Crop Biotechnology Open Access

Winter (2025) 14 (2): 81-98
DOI: 10.30473/cb.2024.71938.1980

REVIEW ARTICLE

A review of plant genetic diversity analysis using PCR-based markers banding pattern

Zahra Sadat Mousavi[1], Fatemeh Nasernakhaei[1](ORCID: 0000000277144331)

1. Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

Correspondence:
Fatemeh Nasernakhaei
Email: f.nasernakhaei@scu.ac.ir

Received: 4/Aug/2024
Accepted: 4/Nov/2024

How to cite:
Mousavi, Z.S., & Nasernakhaei, F. (2025). A review of plant genetic diversity analysis using PCR-based markers banding pattern. *Crop Biotechnology*, 14 (2), 81-98.
(DOI: 10.30473/cb.2024.71938.1980)

ABSTRACT

Genetic diversity is a crucial component of biodiversity, essential for preserving gene banks and enriching plant genetic resources. One way to assess genetic diversity is using band patterns (0 and 1) produced by PCR-based DNA markers (such as RAPD, SSR, ISSR, AFLP, SCoT etc.). After achieving reproducibility, the bands are selected, scored, and analyzed. The data is analyzed using multivariate statistical methods, including cluster and principal coordinate analysis. Genetic similarity or dissimilarity coefficients are used based on 0 and 1 data (for dominant and codominant markers), and allelic frequency coefficients (for codominant markers). Some algorithms such as UPGMA and Ward are employed to group the studied individuals and investigate their genetic relationships. Quantifying polymorphism and assessing genetic diversity within and between populations will depend on the type of marker (dominant and codominant) and reproduction mode. Parameters such as polymorphic information content (PIC), resolving power (Rp), marker index (MI), polymorphic loci/marker ratio, heterozygosity (H)/gene diversity, allelic diversity (A), the effective number of alleles (Ae), Shannon's index (I), Wright's F statistic (F_{IT}, F_{ST}, F_{IS}), G_{st} and analysis of molecular variance (AMOVA) are evaluated. Software tools (NTSYSpc, R, DARwin, PAST, Excel, PowerMarker, Popgen, and GenAlEx) can assist with grouping and estimating genetic diversity.

KEYWORDS

Dominant and Codominant markers, Gel scoring, Genetic diversity measurement, Multivariate statistical methods, Polymorphism measurement.

© 2024, by the author(s). Published by Payame Noor University, Tehran, Iran.
This is an open access article under the CC BY 4.0 license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).
https://cropbiotech.journals.pnu.ac.ir/

زیست‌فناوری گیاهان زراعی

سال چهاردهم، شماره دوم، پیاپی ۴۸، زمستان ۱۴۰۳ (۸۱-۹۸)

DOI: 10.30473/cb.2024.71938.1980

«مقاله مروری»

مروری بر تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی گیاهی با استفاده از الگوی نواری نشانگرهای مبتنی بر PCR

زهرا سادات موسوی[۱]، فاطمه ناصرنخعی[۱](ارکید: ۰۰۰۰۰۰۰۲۷۷۱۴۴۳۳۱)

۱. گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

نویسنده مسئول:
فاطمه ناصرنخعی
رایانامه: f.nasernakhaei@scu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۱۴
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۱۴

استناد به این مقاله:
موسوی، زهرا سادات و ناصرنخعی، فاطمه (۱۴۰۳). مروری بر تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی گیاهی با استفاده از الگوی نواری نشانگرهای مبتنی بر PCR، *فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی*، ۱۴ (۲)، ۸۱-۹۸.
(DOI: 10.30473/cb.2024.71938.1980)

چکیده

تنوع ژنتیکی یکی از سطوح مهم تنوع زیستی است که برای ایجاد بانک‌های ژنی و غنی‌سازی ذخایر ژنتیکی گیاهی حائز اهمیت می‌باشد. از جمله راه‌های ارزیابی تنوع ژنتیکی، استفاده از الگوی نواری یا باندی (داده‌های صفر و یک) حاصل از نشانگرهای DNA مبتنی بر PCR (مانند RAPD، SSR، ISSR، AFLP، SCoT و غیره) می‌باشد. در صورت قابلیت تکرارپذیری، باندها انتخاب، امتیازدهی و مورد تجزیه و تحلیل قرار می‌گیرند. تجزیه و تحلیل داده‌ها، به وسیله روش‌های آماری چند متغیره نظیر تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی با استفاده از ضرایب تشابه یا عدم تشابه ژنتیکی مبتنی بر داده‌های صفر و یک (برای نشانگرهای غالب و هم‌بارز) و یا ضرایب مبتنی بر فراوانی آللی (برای نشانگرهای هم‌بارز) و برخی الگوریتم‌ها نظیر UPGMA و Ward انجام می‌شود و بدین ترتیب گروه‌بندی افراد مورد مطالعه و بررسی روابط ژنتیکی آن‌ها صورت می‌گیرد. همچنین با توجه به نوع نشانگر (غالب یا هم‌بارز) و سیستم زادآوری، ارزیابی چندشکلی و بررسی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها با استفاده از پارامترهایی نظیر محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)، قدرت تفکیک (Rp)، شاخص نشانگری (MI)، نسبت مکان‌های ژنی چندشکل/نسبت نشانگرهای چندشکل، هتروزیگوسیتی (H)/تنوع ژنی، تنوع آللی (A)، تعداد آل‌های موثر (A_e)، شاخص شانون (I)، آماره F رایت (F_{IT}, F_{ST}, F_{IS})، G_{st} و تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) انجام می‌شود. بدین منظور می‌توان از برخی نرم‌افزارها (R، NTSYSpc، DARwin، PAST، Excel، PowerMarker، Popgen و GenAlEx) در گروه‌بندی و برآورد تنوع ژنتیکی بهره جست.

واژه‌های کلیدی

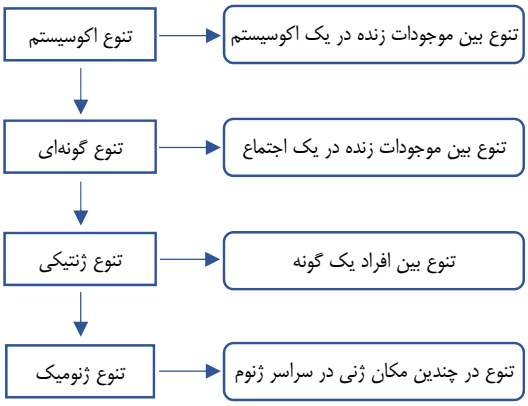
امتیازدهی ژل، اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی، اندازه‌گیری چندشکلی، روش‌های آماری چند متغیره، نشانگرهای غالب و هم‌بارز.

حق انتشار این مستند، متعلق به نویسندگان آن است. ۱۴۰۳ ©. ناشر این مقاله، دانشگاه پیام نور است.

این مقاله تحت مجوز Creative Commons Attribution (CC BY 4.0) منتشر شده و استفاده از آن با ارجاع صحیح مجاز است.
(http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)
https://cropbiotech.journals.pnu.ac.ir/

مقدمه

تنوع زیستی[1] به گوناگونی[2] موجودات زنده اشاره دارد (Swingland, 2001) که ارزش آن برای بشر در دهه‌های اخیر به خوبی شناخته شده است و بسیاری استدلال می‌کنند که وجود آن برای توسعه پایدار فعالیت‌های مختلف انسانی، ضروری است (Shiva, 1994). به‌طور کلی تنوع در چهار سطح تعریف می‌گردد (شکل ۱). تنوع اکوسیستم[3] نشان‌دهنده تغییرپذیری در میان جوامع مختلف گونه‌ها است. در سطح بعدی تنوع گونه‌ای[4] است که نشان‌دهنده گونه‌های مختلف در یک اجتماع[5] است که به آن غنای گونه‌ای[6] نیز گفته می‌شود. تنوع ژنتیکی[7] به تنوع موجود در ژنوتیپ‌های مختلف یک گونه اطلاق می‌گردد. به این دلیل، وجود آلل های متفاوت یک ژن در افراد مختلف، سبب ایجاد فنوتیپ های متفاوت می‌شود. تنوع ژنومیک[8] را می‌توان به عنوان تنوع در چندین مکان ژنی[9] در یک فرد تعریف کرد. در این میان، تنوع ژنتیکی بیش‌ترین توجه را در بین محققین بخش کشاورزی به خود اختصاص داده است (Bhandari *et al.*, 2017).



شکل ۱. انواع تنوع (Bhandari *et al.*, 2017)

Figure 1. Types of diversity (Bhandari *et al.*, 2017)

به تغییرات ویژگی‌های وراثتی موجود در جمعیت یک گونه تنوع ژنتیکی می‌گویند (Swingland, 2001). تنوع در صفات وراثتی ممکن است خود را به شکل تغییر مورفولوژی، آناتومی، رفتار فیزیولوژیکی یا ویژگی‌های بیوشیمیایی نشان دهد (Bhandari *et al.*, 2017). تنوع ژنتیکی میان افراد، نشان‌دهنده وجود آلل‌های مختلف در مخزن ژنی و نیز ژنوتیپ‌های متفاوت در جمعیت‌ها می‌باشد (Caliskan, 2012). برخی منابع به گوناگونی‌های موجود در بین ژنوتیپ‌های مختلف با توجه به ترکیب ژنتیکی ژنوتیپ‌های مربوط به یک گونه یا بین گونه‌ها، تنوع ژنتیکی می‌گویند (Bhandari *et al.*, 2017). همچنین Salgotra and Chauhan (2023) تنوع ژنتیکی را در سه سطح تنوع بین گونه‌ها، تنوع بین جمعیت‌های یک گونه و تنوع بین افراد یک جمعیت تعریف می کنند. بنابراین تنوع ژنتیکی یک اصطلاح گسترده است که در تعبیر رایج، با گوناگونی ژنتیکی[10] به اشتباه، مترادف یکدیگر در نظر گرفته می‌شوند. گوناگونی[11] به تفاوت در یک یا چند صفت موجود زنده گفته می‌شود. به عبارتی گوناگونی ژنتیکی، تغییر در آلل‌های ژن یا تغییر در توالی‌های DNA/RNA در مخزن ژنی یک گونه یا جمعیت است که خود را در قالب فنوتیپ‌های متفاوت بیان می‌کند (Bhandari *et al.*, 2017). تنوع ژنتیکی از طریق شمارش تعداد ژن‌های مختلف در یک مخزن ژنی قابل اندازه‌گیری است، اما گوناگونی ژنتیکی[12] را تنها می‌توان تخمین زد و آن را می‌توان به عنوان بلوک‌های سازنده تنوع ژنتیکی در نظر گرفت (Bhandari *et al.*, 2017). جهش[13]، رانش ژنتیکی[14]، نوترکیبی[15] و جریان ژنی[16] برخی از منابع مختلف ایجادکننده تنوع ژنتیکی هستند (Salgotra and Chauhan, 2023).

1. Biodiversity
2. Variety
3. Ecological diversity
4. Species diversity
5. Community
6. Species richness
7. Genetic diversity
8. Genomic diversity
9. Gene-loci
10. Genetic variability
11. Variability
12. Genetic variation
13. Mutation
14. Genetic drift
15. Recombination
16. Gene flow

ذخایر ژنتیکی گیاهی یکی از ارزشمندترین منابع طبیعی می‌باشند که آگاهی از تنوع موجود در آن از ملزومات ایجاد و غنی‌سازی بانک‌های ژنی و همچنین توسعه‌ی انواع محصولات زراعی جدید می‌باشد (Mohammadi, 2006; Darvish Zadeh and Azizi, 2015). بنابراین حفظ و استفاده از این ذخایر ژنتیکی نقش مهمی در کشاورزی، امنیت غذایی و جنگلداری خواهد داشت. موضوع تنوع ژنتیکی برای کشاورزان و به‌نژادگران به منظور به دست آوردن ارقام جدید با عملکرد بالا، کیفیت بهتر یا سازگارتر در برابر تنش‌های غیرزیستی (مانند گرما و سرمای شدید)، یا مقاوم‌تر در برابر آفات و عوامل بیماری‌زا و نیز مقاوم به آلاینده‌های مختلف هوا و خاک لازم است (Rao, 2004; Laurentin, 2009; Bhandari *et al*., 2017; Shashidhara *et al*., 2023). لذا وجود تنوع ژنتیکی بالا برای یک جمعیت به لحاظ بقا، سازگاری و تکامل آن جمعیت حیاتی است (Nonić and Šijačić-Nikolić, 2019).

با توجه به اهمیت تنوع ژنتیکی، ارزیابی آن با استفاده از نشانگرهای ژنتیکی[1] می‌تواند اطلاعات ارزشمندی را در زمینه حفظ و نگهداری از گیاهان و همچنین استفاده از آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی در اختیار پژوهشگران قرار دهد. نشانگرهای ژنتیکی، اشکال بیولوژیکی مانند ویژگی‌های فنوتیپی[2] (صفات ریخت‌شناسی)، آنزیم‌ها/پروتئین‌ها و قطعاتی از DNA بوده که از والدین به نتاج[3] به ارث می‌رسند و به دلیل استفاده از آن‌ها در ردیابی یک فرد یا یک ژن، نشانگر نامیده می‌شوند (Kadirvel *et al*., 2015). نشانگرهای ژنتیکی به نشانگرهای ریخت‌شناسی و نشانگرهای مولکولی در سطح پروتئین و DNA (مبتنی و غیرمبتنی بر PCR) تقسیم می‌شوند. این نشانگرها در مطالعات فیلوژنتیک و تعیین میزان قرابت، انتقال ژن از گونه‌های خودرو، رده‌بندی گیاهان زراعی، تعیین محل ژن‌های کنترل‌کننده صفات کیفی و کمی، تهیه نقشه‌های ژنتیک و تسهیل انتخاب به کمک نشانگر کاربرد دارند (Naghavi *et al*., 2009).

همچنین با استفاده از نشانگرها، شناسایی مولکولی[4] منابع گیاهی در سطح DNA از طریق الگوی باندها یا انگشت‌نگاری[5] امکان‌پذیر است. مقایسه اثر انگشت در مطالعات منابع ژنتیکی گیاهی برای برآورد تنوع ژنتیکی در یک مجموعه[6] (درون یا بین گروهی)، و یا تخمین مفید بودن نشانگرهای DNA در شناسایی یک اکسشن[7] خاص استفاده می‌شود (Laurentin, 2009).

در این مطالعه مفاهیم مرتبط با ارزیابی تنوع ژنتیکی منابع گیاهی و چگونگی اندازه‌گیری آن با استفاده از نتایج حاصل از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR که شناسایی چندشکلی در آن‌ها بر اساس جداسازی روی ژل و امتیازدهی[8] باندها (الگوی نوارها) است، مرور می‌گردد.

نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR

نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR (Kumar *et al*., 2009; Kalendar and Schulman, 2014; Dar *et al*., 2024; Amiteye, 2021; Bidyananda *et al*., 2019; Rani *et al*., 2024) (جدول ۱) بازتاب تفاوت‌های موجود در ردیف DNA افراد می‌باشند و چندشکلی[9] را در سطح DNA با استفاده از PCR شناسایی می‌کنند. این نشانگرها نواحی ژنومی رمزکننده و غیر رمزکننده خاصی هستند که به منظور تجزیه و تحلیل ژنوم مورد استفاده قرار می‌گیرند. همچنین به دلیل فراوانی فوق‌العاده آن‌ها، عدم تاثیرپذیری از شرایط محیطی، دقت و قابلیت مطلوب تفسیر نتایج، هم‌بارز[10] بودن بسیاری از این نشانگرها و سهولت تشخیص افراد هتروزیگوت[11] (ناخالص) از هموزیگوت[12] (خالص) اهمیت بیش‌تری نسبت به نشانگرهای ریخت‌شناسی پیدا کرده‌اند (Agarwal *et al*., 2008; Naghavi *et al*., 2009; Heidari, 2011; Darvish Zadeh and Azizi, 2015).

1. Genetic marker
2. Traits
3. Progeny
4. Molecular identity
5. Fingerprint
6. Collection
7. Accession
8. Scoring
9. Polymorphism
10. Co-dominant
11. Heterozygous
12. Homozygous

نشانگرهای مولکولی ممکن است به صورت نشانگرهای چند مکانی[1] و یا تک مکانی[2] باشند. در یک تجزیه و تحلیل با استفاده از نشانگرهای چند مکانی، امکان مشاهده باندهای زیادی وجود دارد، در حالی‌که برای نشانگرهای تک مکانی، حداکثر دو باند که مربوط به آلل‌های ژنوم دیپلوئید می‌باشد، رویت می‌گردد. بسته به اهداف مطالعه، محقق ممکن است از نشانگرهای تک یا چند مکانی و یا ترکیبی از هر دو استفاده کند. نشانگرهای چند مکانی اطلاعات گسترده‌ای از ژنوم افراد را ارائه می‌دهند، به همین دلیل در مطالعات ژنتیک جمعیت، با توجه به اینکه هدف تمایز میان افراد یک جمعیت بر اساس الگوی باندها (نوارها) است، نشانگرهای چند مکانی کارآمدتر هستند (Simpson, 1997). نشانگرهای مولکولی می‌توانند به صورت نشانگرهای چندشکل[3] و یک شکل[4] مشاهده شوند؛ بدین معنا که اگر نشانگر قادر به شناسایی تفاوت‌های میان افراد یک گونه یا گونه‌های متفاوت باشند، چندشکل و در صورتی که پتانسیل ایجاد تمایز میان ژنوتیپ‌ها را نداشته باشند، یک شکل تلقی می‌گردند (Kanouni and Khalily, 2010). نشانگرها را می‌توان تحت عنوان غالب[5] (بارز) و هم‌بارز نیز تقسیم‌بندی کرد (Kadirvel *et al*., 2015). مزیت نشانگرهای هم‌بارز نسبت به نشانگرهای غالب، تمایز افراد هموزیگوت از هتروزیگوت است (Laurentin, 2009).

روند شناسایی گوناگونی‌های ژنتیکی افراد مورد مطالعه (ژنوتایپینگ)[6] با استفاده از نشانگرهای مبتنی بر PCR بر اساس امتیازدهی ژل

روش کلی ژنوتایپینگ با استفاده از نشانگرهای DNA مبتنی بر PCR به شرح شکل ۲ می‌باشد. ابتدا DNA گیاهی استخراج شده و پس از سنجش کمیت و کیفیت آن، با استفاده از نشانگرهای DNA واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام می‌گیرد. جهت مشاهده قطعات تکثیر شده می‌توان از ژل آگارز یا پلی‌آکریل آمید استفاده نمود. سپس باندهای مشاهده شده بر روی ژل امتیازدهی شده و نهایتا تجزیه و تحلیل داده‌ها انجام می‌گردد.

امتیازدهی

امتیازدهی باندها به صورت دستی یا با کمک برخی نرم‌افزارها (Mukhopadhyay and Bhattacharjee, 2016) نظیر CLIQS، PyElph، TotalLab، ImageQuant، Quantity One و VisionWorks انجام می‌شود. روش کار به این صورت خواهد بود که باندهای واضح انتخاب و به صورت وجود و عدم وجود باند (یک و صفر) برای نشانگرهای غالب و هم‌بارز و به صورت فراوانی آللی برای نشانگرهای هم‌بارز امتیازدهی می‌شود؛ البته در اکثر موارد نشانگرهای هم‌بارز مانند نشانگرهای غالب به صورت یک و صفر امتیازدهی می‌شوند (Mohammadi, 2006; Heras *et al*., 2016) (شکل ۳) و داده‌ها به صورت یک ماتریس دوتایی[7] در اکسل آماده می‌شود (Sarwat, 2012). این ماتریس برای نشانگرهای غالب و هم‌بارز متفاوت است (شکل ۳). در صورت استفاده از نشانگر هم‌بارز، ماتریس دوتایی باید به ماتریسی از ژنوتیپ‌ها (هموزیگوت و هتروزیگوت) برای هر فرد در هر مکان[8] تبدیل شود (Laurentin, 2009).

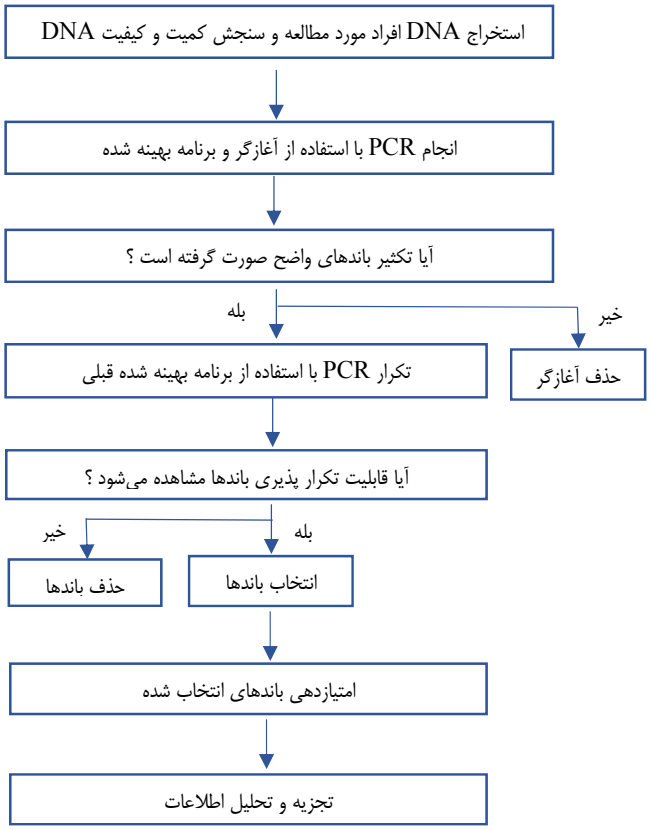
تجزیه و تحلیل اطلاعات

تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت‌ها شامل کمی کردن تنوع درون جمعیت[9] و بین جمعیت‌ها و/ یا افراد[10]، کمی کردن روابط ژنتیکی[11] و نمایش روابط ژنتیکی است (De Vicente *et al*., 2004) که در ادامه به آن‌ها پرداخته می‌شود.

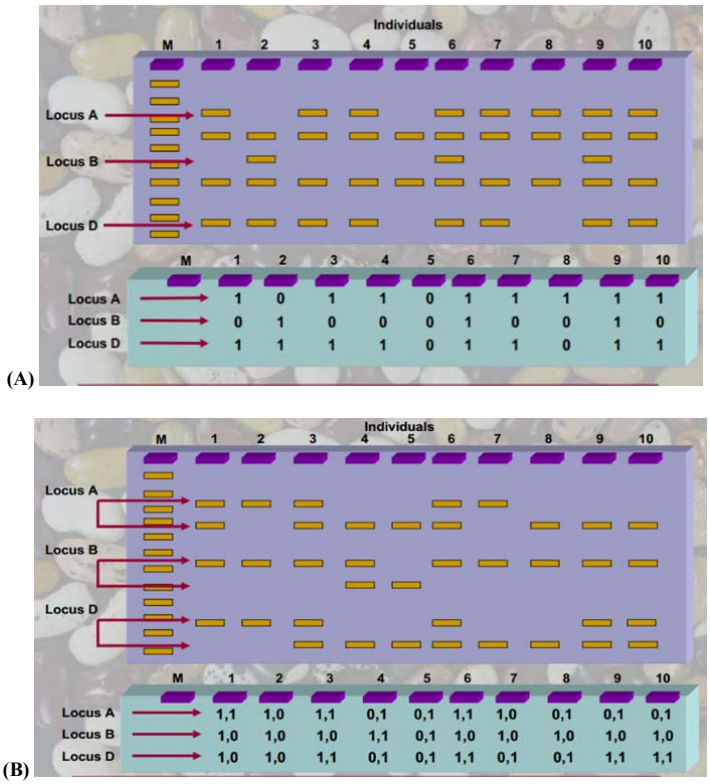
1. Multi-locus
2. Single-locus
3. Polymorph
4. Monomorph
5. Dominant
6. Genotyping
7. Binary matrix
8. Locus
9. Intrapopulation genetic diversity
10. Interpopulation genetic diversity
11. Genetic relationships

جدول ۱. برخی از نشانگرهای مبتنی بر PCR و استفاده شده در ارزیابی تنوع ژنتیکی
Table 1. Some of the PCR-based markers used in genetic diversity assessment

نام نشانگر	منبع	مزایا	معایب و محدودیت‌ها	مثال
دی‌ان‌ای چندشکل تکثیر شده تصادفی (RAPD) **R**andomly **A**mplified **P**olymorphic **D**NA	Williams *et al*., (1990)	پوشش بهتر ژنوم	تکرارپذیری پایین، نشانگر غالب	*Abelmoschus esculentus* L. (Hamdan *et al*., 2024)
ردیف‌های تکراری ساده یا ریزماهواره (SSR) **S**imple **S**equence **R**epeats	Akkaya *et al*., (1992)	تکرارپذیری و چندشکلی بالا، نشانگر هم‌بارز	نیاز به اطلاعات توالی	*Hordeum vulgare* L. (Esmaili *et al*., 2014); *Solanum lycopersicum* L. (Hosseini *et al*., 2023)
توالی‌های چندشکل تکثیر شده شکسته شده (CAPS) **C**leaved **A**mplified **P**olymorphic **S**equence	Akopyanz *et al*., (1992)	تکرارپذیری بالا، نشانگر هم‌بارز	نیاز به اطلاعات توالی برای ساخت آغازگر	*Solanum lycopersicum* L. (Pozharskiy *et al*., 2023)
ناحیه تکثیر شونده با ردیف مشخص (SCAR) **S**equence **C**haracterized **A**mplified **R**egion	Paran and Michelmore, (1993)	تکرارپذیری بالا، نشانگر هم‌بارز	نیازمند توالی ژن جهت ساخت آغازگر	*Amaranthus* (Ray and Roy, 2009)
تفاوت‌های ریزماهواره تکثیرشونده تصادفی (RAMP) **R**andom **A**mplified **M**icrosatellite **P**olymorphisms	Wu *et al*., (1994)	عدم نیاز به اطلاعات توالی برای ساخت آغازگر، نشانگر هم‌بارز	مشکل تکرارپذیری	*Hordeum vulgare* (Yongcui *et al*., 2005)
توالی‌های تکراری ساده میانی (ISSR) **I**nter-**S**imple **S**equence **R**epeat	Zietkiewics *et al*., (1994)	عدم نیاز به اطلاعات توالی برای ساخت آغازگر، نیاز به مقدار کم DNA	مشکل تکرارپذیری، نشانگر غالب	*Ricinus communis* (Sharifi Soltani *et al*., 2023)
تفاوت طول قطعات حاصل از تکثیر (AFLP) **A**mplified **F**ragment **L**ength **P**olymorphism	Vos *et al*., (1995)	عدم نیاز به اطلاعات توالی	مشکل تکرارپذیری، نشانگر غالب	*Oryza sativa* L. (Alizadeh *et al*., 2013); *Sorghum bicolor* L. Moench (Medraoui *et al*., 2024)
چندشکلی در تکثیر بین رتروترانسپوزون‌ها (IRAP) **I**nter-**R**etrotransposon **A**mplified **P**olymorphism	Kalendar *et al*., (1999)	چندشکلی و پوشش ژنومی بالا	تشخیص آلل، نشانگر غالب	*Gladiolus* (Nazarbeigi *et al*., 2024)
چندشکلی در تکثیر بین ریزماهواره و رتروترانسپوزون (REMAP) **R**etrotransposon-**M**icrosatellite **A**mplified **P**olymorphism	Kalendar *et al*., (1999)	چندشکلی و پوشش ژنومی بالا	از نظر تکنیکی دارای مشکل تشخیص آلل، نشانگر غالب	*Triticum turgidum* L. (Marzang *et al*., 2020)
چندشکلی نواحی هدف کدون آغاز (SCoT) **S**tart **C**odon **T**argeted	Collard and Mackill, (2009)	سادگی، مقرون به صرفه	گاها مشکل تکرارپذیری، نشانگر غالب	*Foeniculum vulgare* Mill. (Nikkerdar *et al*., 2018); *Cressa cretica* L. (Jahangir, 2021)



شکل ۲. ژنوتایپینگ با استفاده از نشانگرهای DNA مبتنی بر PCR بر اساس الگوی باندها (Ng and Tan, 2015)
Figure 2. Genotyping using PCR-based DNA markers banding pattern (Ng and Tan, 2015)



شکل ۳. امتیازدهی ژل نشانگر A) غالب و B) هم‌بارز در ۱۰ فرد (De Vicente *et al*., 2004)

Figure 3. Gel scoring A) dominant and B) codominant marker in 10 individuals (De Vicente *et al*., 2004)

جمعیت به گروهی از افراد که علاوه بر مخزن ژنی مشترک، از توانایی تلاقی با یکدیگر نیز برخوردار هستند اطلاق می‌شود. ساختار هر جمعیت در سه سطح افراد[1]، زیرجمعیت[2] و جمعیت کل تقسیم می‌گردد. توصیف تنوع ممکن است در درون یک جمعیت یا بین جمعیت‌ها انجام شود (De Vicente *et al*., 2004). زمانی که الگوی باندها امتیازدهی شد، می‌بایست بر اساس نوع نشانگر مورد استفاده (غالب یا هم‌بارز) و سیستم زادآوری گیاه، میزان چندشکلی و تنوع مشاهده شده در درون یا بین جمعیت‌ها از نظر کمی تعیین شود. از مهم‌ترین پارامترها در برآورد تنوع درون جمعیتی می‌توان به اندازه‌گیری میزان چندشکلی، نسبت مکان‌های چندشکل، میانگین تعداد آلل‌ها در هر مکان، تعداد آلل‌های موثر در هر مکان و میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار اشاره کرد (De Vicente *et al*., 2004; Nonić and Šijačić-Nikolić, 2019). همچنین در ارزیابی تنوع بین جمعیتی از تمایز بین جمعیتی برای یک مکان[3] (g_{st})، تمایز بین جمعیتی برای چندین مکان[4] (G_{st})، سهم جمعیت در تنوع ژنتیکی کل[5]، آماره F رایت[6] و تجزیه واریانس مولکولی[7] (AMOVA) استفاده می‌شود (De Vicente *et al*., 2004; Nonić and Šijačić-Nikolić, 2019). برای برآورد پارامترهای مذکور می‌توان از نرم‌افزارهایی همچون Excel، PowerMarker، POPGENE و GenAlEx بهره برد. در ادامه به توضیح برخی از مفاهیم پارامترهای مورد استفاده برای بررسی میزان چندشکلی و تنوع ژنتیکی (جدول ۲) پرداخته می‌شود.

1. Individuals
2. Subpopulation

3. Interpopulation differentiation for one locus (gST)
4. Interpopulation differentiation for several loci (GST)
5. Population's contribution to total genetic diversity
6. Wright's F statistics
7. Analysis of Molecular Variance (AMOVA)

جدول ۲. برخی از پارامترهای مورد استفاده در برآورد میزان چندشکلی و تنوع ژنتیکی
Table 2. Some parameters used in the estimation of polymorphism and genetic diversity

پارامتر / نشانگر	محتوای اطلاعات چندشکلی	قدرت تفکیک	شاخص نشانگری	نسبت مکان‌های ژنی چندشکل / نسبت نشانگرهای چندشکل	هتروزیگوسیتی / تنوع ژنی	شاخص شانون	تنوع آللی	تعداد آل‌های موثر	تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی	آماره F رایت	پارامترهای نی
غالب	✓	✓	✓	✓	✓	✓			✓	✓	✓
هم‌بارز	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

آماره F_{st} برای نشانگرهای غالب نیز قابل محاسبه است.

محتوای اطلاعات چندشکلی[1]

محتوای اطلاعات چندشکلی نشان‌دهنده توانایی یک نشانگر در تشخیص چندشکلی میان افراد یک جمعیت است و به تعداد آلل‌های موجود و فراوانی توزیع آن‌ها بستگی دارد. لذا هر چه این پارامتر بالاتر باشد، ارزش آن نشانگر بیش‌تر است (Serrote *et al*., 2020). این پارامتر برای نشانگرهای هم‌بارز از طریق رابطه $PIC = 1 - \sum_{i=1}^{n} p_i^2$ (Botstein *et al*., 1980) و برای نشانگرهای غالب به روش $PIC = 2fi\ (1 - fi)$ محاسبه می‌شود که در آن‌ها منظور از p_i و fi فراوانی آلل iام است. دامنه تغییرات این پارامتر برای نشانگرهای هم‌بارز از صفر تا یک و برای نشانگرهای غالب صفر تا نیم می‌باشد (Serrote *et al*., 2020). برخی محققین همچون Chesnokov and Artemyeva (2015) آن را معادل تنوع ژنی[2] در نظر گرفته‌اند.

نسبت مکان‌های ژنی چندشکل/نسبت نشانگرهای چندشکل[3]

یکی از پارامترهایی که برای بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای غالب و هم‌بارز قابل استفاده است محاسبه چندشکلی می‌باشد. از آن‌جا که Ott (1992) سیستمی که فراوانی رایج‌ترین مرحله[4] آن کم‌تر از ۰/۹۵ باشد را به عنوان چندشکل معرفی می‌کند، در نشانگرهای غالب که فرض می‌شود هر باند یک مکان را نشان می‌دهد مرحله‌ای که او به آن اشاره می‌کند همان توجه به «حضور و عدم حضور باند در هر فرد» در میان افراد تشکیل‌دهنده گروه مورد مطالعه است. به عنوان مثال اگر یک باند در ۹۴ درصد از افراد دیده شود، رایج‌ترین مرحله «حضور باند» خواهد بود، بنابراین به عنوان چندشکل در نظر گرفته می‌شود. همچنین اگر باندی فقط در ۶ درصد افراد مشاهده شود، شایع‌ترین مرحله «عدم حضور باند» خواهد بود که در ۹۴ درصد افراد دیده می‌شود، بنابراین باز هم، باند چندشکل خواهد بود (Laurentin, 2009). این پارامتر برای نشانگرهای غالب به‌جای مکان‌های چندشکل، نشانگر چندشکل نامیده می‌شود. در نشانگرهای هم‌بارز یک مکان با تعداد باندهایی که آلل می‌نامند نشان داده می‌شود؛ بنابراین، اگر رایج‌ترین مرحله یعنی حضور یا عدم حضور باند (آلل) در کم‌تر از ۹۵ درصد از افراد تشکیل‌دهنده گروه مورد مطالعه دیده شود، مکان چندشکل است. این پارامتر به صورت نسبت تعداد مکان‌های ژنی چندشکل بر تعداد کل مکان‌ها برای نشانگرهای هم‌بارز یا نسبت نشانگرهای چندشکل بر تعداد کل نشانگرها برای نشانگرهای غالب قابل محاسبه است (Laurentin, 2009).

1. Polymorphic Information Content (PIC)
2. Gene diversity
3. Polymorphic loci/marker ratio
4. Stage

قدرت تفکیک[1] و شاخص نشانگری[2]

قدرت تفکیک پارامتری است که برای مشخص کردن توانایی نشانگر در تشخیص تفاوت میان ژنوتیپ‌ها استفاده می‌شود و به روش $Rp = \sum I_b$ محاسبه می‌گردد (Kumar and Agrawal, 2019). در این رابطه، منظور از I_b اطلاعات باندها[3] است که میزان عددی آن از صفر تا یک متغیر و حاصل از رابطه $I_b = 1 - (2|0.5 - p|)$ می‌باشد. در رابطه مذکور p نسبت افراد دارای باند به کل افراد است (Chesnokov and Artemyeva, 2015; Govindaraj *et al*., 2015).

شاخص نشانگری معیاری برای تعیین کارایی نشانگر در شناسایی مکان‌های چندشکل در بین ژنوتیپ‌های مختلف است که از حاصل‌ضرب محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) و نسبت چندگانه موثر[4] (EMR) از طریق رابطه $MI = EMR \times PIC$ برآورد می‌گردد. نسبت چندگانه موثر از طریق رابطه $EMR = n_p(n_p/n)$ محاسبه می‌گردد که در آن منظور از n_p تعداد مکان‌های چندشکل و n تعداد کل مکان‌ها است (Nagaraju *et al*., 2001; Kumar and Agrawal, 2019).

هتروزیگوسیتی/تنوع ژنی[5]

هتروزیگوسیتی (H) احتمال متفاوت بودن دو آلل در یک مکان (که به‌طور تصادفی از جمعیت انتخاب شده‌اند) است که تنها در نشانگرهای هم‌بارز (به دلیل شناسایی افراد هموزیگوت از هتروزیگوت) قابل استفاده است. اصطلاح تنوع ژنی همین کاربرد را دارد با این تفاوت که برای نشانگرهای غالب به کار می‌رود زیرا افراد هموزیگوت و هتروزیگوت به‌طور مستقیم متمایز نمی‌گردند (Laurentin, 2009). هتروزیگوسیتی در دو سطح هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H_E) و هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_O) تعریف می‌گردد که معمولا از H_E به منظور توصیف تنوع ژنتیکی استفاده می‌گردد زیرا نسبت به اندازه نمونه کم‌تر حساس است. هنگامی‌که H_O و H_E مشابه هستند (تفاوت قابل‌توجهی نداشته باشند)، تلاقی در جمعیت تقریبا تصادفی است (Chesnokov and Artemyeva, 2015). هتروزیگوسیتی برای هر مکان به روش $h = 1 - \sum p_i^2$ محاسبه می‌گردد که در آن p_i فراوانی آلل iام است (De Vicente *et al*., 2004). مقادیر این پارامتر از صفر تا یک متغیر است و زمانی که تعداد زیادی آلل در فراوانی‌های[6] مساوی وجود داشته باشد هتروزیگوسیتی مورد انتظار به حداکثر می‌رسد. میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار در تمام مکان‌ها تخمینی از گوناگونی ژنتیکی[7] در جمعیت است که با کم کردن فراوانی‌های مورد انتظار هموزیگوت‌ها در یک مکان از ۱ محاسبه می‌شود، این عمل برای همه مکان‌ها تکرار و سپس میانگین آن‌ها محاسبه می‌گردد (De Vicente *et al*., 2004). به گفته Laurentin (2009) رابطه فوق جهت محاسبه فراوانی آللی است و هتروزیگوسیتی یا تنوع ژنی برای هر مکان طبق رابطه $h = 2n\,(1 - \sum x_i^2)/(2n - 1)$ برآورد می‌گردد؛ که در این رابطه منظور x_i فراوانی آلل iام (یا نشانگر) و n تعداد افراد است. برای به دست آوردن یک دید کلی از تنوع ژنتیکی در یک جمعیت (از نظر مفهومی) هتروزیگوسیتی/تنوع ژنی مفهومی مناسب‌تر از PIC است (Laurentin, 2009).

تنوع آللی[8] و تعداد آلل‌های موثر[9]

ساده‌ترین راه برای اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی، کمی کردن تعداد آل‌های موجود است. تنوع آللی (A) میانگین تعداد آل‌ها در هر مکان است و برای توصیف تنوع ژنتیکی استفاده می‌شود و از طریق $A = n_i/n_l$ برآورد می‌گردد که در آن n_i تعداد کل آل‌های موجود در مکان‌ها و n_l تعداد مکان‌ها است (Govindaraj *et al*., 2015; Mukhopadhyay and Bhattacharjee, 2016). این پارامتر نسبت به اندازه نمونه حساس بوده و با افزایش

1. Resolving Power (RP)
2. Marker Index (MI)
3. Informative bands (Ib)
4. Effective Multiplex Ratio (EMR)
5. Heterozygosity (H)/Gene diversity
6. Frequencies
7. Genetic variability
8. Allelic diversity (A)
9. Effective number of alleles (Ae)

اندازه نمونه جمعیت احتمال آشکار شدن یک آلل جدید (نادر) افزایش می‌یابد (Laurentin, 2009).

اصطلاح تعداد آلل‌های موثر (A_e) که توسط Hartl and Clark (1997) مطرح شد (Laurentin, 2009) عبارت از اندازه‌گیری تعداد آلل‌های با فراوانی برابر است و جهت دستیابی به سطح معینی از تنوع ژنی لازم می‌باشد. از آن‌جا که جمعیتی با سه آلل با فراوانی مشابه نسبت به جمعیتی که یک آلل با فراوانی بالا و دو آلل با فراوانی کم، چندشکلی بیش‌تری نشان می‌دهد، لذا A_e معیار بهتری نسبت به A است (Bagherieh Najjar *et al*., 2014). تعداد آلل‌های موثر از طریق $Ae = 1/(1-h) = 1/\sum p_i^2$ محاسبه می‌شود که p_i فراوانی آلل iام در یک مکان و $h = 1 - \sum p_i^2$ میزان هتروزیگوسیتی در یک مکان است (De Vicente *et al*., 2004). بنابراین دستیابی به بیش‌ترین تعداد آلل‌های موثر زمانی رخ می‌دهد که هتروزیگوسیتی بالا باشد و این مسئله مستلزم برابر بودن فراوانی همه آلل‌ها است. البته این محاسبه ممکن است تحت تاثیر اندازه نمونه قرار گیرد (De Vicente *et al*., 2004).

شاخص شانون[1]

شاخص تنوع شانون برای ارزیابی تنوع در سطوح مختلف از ژن‌ها و جمعیت‌ها گرفته تا همه گونه‌ها و اکوسیستم‌ها پیشنهاد شده است. اگرچه برخی از محققین استفاده از این شاخص به عنوان معیار تنوع ژنتیکی را رد می‌کنند (Hennink and Zeven, 1990; Konopiński, 2020). در مطالعات ژنتیک جمعیت، وقتی در برخی از جمعیت‌ها چند آلل مشترک غالب باشد و در جمعیت‌های دیگر تغییرات[2] به‌طور یکنواخت توسط همه آلل‌ها ایجاد شود امکان تشخیص سطح تغییرات بین جمعیت‌ها (با تعداد آلل یکسان) توسط شاخص شانون فراهم خواهد شد. شاخص شانون در مقایسه با هتروزیگوسیتی، به از دست دادن واریانت‌های نادر (مثلا به دلیل تنگناهای ژنتیکی)[3] حساس‌تر است. همچنین این شاخص حامل اطلاعات بیش‌تری نسبت به غنای آللی یا تعداد آلل‌ها می‌باشد (Sherwin *et al*., 2017). این پارامتر بر اساس رابطه $I = -\sum p_i \log_2 p_i$ حساب می‌شود که در این رابطه p_i فراوانی حضور یا عدم حضور یک باند در یک مکان است (Shannon and Weaver, 1949). از نرم‌افزاری نظیر GenAlEx می‌توان برای اندازه‌گیری این شاخص استفاده نمود.

آماره F رایت[4] و G_{st}[5]

یکی از راه‌های مطالعه ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها استفاده از آماره‌های F (F_{IT}, F_{ST}, F_{IS}) است که امکان آنالیز ساختار جمعیت‌های در حال تقسیم[6] را فراهم می‌کند (De Vicente *et al*., 2004). آماره F رایت یا شاخص تثبیت[7] به منظور برآورد تفاوت هتروزیگوسیتی مشاهده شده و هتروزیگوسیتی مورد انتظار وقتی‌که تعادل هاردی واینبرگ برقرار باشد به کار می‌رود (Laurentin, 2009). تمایز در سه سطح کل گروه ($F_{IT} = 1 - (H_I/H_T)$)، بین گروه‌های فرعی ($F_{ST} = 1 - (H_S/H_T)$) و درون گروه‌های فرعی ($F_{IS} = 1 - (H_I/H_S)$) ارزیابی می‌شود؛ که در این روابط منظور از H_I میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده در تمام مکان‌ها، H_T میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار در کل گروه و H_S میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار در گروه‌های فرعی است. آماره‌های مذکور برای نشانگرهای هم‌بارز قابل محاسبه‌اند زیرا نیازمند برآورد هتروزیگوسیتی مشاهده شده می‌باشند (Laurentin, 2009). آماره F_{ST} برای نشانگرهای غالب نیز قابل اجرا است. دامنه تغییرات آن از صفر (عدم تمایز ژنتیکی) تا یک (حداکثر تمایز) متغیر می‌باشد؛ در این میان بازه ۰/۰۵–۰ نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی کم، ۰/۱۵–۰/۰۵ متوسط، ۰/۲۵–۰/۱۵ زیاد و بالاتر از ۰/۲۵ بسیار زیاد می‌باشد (De Vicente *et al*., 2004; Laurentin, 2009).

1. Shannon's index
2. Variation
3. Genetic bottlenecks
4. Wright's F-statistics
5. Interpopulation differentiation for several loci
6. Subdivided populations
7. Fixation index

برخی منابع G_{ST} را معادل F_{ST} گزارش کرده‌اند (Nei, 1973) که تنوع ژنی بین جمعیت‌ها را اندازه‌گیری می‌کند؛ لذا برای برآورد آن باید تعداد زیادی از مکان‌ها را مورد مطالعه قرار داد (De Vicente *et al*., 2004). این پارامتر جهت مطالعه ساختار ژنتیکی یک جمعیت تقسیم شده بدون در نظر گرفتن تعداد آلل‌ها در هر مکان یا نیروهای تکاملی کاربردی می‌باشد. تمایز ژنی (G_{ST}) طبق رابطه $G_{ST} = D_{ST}/H_T$ برآورد می‌گردد که در آن G_{ST} تمایز ژنی مرتبط با کل جمعیت، D_{ST} تمایز ژنی (میانگین تنوع ژنی) میان زیرجمعیت‌ها و H_T تنوع ژنی در کل جمعیت است (Laurentin, 2009).

تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی

از روش‌های رایج برای محاسبه آماره‌های F می‌توان به تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) اشاره کرد که آزمایش وجود ساختار جمعیت سلسله‌مراتبی را آسان می‌کند (Excoffier *et al*., 1992). با این حال، این تکنیک مستلزم آن است که ساختار سلسله‌مراتبی جمعیت از قبل شناخته شده باشد. بنابراین، یک تجزیه و تحلیل خوشه‌بندی به عنوان مثال، Structure (Pritchard *et al*., 2000) ممکن است بر روی‌داده‌ها انجام شود، که نتایج آن سپس به عنوان مبنایی برای AMOVA استفاده می‌شود (Meirmans, 2012). همچنین AMOVA می‌تواند اجزای واریانس بین و درون گروه‌ها را تخمین زند و سهم هر یک از تنوع درون و بین جمعیت‌ها را نسبت به تنوع کل مشخص نماید (Excoffier *et al*., 1992).

اندازه‌گیری تشابه[1] و عدم تشابه[2] ژنتیکی (فاصله ژنتیکی) و ضرایب مورد استفاده

در ارزیابی روابط ژنتیکی میان افراد می‌توان از ماتریس عدم تشابه ژنتیکی استفاده کرد که میزان تفاوت میان جفت افراد، محاسبه و از آن برای توصیف ساختار جمعیت بر اساس قرابت نسبی هر فرد با سایر افراد مورد مطالعه، استفاده می‌گردد (Kosman and Leonard, 2005). در واقع ژنوتیپ‌هایی با ژن‌های مشابه، فاصله ژنتیکی کم‌تری با یکدیگر دارند (Bhandari *et al*., 2017). جهت برآورد عدم تشابه ژنتیکی می‌توان از ضرایب مبتنی بر فراوانی آللی[3] نظیر اقلیدسی[4]، راجر[5]، راجر تغییریافته[6]، رینولد[7]، نی ۷۲[8] (فاصله ژنتیکی استاندارد نی)[9] و نی و همکاران ۸۳[10] استفاده نمود (Mohammadi, 2006).

دسته دیگر ضرایب مورد استفاده جهت برآورد تشابه ژنتیکی یا عدم تشابه افراد، مبتنی بر داده‌های صفر و یک[11] است که متداول‌ترین آن‌ها شامل ضرایب جاکارد[12] (J)، دایس[13] (D) یا نی و لی[14] (NL) و تطابق ساده[15] (SM) می‌باشد (Mohammadi, 2006). در انتخاب ضرایب مذکور، Laurentin (2009) به نوع نشانگر (غالب یا هم‌بارز) و همچنین به نوع سیستم زادآوری گیاه (خودگشن یا دگرگشن) توجه کرده است. او ضرایب جاکارد و دایس را در بررسی افراد غیرخویشاوند و ضریب تطابق ساده را در بررسی افراد خویشاوند با استفاده از نشانگرهای غالب پیشنهاد کرده است. همچنین او در بررسی روابط ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای هم‌بارز به‌طور عمده ضریب دایس را برای گیاهان خودگشن پیشنهاد می‌کند (Laurentin, 2009). از آن‌جا که در ضریب دایس وزن تعداد باندهای مشترک بین دو فرد، دو برابر ضریب جاکارد در نظر گرفته می‌شود، در صورت هموزیگوت بودن افراد مورد بررسی، برآورد شباهت ژنتیکی آن‌ها با استفاده از این دو ضریب (دایس و جاکارد) یکسان است و در صورت هتروزیگوت بودن آن‌ها، برآورد این دو ضریب با استفاده از نشانگرهای هم‌بارز که قدرت تفکیک افراد هموزیگوت و

1. Similarity
2. Dissimilarity (distance) matrix

3. Genetic dissimilarity coefficients for allelic informative marker data
4. Euclidean
5. Rogers
6. Modified Rogers
7. Reynolds *et al*., (1983)
8. Nei, (1972)
9. Nei's standard genetic distance
10. Nei *et al*., (1983)
11. Similarity coefficients for allelic noninformative marker data
12. Jaccard (J)
13. Dice (D)
14. Nei and Li (NL)
15. Simple Matching (SM)

هتروزیگوت را دارند، متفاوت خواهد بود (Link *et al*., 1995; Mohammadi, 2006). در ضریب تطابق ساده، عدم وجود باند برای هر دو فرد مورد مقایسه به عنوان تشابه در نظر گرفته می‌شود، در حالی‌که ضرایب جاکارد و دایس آن را به عنوان معیاری برای تشابه در نظر نمی‌گیرند (Kosman and Leonard, 2005).

تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی

روش‌های آماری چند متغیره راه مهمی برای نمایش روابط ژنتیکی و گروه‌بندی افراد می‌باشد که رایج‌ترین آن‌ها شامل تجزیه خوشه‌ای[1] و تجزیه به مختصات اصلی[2] می‌باشد (Mohammadi and Prasanna, 2003). در تجزیه خوشه ای، افراد بر اساس اطلاعات توصیف‌کننده آن‌ها و روابطشان گروه‌بندی می‌گردند. در واقع افراد درون یک گروه، مشابه یا مرتبط با یکدیگر بوده و از افراد گروه‌های دیگر متمایز می‌شوند. هر چه شباهت در یک گروه و تفاوت بین گروه‌ها بیش‌تر باشد، خوشه‌بندی بهتر یا متمایزتر است (Tan *et al*., 2006). یکی از روش‌های خوشه‌بندی، سلسله‌مراتبی[3] است که با ساختار درخت‌مانند مشخص می‌شود. این روش دارای دو رویکرد بالا به پایین (تجزیه‌ای)[4] و پایین به بالا (تجمعی)[5] می‌باشد. در حالت تجمعی هر فرد در یک خوشه مجزا قرار گرفته و سپس خوشه‌ها با توجه به شباهت‌شان با یکدیگر ادغام می‌شوند. ابتدا، دو خوشه مشابه (آن‌هایی که کم‌ترین فاصله را دارند) ادغام شده تا یک خوشه جدید در پایین سلسله‌مراتب تشکیل شود؛ سپس یک جفت دیگر از خوشه‌ها ادغام شده و به سطح بالاتری از سلسله‌مراتب پیوند داده می‌شود و به همین ترتیب سلسله‌مراتبی از خوشه‌ها از پایین به بالا ایجاد می‌گردد. در صورتی که در رویکرد بالا به پایین ابتدا همه افراد در یک خوشه قرار گرفته، سپس به‌تدریج تقسیم می‌شوند (Sarstedt and Mooi, 2011). تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) روشی است که با ماتریسی از شباهت‌ها یا عدم تشابه بین مجموعه‌ای از افراد شروع شده و هدف آن ایجاد نمودار گرافیکی بر اساس فاصله‌ی میان افراد است؛ به‌گونه‌ای که فاصله بین نقاط در نمودار، نزدیک به تفاوت‌های اصلی باشد (Mohammadi and Prasanna, 2003).

تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی با استفاده از برخی نرم‌افزارها مانند NTSYSpc، DARwin، PAST و R بر اساس ضرایب و الگوریتم‌های متفاوتی ترسیم می‌گردند.

انواع الگوریتم‌های گروه‌بندی

در گروه‌بندی سلسله‌مراتبی بر اساس روش اندازه‌گیری فاصله بین افراد، از الگوریتم‌هایی نظیر نزدیک‌ترین همسایگی[6]، دورترین همسایگی[7]، جفت گروه بدون وزن با میانگین حسابی[8] (UPGMA) و نیز روش Ward استفاده می‌گردد. مبنای اندازه‌گیری در این چهار روش به ترتیب کم‌ترین، بیش‌ترین، میانگین و مجموع مربعات فاصله جفت افراد می‌باشد (De Vicente *et al*., 2004; Maulik *et al*., 2011). UPGMA و Ward از متداول‌ترین الگوریتم‌های مورد استفاده هستند (Mohammadi and Prasanna, 2003) که اهمیت آن‌ها را می‌توان به سهولت دسترسی به آن‌ها در برنامه‌های آماری، درک آسان‌تر نتایج حاصل از آن‌ها و کوتاه بودن زمان مورد نیاز برای تجزیه و تحلیل نسبت داد (Ebrahimi & Zienalabedini, 2013). در روش UPGMA وجود اثر زنجیره‌ای[9]، تفسیر داده‌ها را مشکل می‌کند که از معایب اصلی آن شمرده شده است در صورتی که در روش Ward اثر زنجیره‌ای به‌ندرت دیده می‌شود (Mohammadi and Prasanna, 2003). روش دیگری به نام اتصال همسایگی[1] (NJ) نیز وجود دارد که ابتدا با یک درخت با توپولوژی ستاره مانند شروع و سپس با انتخاب متوالی جفت تاکسون‌ها بر اساس فاصله آن‌ها ادامه یافته تا درخت نهایی ترسیم گردد (Yang and Rannala, 2012). در برخی منابع توصیه به استفاده از روش NJ و Ward شده است (Ebrahimi & Zienalabedini, 2013).

1. Cluster analysis
2. Principal Coordinate Analysis (PCoA)
3. Hierarchical clustering
4. Divisive clustering
5. Agglomerative clustering
6. Single linkage
7. Complete linkage
8. Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA)
9. Chaining effect

یکی از رایج‌ترین روش‌های سنجش کارایی هر یک از الگوریتم‌های مورد استفاده در تجزیه خوشه‌ای، ضریب همبستگی کوفنتیک (r) است که به منظور تطابق شباهت نشان داده شده توسط درخت و ماتریس تشابه به کار می‌رود. مقادیر مساوی ۰/۹ و یا بیش‌تر، کارایی الگوریتم مورد استفاده را نشان می‌دهد اما لازم به ذکر است که پایین بودن مقدار ضریب همبستگی مبنی بر عدم کارایی درخت نبوده و ممکن است مرتبط به داده‌های مولکولی گمشده باشد (Mohammadi, 2006; Darvish Zadeh and Azizi, 2015). همچنین روش دیگری به نام نمونه برداری مجدد با جایگزینی با همان ماتریس داده (بوتسترپ)۲ وجود دارد که امکان محاسبه انحراف معیارها و واریانس‌ها را فراهم می‌کند و برای شرایطی که تعداد نمونه‌ها یا زمان و بودجه محدود است مناسب می‌باشد (De Vicente *et al*., 2004).

برنامه‌های نرم‌افزاری برای بررسی تنوع ژنتیکی

تجزیه و تحلیل بر پایه ابزار آماری سبب تفسیر بهتر داده‌ها می‌گردد. انواع مختلفی از نرم‌افزارها (Aremu, 2012; Tanavar *et al*., 2014; Pagnotta, 2018) برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی وجود دارد که اکثر آن‌ها بر اساس تحلیل آماری چند متغیره هستند. اغلب نرم‌افزارها به صورت رایگان در دسترس و برای رایانه‌های شخصی مناسب هستند (Bhandari *et al*., 2017). در این مطالعه به برخی از پرکاربردترین نرم‌افزارها در جدول ۳ اشاره شده است.

جدول ۳. برخی از رایج‌ترین برنامه‌های نرم‌افزاری برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی (Govindaraj *et al*., 2015; Mukhopadhyay and Bhattacharjee, 2016; Bhandari *et al*., 2017)

Table 3. Some of the most common software programs for analyzing genetic diversity (Govindaraj *et al*., 2015; Mukhopadhyay and Bhattacharjee, 2016; Bhandari *et al*., 2017)

نرم‌افزار	برخی از ویژگی‌های اصلی	منبع	آدرس سایت
NTSYSpc (**N**umerical **T**axonomy **Sy**stem for **p**ersonal **c**omputer)	مبتنی بر ضرایب تشابه و عدم تشابه، تجزیه خوشه‌ای، تجزیه به مختصات اصلی و تجزیه به مولفه‌های اصلی	Rohlf, (2002)	https://www.appliedbiostat.com/ntsyspc/ntsyspc.html
DARwin (**D**issimilarity **A**nalysis and **R**epresentation for **win**dows)	تخمین فاصله و عدم تشابه، تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی	Perrier and Jacquemoud-Collet, (2006)	https://darwin.cirad.fr/product.php
PAST (**PA**leontological **ST**atistics software for analysis and education)	پارسیمونی، تجزیه به مولفه‌های اصلی و تجزیه به مختصات اصلی	Hammer *et al*., (2001)	https://www.nhm.uio.no/english/research/resources/past/
PowerMarker (A **Powerful** software for **Marker** data analysis)	مناسب داده‌های SSR در بررسی ژنتیک جمعیت، تعداد آلل‌ها، تنوع ژنی، ضریب خودگشنی، ساختار جمعیت، آزمون منتل، هتروزیگوسیتی، محتوای اطلاعات چندشکلی، فراوانی آللی، تعادل هاردی–واینبرگ	Liu and Muse, (2005)	https://brcwebportal.cos.ncsu.edu/powermarker/
POPGENE (Microsoft Window-based Freeware for **Pop**ulation **Gene**tic Analysis)	مناسب برای نشانگرهای غالب و هم‌بارز، فراوانی ژنی، تعداد آلل‌ها، تعداد آلل‌های موثر، مکان‌های چندشکل، تنوع ژنی، شاخص شانون، آماره‌های F، جریان ژنی، فاصله ژنتیکی (مبتنی بر ضریب نی) و تجزیه خوشه‌ای (بر اساس UPGMA و Neighbor Joining)	Yeh *et al*., (1999)	https://sites.ualberta.ca/~fyeh/popgene.html
GenAlEx (**Gen**etic **A**nal**y**sis in **Ex**cel)	مناسب برای نشانگرهای غالب و هم‌بارز، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، شاخص نشانگری، شاخص تثبیت، Fst، فاصله ژنتیکی نی، شاخص شانون و تجزیه به مختصات اصلی	Peakall and Smouse, (2006)	http://biology-assets.anu.edu.au/GenAlEx/Welcome.html
Arlequin	تخمین فراوانی آللی، تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی	Excoffier *et al*., (2010)	https://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35
FSTAT	تنوع ژنی، بوتسترپ	Goudet, (2002)	https://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm

1. Neighbor-joining (NJ)
2. Bootstrapping

نتیجه‌گیری

تنوع ژنتیکی برای سازگاری گیاهان با تغییرات محیطی لازم و ضروری است. واکنش گیاهان و توانایی‌های سازگاری آن‌ها به تغییرات آب و هوایی به سطح تنوع ژنتیکی آن‌ها بستگی دارد. نشانگرهای مولکولی به‌طور گسترده برای مطالعات تنوع ژنتیکی منابع گیاهی و ژنتیک جمعیت کاربرد دارند. استفاده از این نشانگرها به منظور اصلاح و بهبود محصولات، حفاظت و معرفی گیاهان در معرض خطر و با ارزش ضروری است. همچنین شناسایی واریته‌های گیاهی جدید و تشخیص تغییرات ژنتیکی انواع گیاهان را امکان‌پذیر می‌سازند و بینش‌های ارزشمندی را در مورد تغییرات ژنتیکی موجود در درون و بین جمعیت‌های گیاهی ارائه می‌دهند. لذا شناسایی و برآورد مناسب تنوع ژنتیکی برای اهداف مذکور حائز اهمیت است. بنابراین ابزارهای مولکولی و روش‌های آماری می‌توانند دریچه جدیدی را برای درک بهتر چندشکلی و روابط ژنتیکی بین افراد باز کنند و به محققین اجازه دهند تا به سؤالات مهم در این زمینه‌ها پاسخ دهند.

لذا در این مطالعه مروری بر مفاهیم پایه مرتبط به کمی کردن تنوعات درون جمعیت‌های گیاهی (تنوع آللی، تعداد آلل‌های موثر و هتروزیگوسیتی/تنوع ژنی)، تنوعات بین جمعیت‌های گیاهی (و یا افراد) (آماره F رایت، G_{st} و تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی)، روابط ژنتیکی بین آنها (ضرایب مبتنی بر تشابه و فاصله ژنتیکی) و نیز نمایش این روابط (خوشه‌بندی و تجزیه به مختصات اصلی) بر اساس داده‌های مولکولی مبتنی بر امتیازدهی ژل صورت گرفته است. همچنین به برخی از رایج‌ترین برنامه‌های نرم‌افزاری در این زمینه اشاره می‌گردد.

تشکر و قدردانی

از حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شهید چمران اهواز در قالب پژوهانه به شماره SCU.AA1402.165 در انجام این تحقیق، تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

References

Agarwal, M., Shrivastava, N., & Padh, H. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports*, 27, 617-631.

Akkaya, M. S., Bhagwat, A. A., & Cregan, P. B. (1992). Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics*, 132 (4), 1131-1139.

Alizadeh, M., Nematzadeh, G. A., Ebrahimi, M.A., & Hashemi, H. (2013). Fingerprinting of some rice (*Oryza sativa* L.) germplasm via AFLP markers. *Crop Biotechnology*, 3 (4), 53-60. (*In Persian*)

Akopyanz, N., Bukanov, N. O., Westblom, T. U., & Berg, D. E. (1992). PCR-based RFLP analysis of DNA sequence diversity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Research*, 20 (23), 6221-6225.

Amiteye, S. (2021). Basic concepts and methodologies of DNA marker systems in plant molecular breeding. *Heliyon*, 7 (10), 1-20.

Aremu, C. O. (2012). Exploring statistical tools in measuring genetic diversity for crop improvement. *Genetic Diversity in Plants*, 340-348.

Baghernieh Najjar, M. B., Kohan Baghkheirati, E., & Abasi, Z. (2014). *DNA fingerprinting in plants principles, methods and applications*. Gorgan, Golestan University. (*In Persian*)

Bhandari, H. R., Bhanu, A. N., Srivastava, K., Singh, M. N., & Shreya, H. A. (2017). Assessment of genetic diversity in crop plants - an overview. *Advances in Plants & Agriculture Research*, 7 (3), 279-286.

Bidyananda, N., Jamir, I., Nowakowska, K., Varte, V., Vendrame, W. A., Devi, R. S., & Nongdam, P. (2024). Plant genetic diversity studies, insights from DNA marker analyses. *International Journal of Plant Biology*, 15 (3), 607-640.

Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32 (3), 314.

Caliskan, M. (Ed.). (2012). *Genetic diversity in plants*. BoD–Books on Demand.

Chesnokov, Y. V., & Artemyeva, A. M. (2015). Evaluation of the measure of polymorphism information of genetic diversity. *Agricultural Biology*, 50 (5), 571-578.

Collard, B. C., & Mackill, D. J. (2009). Start codon targeted (SCoT) polymorphism, a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 27, 86-93.

Dar, A. A., Mahajan, R., & Sharma, S. (2019). Molecular markers for characterization and conservation of plant genetic resources. *The Indian Journal of Agricultural Sciences*, 89 (11), 1764-1772.

Darvish Zadeh, R., & Azizi, H. (2015). *Molecular markers and their application in the analysis of genetic diversity*. Urmia, University of Urmia. (*In Persian*)

De Vicente, M. C., Lopez, C., & Fulton, T. (2004). Genetic diversity analysis with molecular marker data, learning module. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI).

Ebrahimi, M. A., & Zienalabedini, M. (2013). Application of genomic and unigene-based microsatellite markers in conservation and management of genetic resources of some Iranian crops. *Crop Biotechnology*, 4, 133-148.

Esmaili, A., Talebi, B., Drikvand, R., Ebrahimi, M. A., & Hossienpour, T. (2014). Evaluation of genetic diversity among hull-less and hulled rain-fed barley genotypes using SSR molecular marker. *Crop Biotechnology*, 3 (5), 103-111. (*In Persian*)

Excoffier, L., Smouse, P. E., & Quattro, J. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes, application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131 (2), 479-491.

Excoffier, L., Lischer, H. E. L. (2010) Arlequin suite ver 3.5, a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564-567.

Goudet, J. (2002). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9. 3.2). http://www. unil. ch/izea/softwares/fstat. html.

Govindaraj, M., Vetriventhan, M., & Srinivasan, M. (2015). Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances, an overview of its analytical perspectives. *Genetics Research International*, 2015, 1-14.

Hamdan, Y. A., Hawamda, A. I., Basheer-Salimia, R., & Salman, M. (2024). Genetic diversity assessment of Palestinian okra landraces (*Abelmoschus esculentus* L.) through RAPD marker. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 1-8.

Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). PAST, paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica,* 4 (1), 1-9.

Hartl, D. L., & Clark, A. G. (1997). *Principles of population genetics*. Sunderland, Massachusetts , Sinauer Associates.

Heidari, B. (2011). *Plant molecular breeding*. Shiraz, University of Shiraz. (*In Persian*)

Hennink, S., & Zeven, A. C. (1990). The interpretation of Nei and Shannon-Weaver within population variation indices. *Euphytica*, 51, 235-240.

Heras, J., Domínguez, C., Mata, E., Pascual, V., Lozano, C., Torres, C., & Zarazaga, M. (2016). A survey of tools for analysing DNA fingerprints. *Briefings in Bioinformatics*, 17 (6), 903-911.

Hosseini, F., Niknejad, A., Sorkhilaleloo, B., Kohpalekani, J. A., & Khameneh, M. M. (2023). Valuation of genetic diversity of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) based on the comparison of ISSR and SSR marker efficiency. *Agricultural Biotechnology Journal*, 15 (2), 63-82. (*In Persian*)

Jaccoud, D., Peng, K., Feinstein, D., & Kilian, A. (2001). Diversity arrays, a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Research*, 29 (4), e25.

Jahangir, M. (2021). Genetic diversity and population structure of *Cressa cretica* L. in Ahvaz using morphological and molecular markers (SCoT and ISSR). The thesis was submitted in partial fulfillment of the requirements for the Master of Science degree (M.Sc.). Shahid Chamran University of Ahvaz. (*In Persian*)

Kadirvel, P., Senthilvel, S., Geethanjali, S., Sujatha, M., & Varaprasad, K. S. (2015). Genetic markers, trait mapping and marker-assisted selection in plant breeding. *Plant Biology and Biotechnology, Volume II, Plant Genomics and Biotechnology*, 65-88.

Kalendar, R., Grob, T., Regina, M., Suoniemi, A., & Schulman, A. (1999). IRAP and REMAP, two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theoretical and Applied Genetics*, 98, 704-711.

Kalendar, R., & Schulman, A. H. (2014). Transposon-based tagging, IRAP, REMAP, and iPBS. Molecular plant taxonomy, methods and protocols, 233-255.

Kanouni, H., & Khalily, M. (2010). *Advances in crop breeding, laboratory protocols of molecular markers*. Urmia, Academic Jihad. (*In Persian*)

Konopiński, M. K. (2020). Shannon diversity index, a call to replace the original Shannon's formula with unbiased estimator in the population genetics studies. *PeerJ*, 8, e9391.

Kosman, E., & Leonard, K. J. (2005). Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid, and polyploid species. *Molecular Ecology*, 14 (2), 415-424.

Kumar, J., & Agrawal, V. (2019). Assessment of genetic diversity, population structure and sex identification in dioecious crop, *Trichosanthes dioica* employing ISSR, SCoT and SRAP markers. *Heliyon*, 5 (3), 1-26.

Kumar, P., Gupta, V. K., Misra, A. K., Modi, D. R., & Pandey, B. K. (2009). Potential of molecular markers in plant biotechnology. *Plant Omics*, 2 (4), 141-162.

Laurentin, H. (2009). Data analysis for molecular characterization of plant genetic resources. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56, 277-292.

Link, W., Dixkens, C., Singh, M., Schwall, M., & Melchinger, A. E. (1995). Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germ plasm revealed by RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 90, 27-32.

Liu, K., & Muse, S. V. (2005). PowerMarker, an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics*, 21 (9), 2128-2129.

Marzang, N., Abdollahi Mandoulakani, B., Shaaf, S., Ghadmizadeh, M., Bernousi, I., Abbasi Holasou, H., & Sadeghzadeh, B. (2020). IRAP and REMAP -based genetic diversity among Iranian, Turkish, and international durum wheat (*Triticum turgidum* L.) cultivars. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 22 (1), 271-285.

Maulik, U., Bandyopadhyay, S., & Mukhopadhyay, A. (2011). *Multiobjective genetic algorithms for clustering, applications in data mining and bioinformatics*. Germany, Springer Berlin Heidelberg.

Medraoui, L., Rabeh, K., Ater, M., & Filali-Maltouf, A. (2024). Genetic diversity analysis of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) landraces from northwestern Morocco using ISSR and AFLP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 71 (2), 835-850.

Meirmans, P.G. (2012). AMOVA-based clustering of population genetic data. *Journal of Heredity*, 103 (5), 744-750.

Mohammadi, A. (2006). *Analysis of molecular data from the point of view of genetic diversity*. The 9th Congress of Agricultural Sciences and Plant Breeding of Iran, 96-119. (*In Persian*)

Mohammadi, S. A., & Prasanna, B. M. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants—salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, 43(4), 1235-1248.

Mooi, E., & Sarstedt, M. (2011). *A concise guide to market research*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Mukhopadhyay, T., & Bhattacharjee, S. (2016). Genetic diversity, importance and measurements. conserving biological diversity, a multiscaled approach. *Research India Publications, New Delhi*, 251-295.

Nagaraju, J., Reddy, K. D., Nagaraja, G. M., & Sethuraman, B. N. (2001). Comparison of multilocus RFLPs and PCR-based marker systems for genetic analysis of the silkworm, *Bombyx mori*. *Heredity*, 86 (5), 588-597.

Naghavi, R., Ghariazi, B., & Hosseini Salekdeh, G. H. (2009). *Molecular markers*. Tehran, University of Tehran. (*In Persian*)

Nazarbeigi, M., Roein, Z., & Sabouri, A. (2024). Investigating the genetic diversity of native Iranian *Gladiolus* with ISSR and IRAP molecular markers. *Journal of Plant Production Research*, 31 (1), 89-110. (*In Persian*)

Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106 (949), 283-292.

Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70 (12), 3321-3323.

Ng, W. L., & Tan, S. G. (2015). Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers, are we doing it right. *ASM Science Journal*, 9 (1), 30-39.

Nikkerdar, F., Farshadfar, M., Ebrahimi, M. A., & Shirvani, H. (2018). Genetic diversity among fennel (*Fueniculum Vulgare* Mill.) landrace using SCoT Markers. *Journal of Crop Breeding*, 9 (24), 95-102. (*In Persian*)

Nonić, M., & Šijačić-Nikolić, M. (2019). Genetic diversity, sources, threats, and conservation. *Life on Land*, 1-15.

Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., & Hayashi, K. (1989). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 5 (4), 874-879.

Ott, J. (1992). Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. *American Journal of Human Genetics*, 51 (2), 283-290.

Pagnotta, M. A. (2018). Comparison among methods and statistical software packages to analyze germplasm genetic diversity by means of codominant markers. *Multidisciplinary Science Journal*, 1 (1), 197-215.

Paran, I., & Michelmore, R. W. (1993). Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*, 85, 985-993.

Peakall, R., & Smouse, P.E., (2006). GenAlEx 6, genetic analysis in Excel. population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology*, 6 (1), 288-295.

Perrier, X., & Jacquemoud-Collet, J. P. (2006). DARwin software, http://darwin.cirad.fr/darwin.

Pozharskiy, A., Kostyukova, V., Khusnitdinova, M., Adilbayeva, K., Nizamdinova, G., Kapytina, A., Kerimbek, N., Taskuzhina, A., Kolchenko, M., Abdrakhmanova, A., Kisselyova, N., Kalendar, R., & Gritsenko, D. (2023). Genetic diversity of the breeding collection of tomato varieties in Kazakhstan assessed using SSR, SCAR and CAPS markers. *PeerJ*, 11, 1-19.

Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155 (2), 945-959.

Rani, V., Yadav, M. K., Singh, R., & Yadav, D. (2024). Genetic diversity assessment in cereal crops. in sustainable utilization and conservation of plant genetic diversity (pp. 363-398). Singapore, Springer Nature Singapore.

Rao, N. K. (2004). Plant genetic resources, advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology*, 3 (2), 136-145.

Ray, T., & Roy, S. C. (2009). Genetic diversity of *Amaranthus* species from the Indo-Gangetic plains revealed by RAPD analysis leading to the development of ecotype-specific SCAR marker. *Journal of Heredity*, 100 (3), 338-347.

Rohlf, F. J. (2002). NTSYSpc, numerical taxonomy system, version 2.1, Exeter Publishing, Setauket, NY, USA.

Salgotra, R. K., & Chauhan, B. S. (2023). Genetic diversity, conservation, and utilization of plant genetic resources. *Genes*, 14 (1), 174.

Sarwat, M. (2012). ISSR, a reliable and cost-effective technique for detection of DNA polymorphism. *Plant DNA Fingerprinting and Barcoding, Methods and Protocols*, 103-121.

Serrote, C. M. L., Reiniger, L. R. S., Silva, K. B., dos Santos Rabaiolli, S. M., & Stefanel, C. M. (2020). Determining the polymorphism information content of a molecular marker. *Gene*, 726, 1-15.

Shannon, C. E., & Weaver, W. (1949). The mathematical theory of communication, by CE Shannon (and recent contributions to the mathematical theory of communication), W. Weaver. University of Illinois Press.

Shashidhara, N., Dhanalakshmi, T. N., & Santosh, D. T. (2023). *Plant genetic resources in sustainable agriculture, current state, future perspectives, and challenges*. New Delhi.

Sharifi Soltani, S., Ranjbar, G. A., Kazemitabar, S. K., Pakdin-Parizi, A., & Najafi Zarrini, H. (2023). Investigation of genetic diversity in castor (*Ricinius communis*) ecotypes using ISSR markers. *Journal of Plant Research* (*Iranian Journal of Biology*), 36 (3), 294-308. (*In Persian*)

Sherwin, W. B., Chao, A., Jost, L., & Smouse, P. E. (2017). Information theory broadens the spectrum of molecular ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 32 (12), 948-963.

Shiva, V. (1994). Agriculture and food production. *Environmental Education Dossiers*, 9, 2-3.

Simpson, J. (1997). Molecular markers. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 60, 73-76.

Swingland, I. R. (2001). Biodiversity, definition of. *Encyclopedia of Biodiversity*, 1, 377-391.

Tan, P. N., Steinbach, M., & Kumar, V. (2006). Cluster analysis, basic concepts and algorithms. *Introduction to Data Mining*. (Boston), 525-612.

Tanavar, M., Kelestanie, A. R. A., & Hoseni, S. A. (2014). Software programs for analyzing genetic diversity. *International Journal of Farming and Allied Sciences*, 3 (5), 462-466.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T. V. D., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995). AFLP, a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23 (21), 4407-4414.

Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalsky, J. A., & Tingey, S. V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18, 6531-6535.

Wu, K. S., Jones, R., Danneberger, L., & Scolnik, P. A. (1994). Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acids Research*, 22 (15), 3257-3258.

Yang, Z., & Rannala, B. (2012). Molecular phylogenetics, principles and practice. *Nature Reviews Genetics*, 13 (5), 303-314.

Yeh, F. C., Yang, R. C., & Boyle, T. (1999). POPGENE. microsoft windows based freeware for population genetic analysis. release 1.31. University of Alberta, Edmonton. (http,//www. ualberta. ca/s-fyeh/fyeh).

Yongcui, H., Zehong, Y., & Xiujin, L. (2005). Genetic diversity among barley germplasm with known origins based on the RAMP and ISSR markers. *Scientia Agricultura Sinica*, 38 (12), 2555-2565.

Zietkiewicz, E., Rafalski, A., & Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20 (2), 176-183.