Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 17:33 IRST on Tuesday January 25th 2022

استفاده از نشانگرهای ریزماهواره *Pistacia khinjuk* Stocks. برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ارقام تجاری پسته ایرانی

حسام عرب نژاد[۱]، مسعود بهار[۱*] و علی تاج آبادی پور[۲]

(تاریخ دریافت: ۸۶/۸/۱۶ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۷/۲/۲۹)

چکیده

به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی ارقام پسته ایرانی، کارایی آغازگرهای ریزماهواره ای جداسازی شده از گونه وحشی خنجوک (*Pistacia khinjuk* Stocks.) روی ژنوتیپ‌های تجاری پسته متعلق به گونه *P. vera* L. بررسی شد. از مجموع ۲۷ جفت آغازگر SSR استفاده شده، ۲۵ جفت آغازگر قادر به تکثیر DNA در ارقام مختلف پسته بودند که از این تعداد، ۱۹ جفت آغازگر تکثیر تمیز و قابل تفسیری داشته و از انتقال‌پذیری مطلوبی روی ارقام اهلی برخوردار بودند. مقایسه الگوهای تکثیر نشان داد، ۱۱ جفت آغازگر محصول چندشکل دارند که مجموع ۴۸ آلل در دامنه‌ای از دو تا ۱۱ آلل را در بین ژنوتیپ‌های تحت بررسی تکثیر نمودند. متوسط تعداد آلل به ازای هر جایگاه و هتروزیگوسیتی مشاهده شده، به ترتیب ۳/۶۹ و ۰/۶۹ محاسبه گردید که حاکی از محتوای بالای اطلاعات نشانگرهای استفاده شده بود. بر اساس تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA و ضریب تشابه نی، ژنوتیپ‌های تجارتی پسته یک گروه بزرگ با سه زیر گروه متفاوت را تشکیل دادند، در حالی که ژنوتیپ‌های قزوینی زودرس و سرخس که میوه‌های ریزتری داشته و به مناطق خاصی محدود هستند، در دو گروه متفاوت و مستقل از گروه ارقام تجاری پسته قرار گرفتند. به نظر می‌رسد ژنوتیپ قزوینی زودرس از سرخس مشتق شده باشد که ژنوتیپ اخیر احتمالاً یک ژنوتیپ تأثیرگذار در تکامل پسته‌های تجاری می‌باشد. نتایج این مطالعه نشان داد که نشانگرهای ریزماهواره پسته خنجوک با پراکندگی مناسب در طول ژنوم، از انتقال پذیری مناسبی بر روی ژنوتیپ‌های پسته اهلی برخوردار هستند و بنابراین می‌توان از این نشانگرها برای انگشت نگاری ژنتیکی ارقام تجاری پسته استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: پسته، خنجوک، تنوع ژنتیکی، نشانگر SSR

مقدمه

پسته (*Pistacia vera* L.) به عنوان یکی از مهم‌ترین محصولات باغی و سومین کالای صادراتی ایران از اهمیت تجاری و اقتصادی ویژه‌ای برخوردار است. تحمل به شوری، خشکی و توانایی رشد این گیاه در خاک‌های ضعیف از خصوصیات مهم پسته است که آن را برای کشت در زمین‌های حاشیهٔ کویر مستعد نموده و منبع درآمد مهمی برای مردم ساکن این مناطق محسوب می‌شود.

چون مطالعه ژنتیکی ژنوتیپ‌های پسته به بهبود مدیریت و بهره‌برداری آنها کمک می‌کند، شناسایی و ارزیابی دقیق ذخایر توارثی پسته ایرانی به منظور طراحی برنامه‌های اصلاحی مناسب و اطمینان از تهیه ارقام اصلاح شده، ضروری است (۱۷،

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۲. عضو هیئت علمی مؤسسه تحقیقات پسته کشور، رفسنجان

* : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mbahar@cc.iut.ac.ir

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 17:33 IRST on Tuesday January 25th 2022

۲۳). به این مناسبت، طی دهه‌های گذشته عمده ژنوتیپ‌های شناخته شده پسته ایران از سراسر کشور جمع‌آوری شده و در کلکسیون‌های مراکز تحقیقات پسته کشور نگه‌داری و مطالعه می‌شوند (۳۶).

در مطالعات اولیه مربوط به تنوع ژنتیکی پسته، نشانگرهای مورفولوژیکی مانند شکل میوه و برگ مورد استفاده محققین قرار گرفتند (۹ و ۴۱)، ولی تأثیرپذیری این دسته از نشانگرها از شرایط محیطی، سن گیاه و طولانی بودن مراحل رشد گیاه برای ظهور و ثبت مشخصات ظاهری اندام‌ها، کاربرد آنها را مشکل ساخته است (۴). در مراحل بعدی مطالعات آیزوزایمی متعددی با هدف تمایز بین گونه‌ها و ارقام پسته انجام شد (۳، ۶ و ۱۳) که در تمامی موارد، ناکافی بودن چندشکلی آیزوزایم‌ها در بین ارقام نزدیک به هم، قابلیت آنها را در تشخیص تنوع ژنتیکی و بررسی دقیق روابط خویشاوندی مورد تردید قرار داد. بنابراین به تدریج مطالعات مولکولی پسته به سمت استفاده از نشانگرهای مبتنی بر DNA، متمایل گشت (۱۷). تاکنون مطالعات ژنتیکی متعددی روی گیاه پسته و با استفاده از نشانگرهای DNA از جمله RAPD (۵، ۱۲، ۲۴، ۲۱ و ۲۰)، RFLP (۳۱) و AFLP (۱، ۲۵ و ۱۷) انجام شده است. علی‌رغم اطلاعات مفید به‌دست آمده از این نشانگرها در تعیین روابط خویشاوندی گونه‌های جنس پسته (۱۷، ۲۵ و ۳۱) و تعیین تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های تجارتی پسته (۱، ۵، ۱۲ و ۲۴)، محدودیت‌های خاص مربوط به هر یک از آنها، از جمله ماهیت بارز و تکرارپذیری پایین RAPD، پیچیدگی روش به همراه عدم تشخیص آلل‌های هر نشانگر و غالب بودن وراثت در AFLP و نیز سطح پایین چندشکلی و نیاز به هزینه زیاد و پیچیدگی روش در RFLP (۲۷، ۳۰ و۳۸)، موجب توجه به استفاده از نشانگرهای هم بارز ریزماهواره‌ای (Simple Sequence Repeats= SSRs) شده است. این نشانگرها علاوه بر کاربرد آسان وسهولت در تفسیر نتایج، از مزایای تولید آلل‌های فراوان، ارائه سطوح بالای چندشکلی و تکرارپذیری قابل اعتماد برخوردار هستند و هم‌چنین با فراوانی مناسب در ژنوم، دامنه بالایی از هتروزیگوسیتی را نشان می‌دهند (۱۹ و ۱۱).

هر چند که استفاده از چندشکلی نواحی ریزماهواره، به دلیل مراحل پرزحمت، زمان بر و پرهزینه شناسایی و جداسازی جایگاه‌های آن، هنوز در تمامی گیاهان کاملاً متداول و مرسوم نشده است (۳۳)، اما به سبب مزایای قابل توجه این نشانگرها، امروزه SSR به عنوان یک ابزار کارآمد برای انگشت نگاری مولکولی انواع گیاهان، کاربرد زیادی پیدا کرده است(۳۳ و ۳۸).

شناسایی و جداسازی جایگاه‌های ریزماهواره‌ای گیاه پسته برای تعیین تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های تجارتی با معرفی ۱۴ جفت آغازگر شروع گردید (۷). علی‌رغم کارایی این نشانگرها در تجزیه و تحلیل ژنوم پسته، ایجاد چندشکلی مناسب برای ارقام مدیترانه‌ای و شناسایی برخی پایه‌های تجاری، این آغازگرها به دلیل ایجاد چندشکلی پایین در ژرم پلاسم‌های دارای روابط نزدیک ژنتیکی، قادر به تفکیک مناسب ارقام ایرانی نبودند (۷ و ۸). لذا در پژوهش دیگری با هدف بررسی روابط ژنتیکی و تفکیک ارقام پسته ایرانی، جایگاه‌های ریزماهواره در پسته خنجوک (*P. khinjuk*) شناسایی شد و ۲۷ جفت آغازگر SSR به این منظور طراحی و معرفی گردید (۳). چون جفت آغازگرهای طراحی شده از ریزماهواره‌های یک گونه، به دلیل حفاظت شدگی توالی‌های اطراف ریزماهواره‌ها، عموماً روی گونه‌ها و حتی جنس‌های خویشاوند آن گونه انتقال پذیرند (Transferability) (۱۶، ۱۹، ۲۲ و ۳۹)، که در یک مثال شاخص از موارد کاربردی آن می‌توان به کارایی مطلوب SSRهای طراحی شده و توسعه یافته در سیب برای انگشت نگاری ژنوتیپ‌های گلابی اشاره نمود (۳۸)، لذا در پژوهش حاضر، به دلیل رابطه نزدیک ژنتیکی بین دو گونه *P.vera* و *P. khinjuk* (۱۷، ۲۵ و ۳۱)، کارایی نشانگرهای SSR معرفی شده از گونه *P. khinjuk* برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ارقام پسته ایرانی و تعیین روابط ژنتیکی بین آنها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی استفاده شده در این مطالعه شامل نمونه‌های برگی

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 17:33 IRST on Tuesday January 25th 2022

۲۰ رقم از مشهورترین ارقام تجاری پسته ایرانی شامل ارقام ممتاز، بادامی راور، موسی آبادی، حسنی، سیف الدینی، اکبری، احمدآقایی، حسن زاده، غلام رضایی، قزوینی زودرس، ایتالیایی زودرس، ممتاز تاج آبادی، خنجری دامغان، سبز پسته نوق، نیش کلاغی، بادامی زرند، راور شماره ۲، اوحدی، فندقی ریز و کله قوچی و نیز نمونه برگی ژنوتیپ وحشی سرخس بود که در اردیبهشت ۱۳۸۴ از درختان پسته باغ کلکسیون مؤسسه تحقیقات پسته کشور- رفسنجان جمع‌آوری گردید.

برای استخراج DNA ژنومی هر نمونه، ۸۰۰ میلی‌گرم از بافت برگ‌های جمع‌آوری شده در هاون چینی و در حضور ازت مایع پودر شد و سپس به روش توصیه شده توسط میرزایی و همکاران (۲۸) استخراج DNA از نمونه‌ها انجام گرفت. کیفیت و کمیّت DNA به‌دست آمده، روی ژل ۰/۷٪ آگارز در بافر TAE (Tris-Acetate EDTA)، در مقایسه با غلظت باندهای نشانگر وزن مولکولی III (Roche Co., Germany) تخمین زده شد.

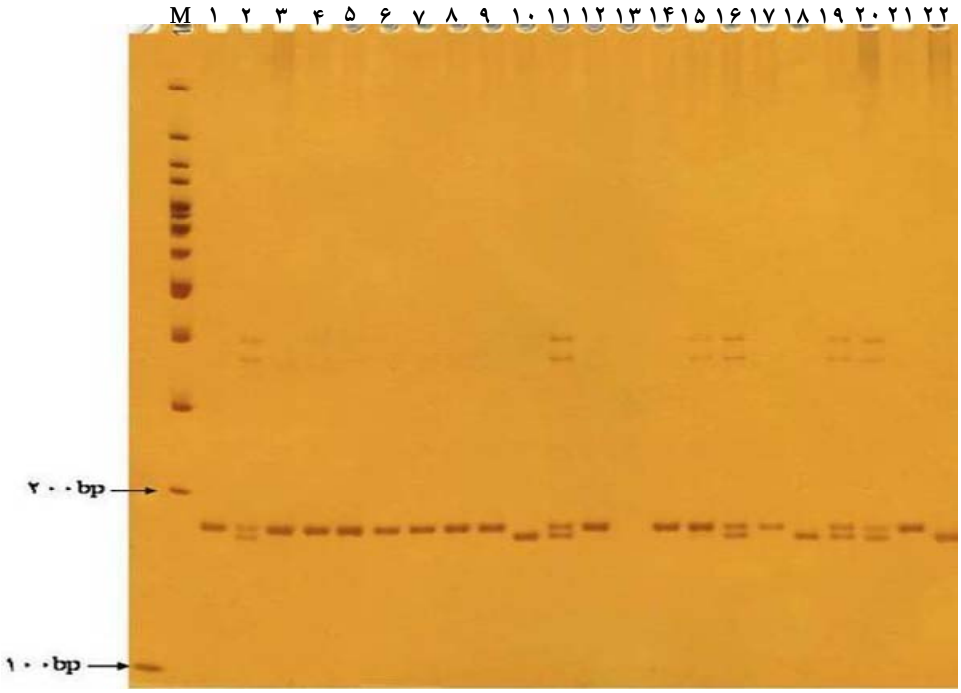
به منظور انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از ۲۷ جفت آغازگر SSR اختصاصی طراحی شده از گونه وحشی پسته خنجوک (*P. khinjuk*) استفاده شد (۳). آغازگرهای مورد نظر توسط شرکت ایزوژن هلند (Isogen Life Science) ساخته شده و مخلوط PCR با استفاده از مواد تولیدی شرکت سیناژن (CinnaGen, Iran) و در حجم ۲۰ میکرولیتر، شامل غلظت‌های 1X بافر PCR، ۰/۱۵ میلی‌مولار مخلوط نوکلئوتیدی (dNTP mix)، ۲/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیوم، ۰/۱۵ میکرومولار از هر آغازگر، به همراه ۲۰ نانوگرم DNA ژنومی و ۱/۵ واحد آنزیم *Taq* DNA polymerase تهیه شد. واکنش‌های PCR در دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler gradient, Eppendorf, Germany) تحت برنامه‌ای شامل، یک چرخه سه دقیقه‌ای در ۹۵ $^{\circ}$C برای واسرشته سازی اولیه و سپس ۳۵ چرخه شامل ۳۰ ثانیه در ۹۴ $^{\circ}$C ، یک دقیقه در دمای اتصال مناسب برای هر جفت آغازگر (جدول ۲) و یک دقیقه گسترش در ۷۲ $^{\circ}$C و در نهایت یک چرخه ۱۰ دقیقه ای در ۷۲ $^{\circ}$C مربوط به گسترش نهایی انجام شد (۳).

برای الکتروفورز محصولات تکثیر یافته در واکنش PCR، از ژل پلی اکریل آمید ۸٪ غیر واسرشته ساز استفاده شد. در برخی موارد به منظور تفکیک بهتر باندها، غلظت ژل تا ۱۶٪ نیز افزایش یافت. ژل‌ها با روش نیترات نقره رنگ آمیزی شد و اندازه تقریبی باندهای تکثیر شده بر اساس باندهای نشانگر ۱۰۰ جفت بازی (Ladder 100, Roche, Germany) تخمین زده شد. جفت آغازگرهای فاقد تکثیر و یا دارای تکثیر نامطمئن از ادامه آزمایش‌ها حذف گردید و تکرارپذیری مابقی آغازگرها حداقل دوبار امتحان و تأیید شد. در جفت آغازگرهایی که دو جایگاه را با فاصله باندی مناسب از یکدیگرتکثیر نمودند، به دلیل تکرارپذیری و واقعی بودن آنها براساس تفسیر احمد و همکاران (۷)، امتیازدهی هر جایگاه به‌طور مجزا از جایگاه دیگر انجام شد. کلیه تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم افزار Powermarker V3.25 (http://www.powermarker.net) صورت گرفت و تجزیه خوشه‌ای و گروه بندی ژنوتیپ‌ها نیز بر اساس ضریب تشابه نی (۲۹) و با استفاده از روش UPGMA انجام شد. در نهایت آزمون Bootstrap با ۱۰۰ جایگزینی برای بررسی میزان اطمینان دندوگرام ترسیمی استفاده شد و دندوگرام حاوی ضرایب آزمون Bootstrap با استفاده از نرم افزار MEGA3 رسم گردید (۱۴).

نتایج و بحث

از مجموع ۲۷ جفت آغازگر استفاده شده در این مطالعه، ۲۵ عدد در ارقام پسته اهلی تکثیر نشان دادند. از این تعداد، آغازگرهایی که یا باندهای اضافی تکثیر نمودند و یا فاقد تکرارپذیری مناسب بودند حذف شده و ۱۹ جفت آغازگر باقی‌مانده که از تکثیر نسبتاً مناسبی برخوردار بودند، به عنوان جفت آغازگرهای دارای انتقال‌پذیری مناسب روی پسته‌های اهلی شناخته شدند. از آنجا که در مطالعات مربوط به بررسی انتقال‌پذیری ریزماهواره‌ها بین گونه‌های مختلف، رابطه مستقیمی بین رابطه ژنتیکی گونه‌های مورد نظر و میزان

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 17:33 IRST on Tuesday January 25th 2022



شکل ۱. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۲۲ ژنوتیپ پسته با جفت آغازگر PK15

M- نشانگر وزن مولکولی 100 bp Ladder plus، ۱- ممتاز، ۲- بادامی راور، ۳- موسی آبادی، ۴- حسنی، ۵- سیف الدینی، ۶- اکبری، ۷- احمدآقایی، ۸- حسن زاده، ۹- غلام رضایی، ۱۰- قزوینی زودرس، ۱۱- ایتالیایی زودرس، ۱۲- ممتاز تاج آبادی، ۱۳- خنجری دامغان، ۱۴- سبز پسته نوق، ۱۵- نیش کلاغی، ۱۶- بادامی زرند، ۱۷- راور شماره ۲، ۱۸- سرخس، ۱۹- اوحدی، ۲۰- فندقی ریز، ۲۱- کله قوچی، ۲۲- خنجوک

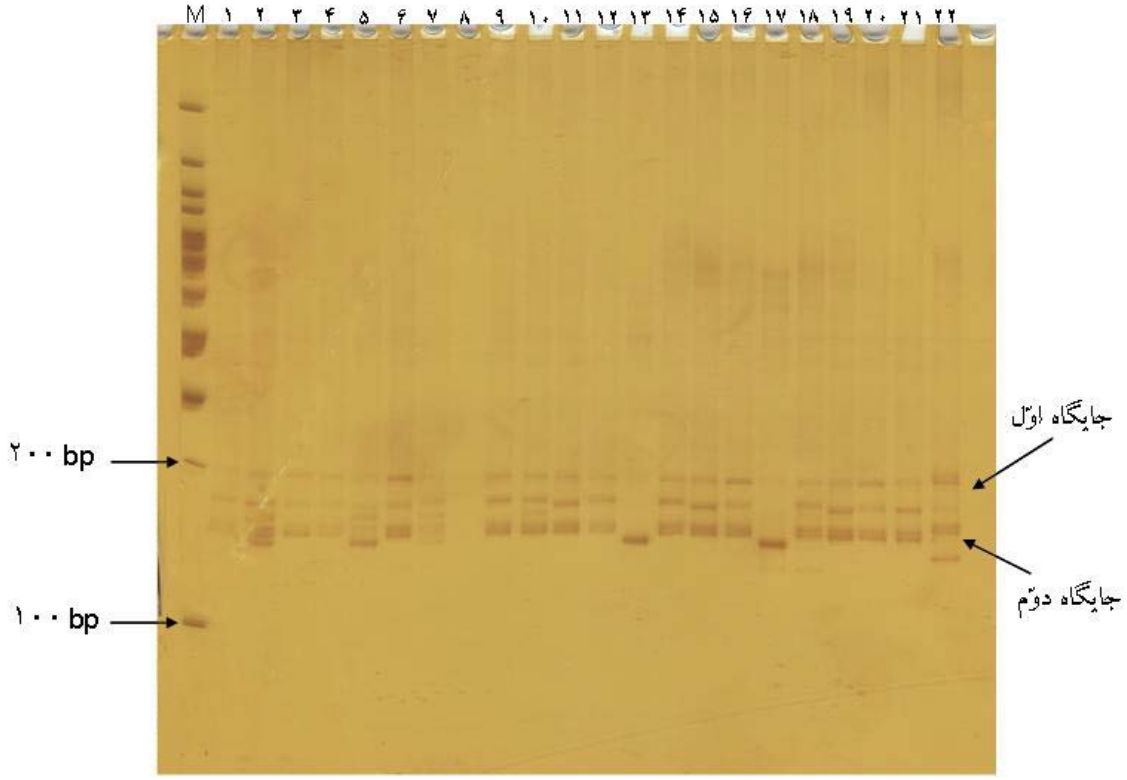
انتقال‌پذیری برقرار است (۱۰ و ۱۶)، لذا انتقال پذیری نسبتاً مناسب این جفت آغازگرها روی ژنوتیپ‌های اهلی پسته را می‌توان به رابطه نزدیک ژنتیکی بین دو گونه *P. vera* و *P. khinjuk* نسبت داد.

در بین آغازگرهای مورد بررسی، جفت آغازگرهای Pk11، Pk15، Pk16، Pk21 و Pk27 تکثیر بسیار مناسبی در ژنوتیپ‌های مختلف پسته انجام دادند و تقریباً عاری از باندهای اضافه بودند. در این میان به جز آغازگر Pk21، که از اطراف ناحیه ریزماهواره با موتیف دوتایی طراحی شده بود، چهار آغازگر دیگر، ریزماهواره‌های با موتیف سه تایی را تکثیر نمودند. تکثیر مناسب‌تر آغازگرهای دارای موتیف سه تایی در کار دیگران تأیید شده است (۱۱). در شکل ۱، الگوهای باندی حاصل از تکثیر DNA استخراج شده از ارقام پسته، با استفاده از جفت آغازگر PK15، نشان داده شده است.

از میان ۱۹ جفت آغازگر دارای انتقال پذیری مناسب، جفت آغازگرهای Pk12 و Pk21، دو جایگاه را تکثیر نمودند که جایگاه دوم علاوه بر تکرارپذیری مناسب الگوی تکثیر، به طور مشخصی از جایگاه اصلی متمایز و مشخص بود (شکل ۲). پیش از این نیز در گیاهان پسته (۷) و سیب (۱۸) چنین گزارش‌هایی در مورد تکثیر دو جایگاه ژنومی توسط برخی جفت آغازگرها گزارش شده است. با توجه به نتایج به دست آمده از مطالعات سیتوژنتیک پسته و مردود بودن احتمال تتراپلوئیدی در این گیاه (۴۱)، احتمال می‌رود تکراری بودن نواحی خاصی از ژنوم در ایجاد جایگاه دوم نقش داشته باشد. مطمئن‌ترین راه برای بررسی میزان صحت این فرضیه، توالی‌یابی باندهای مربوط به جایگاه دوم باشد که مورد نظر مطالعات آتی است.

از ۱۹ جفت آغازگر دارای تکثیر مناسب، ۱۱ عدد سطوح متفاوتی از چندشکلی را روی ارقام پسته اهلی ایرانی نشان

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 17:33 IRST on Tuesday January 25th 2022



شکل ۲. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۲۲ ژنوتیپ پسته با جفت آغازگر PK21

M- نشانگر وزن مولکولی 100 bp Ladder plus، ۱- ممتاز، ۲- بادامی راور، ۳- موسی آبادی، ۴- حسنی، ۵- سیف الدینی، ۶- اکبری، ۷- احمدآقایی، ۸- حسن زاده، ۹- غلام رضایی، ۱۰- قزوینی زودرس، ۱۱- ایتالیایی زودرس، ۱۲- ممتاز تاج آبادی، ۱۳- خنجری دامغان، ۱۴- سبز پسته نوق، ۱۵- نیش کلاغی، ۱۶- بادامی زرند، ۱۷- راور شماره ۲، ۱۸- سرخس، ۱۹- اوحدی، ۲۰- فندقی ریز، ۲۱- کله قوچی، ۲۲- خنجوک

دادند (جدول ۱). تعداد هشت جفت آغازگر دیگر فاقد چندشکلی مورد نیاز برای تفکیک ارقام بودند که البته با توجه به گزارش‌های قبلی مبنی بر قرابت ژنوتیپ‌های پسته ایرانی (۱ و ۵)، عدم ایجاد چندشکلی توسط این تعداد از آغازگرها، چندان دور از انتظار نیست. چندشکلی نسبتاً پایین به دست آمده از ۱۱ جفت آغازگر باقی‌مانده نیز احتمالاً از وجود نوعی یک‌نواختی خاص در ژرم پلاسم پسته ناشی می‌شود. به هرحال چون منشاء تمامی نمونه‌های پسته ارزیابی شده در این مطالعه ایران بوده است و به دلیل عدم دسترسی، نمونه‌های پسته متفاوتی از مناطق جغرافیایی دیگر بررسی نشدند، بنابراین نمی‌توان یک ارزیابی مستدل و دقیقی از ایجاد سطوح چندشکلی توسط این جفت آغازگرها ارائه کرد.

یازده جفت آغازگر دارای چندشکلی، در مجموع ۴۸ آلل با میانگین ۳/۶۹ آلل به ازای هر جایگاه را تکثیر نمودند که با توجه به دگرگشن بودن گیاه پسته، میزان پایینی محسوب می‌شود (جدول ۱). در پژوهش‌های دیگران، متوسط آلل مربوط به درختان میوه دگرگرده افشان در حد بالاتری گزارش شده است، به‌طوری‌که میانگین آلل به ازای هر جایگاه در مرکبات ۵/۵، گلابی ۱۱، سیب ۱۲/۱ و کیوی ۲۳/۷ آلل می‌باشد (۴۰). بنابراین می‌توان استنتاج نمود که میانگین آللی در پسته در مقایسه با سایر گیاهان چوبی دگرگرده افشان و چندساله با طول دوره رویشی طولانی، پایین است. با توجه به گزارش سال ۱۹۹۶ سازمان خوار و بار جهانی (FAO) درباره منابع ژنتیکی گیاهان، که تعداد ارقام مرکبات و سیب موجود در سطح جهان را به ترتیب ۶۰۰۰ و ۱۹۷۵۰۰ عنوان نموده است (۹) و در همین زمان تنها حدود ۱۰۰ واریته با تفاوت‌های محدود برای پسته

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 17:33 IRST on Tuesday January 25th 2022

جدول ۱. جفت آغازگرهای مورد استفاده، موتیف تکراری، فراوانی آلل حداکثر، تعداد آلل مشاهده شده، هتروزیگوسیتی و شاخص اطلاعات چندشکلی در ۲۱ ژنوتیپ پسته

جفت آغازگر	موتیف تکراری	دمای اتصال مناسب (°C)	تعداد جایگاه	تعداد آلل	فراوانی آلل حداکثر	هتروزیگوسیتی	شاخص اطلاعات چندشکلی (PIC)
PK1	$(AG)_{26}$	۶۰	۱	۷	۰/۴۵۲۴	۱/۰۰۰۰	۰/۵۵۶۶
PK2	$(AG)_{6}$	۶۵	۱	۲	۰/۵۴۷۶	۰/۹۰۴۸	۰/۳۷۲۷
PK5	$(TC)_{13}$-$(AC)_{8}$	۶۰	۱	۳	۰/۵۰۰۰	۱/۰۰۰۰	۰/۵۲۲۹
PK6	$(AG)_{17}$	۶۵	۱	۴	۰/۴۷۶۲	۱/۰۰۰۰	۰/۴۴۱۵
PK9	$(AG)_{30}$	۶۰	۱	۳	۰/۵۰۰۰	۱/۰۰۰۰	۰/۵۳۹۲
PK11	$(ATG)_{13}$	۶۰	۱	۲	۰/۹۷۶۲	۰/۰۴۷۶	۰/۰۴۵۴
PK12	$(ATC)_{8}$	۶۰	۲	۳	۰/۴۷۲۲	۰/۵۵۵۶	۰/۵۰۳۸
				۳	۰/۴۵۰۰	۰/۹۰۰۰	۰/۵۴۸۳
PK13	$(TC)_{11}$	۶۵	۱	۳	۰/۵۰۰۰	۱/۰۰۰۰	۰/۴۰۸۸
PK15	$(ATG)_{4}$	۶۰	۱	۲	۰/۷۷۵۰	۰/۲۵۰۰	۰/۲۸۷۹
PK21	$(AC)_{17}$	۵۵–۶۰	۲	۶	۰/۴۷۲۲	۰/۶۱۱۱	۰/۶۸۱۳
				۵	۰/۳۴۲۱	۰/۲۶۳۲	۰/۷۱۰۲
PK27	$(TCA)_{11}$…$(TCA)_{5}$	۶۰	۱	۵	۰/۷۳۸۱	۰/۴۲۸۶	۰/۴۰۱۷
میانگین	---		---	۳/۶۹۲۳	۰/۵۵۴۰	۰/۶۸۹۳	۰/۴۶۳۱

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 17:33 IRST on Tuesday January 25th 2022

اعلام شده است (۱۲)، می‌توان احتمال داد که پایین بودن تعداد آلل در هرجایگاه، بر محدود بودن تنوع ژنتیکی در ارقام پسته اهلی دلالت دارد (۱، ۵ و ۷). یادآوری می‌شود که علی‌رغم پایین بودن میانگین تعداد آلل در هر جایگاه برای این ۱۱ جفت آغازگر در مقایسه با سایر درختان میوه، عدد حاصله بیش از میانگین آللی۲/۷ مربوط به جفت آغازگرهای SSR طراحی شده در ارقام *P. vera* (۷) و ۲/۹ در هیبریدهای بین گونه‌ای *P. atlantica* و *P. integerrima* بود (۸). با مقایسه میانگین آللی بین جفت آغازگرهای SSR طراحی شده از پسته اهلی [۲/۷] (۷) و خنجوک [۳/۶] (۳) می‌توان چنین استنباط کرد که احتمالاً جفت آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه کارایی بیشتری برای ارائه سطوح چندشکلی در پسته دارند. چون ژرم پلاسم پسته‌های ایران، از تنوع کمتری نسبت به سایر مناطق مانند سوریه برخوردار است (۷)، بنابراین میانگین بالای آللی ایجاد شده توسط جفت آغازگرهای ریزماهواره‌ای خنجوک نسبت به آغازگرهای ریزماهواره‌ای پسته اهلی، برتری کارایی آنها را برای ارزیابی ژنوتیپ‌های نزدیک‌تر پسته توجیه می‌نماید.

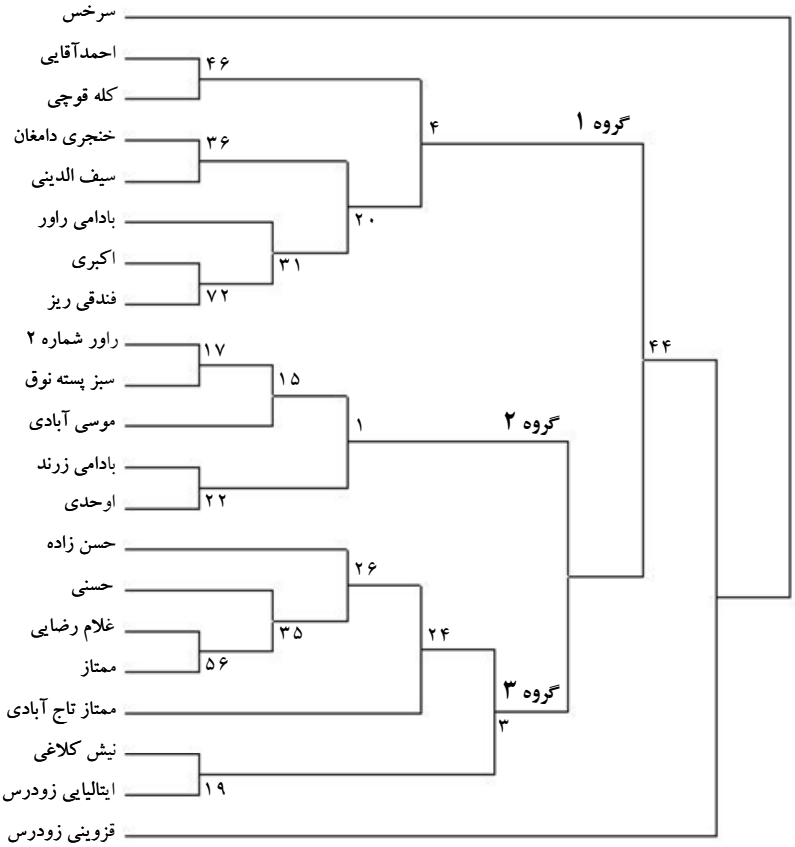
در مطالعه حاضر، ارائه سطوح چندشکلی بین ریزماهواره‌های با موتیف دوتایی و ریزماهواره‌های با موتیف سه تایی متفاوت بود. میانگین تعداد آلل برای ریزماهواره‌های دوتایی ۴/۱۲ آلل، و برای ریزماهواره‌های سه تایی ۳ آلل به ازای هر جایگاه ارزیابی شد. این تفاوت با تغییرپذیری ریزماهواره‌ها در جمعیت‌های طبیعی ارتباط دارد که در آنها ریزماهواره‌های با موتیف دونوکلئوتیدی از سرعت وقوع جهش بیشتری برخوردارند (۲۶ و ۳۵). در این بررسی بین تعداد تکرار یک ریزماهواره و تعداد آلل شناسایی شده در نمونه‌های مورد مطالعه رابطه مستقیمی مشاهده شد. به طوری‌که جفت آغازگرهای مربوط به نواحی ریزماهواره با تعداد تکرار بیشتر، آلل‌های بیشتری را تکثیر نمودند که در مطالعه قبلی مربوط به جداسازی ریزماهواره‌های پسته (۷) چنین رابطه‌ای گزارش نشده بود. این یافته‌ها با نتایج مطالعات دیگران نیز مطابقت دارد که با بررسی روی انواع موجودات ثابت نموده اند بیشتر بودن تعداد تکرار ریزماهواره‌ها باعث افزایش میزان و سرعت ایجاد جهش می‌شود و این افزایش حالت تصاعدی دارد (۳۵ و ۳۷).

در مطالعه حاضر، میانگین درصد هتروزیگوسیتی مشاهده شده ۰/۶۹ بود و دامنه تغییرات آن در محدوده ۰/۰۵ برای جایگاه PK11 تا یک برای جایگاه‌های PK1، PK5، PK6، PK9 و PK13 نوسان داشت. درصد بالای هتروزیگوسیتی، از دوپایه بودن و طبیعت دگرگشن گیاه پسته ناشی می‌شود. در همین راستا و طبق نتایج به دست آمده، علت درصد بالای هتروزیگوسیتی درکیوی و درصد پایین هتروزیگوسیتی در توت فرنگی نیز به نحوه گرده افشانی آنها نسبت داده شده است (۱۸ و۱۹).

میانگین شاخص اطلاعات چندشکلی [Polymorphic Information Content (PIC)] در این مطالعه معادل ۰/۴۶ برای هر جایگاه ارزیابی شد که تغییرات آن از ۰/۰۵ برای جایگاه PK11 تا ۰/۷۱ برای جایگاه دوم PK21 محدود بود. این در حالی است که جفت آغازگر PK1 با هفت آلل، بیشترین تعداد آلل را داشت. با توجه به نحوه محاسبه شاخص PIC، می‌توان دلیل بالاتر بودن این شاخص در جایگاه دوم PK21 را فراوانی کمتر آلل حداکثر آن (۰/۳۴) در مقایسه با جایگاه PK1 (۰/۴۵) دانست که منجر به فراوانی یک‌نواخت‌تر آلل‌ها و بالاتر بودن PIC شده است. مشابه این نتیجه در گیاهان دیگر از جمله *Humulus lupulus* نیز گزارش شده است (۲۲).

با استفاده از یازده جفت آغازگر دارای چندشکلی، ژنوتیپ‌های پسته مورد بررسی، در یک گروه بزرگ با سه زیرگروه مجزا و دو ژنوتیپ مستقل، دسته بندی شدند (شکل ۳). بر این اساس، ارقام احمد آقایی، کله قوچی، خنجری دامغان، سیف الدینی، بادامی راور، اکبری و فندقی ریز در زیرگروه اول، ارقام راور شماره ۲، سبز پسته نوق، موسی آبادی، بادامی زرند و اوحدی در زیرگروه دوم و ارقام حسن زاده، حسنی، غلام رضایی، ممتاز، ممتاز تاج آبادی، نیش کلاغی و ایتالیایی زودرس در زیر گروه سوم متعلق به گروه ارقام تجاری پسته قرار گرفتند. طی این دسته‌بندی ژنوتیپ قزوینی زودرس و نیز پسته وحشی سرخس (*P. vera*) به‌صورت دو

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 17:33 IRST on Tuesday January 25th 2022



شکل ۳. گروه‌بندی ژنوتیپ‌های پسته ایرانی بر اساس الگوهای باندی SSR، با استفاده از ضریب تشابه نی (۱۹۸۳) و روش UPGMA. ضرایب هر Internal node مربوط به آزمون Bootstrap است.

ژنوتیپ مستقل جایگاه مجزایی از گروه مربوط به ارقام تجارتی پیدا کردند.

بر اساس دندروگرام ترسیمی، تشابه ژنتیکی قابل توجهی بین ژنوتیپ‌های پسته ایرانی مشاهده شد که با توجه به وجود تفاوت‌های بارز در صفات ژنتیکی ارقام مذکور، این‌گونه به نظر می‌رسد که تفاوت ارقام مذکور تنها در خصوصیات مورد توجه کشاورزان، از جمله اندازه میوه، شکل میوه و زمان رسیدگی باشد که به واسطه انتخاب تک درخت و حفظ آن به واسطه تکثیر رویشی، نگه‌داری شده است. هم‌چنین ضرایب نسبتاً پایین به‌دست آمده از آزمون Bootstrap، این نکته را یادآوری می‌کند که شاید دندروگرام ترسیمی تفاوت‌هایی را با دندروگرام واقعی مربوط به روابط ژنتیکی ارقام پسته داشته باشد. از سوی دیگر می‌توان پیچیدگی خاص و قابل توجه روابط ژنتیکی بین ارقام تجاری پسته ایرانی را ناشی از دگرگشن بودن پسته و عدم وجود یک سیستم دقیق شناسایی، نام‌گذاری و معرفی ارقام دانست که در حصول ضرایب نسبتاً پایین آزمون Bootstrap دخیل است.

مقایسه دسته‌بندی مفروض با نشانگرهای SSR با گروه بندی به‌دست آمده از مطالعه RAPD روی ارقام مشابه (۵)، نشان از هم‌بستگی مطلوب نتایج حاصل از دو نشانگر داشت که این امر بیانگر آن است که دسته بندی‌های صورت گرفته چندان دور از واقعیت نیستند. اگرچه نشانگر RAPD نتوانسته بود ارقام غلامرضایی و ممتاز را از یکدیگر تفکیک کند، ولی نشانگرهای SSR استفاده شده در این مطالعه، ضمن تأیید تشابه قابل توجه این ژنوتیپ‌ها، توانستند این دو رقم را از یکدیگر تمییز دهند. چنین امری می‌تواند دلیلی بر کارایی بهتر نشانگرهای SSR به منظور انگشت‌نگاری ارقام و ژنوتیپ‌های پسته باشد.

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 17:33 IRST on Tuesday January 25th 2022

بر اساس دندوگرام ترسیمی، ژنوتیپ وحشی سرخس به صورت یک ژنوتیپ مجزا از بقیه ارقام پسته قرار گرفت. چنین نتیجه‌ای در تعیین روابط ژنتیکی ارقام پسته ایرانی با استفاده از نشانگر RAPD به دست آمده بود و بر اساس آن سرخس از سایر ارقام *P. vera* جدا شده و در مجاورت خنجوک قرار گرفته بود (۲۸). با توجه به قرار گرفتن ژنوتیپ وحشی سرخس در جایگاه Root دندوگرام این‌گونه به نظر می‌رسد که این ژنوتیپ در پیدایش و تکامل پسته‌های اهلی و تجاری *P. vera* نقش داشته است. پیش از این نیز در مطالعه میرزایی و همکاران (۵) و اعلمی (۲) از ژنوتیپ وحشی سرخس به عنوان والد احتمالی ارقام اهلی پسته نام برده شده بود که نتایج به‌دست آمده در این مطالعه، فرضیه مزبور را تأیید می‌کند. در بین ارقام اهلی نیز ژنوتیپ قزوینی زودرس از کمترین فاصله ژنتیکی با سرخس برخوردار بود. قابل ذکر است که این رقم از لحاظ مورفولوژیکی نیز از شباهت قابل توجهی با ژنوتیپ وحشی سرخس برخوردار است و چنین استنباط می‌شود که ژنوتیپ پسته وحشی سرخس از مسیر ژنوتیپ قزوینی زودرس به سایر ارقام اهلی تکامل یافته است. بر اساس اطلاعات به‌دست آمده و با توجه به تنوع جالب توجه صفات ظاهری مشاهده شده در بین درختان خودروی سرخس در جنگل‌های مناطق شمال شرق ایران، مطالعه همه جانبه این ژنوتیپ برای درک هر چه بهتر تاریخچه پیدایش ارقام تجاری پسته و ردیابی ژن‌های مفید، ضروری و الزام‌آور است.

به طور کلی، نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر نشان می‌دهد که جفت آغازگرهای SSR استفاده شده در این تحقیق، علاوه بر انتقال‌پذیری مناسب بر روی ارقام تجاری پسته، از کارایی مطلوبی در متمایز نمودن آنها از یکدیگر برخوردارند و با توجه به الگوی تکثیر منحصر به فردشان، می‌توانند به نحو مطلوبی در مطالعات مختلف مولکولی گیاه پسته از جمله انتخاب صحیح والدین و ارزیابی سریع‌تر نتاج در برنامه‌های اصلاحی، شناسایی نهال‌ها برای ایجاد باغ‌های یک‌نواخت، تعیین خلوص میوه‌های پسته صادراتی، انگشت‌نگاری ژنوتیپ‌ها و احتمالاً تهیه نقشهٔ ژنتیکی پسته برای پیدا نمودن ژن‌های مفید مورد استفاده قرار گیرند (۹، ۱۲، ۳۸ و ۴۱).

سپاسگزاری

نگارندگان از سازمان تحقیقات وزارت جهاد کشاورزی و مؤسسه تحقیقات پسته کشور برای تأمین هزینه‌های اجرایی این طرح قدردانی می‌نمایند.

منابع مورد استفاده

۱. احمدی افزادی، م. ۱۳۸۴. استفاده از نشانگر AFLP برای بررسی تنوع ژنتیکی بین بعضی از ارقام و گونه‌های پسته. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان.

۲. اعلمی، ع. ۱۳۷۵. کاربرد آیزوزایم‌ها به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ارقام پسته ایرانی، پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.

۳. عرب نژاد، ح. ۱۳۸۵. شناسایی و جداسازی ریزماهواره‌های پسته خنجوک. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان.

۴. گلعین، ب. ۱۳۸۴. شناسایی و جداسازی ریزماهواره‌های مرکبات به منظور تشخیص هیبریدها و ارزیابی پرتقال و نارنگی ایران. پایان نامه دکتری، دانشکده پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران.

۵. میرزایی، س.، م. بهار و ب. شریف نبی. ۱۳۸۲. تنوع ژنتیکی ارقام پسته ایرانی بر اساس نشانگرهای RAPD، مجموعه مقالات سومین همایش بیوتکنولوژی (جلد دوم)، مشهد، ص ۹۲-۹۰.

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 17:33 IRST on Tuesday January 25th 2022

6. Agar, I. T., N. Kaska and S. Kafkas. 1995. Effect of different ecologies on the fat content and fatty acid composition of different *Pictacia vera* varieties grown in different parts of Turkey. Acta. Hort. 419: 411-416.
7. Ahmad, R., L. Ferguson and S. M. Southwick. 2003. Identification of pistachio (*Pistacia vera* L.) nuts with microsatellite markers. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 128(6): 898-903.
8. Ahmad, R., L. Ferguson and S. M. Southwick. 2005. Molecular marker analyses of pistachio rootstocks by Simple Sequence Repeats and Sequence-Related Amplified Polymorphism. J. Hort. Sci. Biotech. 80(3): 382-386.
9. Caruso, T., C. Iannini, F. Monastra, G. Zakynthinos, D. Rouskas, E. Barone, F. P. Marra, F. Sottile, I. Batlle, F. Vargas, M. Romero, S. Padulosi, C. I. Greco, M. R. Cabina, G. Martelli, B. E. Ak and M. Laghezali. 1998. Genetic and phenotypic diversity in pistachio (*Pistacia vera* L.) germplasm collected in Mediterranean countries. Acta. Hort. 470: 168-178.
10. Chambers, G. K. and E. S. Mac Avoy. 2000. Microsatellites: consensus and controversy. Comp. Biochem. Physiol. 126: 455-476.
11. De Vienne, D. 2003. Molecular Markers in Plants Genetics and Biotechnology. Science Pub. Inc., Enfield.
12. Dollo, L., J. I. Hormaza and V. S. Polito. 1995. RAPD polymorphisms among pistachio (*Pistacia vera* L.) cultivars. Fruit Varieties J. 49(3): 147-152.
13. Dyszel, S. M. and B. C. Pettit. 1990. Determination of the country of origin of pistachio nuts by DSC and HPLC. JAOCS. 67: 947-951.
14. Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791.
15. Food and Agricultural Organization. 2004. Agricultural Production Indices. http://faostat.fao.org/faostat/collections?version=ext&hasbulk=0&subject=agriculture
16. Giraldo, E., M. A. Viruel., M. Lopez-Corrales and J. I. Hormaza. 2005. Characterization and cross-species transferability of microsatellites in the common fig (*Ficus carica* L.). J. Horti. Sci. Biotech. 80(2): 217-224.
17. Golan-Goldhirsh, A., O. Barazani, Z. S. Wang, D. K. Khadka, J. A. Saunders, V. Kostiukovsky and L. J. Rowland. 2004. Genetic relationships among Mediterranean *Pistacia* species evaluated by RAPD and AFLP markers. Plant. Sys. Evol. 246: 9-18.
18. Guarino, C., S. Santoro, L. De Simone, O. Lain., G. Cipriani and R. Testolin. 2006. Genetic diversity in a collection of ancient cultivars of apple (*Malus* × *domestica* Borkh.) as revealed by SSR-based fingerprinting. J. Hort. Sci. Biotech. 81(1): 39-44.
19. Hadonou, A. M., D. J. Sargent, F. Wilson, C. M. James and D. W. Simpson. 2004. Development of microsatellite markers in *Fragaria*, their use in genetic diversity analysis, and their potential for genetic linkage mapping. Genome 47: 429-438.
20. Hormaza, J. I., K. Pinney and V. S. Polito. 1998. Genetic diversity of pistachio (*Pistacia vera*, Anacardiaceae) germplasm based on Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers. Econ. Bot. 52(1): 78-87.
21. Hormaza, J. I., L. Dollo and V. S. Polito. 1994. Determination of relatedness and geographical movement of *Pistacia vera* (pistachio; Anacardiaceae) germplasm by RAPD analysis. Econ. Bot. 48(4): 349-358.
22. Jakse, J., Z. Satovic and B. Javornik. 2004. Microsatellite variability among wild and cultivated hops (*Humulus lupulus* L.). Genome 47: 889-899.
23. Kafkas, S. and R. Perl-Treves. 2001. Morphological and molecular phylogeny of *Pistacia* species in turkey. Theor. Appl. Genet. 102: 908-915.
24. Kafkas, S., S. Cetiner and R. Perl-Trevis. 2001. Development of sex-associated RAPD markers in wild *Pistacia* species. J. Hort. Sci. Biotech. 76(2): 242-246.
25. Katsiotis, A., M. Hagidimitriou, A. Drossou, C. Pontikis and M. Loukas. 2003. Genetic relationships among species and cultivars of *Pistacia* using RAPDs and AFLPs. Euphytica 132: 279-286.
26. Katti, M. V., P. K. Ranjekar and V. S. Gupta. 2001. Differential distribution of Simple Sequence Repeats in eukaryotic genome sequences. Mol. Biol. Evol. 18: 1161-1167.
27. Liu, Z. J. and J. F. Cordes. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. Aquaculture 238: 1-37.
28. Mirzaei, S., M. Bahar and B. Sharifnabi. 2006. A phylogenetic study of Iranian wild pistachio species and some cultivars using RAPD markers. Acta Hort. 726: 39-43.
29. Nei, M. and N. Takezaki. 1994. Estimation of genetic distances and Phylogenetic trees from DNA analysis. 5th World Cong. Genet. Appl. Livstock Prod. 21: 405-412.
30. Nybom, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. Mol. Ecol. 13: 1143-1155.
31. Parfitt, D. E. and M. L. Badenes. 1997. Phylogeny of the genus *Pistacia* as determined from analysis of the chloroplast genome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 7987-7992.
32. Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey and A. Rafalski. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Mol. Breed. 2: 225-238.

33. Rakoczi-Trojanowska, M. and H. Bolipok. 2004. Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their applications in plants. Cell. Mol. Biol. Lett. 9: 221-238.
34. Russell, J. R., J. D. Fuller, M. Macaulay, B. G. Hatz, A. Jahoor, W. Powell and R. Waugh. 1997. Direct comparison of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs, and RAPDs. Theor. Appl. Genet. 95: 714-722.
35. Schlotterer, C. 1998. Genome evolution: are microsatellites really simple sequence?. Curr. Biol. 8(4): R132-R134.
36. sheibani, A. 1996. Distribution, use and conservation of pistachio in Iran. PP: 51-56. *In*: S. Padulosi, T. Caruso, E. Barone (Eds.), Taxonomy, distribution, conservation and uses of Pistacia genetic resources. IPGRI, Palermo, Italy.
37. Wierdl, M., M. Dominska and T. D. Petes. 1997. Microsatellite instability in yeast: depending on the length of the microsatellite. Genetics 146: 769-779.
38. Wunsch, A. and J. I. Hormaza. 2002. Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. Euphytica 125: 59-67.
39. Zane, L., L. Bargelloni and T. Patarnello. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. Mol. Ecol. 11: 1-16.
40. Zhen, Y., Z. Li and H. huang. 2004. Molecular characterization of Kiwifruit (*Actinidia*) cultivars and selections using SSR markers. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 129(3): 374-382.
41. Zohary, D. 1995. The genus *Pistacia* L. PP: 1-11. *In*: S. Padulosi, T. Caruso, E. Barone (Eds.), Taxonomy, Distribution, Conservation and Uses of *Pistacia* Genetic Resources. IPGRI, Italy.

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 17:33 IRST on Tuesday January 25th 2022