

Application of Molecular Markers for Sex Determination and Genetic Diversity Analysis of Jojoba (*Simmondsia chinensis*) Based on ISSR and RAPD Molecular Markers

Zahra Nabi Ghahfarokhi¹, Hossein Shahsavand Hassani^{2*} , Farhad Nazarian-Firouzabadi³ Askar Ghani⁴

1. Ph.D. Student, Production Engineering and Plant Genetic Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

2. Professor, Production Engineering and Plant Genetic Department, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

3. Professor, Production Engineering and Plant Genetic Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

4. Associate Professor, horticulture science department, Faculty of Agriculture, Jahrom University, Jahrom, Iran.

Correspondence:

Hossein Shahsavand Hassani

Email: shahsavand@shirazu.ac.ir

Received: 10, Feb. 2025

Accepted: 15, Jul. 2025

How to cite:

Nabi Ghahfarokhi, Z., Nazarian-Firouzabadi, F., Shahsavand Hassani, H., & Ghani, A. (2025). Application of Molecular Markers for Sex Determination and Genetic Diversity Analysis of Jojoba Plant (*Simmondsia chinensis*) Based on ISSR and RAPD Molecular Markers. *Crop Biotechnology*, 15 (2), 1-12.
(DOI:[10.30473/cb.2025.73765.2004](https://doi.org/10.30473/cb.2025.73765.2004))

ABSTRACT

Jojoba (*Simmondsia chinensis* Link Schneider), often referred to as the "miracle plant," is a dioecious, cross-pollinated, evergreen, and diploid ($2n = 52$) perennial shrub. Renowned for its significant economic value, jojoba is widely utilized in the pharmaceutical, health, and even in military industries. Moreover, jojoba remarkable resistance to both biotic and abiotic stresses enhances its environmental adaptations. Determining the sex of jojoba plants at the seedling stage (1–3 years old) is crucial for optimizing the male-to-female plant ratio for establishment and for commercial cultivation. This optimization facilitates increased productivity and yield per unit area, ensuring efficient garden establishment and management. This study assessed the genetic diversity of 17 jojoba (*Simmondsia chinensis*) trees, derived from the Arizona cultivar, consisting of 9 female and 8 male genotypes. These genotypes were selected based on prior research conducted at the only jojoba germplasm garden in Iran, located in Fars Province. The study employed RAPD and ISSR molecular markers to determine the sex of the jojoba genotypes and to evaluate their genetic diversity. The primary objective was to validate four specific sex determination markers: two ISSR markers (UBC-807 and CAPS) and two RAPD markers (F1 and F10). The results of this study revealed that although the molecular markers used were unable to definitively distinguish male and female jojoba genotype by amplify sex specific band, significant genetic diversity was observed between the sexes. Among the markers, the F1 primer exhibited the highest polymorphism (82.5%), while the CAPS primer showed the lowest polymorphism (78.77%). Furthermore, the F10 primer demonstrated the highest, and the CAPS primer the lowest, values for the number of effective alleles, Shannon diversity index, band index, and expected heterozygosity, making F10 the most effective and CAPS the least effective marker for assessing genetic diversity between male and female genotypes. The genetic diversity dendrogram, constructed using the Jaccard similarity coefficient, effectively differentiated male and female genotypes. Although the markers used in this study were unable to replicate the sex-specific bands reported in previous studies, the F1 primer demonstrated strong potential for distinguishing male and female genotypes based on genetic diversity. Additionally, ISSR markers were found to be more efficient than RAPD markers in evaluating genetic diversity both within and between genotypes. These findings provide a valuable framework for sex differentiation in other agriculturally, horticulturally, and medicinally important species, potentially reducing the costs associated with maintaining and establishing relevant orchards.

KEYWORDS

Miracle plant (jojoba), molecular detection, polymerase chain reaction, polymorphism, sex markers.



«مقاله پژوهشی»

تعیین جنسیت مولکولی و بررسی تنوع ژنتیکی جوجوبا (*Simmondsia chinensis* Link Schneider) با نشانگرهای مولکولی ISSR و RAPD

زهرا نبی قهفرخی^۱، حسین شاهسوند حسنی^{۲*} ، فرهاد نظریان فیروزآبادی^۳، عسکر غنی^۴

۱. دانشجوی دوره دکتری، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.
۲. استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.
۳. استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.
۴. دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جهرم، جهرم، ایران.

نویسنده مسئول:

حسین شاهسوند حسنی

رایانامه: shahsavand@shirazu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۲۴

استناد به این مقاله:

نبی قهفرخی، زهرا؛ نظریان فیروزآبادی، فرهاد؛ شاهسوند حسنی، حسین و غنی، عسکر (۱۴۰۴). تعیین جنسیت مولکولی و بررسی تنوع ژنتیکی گیاه جوجوبا (*Simmondsia chinensis* Link Schneider) با نشانگرهای مولکولی ISSR و RAPD. فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی، ۱۵ (۲)، ۱-۱۲.

(DOI: [10.30473/cb.2025.73765.2004](https://doi.org/10.30473/cb.2025.73765.2004))

چکیده

جوجوبا (*Simmondsia chinensis* Link Schneider) معروف به گیاه معجزه، گیاهی چندساله و مقاوم به تنش‌های زیستی و غیرزیستی است که به دلیل تولید روغن صنعتی باکیفیت، از اهمیت اقتصادی بالایی برخوردار است. تشخیص جنسیت گیاهچه‌های جوجوبا در مراحل اولیه رشد، برای بهینه‌سازی نسبت گیاهان نر و ماده و افزایش بهره‌وری در باغ‌های تجاری ضروری است. در این پژوهش، تنوع ژنتیکی ۱۷ ژنوتیپ جوجوبای بذری (۹ ماده و ۸ نر) با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR بررسی شد. هدف، اعتبار سنجی دو نشانگر اختصاصی جنسیت شامل ISSR (UBC-807 و CAPS) و دو نشانگر RAPD (F1 و F10) بود. نتایج نشان داد نشانگرهای مورد استفاده توانایی تفکیک قطعی جنسیت را از طریق تکثیر باند اختصاصی هر جنس نداشتند، اما تنوع ژنتیکی قابل توجهی بین ژنوتیپ‌های نر و ماده مشاهده شد. آغازگر F1 و CAPS به ترتیب بالاترین (۸۲٫۵٪) و پایین‌ترین (۷۷٫۸٪) چند شکلی را نشان دادند. همچنین، آغازگر F10 بیشترین تنوع شانون، تعداد آلل مؤثر، شاخص باند و هتروزیگوسیتی مورد انتظار را دارا بود. دندروگرام حاصل از ضریب تشابه جاکارد توانست ژنوتیپ‌های نر و ماده را به خوبی تفکیک کند. بررسی‌ها نشان داد ISSR در مقایسه با RAPD در بررسی تنوع ژنتیکی کارآمدتر است و آغازگر F1 به‌طور ویژه ژنوتیپ‌های نر را با دقت تفکیک کرد. این یافته‌ها نشان می‌دهد که علیرغم عدم توانایی تکثیر قطعی باندهای اختصاصی جنسیت، نشانگرهای مورد استفاده در شناسایی تنوع ژنتیکی مؤثر بوده و می‌توانند با کاهش هزینه‌های احداث باغ‌های جوجوبا، الگویی برای تفکیک جنسیت در سایر گونه‌های زراعی، باغی و دارویی باشند.

واژه‌های کلیدی

تشخیص مولکولی، چندشکلی، جوجوبا، نشانگرهای جنسیت، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز.



مقدمه

تنوع ژنتیکی شرط لازم برای بقای کوتاه مدت و بلند مدت گونه‌های گیاهی در زیستگاه‌های طبیعی به منظور حفاظت و دستکاری‌های ژنتیکی آنهاست (AI-*Simmondsia* (Dossary *et al.*, 2021). گیاه جوجوبا (*chinensis* Link Schneider)، درختچه‌ای چندساله و مقاوم به خشکی و شوری است که از این رو گیاهی ویژه برای کشت در خاک‌های خشک و شور می‌باشد (Sturtevant *et al.*, 2020). اهمیت تجاری این گیاه به تولید و انباشت روغن مومی موجود در دانه‌های آن بر می‌گردد که سرشار از استرهای موم مایع زنجیره‌ای مستقیم با طول یکنواخت است و تحمل بالایی در برابر حرارت و شرایط اکسایشی دارد. روغن این گیاه در روان کننده‌ها، داروها و لوازم آرایشی، پزشکی، نظامی و برخی صنایع مرتبط کاربرد فراوان دارد، همچنین این روغن در پلاستیک‌سازی، جوهر چاپگر و روان کننده‌های چرمی قابل استفاده است (Liu *et al.*, 2022). همانند سایر گیاهان دوپایه، جنسیت جوجوبا نیز تا مرحله گلدهی یعنی سن ۵-۲ سالگی گیاه، قابل شناسایی نیست. همچنین دانه‌های بذری معمولاً منجر به تولید ۸۴٪ گیاهان نر و ۱۶٪ گیاهان ماده می‌شود، در حالی که در باغ‌های تجاری جوجوبا به تعداد بسیار کمتری از گیاهان نر (۱۰٪) برای عملکرد مطلوب نیاز است (Liu *et al.*, 2022). برای کاشت مقرون به صرفه جوجوبا با پایه‌های بذری و افزایش کارایی پایه‌های ماده اصلاح شده، شناسایی جنسیت گیاه در مرحله نهال ضروری است که می‌تواند موجب صرفه جویی در هزینه‌های نگهداری تا مرحله زایشی و چیدمان مناسب باغ شود (Solliman *et al.*, 2023).

معرفی و استفاده از نشانگرهای مبتنی بر DNA برای تعیین جنسیت گیاهچه‌ها روشی مناسب برای کاشت بهینه گیاهان دوپایه است. نشانگرهای RAPD و ISSR دارای چندین ویژگی منحصر به فرد مانند عدم نیاز به دانش قبلی از توالی ژنوم، تجزیه و تحلیل کم هزینه با توان بالا و تولید چند شکلی سطح بالا برای تمایز ژنوتیپ‌های نزدیک به هم هستند (Verma *et al.*, 2017). بنابراین در این پژوهش، از نشانگرهای تعیین

جنسیت RAPD و ISSR با توجه به کارایی و کاربرد آن‌ها در تشخیص پتانسیل چند شکلی ژنتیکی ۱۷ ژنوتیپ نر و ماده گیاه جوجوبا استفاده شد و توانایی آن‌ها در تعیین جنسیت ژنوتیپ‌ها مورد مطالعه و ارزیابی قرار گرفت.

پیشینه پژوهش

اطلاع از تنوع ژنتیکی گیاهان دوپایه و چندساله مثل جوجوبا در تعیین نقشه کشت باغ و داشتن عملکرد بالا حائز اهمیت است. روش‌های مولکولی از جمله راهکارهای مؤثر در شناسایی این تنوع در دانه‌های جوجوبا می‌باشد که توانسته در کشت بسیاری از گیاهان مانند پسته (*Pistacia vera*)، پاپایا (*Carica papaya*) و شنگرفی (*Mercurialis annua*) موفق باشد (Antonova *et al.*, 2006). در یک مطالعه، نحلا و همکاران (۲۰۱۸) از روش تشخیص مولکولی برای تعیین جنسیت ۱۵ بوته ماده و ۵ بوته نر گیاه جوجوبا جهت معرفی ژنوتیپ برتر با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیک و نشانگرهای مولکولی استفاده کردند. نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از نشانگرهای مولکولی برای تنوع تشخیص بین بوته‌ها در برنامه‌های به‌نژادی مفید است (Nahla *et al.*, 2018). در مطالعه دیگری، جنسیت ۱۳ بوته جوجوبا با استفاده از ۲۰ آغازگر نشانگر RAPD بررسی و دو نشانگر با طول ۴۶۰ و ۶۸۰ جفت باز برای تشخیص جنسیت معرفی شدند (Hosseini *et al.*, 2011). در مطالعه دیگری جنسیت تعداد ۱۲۰ نمونه گیاه جوجوبا، با ۶۲ آغازگر مولکولی RAPD بررسی و نشانگر JMS900 به عنوان مناسب‌ترین نشانگر تعیین جنسیت معرفی شد (Ince *et al.*, 2010). شارما و همکاران (۲۰۰۸) جنسیت تعداد ۸ گیاه جوجوبا را با استفاده از ۴۲ آغازگر ISSR بررسی کردند و یک قطعه ۱۲۰۰ جفت بازی را برای تعیین جنس نر معرفی کردند (Sharma *et al.*, 2008). با بررسی تعداد ۵ آغازگر RAPD در گیاه جوجوبا معلوم گردید که آغازگر C5 در تعیین جنسیت بوته‌های جوجوبا کارایی دارد (Al-Obaidi *et al.*, 2012). مطالعه بر روی ۵۰ آغازگر RAPD و ۵۵ آغازگر ISSR جهت بررسی

تنوع ژنتیکی درون بوته های نر، درون بوته های ماده و بین بوته های ماده و نر کارآمد بود و مشخص شد که نشانگر ISSR چند شکلی بیشتری نسبت به نشانگر RAPD تواید کرد (Bhardwaj *et al.*, 2010). برای ارزیابی تمایز بین دو کلون متفاوت جوجوبا با استفاده از ۳۰ آغازگر RAPD، تعداد ۳ قطعه آغازگر متفاوت برای یکی از کلون ها و ۲ قطعه آغازگر دیگر برای کلون دیگر شناسایی گردیدند (Amarger & Mercier, 1995). علاوه بر نشانگرهای ISSR و RAPD، استفاده از نشانگرهای AFLP نیز برای تعیین جنسیت کولتیوارهای جوجو با موفق آمیز بود. برای مثال، در یک پژوهش بر روی ۶۲ گیاه نر و ۵۱ گیاه ماده با استفاده از ۱۶ نشانگر AFLP، دو قطعه ۵۲۵ و ۳۲۵ جفت بازی برای شناسایی پایه نر و یک قطعه ۲۷۰ جفت بازی برای شناسایی پایه ماده شناسایی شدند (Agarwal *et al.*, 2011).

روش شناسی پژوهش

مواد ژنتیک گیاهی مورد استفاده در این پژوهش شامل تعداد ۱۷ ژنوتیپ ۲۶ ساله (شامل ۹ بوته بالغ ماده و ۸ بوته بالغ نر) متفاوت حاصل از بذر رقم دورگ آریزونا متعلق به گونه اهلی شده و باغی امروزی جوجوبا، واقع در باغ جوجوبای تحقیقاتی مرکز تحقیقات، آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس در روستای محمداًباد شهرستان جهرم بود (جدول ۱). در دی ماه ۱۴۰۰ و هنگامی گیاهان در مرحله گلدهی بودند، از هر کدام از درختچه های جوجوبا، برگ های جوان جمع آوری شدند. برگ ها بی درنگ در ازلت مایع منجمد شدند و در آزمایشگاه در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد تا زمان استفاده از آن ها برای استخراج اسیدهای نوکلئیک و پروتئین ها نگهداری شدند. استخراج DNA از برگ ها با استفاده از کیت GeneAll® GenEx Plant™ (Plus) (کره جنوبی Cat No: 228-100) صورت گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و به کمک دستگاه NanoDrop 2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific NanoDrop 2000, USA) بررسی و تعیین گردید.

جدول ۱. کد و جنسیت ژنوتیپ های متفاوت درختچه جوجوبا مورد استفاده در این پژوهش

Table 1. Identification code and sex of different Jojoba genotypes used in present study

شماره	کد ژنوتیپ	جنسیت	شماره	کد ژنوتیپ	جنسیت
۱	O9	ماده	۱۰	B14	نر
۲	N6	ماده	۱۱	C1	نر
۳	A16	ماده	۱۲	J14	نر
۴	D1	ماده	۱۳	N3	نر
۵	N9	ماده	۱۴	I12	نر
۶	F15	ماده	۱۵	C8	نر
۷	K15	ماده	۱۶	B7	نر
۸	K1	ماده	۱۷	F17	نر
۹	D20	ماده			

برای ارزیابی توانایی تعیین جنسیت ژنوتیپ های جوجوبا و بررسی چند شکلی DNA در بین ۱۷ ژنوتیپ مختلف جوجوبا، از ۴ آغازگر RAPD و ISSR استفاده شد (جدول ۲). واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) در حجم نهایی 20µl با استفاده از مسترمیکس Amplicon, Denmark, Cat. No.:) Amplicon A180303 (در ترموسایکلر TaKaRa™ ژاپن (Takara Bio, Inc) انجام شد. برنامه دمایی واکنش PCR شامل: مرحله واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه شامل: (مرحله واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال آغازگر در دمای مناسب هر آغازگر (جدول ۲) به مدت ۱ دقیقه، مرحله گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه) و در انتها مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول PCR در ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز و با رنگ GelStain در رنگ آمیزی و در زیر نور UV با دستگاه Documentation مشاهده گردید. الگوی نواری مشاهده شده بر روی ژل براساس وجود یا عدم وجود نوار، به صورت یک و صفر امتیازدهی شدند.

جدول ۲. نام، توالی و دمای اتصال آغازگرهای مورد استفاده. آغازگرهای F1 و F10 برای RAPD، آغازگرهای CAPS و UBC-807 برای ISSR هستند.

Table 2. Primers name, sequence, and annealing temperature. Primers F1 and F10 were utilized for RAPD, whereas CAPS and UBC-807 were applied in ISSR analysis.

نام آغازگر	توالی (5'-3')	دمای اتصال (°C)
F1	AGGAGTCGGA	۵۵
F10	GGGCCACTCA	۵۵
UBC-807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	۴۷
CAPS	F: AGACCCAGAGCACACACAGC R: AGACCCAGAGGATGAGGAATG	۴۷

داده‌های ماتریس حاصل با نرم‌افزارهای NTSYS (Rohlf, 1990) و Peakall & GenAlEx6/5 (Smouse, 2006) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. از سه ضریب تشابه دایس، جاکارد و تطابق ساده برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در نرم‌افزار NTSYS V.PC 2/02 استفاده شد. برای مشاهده و توصیف بهتر روابط ژنتیکی، تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) بر روی ماتریس تشابه انجام گرفت. میزان محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) هر آغازگر با استفاده از رابطه (۱) محاسبه شد (Venkatesan *et al.*, 2021) و شاخص تنوع شانون^۳ (H') که معیاری برای بیان میزان مشارکت آلی در برر سی تنوع ژنوتیپ‌ها است با استفاده از رابطه (۲) محاسبه شد (Kim *et al.*, 2017; Nolan & Callahan, 2006). شاخص نشانگری نیز که نشان‌دهنده کارایی سیستم نشانگری می‌باشد با رابطه (۳) تعیین شد (Varshney *et al.*, 2007). نسبت چندشکلی مؤثر (EMR) که بیانگر تعداد جایگاه‌های ژنی چندشکل موجود در یک ژنوم می‌باشد با استفاده از رابطه ۴ برآورد شد (Venkatesan *et al.*, 2021).

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 \quad \text{رابطه (۱)}$$

در رابطه (۱)، P_i فراوانی آلل نام است.

$$H' = - \sum P_i \times \ln P_i \quad \text{رابطه (۲)}$$

در رابطه (۲)، P_i فراوانی آلل نام است و \ln لگاریتم P_i است.

رابطه (۳) $MI = PIC \times EMR$
در رابطه (۳)، PIC میزان محتوای اطلاعات چندشکلی و EMR بیانگر نسبت چندشکلی مؤثر از رابطه (۴) است.

رابطه (۴) $EMR = np \times \beta$
در رابطه (۴)، np تعداد مکان‌های چندشکل و β نسبت مکان‌های چند شکل به تعداد کل مکان‌ها می‌باشد

رابطه (۵) $R_p = - \sum I_b$
در رابطه (۵)، مقدار I_b بین ۰-۱ متغیر است (Prevost & Wilkinson, 1999) و این کمیت با استفاده از رابطه (۶) تعیین گردید (Venkatesan *et al.*, 2021).
رابطه (۶) $I_b = 1 - (0/5 - P)$
در رابطه (۶)، p فراوانی حضور یک باند یا نوار خاص را نشان می‌دهد.

آنالیز واریانس مولکولی (ANOVA) برای برر سی تنوع ژنتیکی بین و درون ژنوتیپ‌های نر و ماده و همچنین ماتریس فاصله Nei (Nei Genetic Distance) با استفاده از نرم‌افزار GenAlEx6/5 تعیین شد. دندروگرام ماتریس فاصله با استفاده از الگوریتم UPGMA رسم شد. تجزیه و تحلیل بوت استرپ با ۱۰۰۰ تکرار برای یافتن پشتیبانی آماری برای شاخه‌های داخلی درخت UPGMA انجام شد (Stefan Van Dongen & Winnepenninckx, 1996). همچنین از آزمون Mantel (Diniz-Filho *et al.*, 2013)

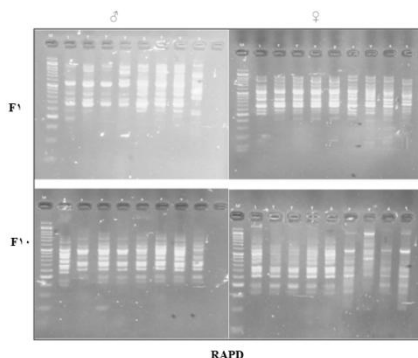
تفکیک بالاتر (به ترتیب ۱۱/۷ و ۱۰/۷) در تفکیک ژنوتیپ‌های جوجوبا بهتر بودند (جدول ۳).

برای تخمین میزان همبستگی بین داده‌های ماتریس شباهت RAPD و ISSR استفاده شد.

یافته‌های پژوهش

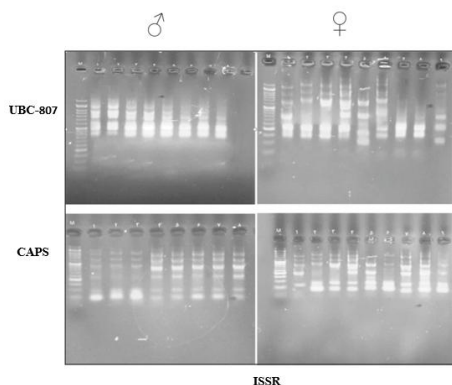
دو آغازگر نشانگر ISSR (UBC-807 و CAPS) و دو آغازگر نشانگر RAPD (F10 و F1) که برای تعیین جنسیت جوجوبا معرفی شده‌اند، در مجموع ۷۶ باند را برای ۱۷ ژنوتیپ این گیاه (۸ ژنوتیپ نر و ۹ ژنوتیپ ماده) شناسایی کردند. از این تعداد باند، تعداد ۶۱ باند چند شکل (۸۰/۲٪) بودند (شکل‌های ۱ و ۲). با مقایسه نشانگرهای ISSR و RAPD از نظر تعداد نوارهای (آلل) چند شکل، مشخص شد که نشانگر ISSR نسبت به RAPD چند شکلی بیشتری را در ژنوتیپ‌های جوجوبا نشان داد. پارامتر نسبت چندگانه مؤثر (EMR) و شاخص اطلاعات باند (Ib) برای نشانگر ISSR به ترتیب ۱۲/۷۲ و ۴/۳ بود که به ترتیب نسبت به مقادیر ۱۳ و ۴/۱ برای نشانگرهای RAPD پایین‌تر بودند. برای هر دو نشانگرهای RAPD و ISSR، مقادیر PIC حدود ۰/۳۳ محاسبه شد. شاخص اطلاعات باند برای نشانگرهای ISSR و RAPD به ترتیب مقادیر ۰/۶۸ و ۰/۶۳ بود. میانگین شاخص نشانگری (MI) در ژنوتیپ‌های مورد بررسی برابر با ۴/۲۷ محاسبه شد. این شاخص رویکردی شایسته از کارایی آغازگرها بوده که به تعداد باندهای چندشکل مشاهده شده و پوشش ژنوم با نشانگر، نسبت داده می‌شود، بالا بودن میزان شاخص نشانگری، نشان‌دهنده‌ی ایجاد اطلاعات بیشتر از ژنوم، با توجه به تولید بیشتر تعداد نوار چندشکل است (Milbourne *et al.*, 1997).

آغازگر F10 با بیشترین و آغازگر CAPS با کمترین میزان تعداد آلل‌های مؤثر، تنوع شانون، شاخص باند و هتروزیگوسیتی مورد انتظار، بهترین و ضعیف‌ترین آغازگرها در تفکیک ژنوتیپ‌ها شناخته شدند. فاصله ژنتیکی نی که نشان‌دهنده فاصله ژنتیکی بین نمونه‌هاست، برای آغازگر CAPS به میزان ۰/۰۸۸ بیشترین و برای آغازگر UBC-807 با ۰/۰۸ کمترین مقدار بود. به طور کلی آغازگرهای ISSR در مقایسه با آغازگرهای RAPD با میزان میانگین قدرت



شکل ۱. الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد مربوط به آغازگرهای RAPD- اعداد ۱ تا ۹ در گیاهان ماده به ترتیب مربوط به ژنوتیپ های ماده گیاه جوجوبا با کد O9, N6, A16, D1, N9, K15, F15, K1, D20 و M: خطکش ژل و اعداد ۱ تا ۸ در گیاهان نر به ترتیب مربوط به ژنوتیپ های نر گیاه جوجوبا با کد J14, C1, B14, N3, I12, L8, F17, B7 و M: خطکش ژل

Figure 1. RAPD analysis on a 1% agarose gel electrophoresis. Numbers 1-9 represent female Jojoba genotypes: O9, N6, A16, D1, N9, K15, F15, K1, and D20. Numbers 1-8 (male plants) correspond to male Jojoba genotypes: B14, C1, J14, N3, I12, L8, F17, and B7. M: molecular weight marker (gel ladder).



شکل ۲. الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد مربوط به آغازگرهای ISSR- اعداد ۱ تا ۹ در گیاهان ماده به ترتیب مربوط به ژنوتیپ های ماده گیاه جوجوبا با کد O9, N6, A16, D1, N9, K15, F15, K1, D20 و M: خطکش ژل و اعداد ۱ تا ۸ در گیاهان نر به ترتیب مربوط به ژنوتیپ های نر گیاه جوجوبا با کد B14, C1, J14, N3, I12, L8, F17, B7 و M: خطکش ژل

Figure 2. 1% agarose gel electrophoresis of ISSR primers. numbers 1-9 (female plants) correspond to the following female Jojoba genotypes: O9, N6, A16, D1, N9, K15, F15, K1, and D20. numbers 1- 8 (male plants) correspond to the following male Jojoba genotypes: B14, C1, J14, N3, I12, L8, F17, and B7. M: molecular weight marker (gel ladder).

جدول ۳. اطلاعات مربوط به آغازگرهای مورد مطالعه در ارزیابی تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مختلف جوجوبا

Table 3. Information on primers used to evaluate genetic diversity among different Jojoba genotypes

میانگین	آغازگر				شاخص‌های مورد مطالعه
	F10	F1	CAPS	UBC-807	
۱/۶۱	۱/۶۳	۱/۶۵	۱/۵۵	۱/۶۳	تعداد آل‌های مشاهده شده (Na)
۱/۴	۱/۴۵	۱/۴	۱/۳۵	۱/۴	تعداد آل‌های مؤثر (Ne)
۰/۳۷	۰/۳۹	۰/۳۷	۰/۳۵	۰/۳۷	شاخص شانون (I)
۰/۲۴	۰/۲۶	۰/۲۳	۰/۲۴	۰/۲۴	هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He)
۰/۲۵	۰/۲۸	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵	هتروزیگوسیتی مشاهده شده (uHe)
۸۰/۲	۷۸/۹۵	۸۲/۵	۷۷/۷۸	۸۱/۵۷	درصد مکان‌های چند شکل (P%)
۰/۰۹	۰/۰۹	۰/۱۲	۰/۰۸	۰/۰۸	فاصله ژنتیکی Nei
۰/۶۶	۰/۷۳	۰/۶۵	۰/۶۴	۰/۶۳	شاخص باند (Ib)
۱۱/۲۳	۱۲/۳۱	۱۱/۱۵	۱۰/۷۳	۱۰/۷۴	قدرت تفکیک آغازگر (Rp)
۰/۳۳	۰/۳۳	۰/۳۶	۰/۳۳	۰/۳۳	میزان اطلاعات چندشکلی (PIC)
۱۲/۸۵	۱۱/۸۴	۱۳/۶۱	۱۳/۳۴	۱۲/۶۴	نسبت چندگانه مؤثر (EMR)
۴/۲۷	۳/۷۹	۴/۹۶	۴/۰۸	۴/۲۷	شاخص نشانگر (MI)

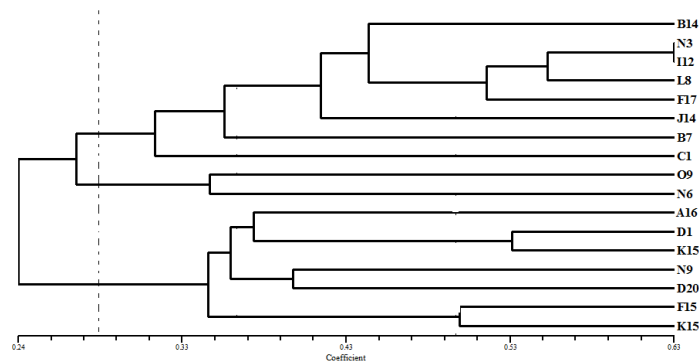
به ژنوتیپ‌های نر نشان می‌دهد که جنسیت ممکن است تنها یکی از عوامل تفاوت‌های ژنتیکی باشد و عوامل متفاوت دیگری نیز در ایجاد فاصله ژنتیکی مطرح باشند (Giuliano *et al.*, 2006).

نتایج تنوع ژنتیکی بر اساس نشانگرهای مولکولی می‌تواند با توجه به تجزیه به مختصات اصلی و به صورت چند بعدی نشان داده شود. برای تجزیه به مختصات اصلی، پس از محاسبه ماتریس فاصله، از تجزیه مقادیر منفرد (SVD) یا تجزیه مقدار ویژه (Eigen decomposition) برای کاهش ابعاد داده‌ها استفاده می‌شود. این تجزیه‌ها به یافتن محورهای اصلی در داده‌ها کمک می‌کنند که بیشترین واریانس را توضیح می‌دهند (Sant'Anna *et al.*, 2020). نمودار PCoA (شکل ۴) این امکان را می‌دهد که تفاوت‌ها و شباهت‌های ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها به صورت تصویری مشاهده شوند (Wang *et al.*, 2020). فاصله‌های بین نقاط در نمودار نشان‌دهنده میزان تفاوت ژنتیکی بین نمونه‌ها است. در نمودار PCoA، ژنوتیپ‌های بذری حاصل از رقم آریزونا شامل پایه‌های نر و ماده به‌طور واضح از یکدیگر جدا شده‌اند. ژنوتیپ‌های نر عمدتاً در بخش‌های چپ نمودار قرار گرفته‌اند، در حالی که ژنوتیپ‌های ماده بیشتر در بخش‌های راست نمودار متمرکز شده‌اند. این تفکیک جنسیتی نشان می‌دهد که نشانگرهای مولکولی به کار رفته قادر به تمایز جنسیت ژنوتیپ‌های نر و ماده بر اساس تنوع ژنتیکی بین آن‌ها هستند.

به منظور تعیین ضریب تشابه و الگوریتم مناسب برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌های جوجوبا، ضرایب کوفنتیک برای ضرایب تشابه تطابق ساده، جاکارد و دایس با استفاده از الگوریتم‌های UPGMA، Complete Linkage و Single Linkage محاسبه و ضریب تشابه جاکارد با الگوریتم UPGMA به عنوان بهترین شاخص برای گروه‌بندی و تفسیر نتایج حاصل از آن انتخاب گردید. تشابه ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد بررسی با استفاده از ضریب تشابه جاکارد در بین گیاهان نر (۰/۳ - ۰/۶۲)، در بین گیاهان ماده (۰/۱۱ - ۰/۵۵) و بین گیاهان نر و ماده (۰/۱۱ - ۰/۶۶) متغیر بود (جدول ۴). بالا بودن تشابه ژنتیکی نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی کم می‌باشد. کمترین شباهت بین ژنوتیپ‌های C1-K15 و بیشترین تشابه ژنتیکی میان N3 و I12 مشاهده شد. از آنجایی که تشابه و فاصله ژنتیکی با یکدیگر رابطه معکوس دارند، می‌توان در برنامه‌های تلاقی برای تولید ژنوتیپ‌های با پتانسیل ژنتیکی بیشتر از ارقامی که فاصله ژنتیکی زیادی با یکدیگر دارند، استفاده نمود (Tomkowiak *et al.*, 2020). هدف از انجام تجزیه خوشه‌ای، انتساب ارقام به گروه‌ها است، به طوری که ارقام دارای شباهت و خویشاوندی بیشتر در یک گروه قرار می‌گیرند (Zhurakovskiy *et al.*, 2023). بر اساس نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای، ژنوتیپ‌های متفاوت بذری حاصل از رقم دورگ آریزونا شامل پایه‌های نر و ماده در فاصله ژنتیکی ۳۰٪ (Kumar *et al.*, 2019) به خوبی از هم جدا شدند (شکل ۳). نزدیکی برخی ژنوتیپ‌های ماده

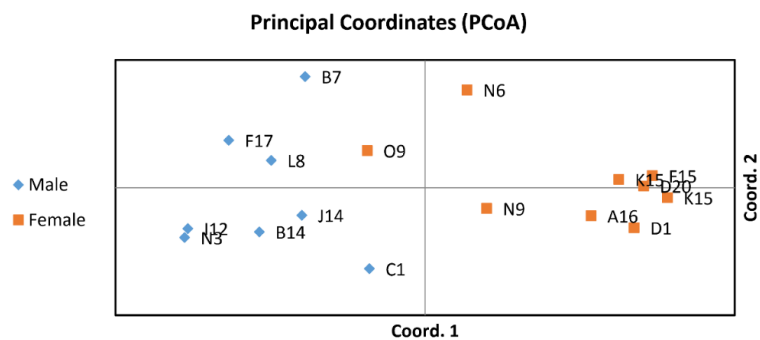
جدول ۴. ماتریس تشابه ژنوتیپ‌های متفاوت گونه جوجوبا شامل والدین نر و ماده بر اساس ضریب تشابه جاکارد
Table 4. Similarity matrix of different genotypes of Jojoba, including male and female parents, based on Jaccard similarity coefficient

کد ژنوتیپ	B14	C1	J14	N3	I12	L8	F17	B7	O9	N6	A16	D1	N9	K15	F15	K15	D20
B14	۱																
C1	/۳۴	۱															
J14	/۴۰	/۳۰	۱														
N3	/۴۸	/۳۵	/۴۱	۱													
I12	/۵۵	/۳۹	/۴۸	/۶۲	۱												
L8	/۴۰	/۳۱	/۳۷	/۵۰	/۶۰	۱											
F17	/۳۴	/۳۱	/۴۰	/۴۸	/۵۱	/۵۵	۱										
B7	/۳۴	/۱۹	/۳۰	/۲۸	/۳۲	/۴۱	/۴۷	۱									
O9	/۳۰	/۲۴	/۳۰	/۲۵	/۳۴	/۳۱	/۳۴	/۲۰	۱								
N6	/۲۵	/۱۲	/۲۱	/۱۶	/۳۳	/۳۲	/۲۹	/۲۹	/۳۵	۱							
A16	/۲۰	/۲۲	/۲۵	/۲۰	/۳۴	/۳۰	/۲۷	/۱۳	/۲۶	/۲۷	۱						
D1	/۳۲	/۲۹	/۲۶	/۱۸	/۲۸	/۲۴	/۳۰	/۲۱	/۲۱	/۲۴	/۳۸	۱					
N9	/۲۸	/۲۶	/۳۵	/۳۲	/۴۷	/۳۵	/۳۹	/۲۹	/۲۸	/۲۹	/۳۸	/۴۱	۱				
K15	/۲۳	/۲۲	/۲۰	/۱۴	/۲۲	/۲۷	/۱۹	/۱۸	/۲۳	/۲۷	/۳۶	/۵۳	/۳۵	۱			
F15	/۲۳	/۱۱	/۱۸	/۱۰	/۱۶	/۲۳	/۲۱	/۱۷	/۱۱	/۲۰	/۲۸	/۳۶	/۲۷	/۳۷	۱		
K15	/۲۰	/۱۸	/۲۵	/۱۹	/۲۱	/۳۴	/۲۴	/۲۳	/۱۷	/۲۰	/۳۲	/۳۶	/۴۰	/۳۷	/۵۰	۱	
D20	/۱۴	/۱۴	/۱۸	/۱۶	/۱۹	/۲۳	/۱۸	/۱۷	/۱۷	/۲۰	/۳۶	/۳۲	/۴۰	/۳۳	/۲۸	/۴۴	۱



شکل ۳. گروه‌بندی ژنوتیپ‌های جوجوبای مورد مطالعه بر مبنای ضریب تشابه جاکارد به روش UPGMA

Figure 3. Clustering of studied Jojoba genotypes based on Jaccard similarity coefficient using the UPGMA method



شکل ۴. پلات دو بعدی ژنوتیپ‌های جوجوبای مورد مطالعه (*Simmondsia chinensis* Link Schneider) حاصل از تجزیه به مختصات اصلی مبتنی بر ضریب تشابه جاکارد

Figure 4. Two-dimensional plot of studied Jojoba (*Simmondsia chinensis* Link Schneider) genotypes based on principal coordinate analysis (PCoA) using Jaccard similarity coefficient

چندانی نداشت. این موضوع احتمالاً به دلیل تعداد محدودتر ژنوتیپ‌های مورد مطالعه باشد. از طرف دیگر، احتمالاً آغازگر UBC-807 خاص ژنوتیپ‌های مشخصی باشد و در همه ژنوتیپ‌ها قابل تکرار نباشد. این موضوع می‌تواند نشان‌دهنده تأثیر محدودیت نمونه‌گیری در ژنوتیپ‌ها بر نتایج مطالعات ژنتیکی باشد (Agarwal *et al.*, 2011).

همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد که آغازگر F1 به عنوان یک آغازگر نسبتاً مناسب برای تشخیص جنسیت ژنوتیپ‌های بذری رقم دورگ آریزونا در تنها گونه جوجوبای اهلی در جهان براساس تنوع ژنتیکی کاربرد دارد. این یافته با مطالعه بنزیونی و واکنین (۲۰۰۲) مطابقت دارد که نشان دادند نشانگرهای مولکولی می‌توانند ابزارهای قدرتمندی برای تشخیص جنسیت در مراحل اولیه رشد گیاه یا دانه‌ها یا نهال‌ها باشند (Benzioni & Vaknin, 2002). استفاده از این آغازگرها می‌تواند به محققان به نژادی کمک کند تا توصیه لازم را به کشاورزان بدهند که بر اساس این توصیه، نسبت مناسبی از گیاهان ژنوتیپ‌های نر و ماده را در احداث باغ تجاری جوجوبا داشته باشند. رعایت این مسئله در همان اوایل احداث باغ، می‌تواند به کاهش هزینه‌ها، افزایش بهره‌وری و کیفیت محصول بیانجامد. در مطالعات متعددی توصیه شده است که نسبت مناسب ۲۰ به ۸۰ درصد به ترتیب از ژنوتیپ‌های

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که نشانگرهای مولکولی CAPC، UBC-807، F1 و F10 دارای کارایی بالایی در تشخیص تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های بذری حاصل از رقم آریزونا متعلق به جوجوبای اهلی هستند. به ویژه، آغازگر F1 با درصد چند شکلی ۸۲/۵٪ بالاترین مقدار را نشان داد. این در حالی است که آغازگر CAPS با ۷۷/۷۸٪ کمترین مقدار چندشکلی را نشان داد. این نتایج چنانچه بر روی سایر بوته‌های موجود در باغ مورد مطالعه به کار روند می‌توانند گویای تنوع ژنتیکی بالایی در تمام ۱۹۰ بوته بذری حاصل از ژنوتیپ آریزونا جوجوبای اهلی باشد. مطالعات قبلی نیز به اهمیت نشانگرهای مولکولی در تشخیص تنوع ژنتیکی جوجوبا اشاره کرده‌اند (Agarwal *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2008; Solliman *et al.*, 2023; Verma *et al.*, 2017). به عنوان مثال، مطالعه شارما و همکاران با استفاده از نشانگرهای ISSR و RAPD به نتایج مشابهی منجر شد. بر اساس نتایج این محققان، نشانگرهای ISSR به دلیل تکرارپذیری بالا و قابلیت تمایز دقیق‌تر، کارایی بیشتری نسبت به نشانگرهای RAPD داشتند (Sharma *et al.*, 2008). اگر چه در مطالعه آگراوال و همکاران (۲۰۱۱)، آغازگر UBC-807 به عنوان آغازگر خاص جنس نر معرفی شد، اما در مطالعه حاضر، این آغازگر کارایی

بین ژنوتیپ‌ها نشانگرهای ISSR کارآمدی بیشتری نسبت به نشانگرهای RAPD داشتند.

قدردانی: بدینوسیله گروه پژوهشی درختچه جدید

جوجوبا در ایران، معروف به درخت معجزه در جهان، در دانشگاه شهید باهنر کرمان از دهه ۱۳۷۰ و در دانشگاه شیراز از دهه ۱۳۹۰ تاکنون تحت مدیریت آقای دکتر حسین شاه‌سوند - سنی بر خود لازم می‌دانند که از همکاری بی‌شائبه همه رئوسای مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی استان فارس و همکاران آنها و بویژه رئوسای محترم مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی شهرستان چهارم و همکاران محترم آنها در بیش از دو دهه گذشته کمال تشکر و قدردانی را داشته باشند که تنها باغ ژرم پلاسم بومی این گیاه در ایران را در اختیار این گروه پژوهشی تاکنون قرار داده‌اند و از هر گونه همکاری دریغ نکرده‌اند و این همکاری همچنان نیز ادامه دارد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

والد نر به والد ماده (۵:۱) برای تضمین گرده‌افشانی کافی و تولید محصول بهینه و اقتصادی ضروری است (Agrawal *et al.*, 2007; Benzioni & Vaknin, 2002; Palzkill *et al.*, 1989; Solliman *et al.*, 2023).

در مطالعه حاضر مشخص شد که به کارگیری نشانگر ISSR به دلیل استفاده از آغازگرهای بزرگتر و دمای اتصال بالاتر، تکرارپذیری بیشتری نسبت به نشانگرهای RAPD دارد. این نتایج با یافته‌های مطالعات پیشین (Sabreena *et al.*, 2021; Sharma *et al.*, 2008) مطابقت دارد. بنابراین اگرچه براساس یافته‌های این پژوهش استفاده از دو آغازگر ISSR (UBC-807 و CAPS) و دو آغازگر RAPD (F1 و F10) در ۱۷ ژنوتیپ بذری حاصل از رقم آریزونا قادر به تعیین قطعی و تکثیر باند اختصاصی جنسیت در آنها نبودند، اما آغازگر F1 بر اساس تنوع ژنتیکی حاصل توانست ژنوتیپ‌های نر را از ژنوتیپ‌های ماده به خوبی تفکیک کند. هم‌چنین در بررسی تنوع ژنتیکی درون و

منابع

- Agarwal, M., Shrivastava, N., & Padh, H. (2011). Development of sex-linked AFLP markers in *Simmondsia chinensis*. *Plant Breeding*, 130(1), 114-116. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2009.01749.x>
- Agrawal, V., Sharma, K., Gupta, S., Kumar, R., & Prasad, M. (2007). Identification of sex in *Simmondsia chinensis* (Jojoba) using RAPD markers. *Plant Biotechnology Reports*, 1, 207-210. <https://doi.org/10.1007/s11816-007-0031-6>
- Al-Dossary, O., Alsubaie, B., Kharabian-Masouleh, A., Al-Mssallem, I., Furtado, A., & Henry, R. J. (2021). The jojoba genome reveals wide divergence of the sex chromosomes in a dioecious plant. *Plant J*, 108(5), 1283-1294. <https://doi.org/10.1111/tbj.15509>
- Al-Obaidi, J. R., Suliman, B. K., & Al-Ani, N. K. (2012). Molecular-based marker for sex differentiation of jojoba in vivo and in vitro Iraqi cultivars using RAPD-PCR. *Scientific Research and Essays*, 7(4), 522-527. <https://doi.org/10.5897/SRE11.1012>
- Amarger, V., & Mercier, L. (1995). Molecular analysis of RAPD DNA based markers: their potential use for the detection of genetic variability in jojoba (*Simmondsia chinensis* L. Schneider). *Biochimie*, 77(12), 931-936. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(95\)80004-2](https://doi.org/10.1016/0300-9084(95)80004-2)
- Antonova, T., Guchetl, S., Tchelustnikova, T., & Ramasanova, S. (2006). Development of marker system for identification and certification of Sunflower lines and hybrids on the basis of SSR-analysis/desarrollo de sistemas de marcadores para la identificacion y cerificacion de lineas e hibridos de girasol sobre el analisis de los fragmentos SSR/development d'un systeme de marqueurs pour l'identification et la certification de lignees et d'hybrides de tournesol a' partir de l'analyse des fragments SSR'. *Helia*, 29(45), 63-72. <https://doi.org/10.2298/hel0645063a>
- Benzioni, A., & Vaknin, Y. (2002). Effect of female and male genotypes and environment on wax composition in jojoba. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(3), 297. <https://doi.org/10.1007/s11746-002-0477-7>
- Bhardwaj, M., Uppal, S., Jain, S., Kharb, P., Dhillon, R., & Jain, R. K. (2010). Comparative assessment of ISSR and RAPD marker assays

- for genetic diversity analysis in jojoba [*Simmondsia chinensis* (Link) Schneider]. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 19, 255-258. <https://doi.org/10.1007/BF03263351>
- Diniz-Filho, J. A. F., Soares, T. N., Lima, J. S., Dobrovolski, R., Landeiro, V. L., Telles, M. P. d. C.,...Bini, L. M. (2013). Mantel test in population genetics. *Genetics and molecular biology*, 36, 475-485. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572013000400002>
- Giuliano, P., Spilimbergo, A., & Tonon, G. (2006). Genetic, cultural and geographical distances, 2229, 1-30 <http://ssrn.com/abstract=921405>
- Hosseini, F., Shahsavand Hassani, H., Arvin, M., Baghizadeh, A., & Mohammadi-Nejad, G. (2011). Sex determination of jojoba (*Simmondsia chinensis* cv. Arizona) by random amplified polymorphic DNA (RAPD) molecular markers. 1684-5315
- Ince, A. G., Karaca, M., & Onus, A. N. (2010). A reliable gender diagnostic PCR assay for jojoba (*Simmondsia chinensis* (Link) Schneider). *Genetic resources and crop evolution*, 57, 773-779. <https://doi.org/10.1007/s10722-009-9516-1>
- Kim, B.-R., Shin, J., Guevarra, R. B., Lee, J. H., Kim, D. W., Seol, K.-H.,...Isaacson, R. E. (2017). Deciphering diversity indices for a better understanding of microbial communities. *Journal of microbiology and biotechnology*, 27(12), 2089-2093. <https://doi.org/10.4014/jmb.1709.09027>
- Kumar, J., Heikrujam, M., Sharma, K., & Agrawal, V. (2019). SRAP and SSR marker-assisted genetic diversity, population structure analysis and sex identification in Jojoba (*Simmondsia chinensis*). *Industrial crops and products*, 133, 118-132. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.indcro.2019.03.006>
- Liu, X., Zhang, L., & Yang, S. (2022). Analysis of Floral Organ Development and Sex Determination in *Schisandra chinensis* by Scanning Electron Microscopy and RNA-Sequencing. *Life (Basel)*, 12(8). <https://doi.org/10.3390/life12081260>
- Liu, Y., Liu, M.-Y., Qi, Y.-X., Jin, X.-Y., Xu, H.-R., Chen, Y.-x.,...Su, H.-p. (2022). Synthesis and properties of wax based on waste cooking oil. *RSC advances*, 12(6), 3365-3371.
- Milbourne, D., Meyer, R., Bradshaw, J. E., Baird, E., Bonar, N., Provan, J.,...Waugh, R. (1997). Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. *Molecular breeding*, 3, 127-136. <https://doi.org/10.1023/A:1009633005390>
- Nahla, A., Adawy, S., Eliraq, M., El-Khasab, A., El-Aziz, Y., El-Bassel, E.,...El-Ashry, H. (2018). Selection and agronomical evaluation for some elite genotypes of jojoba. *Journal of Applied Life Sciences International*, 18(1), 1-12. <https://doi:10.9734/JALSI/2018/42332>
- Nolan, K. A., & Callahan, J. E. (2006). Beachcomber biology: The Shannon-Weiner species diversity index. Proc. workshop able, 334-338.
- Palzkill, D. A., Younes, M. H., & Hogan, L. (1989). AT-1310, AT-1487, and AT-3365: clonal jojoba germplasm selected for horticultural use. 24(3), 526-527 ref. 6
- Peakall, R., & Smouse, P. E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes*, 6(1), 288-295. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
- Prevost, A., & Wilkinson, M. (1999). A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and applied genetics*, 98, 107-112. <https://doi.org/10.1007/s001220051046>
- Rohlf, F. J. (1990). NTSYS-pc. *Numerical taxonomy and multivariate analysis system*.
- Sabreena, Nazir, M., Mahajan, R., Hashim, M. J., Iqbal, J., Alyemeni, M. N.,...Zargar, S. M. (2021). Deciphering allelic variability and population structure in buckwheat: An analogy between the efficiency of ISSR and SSR markers. *Saudi J Biol Sci*, 28(11), 6050-6056. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.07.061>
- Sant'Anna, I. d. C., Silva, G. N., Carneiro, V. Q., Pontes, D. S., Nascimento, M., & Cruz, C. D. (2020). Comparison of projection of distance techniques for genetic diversity studies. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 42, e42483. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v42i1.42483>
- Sharma, K., Agrawal, V., Gupta, S., Kumar, R., & Prasad, M. (2008). ISSR marker-assisted selection of male and female plants in a promising dioecious crop: jojoba (*Simmondsia chinensis*). *Plant Biotechnology Reports*, 2, 239-243. <https://doi.org/10.1007/s11816-008-0070-7>
- Solliman, M. E., Elbarbary, H. S., Abdullah, M. B., Kapiel, T. Y. S., Aboul-Soud, M. A. M., & Mohasseb, H. A. A. (2023). Discovery of the human homolog of sex-determining region (SRY) gene in dioecious plants. *Saudi J Biol Sci*, 30(2), 103548. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2022.103548>

- Stefan Van Dongen, T., & Winnepeninckx, B. (1996). Multiple UPGMA and neighbor-joining trees and the performance of some computer packages. *Mol. Biol. Evol*, 13(2), 309-313.
- Sturtevant, D., Lu, S., Zhou, Z. W., Shen, Y., Wang, S., Song, J. M., ... Guo, L. (2020). The genome of jujuba (*Simmondsia chinensis*): A taxonomically isolated species that directs wax ester accumulation in its seeds. *Sci Adv*, 6(11), eaay3240. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aay3240>
- Tomkowiak, A., Bocianowski, J., Kwiatek, M., & Kowalczewski, P. Ł. (2020). Dependence of the heterosis effect on genetic distance, determined using various molecular markers. *Open Life Sciences*, 15(1), 1-11. <https://doi.org/10.1515/biol-2020-0001>
- Varshney, R. K., Chabane, K., Hendre, P. S., Aggarwal, R. K., & Graner, A. (2007). Comparative assessment of EST-SSR, EST-SNP and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of genetic resources using wild, cultivated and elite barleys. *Plant science*, 173(6), 638-649. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.08.010>
- Venkatesan, J., Ramu, V., Sethuraman, T., Sivagnanam, C., & Doss, G. (2021). Molecular marker for characterization of traditional and hybrid derivatives of *Eleusine coracana* (L.) using ISSR marker. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 178. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00277-1>
- Verma, K. S., Ul Haq, S., Kachhwaha, S., & Kothari, S. L. (2017). RAPD and ISSR marker assessment of genetic diversity in *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad: a unique source of germplasm highly adapted to drought and high-temperature stress. *3 Biotech*, 7(5), 288. <https://doi.org/10.1007/s13205-017-0918-z>
- Wang, L.-L., Zhang, F.-Y., Dong, W.-W., Wang, C.-L., Liang, X.-Y., Suo, L.-L.,...Jiang, P.-H. (2020). A novel approach for the forensic diagnosis of drowning by microbiological analysis with next-generation sequencing and unweighted UniFrac-based PCoA. *International journal of legal medicine*, 134, 2149-2159. <https://doi.org/10.1007/s00414-020-02358-1>
- Zhurakovskiy, B., Averichev, I., & Shakhmatov, I. (2023). Using the Latest Methods of Cluster Analysis to Identify Similar Profiles in Leading Social Networks. 116-126.