگاه نمونه‌های برگ در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج DNA نگهداری شدند. در این تحقیق ۱۸۰ گیاه کشت بافتی تهیه و با گیاه مادری مقایسه شدند. برای ارقام شاهد و رقم مادری مجول از برگ‌های پاجوش نخل خرما استفاده شد.

استخراج DNA ژنومی و تعیین کمیت و کیفیت

استخراج DNA ژنومی با استفاده روش تغییر یافته CTAB انجام گرفت (مارگاریتوپولوس[19] و همکاران، ۲۰۰۳). جهت تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد و اسپکتروفتومتری با دستگاه نانودراپ در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر استفاده شد. غلظت

1. Lopes
2. Restriction Fragment Length Polymorphism
3. Amplified Fragment Length Polymorphism
4. Inter Simple Sequence Repeat
5. Microsatellite or Simple Sequence Repeat
6. Khanam
7. Hela
8. Elshibli and Korpelainen
9. Moussally
10. Al-Ruqaishi
11. Kumar
12. Moghaieb
13. Kabkab
14. Piyarom
15. Stamaran
16. Deiri
17. Zahedi
18. Barhi
19. Margaritopoulos

نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین و غلظت DNA تمام نمونه‌ها برای یک غلظت بهینه مشخص جهت استفاده در واکنش PCR رقیق‌سازی شدند.

آغازگرهای ریزماهواره‌ای SSR و شرایط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز طبق روش رودر[1] و همکاران (۱۹۹۸) با کمی تغییرات در دستگاه ترموسایکلر (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) اجرا گردید. اجزای PCR، شامل ۱۰µl Master Mix (تهیه شده از شرکت Biofact)، ۱µl آغازگر Forward (۱۰ میکرومول)، ۱µl آغازگر Reverse (۱۰ میکرومول)، ۱µl DNA ژنومی (۵۰ نانوگرم)، ۷µl آب دیونیزه در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر تهیه گردید. چرخه حرارتی PCR به صورت ۳ دقیقه واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، سپس ۳۵ سیکل به‌صورت ۳۰ ثانیه واسرشته سازی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه اتصال آغازگر در دمای TM (بسته به‌آغازگر متفاوت بوده)، ۳۰ ثانیه مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت یک مرحله ۷ دقیقه بسط انتهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، برنامه‌ریزی و اجرا گردید. در این تحقیق از ۲۴ جفت آغازگر ریزماهواره‌ای SSR براساس تحقیقات قبلی استفاده گردید که در جدول (۱) آورده شده است (الخیری و همکاران، ۲۰۱۷).

دمای بهینه برای اتصال هر آغازگر در طی واکنش PCR، با تعریف کردن شیب دمایی برای دستگاه ترموسایکلر مشخص گردید. شیب دمایی براساس دمای کاتالوگ پیشنهادی شرکت سازنده و دمای بیان شده در مقاله رفرنس انتخاب گردید. برای الکتروفورز محصول PCR و آشکارسازی قطعات تکثیر شده از ژل آگارز- متافور ۳ درصد با محلول TBE 1X استفاده شد. الکتروفورز با ولتاژ ثابت ۹۰ وات به‌مدت ۱۵۰ دقیقه انجام شد. از DNA Ladder 50 bp (شرکت thermos scientific) جهت تعیین اندازه قطعه‌های تکثیر شده و از دستگاه ژل‌داک برای عکس‌برداری باندها استفاده شد.

نتایج و بحث

استخراج DNA ژنومی

اولین گام در مباحث مولکولی استفاده از روش بهینه استخراج DNA در گیاه هدف می‌باشد. با بارگذاری حجم‌های مساوی از DNA بافت‌های برگی در ژل آگارز و بررسی داده‌های اسپکتروفتومتری، استخراج DNA با روش CTAB تغییر یافته (مقییب و همکاران، ۲۰۱۱) کمیت و کیفیت مطلوبی از DNA نمونه‌های مورد بررسی را نشان داد. بستاقی و همکاران (۱۳۹۷) پیشتر کارائی روش CTAB تغییر یافته در کمیت مناسب DNA استخراج شده از بافت‌های برگی خرما رقم مجول را گزارش کرده‌اند. از عوامل مهمی که در کیفیت‌سنجی DNA در نظر گرفته می‌شود، سالم بودن رشته DNA و عدم شکستگی آن است که در این مطالعه نمونه‌های فاقد شکستگی، کشیدگی و آلودگی DNA تهیه و در PCR استفاده شد. به‌طور کلی، آلاینده‌های مرتبط با DNA گیاهی مثل ترکیب‌های پلی‌فنلی، پلی‌ساکاریدها و RNA می‌توانند واکنش‌های PCR را تحت تأثیر قرار دهند (کریشنا[2] و همکاران، ۲۰۱۲). ترکیب‌های فنلی موجود در برگ خرما نظیر querceti isorhamnetinhetersides، (+)-catechin، (-)-epicatechin، (dactyliferic acid) 5-caffeoylshikimic acid و ایزومرهای موضعی آن (3-caffeoylshikimic acid 4- caffeoylshikimic acid) می‌توانند جداسازی DNA با کیفیت خوب را مختل کنند (عاریف[3] و همکاران، ۲۰۱۰). به همین دلیل، جهت اطمینان از کارکرد صحیح DNAهای استخراج شده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز از ژن داخلی PUV استفاده شد (شکل ۱) و برای نمونه‌هایی که در این واکنش تکثیر نداشتند، استخراج DNA آن‌ها تکرار گردید.

بهینه‌سازی شرایط PCR و آغازگرهای ریزماهواره‌ای

در این تحقیق بهینه‌سازی شرایط PCR برای ۲۴ جفت آغازگر SSR با توالی تکراری یک تا شش موتیف نوکلئوتیدی مورد بررسی قرار گرفتند. شرایط دمایی اتصال آغازگرها در واکنش‌های PCR با استفاده از PCR گرادیانت در محدوده ۴۷ تا ۶۰ درجه سانتی‌گراد بهینه گردید و نتایج در جدول ۲ نشان داده شده است.

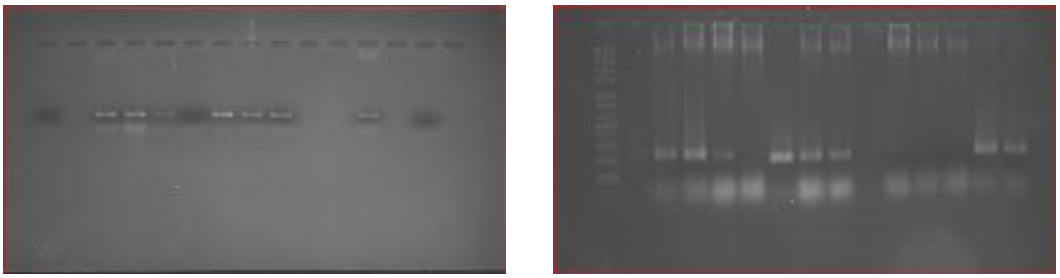
کارائی آغازگرهای SSR در بررسی تنوع سوماکلونال

به منظور بررسی کارایی آغازگرهای SSR و تشخیص تنوع سوماکلونی احتمالی در بین گیاهان حاصل از کشت بافت به‌روش جنین‌زایی غیرجنسی نخل خرما، هر آغازگر SSR ابتدا با چند رقم شاهد خرما در واکنش PCR جهت آزمون چندشکلی بررسی شدند. از ۲۴ جفت آغازگر SSR، هشت

1. Roder
2. Krishna
3. Arif

جدول ۱- آغازگرهای ریزماهواره‌ای SSR جهت بررسی ثبات ژنتیکی گیاهان کشت بافتی خرما

ردیف	نام آغازگر	آغازگر رفت (3'-5')	آغازگر برگشت (3'-5')	دامنه
۱	mPCIR05	GGTGTGGAGTAATCATGTAGTAG	GCTCGGTTGGACTTGTTCT	142-157
۲	mPdCIR12	GCTCGGTTGGACTTGTTCT	GGAGGTGGCTTTGTAGTAT	219-257
۳	PdCIR33	CAAGACCCAAGGCTAAC	CCATTTATCATTCCCTCTCTTG	306-321
۴	mPdIR74	CCATTTATCATTCCCTCTCTTG	CTTGGTAGCTGCGTTTCTTG	205-227
۵	mPdCIR78	CCCCTCATTAGGATTCTAC	GCACGAGAAGGCTTATAGT	207-220
۶	mdCIR8	CTTGGTAGCTGCGTTTCTTG	CCCGAAGAGACGCTATT	175-199
۷	mdCIR91	GAGAGAGGGTGGTGTTATT	TTCATCCAGAACCACAGTA	189-197
۸	PAT1	TTCATCCAGAACCACAGTA	GAGAGAGGGTGGTGTTATT	103-123
۹	PAT3	GAGAGAGGGTGGTGTTATT	AGTTTCTTGCCCCTGTTCTTTC	186-209
۱۰	PAT4	TTCATCCAGAACCACAGTA	TGTTTCATGGTGCTGGAGAATGAA	201-302
۱۱	DCAT01	TTAGTAGACTCCCCACCGTCC	TGTTTCATTGCTGGAGAATGAA	149-185
۱۲	DCAT02	TTTACCCCTCGGCCAAATGTAA	TTTGGACTAGTCCCTCCCTCCC	141-163
۱۳	DCAT07	TGCTGCAAATCTAGGTCACGAG	TTTGGACTAGTCCCTCCCTCCC	131-157
۱۴	DCAT08	TTTGGACTAGTCCCTCCCTCCC	TCTCCATCTCCCTTTTTCTTCTGCTACTC	123-149
۱۵	DCAT15	ACAGAGAGGTGGAGTTTTCGGATT	TCTTCCTTTCAAACCAGCAAGCT	127-163
۱۶	DCAT22	TCTTCCTTTCAAACCAGCAAGCT	ATGAAAACGTGCCAAATGTC	130-138
۱۷	mPdC03	ACAAACGGCGATGGGATTAC	TCTTCCTTTCAAACCAGCAAGCT	190-201
۱۸	mPdC63	CTTTTATGTGGTCTGAGAGA	TCTCTGATCTTGGGTTCTGT	121-156
۱۹	mPdC50	CTGCCATTTCTTCTGAC	CTTTTATGTGGTCTGAGAGA	201-240
۲۰	mPdC90	GTTTAAAGCCTTCTCAAGATAGCCTCAG	GCAGTCAGTCCCTCATA	142-175
۲۱	MPDC6	AATCAGGGAAACCACAGCCA	GTTTAAAGCCTTCTCAAGATAGCCTC	142-170
۲۲	MPDC12	ACTAACATAAGGACAGTGCTATGTGATTG	GTTTAGATCTTGCATGGCAACGC	145-167
۲۳	MPDC18	CATCGTTGATTCCTAACCCCTC	ACTAACATAAGGACAGTGCTATGTGATTG	111-150
۲۴	MPDC006	GCCACAGGAAGCACATTTAG	ACTAACATAAGGACAGTGCTATGTGA	195-210



شکل۱- الگوی نواری تکثیر شده برای ژن داخلی PUV در DNAهای استخراج شده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

جفت آغازگر mPdIR74، PdCIR33، mPdCIR12، DCAT08، mPdC03، DCAT07، DCAT15، PAT31 به خاطر تولید باندهای تک‌شکل و همسان در تمام ارقام شاهد قادر به‌تمایز رقم‌های مختلف خرما و ظهور تنوع ژنتیکی نبودند و بنابراین از این آغازگرها در بررسی تنوع ۱۸۰ نمونه کشت بافتی استفاده نشد. در توافق با این نتایج، آغازگرهای DCAT07، mPdC03، DCAT08 و mPdCIR12 در پژوهش شهبازی و همکاران (۱۳۹۶) نیز قادر به‌تمایز رقم‌ها

و بیان چند شکلی نبوده است. در مطالعه بیلوته[1] و همکاران (2004) در بررسی تنوع نخل خرما با آغازگرmPdCIR12 تعداد ۱۲ باند و ۷۲ درصد هتروژنی، با آغازگر mPdC03 ۱۱ باند و ۳۵ درصد هتروژنی، با آغازگر PdCIR33 ۱۲ باند و ۲۰ درصد هتروژنی و با آغازگر mPdIR74 ۱۵ باند و ۷۱ درصد هتروژنی مشاهده نمودند. در مطالعه راچی[2] و همکاران (۲۰۱۴) در بررسی تنوع نخل خرما با آغازگر mPdCIR12 تعداد ۶ باند و ۹۰ درصد هتروژنی، با آغازگر PdCIR33 ۵ باند و ۷۱ درصد هتروژنی با آغازگرDCAT08 ۸ باند و ۸۸ درصد هتروژنی با آغازگرDCAT07 ۶ باند و ۴۵ درصد هتروژنی و با آغازگرmPdIR74 ۹ باند و ۹۱ درصد هتروژنی مشاهده نمودند. الخیری و همکاران (۲۰۱۷) نیز آغازگر mPdCIR12 با ۵ آلل و ۷۷ درصد هتروژنی، آغازگر PdCIR33 با ۳ آلل و صفر درصد هتروژنی، آغازگر DCAT01 با ۷ آلل و ۵۱ درصد هتروژنی، آغازگر DCAT15 با ۶ آلل و ۴۸ درصد هتروژنی و آغازگر mPdC50 با ۱۲ آلل و ۹۲ درصد هتروژنی در ارقام متفاوت نخل خرما را گزارش دادند.

آغازگر MPDC006 چند شکلی در بین ارقام شاهد نشان داد (شکل ۲-A) و برای بررسی تنوع سوماکلونال ۱۸۰ نمونه کشت بافتی استفاده شد که در تمام نمونه‌ها باندهای تک شکل تکثیر کرده و عدم تنوع سوماکلونال در گیاهان کشت بافتی را نشان داد (شکل ۲-B). نتایج آغازگر MPDC006 با نتایج پژوهش شهبازی و همکاران (۱۳۹۶) در تضاد است و در این تحقیق قادر به‌تمایز ارقام متفاوت ژنتیکی نخل خرما بود. آغازگر MPDC12 چند شکلی در بین ارقام شاهد نشان داد (شکل ۲-A) و تمام نمونه‌ها باندهای تک‌شکل تکثیر کرده و عدم تنوع سوماکلونال در گیاهان کشت بافتی را نشان داد (شکل ۲-B). در توافق با این نتیجه، الخیری و همکاران (۲۰۱۷) نیز برای آغازگر MPDC12 ۴ آلل و ۱۰۰ درصد هتروژنی در ارقام متفاوت نخل خرما را گزارش کرده‌اند. آغازگر PAT4 چند شکلی در بین ارقام شاهد نشان داد (شکل ۲-A) و تمام نمونه‌ها باندهای تک‌شکل تکثیر کرده و عدم تنوع سوماکلونال در گیاهان کشت بافتی را نشان داد (شکل ۲-B). راچی و همکاران (۲۰۱۴) نیز در بررسی تنوع نخل خرما برای آغازگر PAT4 تعداد ۶ باند و ۷۸ درصد هتروژنی مشاهده نمودند. آغازگر mPdC63 چندشکلی در بین ارقام شاهد نشان داد (شکل ۲-A) و تمام نمونه‌ها باندهای تک‌شکل تکثیر کرده و عدم تنوع سوماکلونال در گیاهان کشت بافتی را نشان داد (شکل ۲-B). بیلوته و همکاران (۲۰۰۴) نیز در بررسی تنوع نخل خرما برای آغازگر mPdC63 تعداد ۸ باند و ۳۵ درصد هتروژنی مشاهده نمودند.

آغازگر mPdCIR78 چندشکلی در بین ارقام شاهد نشان داد (شکل ۲-A) و تمام نمونه‌ها باندهای تک‌شکل تکثیر کرده و عدم تنوع سوماکلونال در گیاهان کشت بافتی را نشان داد (شکل ۲-B). بیلوته و همکاران (۲۰۰۴) در بررسی تنوع نخل خرما با آغازگر mPdCIR78 تعداد ۱۲ باند و ۷۲ درصد هتروژنی مشاهده نمودند.

راچی و همکاران (۲۰۱۴) در بررسی تنوع نخل خرما با آغازگر mPdCIR78 تعداد ۱۱ باند و ۸۵ درصد هتروژنی مشاهده نمودند. الخیری و همکاران (۲۰۱۷) نیز برای

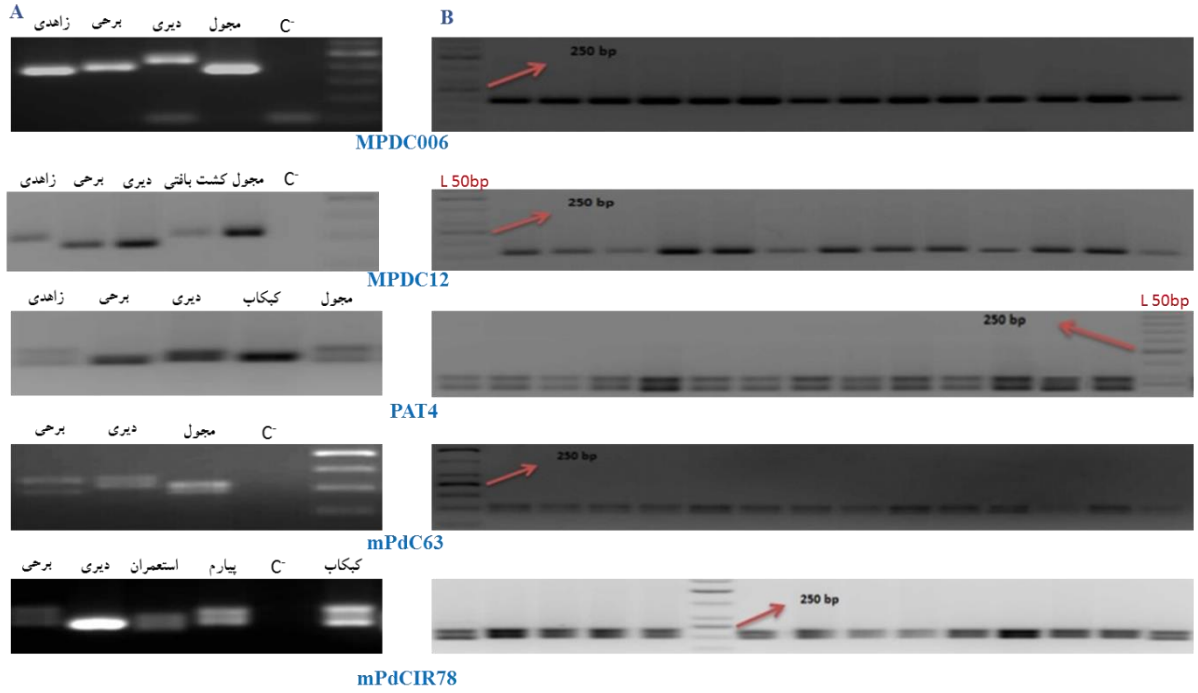
جدول ۲- دمای اتصال بهینه برای آغازگرهای SSR جهت بررسی ثبات ژنتیکی گیاهان کشت بافتی خرما

آغازگر Primer	دمای اتصال °c Anneal Tm	آغازگر Primer	دمای اتصال °c Anneal Tm	آغازگر Primer	دمای اتصال °c Anneal Tm
mPCIR05	۵۶	DCAT07	۵۶	MPDC12	۵۷
mPdCIR12	۵۰	DCAT08	۵۰	MPDC18	۵۶
PdCIR33	۵۴	DCAT15	۵۴	MPDC006	۵۴
mPdIR74	۵۲	DCAT22	۵۲	PAT4	۵۴
mPdCIR78	۵۰	mPdC03	۵۶	DCAT01	۵۸
mdCIR8	۴۸	mPdC63	۵۰	DCAT02	۶۰
mdCIR91	۵۰	mPdC50	۴۸	MPDC6	۶۰
PAT1	۵۲	mPdC90	۵۱	PAT3	۵۵

1. Billotte

2. Racchi

آغازگر mPdCIR78 ۸ آلل و ۶۹ درصد هتروزنی در ارقام متفاوت نخل خرما گزارش کردند. در عدم توافق با نتایج این تحقیق، آغازگر mPdCIR78 در پژوهش شهبازی و همکاران (۱۳۹۶) قادر به‌تمایز ارقام متفاوت نخل خرما نبود.



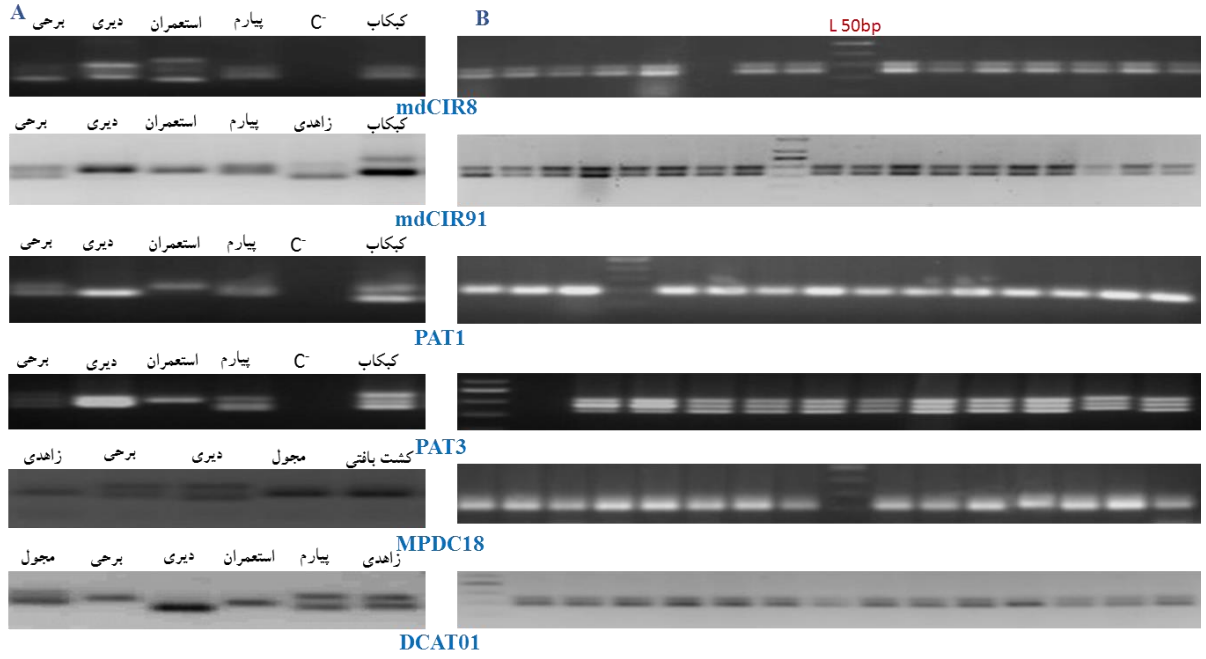
شکل ۲- الگوی باندی آغازگرهای SSR (MPDC006، MPDC12، PAT4، mPdC63 وmPdCIR78) در (A) ارقام شاهد و (B) نمونه‌های کشت بافتی رقم مجول خرما. L: Ladder 50 bp

آغازگر mdCIR8 چند شکلی در بین ارقام شاهد نشان داد (شکل ۳-A) و در بررسی تنوع سوماکلونال ۱۸۰ نمونه کشت بافتی باندهای تک‌شکل تکثیر کرده و عدم تنوع سوماکلونال در گیاهان کشت بافتی را نشان داد (شکل ۳-B). در توافق با این نتیجه، بیلوته و همکاران (۲۰۰۴) در بررسی تنوع خرما با آغازگر mdCIR8 تعداد ۱۴ باند و ۷۸ درصد هتروزنی مشاهده نمودند. راچی و همکاران (۲۰۱۴) در بررسی تنوع خرما با آغازگرmdCIR8 تعداد ۸ باند و ۸۳ درصد هتروزنی مشاهده نمودند. همچنین الخیری و نایک (۲۰۱۷) با آغازگر mdCIR8 ۱۵ آلل و ۷۶ درصد هتروزنی در ارقام متفاوت خرما را گزارش کرده‌اند. آغازگر mdCIR91 چندشکلی در بین ارقام شاهد نشان داد (شکل ۳-A) و نیز عدم تنوع سوماکلونال در ۱۸۰ گیاه کشت بافتی را نشان داد (شکل ۳-B). در توافق، بیلوته و همکاران (۲۰۰۴) در بررسی تنوع خرما با آغازگر mdCIR91 تعداد ۱۸ باند و ۵۶ درصد هتروزنی مشاهده نمودند. همچنین تعداد ۷ باند و ۷۷ درصد هتروزنی (راچی و همکاران، ۲۰۱۴) و ۷ آلل و ۲۵ درصد هتروزنی (الخیری و نایک، ۲۰۱۷) در بررسی تنوع نخل خرما با آغازگر mdCIR91 گزارش شده است.

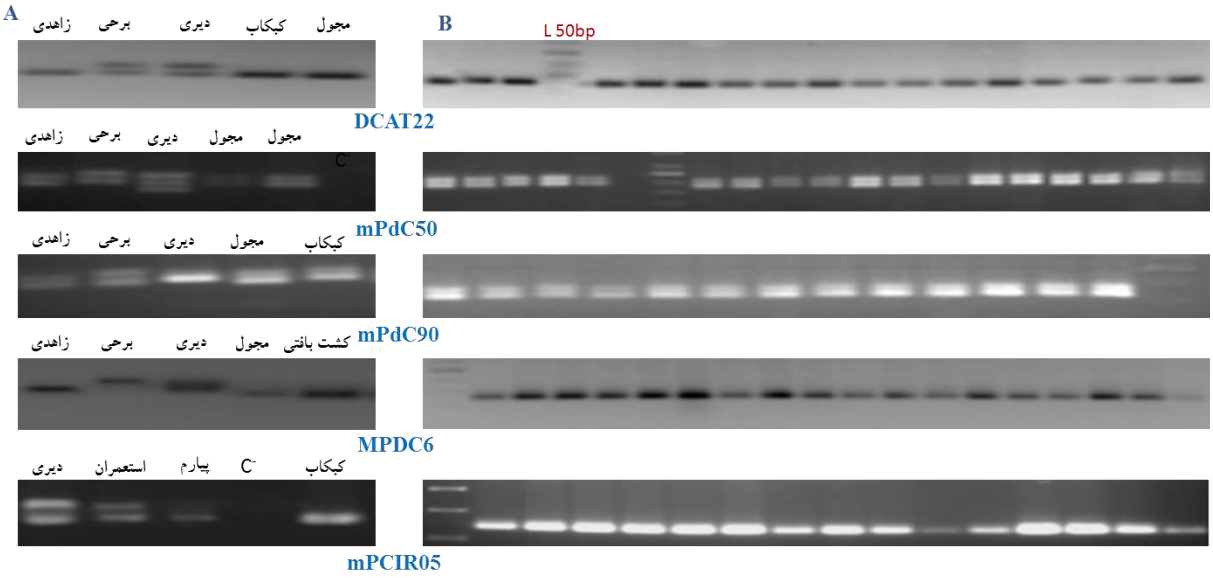
آغازگر mdCIR91 در پژوهش شهبازی و همکاران (۱۳۹۶) قادر به‌تمایز رقم‌ها و بیان چند شکلی نبوده است که با نتایج این تحقیق در تضاد است.

آغازگرهای PAT1، PAT3، DCAT01 و MPDC18 چند شکلی در بین ارقام شاهد را نشان دادند (شکل ۳-A) و نیز عدم تنوع سوماکلونال در ۱۸۰ گیاه کشت بافتی را اثبات کردند (شکل ۳-B). در توافق با این نتایج، راچی و همکاران (۲۰۱۴) در بررسی تنوع نخل خرما برای آغازگرPAT1 تعداد ۴ باند و ۲۳ درصد هتروزنی، برای آغازگرPAT3 تعداد ۷ باند و ۸۵ درصد هتروزنی و برای آغازگرDCAT01 تعداد ۵ باند و ۷۵ درصد هتروزنی را مشاهده و گزارش نموده‌اند. در مطالعه الخیری و نایک (۲۰۱۷) نیز برای DCAT01 ۷ آلل و ۱۰ درصد هتروزنی در ارقام متفاوت خرما گزارش شده است.

آغازگر DCAT22 چندشکلی در بین ارقام شاهد نشان داد (شکل ۴-A) و در بررسی تنوع سوماکلونال ۱۸۰ نمونه کشت بافتی باندهای تک‌شکل تکثیر کرده و عدم تنوع سوماکلونال در آنها را نشان داد (شکل ۴-B). در توافق با این نتیجه در بررسی تنوع خرما با آغازگر DCAT22 تعداد



شکل ۳- الگوی باندی آغازگرهای SSR (mdCIR8، mdCIR91، PAT1، PAT3، DCAT01 و MPDC18) در (A) ارقام شاهد و (B) نمونه‌های کشت بافتی رقم مجول خرما. L: Ladder 50 bp



شکل ۴- الگوی باندی آغازگرهای SSR (DCAT22، mPdC50، mPdC90، MPDC6 و mPCIR05) در (A) ارقام شاهد و (B) نمونه‌های کشت بافتی رقم مجول خرما. L: Ladder 50 bp

۵ باند و ۶۰ درصد هتروژنی (بیلوته و همکاران، ۲۰۰۴) و ۵ آلل و ۵۲ درصد هتروژنی (الخیری و نایک، ۲۰۱۷) مشاهده و گزارش شده است. آغازگرهای mPdC50، mPdC90، MPDC6 و mPCIR05 چندشکلی در بین ارقام شاهد را نشان دادند (شکل ۴-A) و در نتیجه عدم تنوع سوماکلونال در ۱۸۰ گیاه کشت بافتی را مشخص کردند (شکل ۴-B). در این راستا در مطالعه بیلوته و همکاران (۲۰۰۴) در بررسی تنوع خرما برای آغازگر mPdC50 تعداد ۱۶ باند و ۶۷ درصد هتروژنی، برای آغازگر mPdC90 تعداد ۱۰ باند و ۵۹ درصد هتروژنی و برای آغازگرmPCIR05 تعداد ۱۲ باند و ۶۸ درصد هتروژنی گزارش شده است. الخیری و نایک (۲۰۱۷) نیز برای آغازگر mPdC50 ۱۲ آلل و ۹۲ درصد هتروژنی، برای آغازگر mPdC90 ۹ آلل و ۲۶ درصد هتروژنی و برای آغازگر MPDC6 ۲۱ آلل و ۶۵ درصد هتروژنی در ارقام متفاوت خرما را مشاهده کردند. همچنین راچی و همکاران (۲۰۱۴) برای آغازگرmPCIR05 تعداد ۵ باند و ۸۷ درصد

هتروژنی مشاهده نمودند.

همان طور که نتایج ملکولی ۱۶ جفت آغازگر SSR نشان داد، مشخص شد که نمونه مادری و گیاهان کشت بافتی رقم مجول با استفاده از این آغازگرها در یک محدوده مشخص باند تک شکل تکثیر کردند که نشان از حفظ ثبات ژنتیکی گیاهان حاصل از کشت بافت می‌باشد. مشابه این تحقیق، در پژوهشی ثبات ژنتیکی ده رقم از خرمای پاجوشی و کشت بافتی ناشی از اندام‌زائی مستقیم در رقم‌های ایرانی با استفاده از بیست جفت آغازگر ریزماهواره‌ای ارزیابی شدند. نتایج نشان داد از بین جفت آغازگرهای مورد استفاده، چهار آغازگر mPdCIR044، PDAAG1023، DP172 و PDAAG1025 قادر به‌تمایز بین رقم‌ها و بیان چندشکلی بودند که هیچ کدام از این آغازگرها تفاوتی بین نمونهٔ کشت بافتی و پاجوشی درون هر رقم نشان ندادند. نتایج این بررسی نشان داد درختان خرمای به‌دست آمده به روش کشت بافت (اندام‌زائی مستقیم) از لحاظ ژنتیکی مانند گیاهان مادری بودند، لذا روش افزایش سریع نمونه‌های خرما به‌منظور تولید نهال با استفاده از اندام‌زائی مستقیم در شرایط درون شیشه‌ای توصیه گردید (شهبازی و همکاران، ۱۳۹۶).

جنین‌زایی غیرجنسی معمولا یکی از بهترین روش‌های تکثیر در نظر گرفته می‌شود (لروی[1] و همکاران، ۲۰۰۰). نتایج حاصل از این تحقیق با این حقیقت که جنین‌زایی غیرجنسی خرما یکی از امن‌ترین روش‌ها جهت ریزازدیادی به‌منظور تولید گیاهان true-to-type می‌باشد مطابقت دارد. این نتایج با نتایج بنسی[2] و همکاران (۲۰۰۴) و لوپز و همکاران (۲۰۰۶) مطابقت دارد. لروی و همکاران (۲۰۰۰) نیز اعلام کردند که جنین‌زایی غیرجنسی معمولا به‌عنوان یکی از بهترین روش‌های تکثیر جهت کنترل ژنتیکی دقیق در تمامی مراحل تشکیل جنین غیرجنسی مطرح می‌باشد. در مطالعه‌ای دیگر آنالیز ۵۵۸ محصول PCR توسط آغازگر RAPD شباهت بین گیاه مادری و گیاهچه‌های حاصل از جنین‌زایی غیرجنسی گیاه خرما را ثابت نمود (اسلام[3] و همکاران، ۲۰۱۵). اشراقی[4] و همکاران (۲۰۰۵) در یک تحقیق پایداری ژنتیکی جنین‌زایی غیرجنسی گیاهان کشت بافتی و گیاهان مادری نخل ایرانی (رقم خنیزی) را با استفاده از آغازگرهای RAPD انجام دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که همبستگی و شباهت ژنتیکی بین گیاه مادری و گیاهان کشت بافتی حاصل از آن ۹۴ درصد بود. اسلام و همکاران (۲۰۱۵) مطالعه‌ای با هدف ارزیابی گیاهان خرما حاصل از جنین‌زایی غیرجنسی شش رقم اقتصادی و تایید مشابهت آن‌ها با گیاهان مادری جهت ورود به‌برنامه‌های به‌نژادی خرما انجام دادند. از ۷۰ آغازگر RAPD مورد استفاده، ۶۲ آغازگر ۵۵۸ مکان ژنی با تکرارپذیری بالا تولید نمودند. پروفایل RAPD بیانگر هموژنی گیاهان ریزازدیادی شده بود و وجود ۱۰۰ درصد شباهت میان گیاه مادری و گیاهچه‌های حاصل از جنین‌زایی غیرجنسی را تایید نمود. آن‌ها روش تکثیر بکارگرفته شده را باتوجه به‌یافته‌های این مطالعه، روشی مناسب برای تولید انبوه و نگهداری ژرم پلاسم خرما معرفی نمودند.

کومار و همکاران (۲۰۱۰) به‌منظور بررسی ثبات ژنتیکی ۲۷ گیاه خرما تکثیر شده با روش جنین‌زایی غیرجنسی با بیش از ۴۲ واکشت به همراه گیاهان مادری از ۱۶ جفت آغازگر SSR استفاده نمودند. در هیچ یک از گیاهان مورد مطالعه، تغییرات DNA مشاهده نشد و به‌این نتیجه رسیدند که روش مورد استفاده توسط آن‌ها برای ریزازدیادی، روشی کارا همراه با حفظ ثبات ژنتیکی برای تکثیر گیاهان خرمای مشابه گیاه مادری به‌شمار می‌رود. نتایج آنها نشان داد که تکثیر نخل خرما با روش جنین‌زایی غیرجنسی، حتی پس از مدت طولانی ۱۶۸ هفته (سه سال) تحت شرایط کشت درون شیشه، ثبات ژنتیکی را حفظ می‌کند. احمد[5] و همکاران (۲۰۱۲) تنوع ژنتیکی موجود در گیاهچه‌های باززا شده و کالوس‌های آن‌ها را در سه رقم Kubkub، Merziban و Dharlag با آغازگرهای ISSR مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان دهنده وجود تنوع ژنتیکی میان گیاهچه‌ها و کالوس‌های آن‌ها در همه ارقام بود. این محققان، آغازگرهای ISSR را به‌عنوان ابزار مناسبی برای ارزیابی ثبات ژنتیکی و حتی تفکیک ارقام متعلق به‌یک خانواده با تعداد آغازگر کم معرفی نمودند. اوتمانی و همکاران (۲۰۱۰) مطالعه‌ای با هدف بررسی اثر 2,4-D در القای جنین‌زایی سوماتیکی خرما طراحی نمودند. نتایج حاصل از آنالیز آغازگرهای RAPD و AFLP بر روی ۱۸۰ گیاهچه، نشان

1. Leroy
2. Bennici
3. Aslam
4. Eshraghi
5. Ahmed

دهنده وجود ثبات ژنتیکی در گیاهچه‌های تولید شده در کشت بافت نسبت به‌گیاهان مادری و تأییدکننده روش مورد استفاده بود. بررسی ثبات ژنتیکی دو رقم گیاه نیشکر RB943365 و RB92579 تکثیر شده در شرایط کشت درون شیشه‌ای با استفاده از آغازگرهای ISSR توسط حسای[1] و همکاران (۲۰۱۵) صورت گرفت. در رقم‌های مورد نظر هیچ‌گونه شواهدی از چندشکلی در گیاهان تکثیر شده وجود نداشت که بیانگر عدم وجود تنوع‌های سوماکلونال بود. آن‌ها همچنین گزارش نمودند که آغازگرها ISSR برای ارزیابی تنوع سوماکلونال مناسب هستند. در کشت بافت گیاه خرما منبع تأمین ریزنمونه، اثر ترکیبی سن کشت و تعداد واکشت‌ها، تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی، انعطاف پذیری و تغییرات پس از رونویسی از عوامل اثر گذار بر تنوع گیاهان کشت بافتی بوده است، اما انتخاب ژنوتیپ مناسب و تعداد واکشت‌ها می‌تواند میزان تنوع سوماکلونال را محدود نماید. با این وجود گیاهان خارج از تیپ با فنوتیپ پاکوتاه غیرعادی زیادی در جمعیت‌های در حال تکثیر بوجود می‌آیند که اثرهای خود را چند سال پس از کشت نشان می‌دهند که استفاده از روش‌های ژنتیک مولکولی مانند شناسایی با آغازگرها می‌تواند بسیاری از تنوع‌ها را در مراحل اولیه شناسایی و به‌ایجاد منبع ژنتیکی با ثبات کمک نمایند (هادرمی[2] و همکاران، ۲۰۱۱).

نتیجه‌گیری کلی

تنوع ناشی از گیاهان کشت بافتی توسط باندهای ایجاد شده با استفاده از آغازگرهای مختلف قابل مطالعه هستند. استفاده از آغازگرهای ریزماهواره DNA (SSR) جهت بررسی تنوع سوماکلونال به‌دلیل حساسیت، قابلیت تکثیر، فراوانی، قدرت بالا در تفکیک و هم بارز بودن مناسب می‌باشد. در این تحقیق از آغازگرهای SSR جهت شناسایی تنوع سوماکلونال استفاده شد و هیچ تنوعی در الگوهای باندی در گیاهان کشت بافتی در مقایسه با گیاه مادری خرمای رقم مجول مشاهده نشد. بنابراین نتیجه‌گیری می‌شود که پروتکل ریزازدیادی بکار رفته از طریق جنین‌زایی غیرجنسی در تولید گیاهان کشت بافتی از رقم مجول نخل خرما مناسب بوده و پروتکل حاصل توانایی تولید گیاهچه‌های فراوان را با حفظ ثبات ژنتیکی دارد. همچنین نتایج مطالعه حاضر این واقعیت را ثابت می‌کند که جنین‌زایی غیرجنسی یکی از بهترین روش‌های تکثیر برای تولید گیاهان جور (true-to-type) می‌باشد. در نهایت با توجه به‌نتایج حاصل از این تحقیق و نیز اهمیت و ارزش اقتصادی بالای نخل خرما، روش تکثیر جنین‌زایی غیرجنسی نخل خرما توصیه می‌شود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران جهت تأمین امکانات لازم برای اجرای این تحقیق قدردانی می‌گردد.

منابع

بستاقی، آ.، احمدی، ج.، ضرغامی ر. و زهراوی، م. ۱۳۹۷. بهینه‌سازی کیفیت دی‌ان‌ای استخراج شده از گیاهچه‌های کشت بافتی خرما با مقایسه دو روش مختلف. بیستمین کنگره ملی و هشتمین کنگره بین‌المللی زیست‌شناسی ایران. ۳۱ مرداد الی ۲ شهریور، مراغه، ایران.

شهبازی، ا.، عالمی‌سعید، خ.، صلواتی، ا.، غلامی، ن. و گلکار، پ. ۱۳۹۶. بررسی پایداری ژنتیک گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت برخی از رقم‌های خرما با استفاده از آغازگرهای ریزماهواره. مجله علوم باغبانی ایران، ۴۸(۲): ۳۵۷-۳۶۷.

Ahmed, T.A., Alsamaraee, S.A., Zaidan, H.Z. and Elmeer, K. 2012. Inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis of somaclonal variation in date palm plantlets regenerated from callus. In Second international conference on environment and industrial innovation, IPCBEE: 126-130.

1. Hsie

2. Hadrami

Al-Khayri, J. M., Mohan, J.S. and Johnson, D.V. 2017. Date Palm Biotechnology Protocols Volume II, Germplasm Conservation and Molecular Breeding. Springer, New York.

Al-Khayri, J.M. 2005. Date palm *Phoenix dactylifera* L. In: Jain S.M., Gupta P.K. (eds.) Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. Springer, Netherlands. 309-319.

Al-Khayri, J.M. 2007. Micropropagation of date palm *Phoenix dactylifera* L. In: Jain S.M., Haggman H. (eds.) Protocols for micropropagation of woody trees and fruits. Springer, Berlin. 509-526.

Al-Khayri, J.M. and Naik, P.M. 2017. Date palm micropropagation: Advances and applications. Ciência e Agrotecnologia, 41(4): 347-358.

Al-Ruqaishi, I.A., Davey, M., Alderson, P. and Mayes, S. 2008. Genetic relationships and genotype tracing in date palms (*Phoenix dactylifera* L.) in Oman, based on microsatellite markers. Plant Genetic Resources, 6(1): 70-72.

Bennici, A., Anzidei, M. and Vendramin, G.G. 2004. Genetic stability and uniformity of *Foeniculum vulgare* Mill. regenerated plants through organogenesis and somatic embryogenesis. Plant science, 166(1): .221-227.

Arif, I.A., Bakir, M.A., Khan, H.A., Ahamed, A., Al Farhan, A.H., Al Homaidan, A.A., Al Sadoon, M., Bahkali, A.H. and Shobrak, M. 2010. A simple method for DNA extraction from mature date palm leaves: impact of sand grinding and composition of lysis buffer. International journal of molecular sciences, 11(9): 3149-3157.

Aslam, J., Khan, S.A. and Naqvi, S.H. 2015. Evaluation of genetic stability in somatic embryo derived plantlets of six date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars through RAPD based molecular marker. Science Technology and Development, 34(1): 1-8.

Bhansali, R.R. 2010. Date palm cultivation in the changing scenario of Indian arid zones: challenges and prospects. Desert plants: biology and biotechnology: 423-459.

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 dactylifera* L.): characterization and utility across the genus *Phoenix* and in other palm genera. Molecular Ecology Notes, 4(2): 256-258.

Elshibli, S. and Korpelainen, H. 2008. Microsatellite markers reveal high genetic diversity in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) germplasm from Sudan. Genetica, 134: 251-260.

Eshraghi, P., Zarghami, R. and Ofoghi, H. 2005. Genetic stability of micropropagated plantlets in date palm. Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran 16: 311-315.

Garcia, C., Furtado de Almeida, A.A., Costa, M., Britto, D., Valle, R., Royaert, S. and Marelli, J.P. 2019. Abnormalities in somatic embryogenesis caused by 2, 4-D: an overview. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 137(2): 193-212.

Hadrami, A.E., Daayf, F., Elshibli, S., Jain, S.M. and Hadrami, I.E. 2011. Somaclonal variation in date palm. Date palm biotechnology, 183-203.

Hela, S., Salwa, Z., Salem Ali, O.M., Abdelmajid, R., Mohamed, M. and Mokhtar, T. 2004. Genetic polymorphism of plastid DNA in Tunisian date-palm germplasm (*Phoenix dactylifera* L.) detected with PCR-RFLP. Genetic Resources and Crop Evolution, 51: 479-487.

Hsie, B.S., Brito, J.Z., Vila Nova, M.X., Borges-Paluch, L.R., Silva, M.V. and Donato, V.M.S.T. 2015. Determining the genetic stability of micropropagated sugarcane using inter-simple sequence repeat markers. Genetics and Molecular Research, 14(4): 17651-17659.

Khanam, S., Sham, A., Bennetzen, J.L. and Aly, M.A. 2012. Analysis of molecular marker-based characterization and genetic variation in date palm (*'Phoenix dactylifera* 'L.). Australian Journal of Crop Science, 6(8): 1236-1244.

Krishna, R.B., Reddy, S.R.R., Harika, J., Swapna, D. and Reddy, K.J. 2012. An easy and simple method of isolation and purification of genomic DNA from the leaves of *Gymnema sylvestre* an anti-diabetic plant. International Journal of Life science and Pharma Research, 2(1): 15-20.

Kumar, N., Singh, A.S., Modi, A.R., Patel, A.R., Gajera, B.B. and Subhash, N. 2010. Genetic stability studies in micropropagated date palm (*Phoenix dactylifera* L.) plants using microsatellite marker. Journal of Forest and Environmental Science, 26(1): 31-36.

Kunert, K.J., Baaziz, M. and Cullis, C.A. 2003. Techniques for determination of true-to-type date palm (*Phoenix dactylifera* L.) plants: a literature review. Emirates Journal of Food and Agriculture: 1-16.

Leroy, X.J., Leon, K., Charles, G. and Branchard, M. 2000. Cauliflower somatic embryogenesis and analysis of regenerant stability by ISSRs. Plant Cell Reports, 19(11): 1102-1107.

Lipavská, H. and Konrádová, H. 2004. Somatic embryogenesis in conifers: the role of carbohydrate metabolism. In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant, 40: 23-30.

Lopes, T., Pinto, G., Loureiro, J., Costa, A. and Santos, C. 2006. Determination of genetic stability in long-term somatic embryogenic cultures and derived plantlets of cork oak using microsatellite markers. Tree Physiology, 26(9): 1145-1152.

Margaritopoulos, J.T., Bacandritsos, N., Pekas, A.N., Stamatis, C., Mamuris, Z. and Tsitsipis, J.A. 2003. Genetic variation of *Marchalina hellenica* (Hemiptera: Margarodidae) sampled from different hosts and localities in Greece. Bulletin of entomological research, 93(5): 447-453.

Moghaieb, R.E., Abdel-Hadi, A.H.A. and Ahmed, M.R.A. 2011. Genetic stability among date palm plantlets regenerated from petiole explants. African Journal of Biotechnology, 10(65): 14311-14318.

Moussally, S., Al-Sham'aa, K., Almer, K., Khierallah, H., Udupa, S., Hamwieh, A., Farah, J., Lababidi, S., Malek, J.A., Aaouine, M. and Baum, M. 2010. Development of 1000 microsatellite markers across the date palm (*Phoenix dactylifera* L.) genome. In IV International Date Palm Conference, 882: 269-277.

Othmani, A., S. Rhouma, C. Bayoudh, R. Mzid, N. Drira and M. Trifi. 2010. Regeneration and analysis of genetic stability of plantlets as revealed by RAPD and AFLP markers in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Deglet Nour, International Journal of Plant Science. 1(3): 048-055.

Racchi, M.L., Bove, A., Turchi, A., Bashir, G., Battaglia, M. and Camussi, A. 2014. Genetic characterization of Libyan date palm resources by microsatellite markers. 3 Biotech, 4: 21-32.

Röder, M.S., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M.H., Leroy, P. and Ganal, M.W. 1998. A microsatellite map of wheat. Genetics, 149(4): 2007-2023.