مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

کاربرد نشانگرهای ریزماهواره جهت شناسایی و ثبت ارقام پسته

محسن مردی*[۱]، مهرشاد زین العابدینی[۲*]، علی تاج آبادی پور[۳]، محمد رضا جزایری[٤]، مریم فارسی[٥]، سید مجتبی خیام نکوئی[٦]، سید حسین جمالی[٤]، عبدالرضا کاوند[۷]، کامران جراحی[۸]، فرشاد شمس کیا[۸]، علی اکبر لونی[۸]، صغری خوشکام[۸]، زهرا طاهر نژاد[٤]، عبد المجید شرافتی[۸]، عبد المجید مرتضوی[۸]، سعید کاشانی زاده[۸]

[۱] دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران کرج؛ [۲] استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران کرج؛ [۳]موسسه تحقیقات پسته؛ [٤] مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، کرج، ایران؛ [٥]پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران؛ [٦]دانشیار مرکز تحقیقات و توسعه زیست فناوری دانشگاه تربیت مدرس؛ [۷] مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج، ایران؛ [۸] معاونت تولیدات گیاهی وزارت جهاد کشاورزی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰٦/۲٤، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۹/۲۹

چکیده

با توجه به اینکه شناسایی ارقام پسته (*Pistachia Vera* L.) با استفاده از خصوصیات مورفولوژیک در مرحله نونهالی دشوار است، ابزارهای مولکولی نوین چشم انداز جدیدی را در زمینه انگشت نگاری DNA فراهم کرده اند. در این تحقیق با استفاده از ۲۵ نشانگر SSR و ۱۲ جفت آغازگر اختصاصی نشانگر AFLP، کلید شناسایی مولکولی ۱۰ رقم پسته ایرانی (*Pistacia vera*) حاصل گردید. نتایج این تحقیق نشان داد، علیرغم استفاده از ۲۵ نشانگر مولکولی SSR، تنها چهار نشانگر چند شکل بوده و نتایج آن‌ها منجر به شناسایی کلیدهای مولکولی اختصاصی برای ۱۰ رقم پسته مورد مطالعه نشد. ۱۲ ترکیب نشانگر AFLP در ۱۰ رقم پسته ایرانی کلیدهای اختصاصی مولکولی ایجاد کردند. از مجموع ۱۲ جفت آغازگر AFLP استفاده‌شده، دو جفت آغازگر M_TTT-E_GTC و M_GAG-E_CAG برای ۸ رقم مورد مطالعه پسته کلید مولکولی، ایجاد نمودند. جفت آغازگر M_TTT-E_GTC در ارقام عباس علی- احمد آقایی- بادامی سفید- فندقی ٤۸- ممتاز- اوحدی و شاه‌پسند و جفت آغازگر M_GAG-E_CAG در رقم اکبری کلیدهای مولکولی اختصاصی ایجاد نمودند. نتایج این تحقیق نشان داد که زمینه ژنتیکی مشابهی بین درختان مادری ارقام ایرانی پسته وجود دارد. کلیدهای مولکولی اختصاصی به‌وسیله تجزیه‌های مولکولی بر روی ۳٦ درخت مادری ایجاد و نتایج این تحقیق در دو آزمایشگاه مستقل تأیید شد. کلیدهای مولکولی اختصاصی گزارش شده می توانند در شناسایی ۱۰ رقم پسته ایرانی مورد استفاده قرار گیرند.

کلمات کلیدی: *پسته، ریزماهواره، انگشت‌نگاری، روش‌های مبتنی بر مدل، تجزیه خوشه‌ای.*

* نویسنده مسئول: مهرشاد زین العابدینی تلفن: ۰۹۱۲۵۸۳٤۱۷٤ Email: mzeinolabedini@abrii.ac.ir

مقدمه

پسته (*Pistacia vera*) یکی از مهم‌ترین محصولات کشاورزی ایران است که از جنبه‌های مختلف اقتصادی، اجتماعی، زیست‌محیطی اهمیت فوق‌العاده‌ای دارد. ارزش تولید این محصول گران‌بها و بی‌نظیر حدود ۱۰ درصد از درآمدهای غیرنفتی کشور است. کشور ایران از نظر سطح زیر کشت و میزان تولید مقام اول جهان را دارا است و ۵۳ درصد از سطح زیر کشت و ٤۷ درصد از میزان تولید جهانی را در سال ۲۰۱۲ به خود اختصاص داده است. بر اساس آخرین گزارش سازمان خواربار جهانی، ایران با بیش از ٤۷۰ هزار تن بیشترین تولید پسته را به خود اختصاص داده است و در رتبه اول قرار دارد (FAOSTAT, 2012). باوجود جایگاه ممتاز تولید پسته ایران در جهان، یکی از معضلات مهم باغداران در خصوص احداث نهالستان‌ها و باغ‌ها، نامشخص بودن اصالت ژنتیکی ارقام کشت شده است، زیرا شناسایی ارقام باغی در سال‌های اولیه رشد و تا زمانی که درختان در مرحله نونهالی هستند، امری دشوار است. در بسیاری از مواقع، باغداران چندین سال وقت و سرمایه خود را برای کشت یک رقم خاص صرف می‌کنند و این در حالی است که رقم کشت شده، رقم موردنظر نبوده و به‌این‌ترتیب خسارت جبران‌ناپذیری به آن‌ها وارد می‌شود. وجود باغ‌های قدیمی، عدم دسترسی به باغ‌های مادری استاندارد، عدم آشنایی کافی تولیدکنندگان نهال و اشتباه در زمان حمل‌ونقل نهال‌ها و نیز رشد فزاینده نیاز به تولید نهال، از مهم‌ترین مشکلات پیش روی باغبانی کشور است. تعیین منشأ ژنتیکی ارقام نه‌تنها از جنبه‌های احداث باغ، بلکه از نظر شناسایی روابط خویشاوندی، به‌منظور دست‌یابی به ارقام جدید اقتصادی و مطابق با نیازهای روز اهمیت زیادی دارد. بنابراین طراحی هر برنامه به نژادی و ایجاد باغ با ارقام موردنظر و گواهی‌شده، مستلزم شناسایی ویژگی‌های اختصاصی هر رقم است. باوجود این اغلب محصولات باغبانی جزء مهم‌ترین محصولات صادراتی کشور به شمار می‌روند، اما هیچ‌گونه شناسنامه دقیقی برای تعیین اصالت ژنتیکی و حفظ حقوق مالکیت این ذخایر توارثی گران‌بها در کشور وجود ندارد. در گذشته، روش‌های شناسایی ارقام مبتنی بر خصوصیات مورفولوژیک برگ، میوه، هسته و مغز هسته استوار بود، ولی جز در موارد خاص استفاده از صفات مورفولوژیک به‌تنهایی برای شناسایی ارقام کافی نیست. امروزه تعیین اصالت ژنتیکی محصولات باغی از سطح مورفولوژی و فنولوژی فراتر رفته و به‌وسیله روش‌های نوین بیوتکنولوژی در سطح ژنوتیپ گیاه (DNA) صورت می‌گیرد. در حال حاضر با به‌کارگیری هم‌زمان اطلاعات ژنوتیپی و فنوتیپی امکان تعیین دقیق هویت ارقام مهم باغی کشور

میسر شده است. انگشت‌نگاری DNA[1]، در سال ۱۹۸۵ معرفی شد. مبنای انگشت‌نگاری DNA وجود توالی‌های چند شکل در بین نمونه‌های مورد مطالعه است. انجام انگشت‌نگاری DNA با استفاده از نشانگرهای مختلفی امکان‌پذیر است که با پیشرفت فنّاوری در سال‌های اخیر، بر تعداد و کارایی آن‌ها افزوده شده است. به‌این‌ترتیب، در سال‌های اخیر با پیشرفت قابل‌توجه در زمینه زیست‌شناسی مولکولی و بیوتکنولوژی، امکان مطالعه ژنتیکی دقیق گیاهان فراهم‌شده است. در اوایل قرن بیستم استفاده از چند شکلی ژن‌ها به‌منظور آسان‌سازی برنامه‌های اصلاحی پیشنهاد گردید (Sax, 1923). از آن پس نشانگرهای ژنتیکی با کیفیت بالا که بر اساس شناسایی چندشکلی‌های موجود در DNA عمل می‌نمایند، مورد توجه قرار گرفت که اصطلاحاً به آن‌ها نشانگرهای مولکولی گفته می‌شود (Tanksley, 1983). همچنین برخی از مطالعات نشان داد که انتخاب برای ژنوتیپ با استفاده از نشانگرهای مولکولی که با صفات موردنظر پیوستگی دارند، مشکلات انتخاب فنوتیپی را به همراه نداشته، در نتیجه به همراه نشانگرهای مورفولوژیک کارایی بالایی در اصلاح نباتات خواهند داشت (Raflaski & Williams, 1991). نشانگرهای مولکولی به‌طور گسترده‌ای برای خصوصیات مختلف در گونه‌های مختلف گیاهی مورد استفاده قرارگرفته است، اما در مورد گیاه پسته (جنس *Pistacia*) مطالعات نسبتاً محدودی صورت گرفته است. نشانگرهای مولکولی RAPD برای دست‌یابی به نشانگرهای پیوسته با جنسیت در گونه *Pistacia vera* استفاده شد. این آغازگرها، توانستند نشانگری را شناسایی کنند که تا حدودی با قطعه کروموزومی تعیین جنسیت پیوستگی دارد (Hormasa *et al.*, 1994). از داده‌های مورفولوژیک و RAPD در مطالعه روابط تاکسونومیک و تنوع ژنتیکی ژرم پلاسم وحشی پسته استفاده شد. نتایج تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های مورفولوژیک نشان داد که نزدیک‌ترین گونه‌های خویشاوند *P.vera* به ترتیب *P.eurycarpa*، *P.atlantica* و *P.terebinthus* است. ۱۰ آغازگر چند شکل RAPD نیز ۱۳۸ نوار قابل امتیازدهی ایجاد کردند که برای انگشت‌نگاری ارقام، از آن‌ها استفاده گردید (Kafkas & Perl-Treves, 2001). در تحقیق دیگری با استفاده از خصوصیات مورفولوژیک مانند ویژگی‌های برگ، میوه، درخت و جوانه گل بر اساس دستورالعمل‌های متداول (IPGRI, 1997; Tajabadipour, 1997) و ۱۱ آغازگر RAPD، ارقام پسته ایرانی را مورد ارزیابی قرار گرفت (Javanshah *et al.*, 2007). علاوه بر این، از نشانگرهای RAPD در مطالعات فیلوژنی گونه‌های *Pistachio* و برخی از ارقام پسته استفاده شد (Mirzaei *et al.*, 2005). ١٤ نشانگر SSR از پسته جدا و از این نشانگرها برای طبقه‌بندی ارقام تجاری پسته استفاده گردید و در سال ۲۰۰۵ برای آنالیز ٤

[1] DNA Fingerprinting

پایه مهم و تجاری پسته از نشانگرهای SSR و SRAP استفاده شد، به‌این‌ترتیب این محققان توانستند جهت آنالیز ژنوم پسته دو سیستم نشانگری مناسب را ارائه دهند که می‌تواند برای شناسایی و مدیریت در تولید پایه پسته استفاده شود (Ahmad *et al.*, 2003; Ahmad *et al.*, 2005). با استفاده از نشانگرهای AFLP و RAPD ارتباطات ژنتیکی بین گونه‌های پسته مدیترانه مورد ارزیابی گرفت (Golan-Goldhirsh *et al.*, 2004). همچنین در یک مطالعه، ژرم پلاسم *Pistacia vera* به کمک نشانگرهای آیزوزایم شناسایی شد و نتایج نشان داد، استفاده از نشانگرهای آیزوزایم می‌تواند برای غربال سریع ژرم پلاسم پسته و ارزیابی تنوع بین ژرم پلاسم نر و ماده مفید باشد (Barone *et al.*, 1996). مطالعه روابط خویشاوندی بین گونه‌های *Pistachio* با استفاده از نشانگرهای AFLP انجام گردید که شامل ٤٤ نمونه از گونه‌های مختلف بودند. این آغازگرها تا حدودی نمونه‌های مورد ارزیابی را از یکدیگر تفکیک کردند (Karimi *et al.*, 2009). در گزارشی با استفاده از نشانگرهای RFLPs روابط فیلوژنیک ۱۰ گونه پسته را مورد بررسی قرار گرفت (Parfitt *et al.*, 1997). در گزارش دیگری نیز چندین گونه *Pistacia* موجود در یونان با استفاده از نشانگرهای RAPD و AFLP طبقه‌بندی شد (Katsiotis *et al.*, 2003). همچنین تنوع ژنتیکی چندین گونه وحشی و ارقام پسته‌های ایرانی با استفاده از نشانگرهای آیزوزایم مورد بررسی قرار گرفت (Harandi *et al.*, 2000). در حال حاضر با استفاده از روش‌های نوین بیوتکنولوژی امکان انگشت‌نگاری ارقام مهم زراعی پسته ایران بر اساس مولکول DNA تحت عنوان "انگشت‌نگاری DNA" در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی وزارت جهاد کشاورزی میسر شده است. با توجه به تنوع ژنتیکی بسیار بالا پسته در ایران و ضرورت حفظ حقوق مالکیت این ذخیره توارثی گران‌بها, بانک اطلاعات مولکولی پسته ایران در سال ۱۳۸٦ راه‌اندازی شد و کلیدهای مولکولی ژنوتیپ‌های موجود در کلکسیون‌های مهم کشور ارائه گردید. همچنین به دلیل وجود تجربیات موجود، امکان تهیه و ارائه کلیدهای مولکولی اختصاصی و کاربردی برای ارقام زراعی مهم پسته ایران فراهم‌شده است. هدف این تحقیق تهیه کلیدهای شناسایی مولکولی مهم‌ترین ارقام پسته در ایران با استفاده از نشانگرهای SSR و AFLP بود. دراین‌ارتباط ابتدا درختان مادری مهم‌ترین ارقام پسته در کشور توسط بخش‌های ذی‌صلاح اجرایی و پژوهشی وزارت جهاد کشاورزی شناسایی، تأیید و معرفی گردیدند و در ادامه کلیدهای شناسایی مولکولی این ارقام حاصل شد. با شناسایی کلیدهای مولکولی امکان تعیین اصالت ژنتیکی ارقام، به‌منظور ایجاد باغ‌های یکنواخت و درنهایت افزایش تولید میسر می‌گردد.

مواد و روش‌ها

پیرو تصمیمات اتخاذ شده در جلسات هماهنگی کمیته نهال وزارت جهاد کشاورزی نمونه‌برداری پس از دریافت اطلاعات از موسسه ثبت و گواهی بذر و با هماهنگی و حضور مجریان/همکاران/نمایندگان از مؤسسات و مراکز تحقیقاتی ذی‌ربط و همچنین معاونت تولیدات گیاهی وزارت جهاد کشاورزی انجام شد. در جدول ۱ مشخصات نمونه‌های مورد مطالعه شامل نام رقم، شماره رقم، محل نمونه‌برداری و مشخصات جغرافیایی آن‌ها درج‌شده است. تعداد ۲۰-۵۰ نمونه برگی جوان و یا حداقل ۵۰۰ میلی‌گرم همراه با شاخه، انتخاب و در داخل نایلون فریزر و یا نایلون‌های مخصوص قرار داده شد و سپس در کنار یخ خشک سریعاً به آزمایشگاه منتقل گردید که تا زمان استخراج DNA در فریزر و در دمای ۸۰- سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA ساخت شرکت Core Bio و بر پایه دستورالعمل کیت انجام گردید. کیفیت و کمیت DNA با استفاده از ژل آگارز ۱٪ و اسپکتروفتومتر تعیین و غلظت نهایی DNA استخراج‌شده تا ۲۰ نانوگرم در میکرو لیتر رقیق شد.

در این مطالعه، ابتدا از ۲٦ جفت آغازگر ریزماهواره شامل ۱۰ جفت آغازگر ریزماهواره (Ahmad *et al.*, 2003) و ۱٦ جفت آغازگر ریزماهواره جدید که توسط بخش تحقیقات ژنومیکس پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی از پسته جداسازی و تعیین مشخصات شده بود (داده‌های منتشر نشده) در تهیه کلیدهای شناسایی مولکولی مورد استفاده قرار گرفت. تجزیه SSR با استفاده از روش Pazouki *et al.*, 2010 و تجزیه AFLP با استفاده از ۱۱ جفت آغازگر اختصاصی طبق روش Salehi Shanjani *et al.*, 2009 انجام شد (Pazouki *et al.*, 2010; Salehi Shanjani *et al.*, 2009). پس از پایان رنگ‌آمیزی و آشکار شدن نوارها، ژل موردنظر اسکن گردیده و سپس بر روی عکس‌های اسکن شده کار امتیازدهی هر نمونه آغاز گردید. آلل‌ها چند شکل مکان (های) ژنی به شرح ذیل کدگذاری گردیدند. به‌طور مثال، اگر یک نشانگر ریزماهواره دارای سه آلل چند شکل باشد، در صورت مشاهده آلل شماره یک در هر نمونه، کد یک و در صورت عدم مشاهده آلل شماره یک کد صفر- در صورت مشاهده آلل شماره دو در هر نمونه، کد دو و در صورت عدم مشاهده آلل شماره دو کد صفر- در صورت مشاهده آلل شماره سه در هر نمونه، کد سه و در صورت عدم مشاهده آلل شماره سه کد صفر در نظر گرفته می‌شود. با کنار هم قرار گرفتن کدهای مربوط به آلل‌های هر مکان ژنی، بارکد مکان ژنی مورد مطالعه برای هر نمونه به دست آمد (جدول ۲). با کنار هم قرار گرفتن بارکدهای مکان‌های ژنی مورد مطالعه در هر نمونه، بارکد نهایی برای آن حاصل گردید (جدول ۳). بررسی و تهیه کلیدهای شناسایی توسط نرم‌افزار Microsoft Office Excel 2010 و ارزیابی

شاخص‌های تنوع ژنتیکی، تجزیه خوشه‌ای و ساختار جمعیت به کمک نرم‌افزارهای POPGENE، SplitTree 4 و Structure 2.3 انجام گردید. آزمون تکرارپذیری نشانگرهای معرفی‌شده توسط موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی در آزمایشگاه نشانگرهای مولکولی موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال انجام پذیرفت.

جدول ۱- نام و محل نمونه برداری ارقام مورد مطالعه پسته.

Table 1- Names and sampling sites of studied Pistachio cultivars.

شماره Number	نام رقم Cultivar name	کد شناسه Accession code	طول جغرافیایی Longitude	عرض جغرافیایی Latitude	ارتفاع Elevation (m)	محل نمونه برداری Sampling site
1	اوحدی ۱ Ohadi1	115802	E55 56 31.5	N30 23 38.8	1529	رفسنجان ایستگاه شماره ۲ موسسه تحقیقات پسته کشور Rafsanjan, Station 2, Iranian Pistachio Research Institute
2	اوحدی ۲ Ohadi2	115804	E55 56 31.5	N30 23 38.8	1529	رفسنجان ایستگاه شماره ۲ موسسه تحقیقات پسته کشور Rafsanjan, Station 2, Iranian Pistachio Research Institute
3	اوحدی ۳ Ohadi3	115805	E55 56 31.5	N30 23 38.8	1529	رفسنجان ایستگاه شماره ۲ موسسه تحقیقات پسته کشور Rafsanjan, Station 2, Iranian Pistachio Research Institute
4	کله قوچی ۱ Kalehghochi1	115806	E55 56 31.1	N30 23 39.8	1529	رفسنجان ایستگاه شماره ۲ موسسه تحقیقات پسته کشور Rafsanjan, Station 2, Iranian Pistachio Research Institute
5	کله قوچی ۲ Kalehghochi2	115810	E55 56 31.1	N30 23 39.8	1529	رفسنجان ایستگاه شماره ۲ موسسه تحقیقات پسته کشور Rafsanjan, Station 2, Iranian Pistachio Research Institute
6	اکبری ۱ Akbari1	115811	E55 56 28.9	N30 23 42.3	1529	رفسنجان ایستگاه شماره ۲ موسسه تحقیقات پسته کشور Rafsanjan, Station 2, Iranian Pistachio Research Institute
7	اکبری ۲ Akbari2	115813	E55 56 28.9	N30 23 42.3	1529	رفسنجان ایستگاه شماره ۲ موسسه تحقیقات پسته کشور Rafsanjan, Station 2, Iranian Pistachio Research Institute
8	اکبری ۳	115814	E55 56 28.9	N30 23 42.3	1529	رفسنجان ایستگاه شماره ۲ موسسه تحقیقات

	Akbari3					پسته کشور Rafsanjan, Station 2, Iranian Pistachio Research Institute رفسنجان ایستگاه شماره ۲ موسسه تحقیقات
9	اکبری ٤ Akbari4	115815	E55 56 28.9	N30 23 42.3	1529	پسته کشور Rafsanjan, Station 2, Iranian Pistachio Research Institute رفسنجان ایستگاه شماره ۲ موسسه تحقیقات
10	احمد آقایی ۱ Ahmad aghaei1	115817	E55 56 29.7	N30 23 43	1529	پسته کشور Rafsanjan, Station 2, Iranian Pistachio Research Institute رفسنجان ایستگاه شماره ۲ موسسه تحقیقات
11	احمد آقایی ۲ Ahmad aghaei2	115819	E55 56 29.7	N30 23 43	1529	پسته کشور Rafsanjan, Station 2, Iranian Pistachio Research Institute رفسنجان ایستگاه شماره ۲ موسسه تحقیقات
12	احمد آقایی ۳ Ahmad aghaei3	115820	E55 56 29.7	N30 23 43	1529	پسته کشور Rafsanjan, Station 2, Iranian Pistachio Research Institute رفسنجان ایستگاه شماره ۲ موسسه تحقیقات
13	فندقی ٤٨ -۱ Fandoghi48-1	115821	E55 56 30.4	N30 23 42.1	1529	پسته کشور Rafsanjan, Station 2, Iranian Pistachio Research Institute رفسنجان ایستگاه شماره ۲ موسسه تحقیقات
14	فندقی ٤٨ -۲ Fandoghi48-2	115822	E55 56 30.4	N30 23 42.1	1529	پسته کشور Rafsanjan, Station 2, Iranian Pistachio Research Institute رفسنجان ایستگاه شماره ۲ موسسه تحقیقات
15	فندقی ٤٨ -۳ Fandoghi48-3	115823	E55 56 30.4	N30 23 42.1	1529	پسته کشور Rafsanjan, Station 2, Iranian Pistachio Research Institute رفسنجان ایستگاه شماره ۲ موسسه تحقیقات
16	فندقی ٤٨ -٤ Fandoghi48-4	115825	E55 56 30.4	N30 23 42.1	1529	پسته کشور Rafsanjan, Station 2, Iranian Pistachio Research Institute رفسنجان ایستگاه شماره ۲ موسسه تحقیقات
17	ممتاز ۱ Momtaz1	115826	E55 56 32.2	N30 23 43.7	1529	پسته کشور Rafsanjan, Station 2, Iranian Pistachio Research Institute رفسنجان ایستگاه شماره ۲ موسسه تحقیقات
18	ممتاز ۲ Momtaz2	115827	E55 56 32.2	N30 23 43.7	1529	پسته کشور Rafsanjan, Station 2, Iranian Pistachio Research Institute

19	ممتاز ۳ Momtaz3	115828	E55 56 32.2	N30 23 43.7	1529	رفسنجان ایستگاه شماره ۲ موسسه تحقیقات پسته کشور Rafsanjan, Station 2, Iranian Pistachio Research Institute
20	ممتاز ٤ Momtaz4	115829	E55 56 32.2	N30 23 43.7	1529	رفسنجان ایستگاه شماره ۲ موسسه تحقیقات پسته کشور Rafsanjan, Station 2, Iranian Pistachio Research Institute
21	ممتاز ٥ Momtaz5	115830	E55 56 32.2	N30 23 43.7	1529	رفسنجان ایستگاه شماره ۲ موسسه تحقیقات پسته کشور Rafsanjan, Station 2, Iranian Pistachio Research Institute
22	شاهپسند ۱ Shahpasand1	115836	E54 21 38.5	N36 08 46.7	1150	دامغان- ابتدای جاده ورکیان باغ مرتضوی Damghan, The entrance of Varkian Road, Mortazevi garden
23	شاهپسند ۲ Shahpasand2	115837	E54 21 38	N36 08 46.8	1148	دامغان- ابتدای جاده ورکیان باغ مرتضوی Damghan, The entrance of Varkian Road, Mortazevi garden
24	شاهپسند ۳ Shahpasand3	115839	E54 21 38.7	N36 08 47	1147	دامغان- ابتدای جاده ورکیان باغ مرتضوی Damghan, The entrance of Varkian Road, Mortazevi garden
25	عباس علی ۱ Abasali1	115841	E54 35 21.2	N36 13 08	1115	دامغان روستای زرین آباد باغ منصور عباسیان Damghan, Zarrin Abad village, Mansour Abassian garden
26	عباس علی ۲ Abasali2	115842	E54 35 21.5	N36 13 08.4	1116	دامغان روستای زرین آباد باغ منصور عباسیان Damghan, Zarrin Abad village, Mansour Abassian garden
27	عباس علی ۳ Abasali3	115844	E54 35 21.7	N36 13 08.3	1115	دامغان روستای زرین آباد باغ منصور عباسیان Damghan, Zarrin Abad village, Mansour Abassian garden
28	عباس علی ٤ Abasali4	115845	E54 35 20.7	N36 13 08.2	1114	دامغان روستای زرین آباد باغ منصور عباسیان Damghan, Zarrin Abad village, Mansour Abassian garden
29	کله بزی ۱ Kaleh bozi1	115852	E49 59 22.2	N36 14 46.6	1287	قزوین جاده فارسیان، کیویک محله پشت چال Qazvin, Farsian Road, Q1, Poshte Chal District
30	کله بزی ۲ Kaleh bozi2	115853	E49 59 21.3	N36 14 48.8	1287	قزوین جاده فارسیان، کیویک محله پشت چال Qazvin, Farsian Road, Q1, Poshte Chal District
31	کله بزی۳ Kaleh bozi3	115854	E49 59 20.2	N36 14 53.1	1287	قزوین جاده فارسیان، کیویک محله پشت چال Qazvin, Farsian Road, Q1, Poshte Chal District

32	کله بزی ٤ Kaleh bozi4	115855	E49 59 19.7	N36 14 54.6	1287	قزوین جاده فارسیان، کیویک محله پشت چال Qazvin, Farsian Road, Q1, Poshte Chal District
33	بادام سفید ۱ Badami sefid1	115846	E58 71 98	N24 34 08	830	فیض آباد- جاده بجستان باغ نام آور Feiz Abad, Bajestan Road, Namavar garden
34	بادام سفید ۲ Badami sefid2	115848	E58 71 98	N24 34 08	830	فیض آباد- جاده بجستان باغ نام آور Feiz Abad, Bajestan Road, Namavar garden
35	بادام سفید ۳ Badami sefid3	115849	E58 71 98	N24 34 08	830	فیض آباد- جاده بجستان باغ نام آور Feiz Abad, Bajestan Road, Namavar garden
36	بادام سفید ٤ Badami sefid4	115850	E58 71 98	N24 34 08	830	فیض آباد- جاده بجستان باغ نام آور Feiz Abad, Bajestan Road, Namavar garden

جدول ۲-کدگذاری نمونه‌ها برای آلل های چند شکل یک مکان ژنی.

Table 2- Coding of samples for polymorphic alleles of one locus.

Cultivars	Locus1			
	Allel 1	Allel 2	Allel 3	Code
Ohadi	0	2	3	023
Sirizi	1	2	3	123
Seifoddini	0	0	3	003
Ebrahimi	1	2	0	120
UCB1	0	2	0	020
Integrima	0	0	0	000
Bane Baghi	1	0	0	100

جدول ۳-کدگذاری برای آلل های چند شکل چند مکان ژنی.

Table 3- Coding of samples for polymorphic alleles of several locus.

Cultivars	Barcode
Ohadi	023-0030-000
Sirizi	123-0030-000
Seifoddini	003-1030-000
Ebrahimi	120-1030-000
UCB1	020-1000-000
Integrima	000-1000-000
Bane Baghi	100-1000-000

نتایج و بحث

از مجموع ۲۵ نشانگر SSR استفاده‌شده، چهار نشانگر دارای چندشکلی مناسبی در بین ارقام موردمطالعه بودند (شکل ۱). از ۱۱ جفت آغازگر اختصاصی نشانگر AFLP، دو جفت آغازگر M_TTT-E_GTC و M_GAG-E_CAG دارای تکثیری مناسب در بین ارقام پسته بودند (شکل ۲). شاخص‌های تنوع ژنتیکی مرتبط با آغازگرهای AFLP بکار رفته در جدول ٤ آورده شده است.

در این تحقیق علیرغم استفاده از ۲۵ نشانگر مولکولی SSR, کلید شناسایی اختصاصی برای ۱۰ رقم پسته مورد مطالعه حاصل نشد. محدودیت در تعداد نشانگرهای SSR پسته و نیز وجود زمینه ژنتیکی مشابه در بین ارقام مختلف، از دلایل بروز نتیجه مذکور است. لذا استفاده از نشانگرهای AFLP در دستور کار قرار گرفت. از مجموع ۱۱ جفت آغازگر اختصاصی استفاده‌شده, دو جفت آغازگر M_TTT-E_GTC و M_GAG-E_CAG برای ۸ رقم مورد مطالعه پسته کلید شناسایی مولکولی ایجاد نمودند. جفت آغازگر M_TTT-E_GTC در ارقام عباس علی- احمد آقایی- بادامی سفید- فندقی ٤٨- ممتاز- اوحدی و شاه‌پسند و جفت آغازگر M_GAG-E_CAG در ارقام شاه‌پسند- احمد آقایی- اکبری- بادامی سفید- فندقی ٤٨- ممتاز و اوحدی کلیدهای مولکولی اختصاصی ایجاد نمودند.

در جدول ۵ نشانگرهای اختصاصی ارقام مختلف پسته به همراه کلید شناسایی آن‌ها به‌اختصار نشان داده‌شده است. به‌طور مثال، مکان‌های ژنی ۱، ۳ و ٦ در جفت آغازگر اختصاصی MTTT-EGTC در رقم عباسعلی به‌عنوان کلید شناسایی این رقم شناسایی معرفی شد. سایر مکان‌های ژنی اختصاصی به همراه کلیدهای شناسایی ارقام مختلف در جدول آورده شده است.

در آزمون تکرارپذیری نشانگرهای معرفی‌شده توسط موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی، آزمایشگاه نشانگرهای مولکولی موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، دو نشانگر AFLP معرفی‌شده برای ارقام پسته انتخاب و در DNA دو نمونه از ۱۰ رقم موجود (در مجموع ۲۰ فرد) تکثیر شدند. محصولات PCR بر روی ژل پلی اکریل آمید شش درصد الکتروفورز تفکیک و به روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی شدند. نتایج نشان داد پروفایل دو نشانگر انتخاب‌شده در ارقام پسته با پروفایل ارائه‌شده توسط پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی مطابقت کامل داشته و بیانگر تکرار پذیر بودن آللهای این نشانگرها است.

جدول ٤- شاخص‌های تنوع ژنتیکی نشانگرهای AFLP استفاده شده در ارزیابی ارقام پسته.

Table 4- Genetic diversity index of AFLP markers used in Pistachio cultivars assessment.

نام نشانگر Marker name	تعداد کل نوار Total band	تعداد نوار چند شکل Polymorphic band	درصد چند شکلی Polymorphic %	PIC*	MI*	تنوع ژنتیکی Genetic diversity	I*
MTTT_E46	24	9	38%	0.381	9.164	0.381	0.565
MCAG_E46	21	7	33%	0.37	7.777	0.3703	0.545
MGAC_ECAG	23	11	48%	0.352	8.105	0.601	0.908
M35_ECAG	26	14	54%	0.317	8.25	0.352	0.532
M35_EGAC	25	9	36%	0.357	8.945	0.357	0.537
M22_EGAC	25	5	20%	0.276	6.913	0.276	0.442
MGGG_EGAC	22	5	23%	0.307	6.769	0.307	0.478
MTTT_EGAC	27	9	33%	0.296	8.004	0.296	0.469
M22_E46	23	7	30%	0.355	8.186	0.355	0.535
MGGG_ECA	22	6	27%	0.244	5.38	0.244	0.398
MGGG_E46	32	10	31%	0.286	9.178	0.286	0.452

*PIC: Polymorphic Information content; MI: Marker Index; I: Shanon Index

جدول ۵- کلیدهای شناسایی مولکولی ۱۰ رقم مختلف پسته ایران.

Table 5- Molecular identification keys of 10 different Iranian Pistachio.

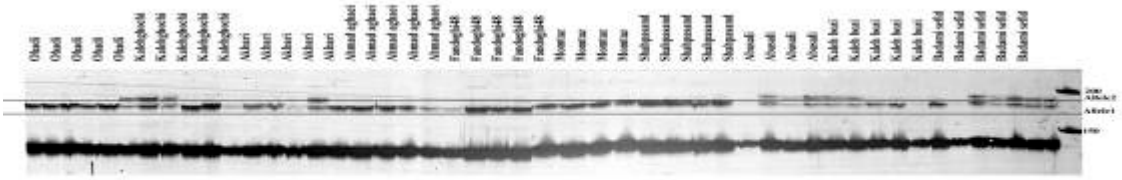
ارقام پسته Pistachio Cultivars	MGAG-ECAG	MCCC-EGTC	MTTT-EGTC	MGAC-ECAG
Abasali	12300678010111200	123006	103006	000056080
Ahmad aghaei	10340678910110130 [a]	123400	103050	020450009
Akbari	12340678910110130	123006	003050	100450089
Badami sefid	123406789101101314	003006	100056	000456089
Fandoghi48	120455780101112130	123406	000450	100456089
Kaleh bozi	0034000801011000	100450	003050	000050709
Kalehghochi	00040678010110130	123006	003050	100400080
Momtaz	00340678901112130	120406	020450	003450080
Ohadi	0004067801000130	123406	003006	000400080
Shahpasand	1204067091001200	120400	023456	000056080

[a] کلیدهای اختصاصی ارقام به رنگ نارنجی نشان داده شده است.

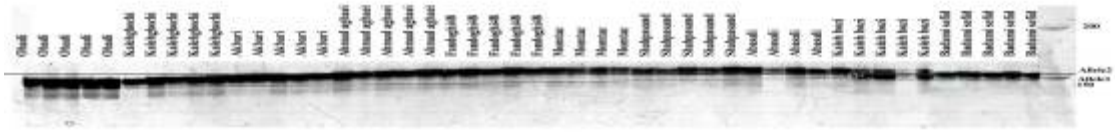
[a] **Specific cultivar keys are showed in orange color.**

مشاهده دندروگرام حاصل از نرم‌افزار SplitsTree 4، درختان مادری ارقام مورد مطالعه پسته با استفاده از ۱۱ نشانگر AFLP چندشکلی نشان داد، اکثر درختان مادری ارقام مختلف در گروه‌های مجزا طبقه‌بندی شدند (شکل ۳). همچنین به‌منظور تأیید نتایج حاصل از روش‌های مبتنی بر تجزیه خوشه‌ای و جهت اطلاع از وجود ساختار یا زیر جمعیت‌های احتمالی در ژرم پلاسم مورد مطالعه، از روش مبتنی بر مدل Bayesian استفاده شد. با استفاده از نرم‌افزار Structure 2.3 فرض K=۲ تا K= ۱۵ اجرا گردید (K نشان‌دهنده تعداد گروه‌ها) و سپس بر مبنای معیارهای lnP(D) و ΔK صحیح‌ترین گروه‌بندی مشخص شد. بر این اساس پایین‌ترین مقدار عددی lnP(D) و بیشترین مقدار عددی ΔK نشان‌دهنده بهترین معیار برای دسته‌بندی جمعیت‌های مورد مطالعه بشمار می‌روند. در این مطالعه بر اساس معیارهای فوق، K= ۱۰ بهترین تعداد گروه بوده که این گروه‌ها با رنگ‌های مجزا مشخص شده است (شکل ٤).

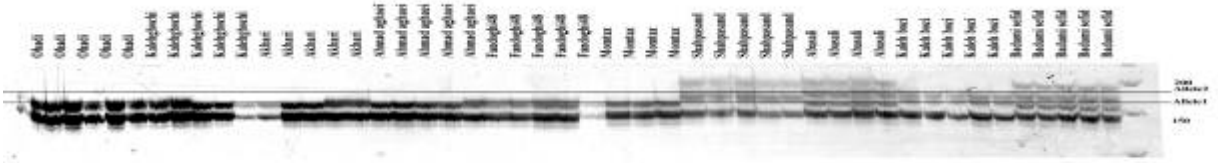
MPI-40



MPI-9



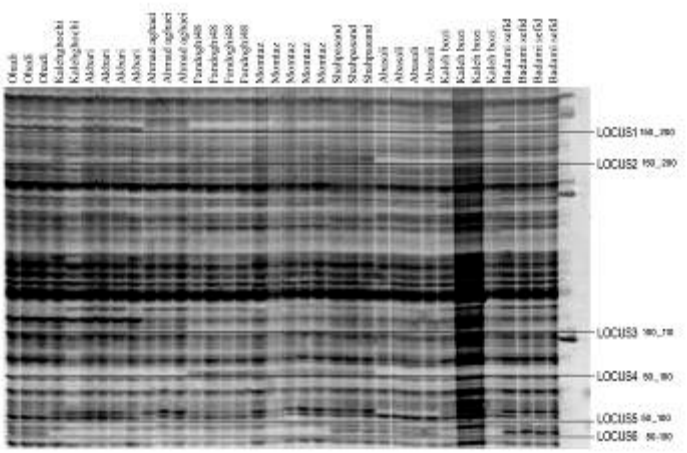
MPI-3



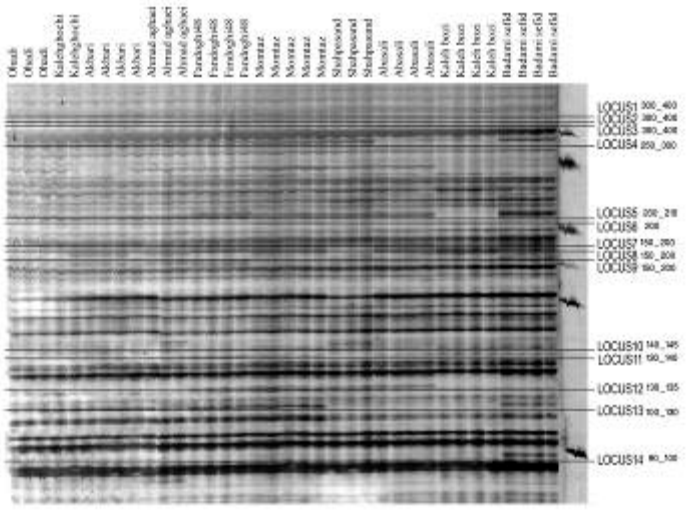
MPI-7

شکل ۱- الگوهای نواری حاصل از به‌کارگیری نشانگرهای SSR در ارقام پسته.

Figure 1- Banding patterns provided by SSR markers in Pistachio cultivars .



AFLP: M_TTT-E_GTC



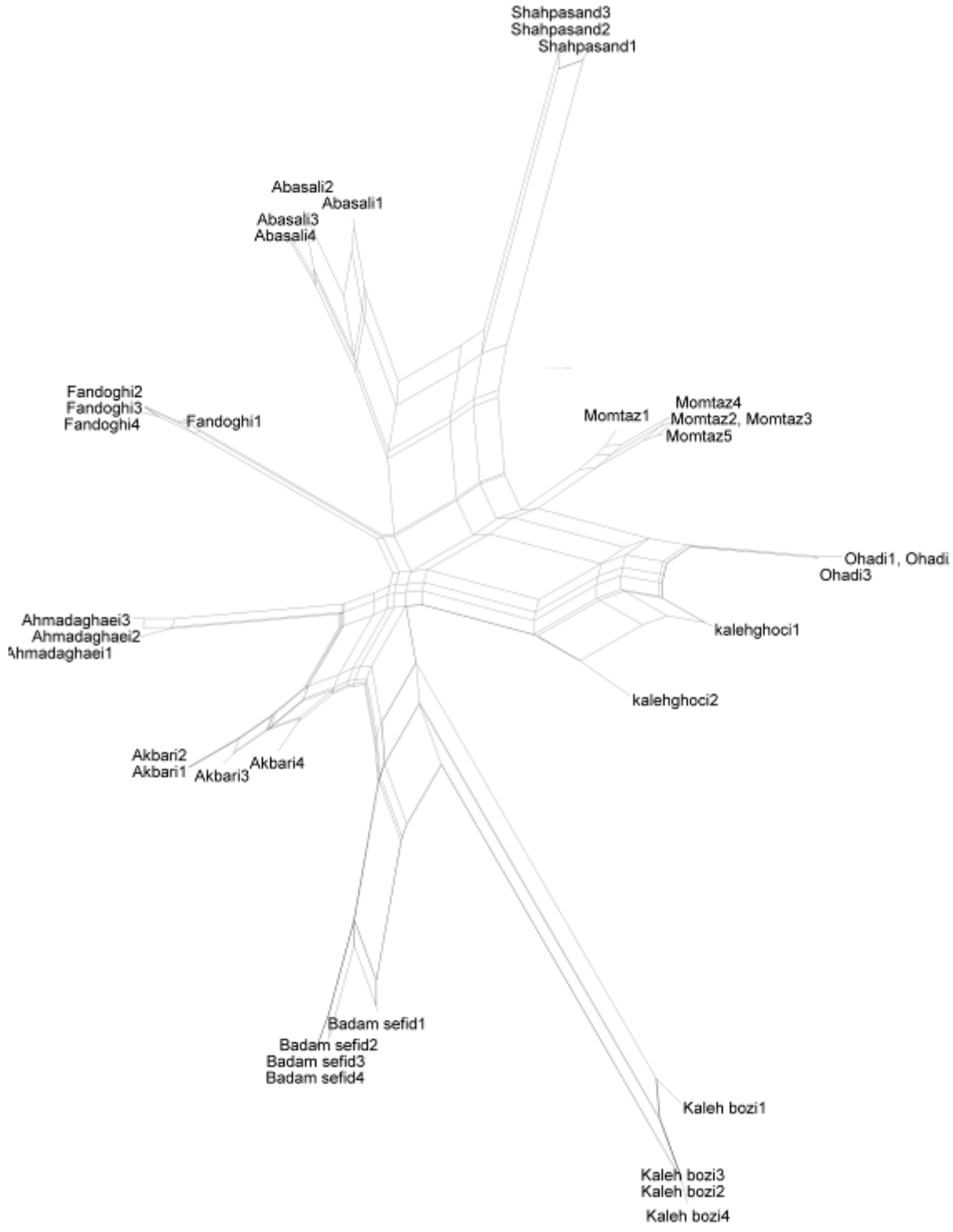
AFLP: M_GAG-E_CAG

شکل ۲- الگوهای نواری حاصل از به‌کارگیری نشانگرهای AFLP در ارقام پسته.

Figure 2- Banding patterns provided by AFLP markers in Pistachio cultivars.

هر فرد و کد مربوط به آن به‌وسیله یک ستون رنگی عمودی (معرف ضریب عضویت) نشان داده می‌شود که وجود بیش از یک رنگ، معرف ساختار مختلط ژنتیکی آن فرد است. در این حالت آن فرد به گروهی تعلق می‌گیرد که بیشترین پهنای رنگی آن خوشه را دارا باشد. در کل

ژنوتیپ‌های داخل هر خوشه دارای احتمال عضویت بیش از ۰/۵ هستند و به احتمال بیش از ۵۰ درصد به خوشه خود تعلق دارند. بر طبق معیارهای lnP(D) و ΔK بهترین تعداد گروه K=۱۰ به دست آمد و این نتیجه با شبکه فیلوژنی در شکل ۳ به روش Neighbor-net کاملاً منطبق است. قرار گرفتن برخی از تکرارهای ارقامی نظیر کله قوچی (۱۱۵۸۰٦ و ۱۱۵۸۱۰) در خوشه‌های دور از هم، می‌تواند دلیل وجود نمونه‌های خارج از تیپ باشد. علت وجود این تفاوت، ممکن است به دلایل مختلفی مانند اختلاط و جهش باشد که به‌منظور ایجاد نهال‌های یکنواخت در ارقام مذکور ضروری است، نمونه‌های مذکور به‌عنوان درخت مادری، مورد استفاده قرار نگیرند. درنهایت، کلیدهای مولکولی اختصاصی به‌وسیله تجزیه‌های مولکولی بر روی ۳٦ درخت مادری ایجاد و نتایج این تحقیق در دو آزمایشگاه مستقل تأیید گردید. با استفاده از کلیدهای شناسایی مولکولی ارقام مورد مطالعه، امکان تشخیص این ارقام به‌منظور تأیید اصالت ژنتیکی آن‌ها را میسر گردید. با استفاده از این کیت‌ها و دستورالعمل‌های ذی‌ربط، شناسایی دقیق ارقام موردنظر در تمامی مراحل رشد و در مدت کوتاهی امکان‌پذیر است. ثبت جهانی ارقام مذکور توسط مؤسسات ذی‌ربط در حال انجام بوده و امکان واگذاری این کیت‌ها به بخش‌های خصوصی به‌منظور ایجاد شبکه آزمایشگاهی تشخیص هویت گیاهان ایران فراهم‌شده است.



شکل ۳- گروه بندی ارقام پسته با استفاده ۱۱ نشانگر AFLP بر اساس روش Neighbor-net.

Figure 3- Grouping of Pistachio cultivars using 11 AFLP markers according to Neighbor-net method.

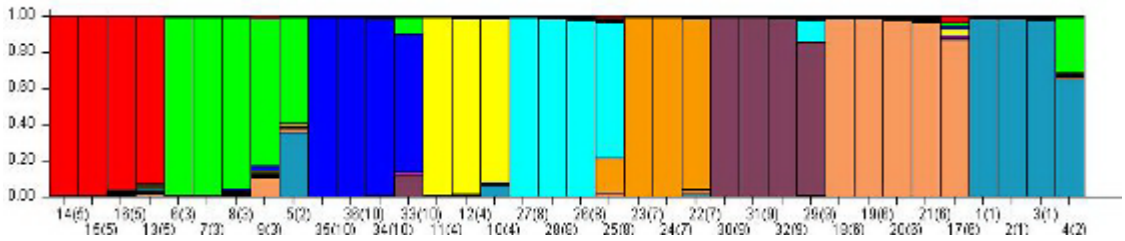


Figure 1

شکل ٤- دسته بندی ارقام پسته بر اساس از روش مبتنی بر مدل با استفاده نرم افزار **Structure**.

Figure 4- Clustering of Pistachio cultivars based on model based method and using Structure software.

منابع

Mosavi deraz mahalleh SM, Zeinolabedini M,Mardi M, Marashi S.H, Malekzadeh S, Kazemi M, Roodbar shojaie T,Zahravi M (2012), The Survey of Genetic Diversity & Population Structure Analysis of Iranian Sweet Pomegranate (Punica granatum L.) Germplasm Using SSR Markers. Iranian Journal of Agricultural Biotechnology 12: 138-150

Ahmad R, Ferguson L, Southwick SM (2003). Identification of Pistachio (Pistacia vera L.) Nuts with microsatellite markers. Journal of the American Society for Horticultural Science 128: 898-903.

Ahmad R, Ferguson, L, Southwick SM (2005). Molecular marker analyses of pistachio rootstocks by simple sequence repeats and sequence-related amplified polymorphisms. Journal of horticultural science & biotechnology 80: 382-386.

Barone E, Di Marco L, Marra FP, Sidari M (1996). Isozymes and canonical discriminant analysis to identify pistachio (*Pistacia vera* L.) germplasm. HortScience 31: 134-138.

FAOSTAT (2011). http://faostat.fao.org.

Golan-Goldhirsh A, Barazani O, Wang ZS, Khadka DK, Saunders JA, Kostiukovsky V, Rowland LJ (2004). Genetic relationships among Mediterranean *Pistacia* species evaluated by RAPD and AFLP markers. Plant Systematics and Evolution 246: 9-18.

Harandi O, Abd-Mishani, C, Shahsavan Behboodi B, Gaffari M, Kalantari P (2000). Wild and cultivated Iranian pistachio (*Pistacia* L.) analysis by isozyme markers. Plant & Animal *VIII* Conference.

Hormaza JI, Dollo L, Polito VS (1994) Identification of a RAPD marker linked to sex determination in *Pistacia vera* using bulked segregant analysis. Theoretical and Applied Genetics 89: 9-13.

IPGRI (1997). Descriptors for pistachio (*Pistacia vera*). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy

Javanshah A, Tajabadipour A, Mirzaei S (2007). Identification of a new phenotype (Siah Barg) of pistachio (*Pistacia vera* L.) with shiny-blackish green leaves using RAPD assay. International Journal of Agriculture and Biology 9: 307-310.

Kafkas S, Perl-Treves R (2001). Morphological and molecular phylogeny of *Pistacia* species in Turkey. Theoretical and Applied Genetics 102:908-915.

Karimi HR, Kafkas S, Zamani Z, Ebadi A, Moghadam MRF (2009). Genetic relationships among *Pistacia* species using AFLP markers. Plant Systematics and Evolution 279: 21-28.

Katsiotis A, Hagidimitriou M, Drossou A, Pontikis C, Loukas M (2003). Genetic relationships among species and cultivars of *Pistacia* using RAPDs and AFLPs. Euphytica 132: 279-286.

Mirzaei S, Bahar M, Sharifnabi B (2005). A phylogenetic study of Iranian wild pistachio species and some cultivars using RAPD markers. IV International Symposium on Pistachios and Almonds 726: 39-44.

Parfitt DE, Badenes ML (1997). Phylogeny of the genus Pistacia as determined from analysis of the chloroplast genome. Proceedings of the National Academy of Sciences 94: 7987-7992.

Pazouki L, Mardi M, Shanjani PS, Hagidimitriou M, Pirseyedi SM, Naghavi MR, Nekoui SK (2010). Genetic diversity and relationships among Pistacia species and cultivars. Conservation Genetics 11: 311-318.

Raflaski J, Williams A (1991). Genotyping using molecular markers. Agricultural Biotechnology News Information 3: 645-648.

Shanjani PS, Mardi M, Pazouki L, Hagidimitriou M, Avanzato D, Pirseyedi SM, Nekoui SMK (2009). Analysis of the molecular variation between and within cultivated and wild Pistacia species using AFLPs. Tree Genetics & Genomes 5: 447-458.

Sax K (1923). The association of size difference with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. Genetics 8: 552-560.

Tajabadipour A (1997). Identification of some of Iranian pistachio cultivars. M.Sc. Thesis P: 177. Tehran University, IRAN.

Tanksley SD (1983). Molecular markers in plant breeding. Plant Molecular Biology Report 1: 3-8.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van De Lee T, Hornes M, Zabeau M (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic acids research 23: 4407-4414.

Application of Microsatellite Markers for Identification and Registration of Pistachio Cultivars

Mardi M[1]., Zeynolabedini M.[*2], Tajabadipor A[3]., Jazayeri M[4]., Farsi M[5]., Khayamnekoie M[6]., Jamali M[4].,Kavand A[7]., Jarahi K[8].,Shams kia F[8]., Loni A[8]., Koshkam S[8]., Tahernejad Z[4]., Sharafati A[8]., Mortazavi A[8].,Kashanizadeh S[8].

[1] Associate Professor of Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran;
[2] Assistant Professor of Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran;
[3]Pistachio Research institute of iran;
[4] Seed & Plant Certification and Registration Institute, Karaj, Iran;
[5] Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran;
[6]Associate Professor, Centre for Research and Development of Biotechnology;
[7] Plant and Seed Improvement Institute, Karaj, Iran;
[8] Adjutancy of plant production of the Ministry of Jihad-e-Agriculture, Tehran, Iran;

Abstract

Due to complex identification of young pistachio cultivars (*Pistacia vera* L.) using morphological traits, advance molecular tools have provided a new prospect for DNA fingerprinting. In this study, specific molecular keys were identified for 10 Iranian pistachio cultivars (*Pistacia vera* L.) using 25 SSR markers and 12 specific AFLP primer combinations. Out of 25 SSR markers, 4 were polymorphic. However, specific molecular keys were not identified using SSR markers. Twelve specific AFLP primer combinations produced specific molecular keys for 10 Iranian pistachio cultivars. Out of 12 specific AFLP primer combinations, two produced specific molecular keys for 8 Iranian pistachio cultivars. Specific primer combination "$M_{_TTT}$-$E_{_GTC}$" in Abbasali, Ahmad Aghaei, Badami Sefid, Fandoghi 48, Momtaz, Ohadi va Shahpasand, and "$M_{_GAG}$-$E_{_CAG}$" in Akbari produced specific keys. The results showed that there was a similar genetic background within Iranian pistachio mother's trees. The specific molecular keys were verified on 36 pistachio mother's trees and the results were confirmed at two independent laboratories. The reported specific molecular keys can be used for identification of 10 Iranian pistachio cultivars.

***Key Words**: Pistachio, microsatellite, Fingerprinting, model based method, clustering.*

[*] Corresponding Author: Zeynolabedini M. Tel: 02632703536 Email: mzeinolabedini@abrii.ac.ir