Archive of SID

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

ارزیابی تنوع ژنتیکی۲۵ ژنوتیپ پسته ایرانی با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR

رامین ارجمند قهستانی[۱]، ایرج توسلیان*[۲]، قاسم محمدی نژاد[۲]

[۱]دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.
[۲]پژوهشکده باغبانی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۱۱/۱۹، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۲۵

چکیده

در مطالعه حاضر، به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۲۵ ژنوتیپ ماده پسته از ۱۷ نشانگر ISSR استفاده گردید. با استفاده از نشانگرهای ISSR، در مجموع۱٤۸ قطعه DNA تکثیر شد که از بین آن‌ها تعداد ۱۲۳ قطعه (۸۳درصد) چند شکل بودند که متوسط چندشکلی ایجاد شده برای هر آغازگر، ۷/۲۳ باند بود. گروه-بندی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با استفاده از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA و بر اساس ماتریس تشابه جاکارد آنها را در ۷ گروه مجزا قرار داد. مطابق با نتایج حاصل از ماتریس تشابه بیشترین شباهت بین ژنوتیپ‌های خنجری دامغان و فندقی٤۸ (٦۳٪) و کمترین شباهت بین ژنوتیپ‌های ابراهیمی و شستی (۲٪) مشاهده شد که نشان دهنده سطح بالای چندشکلی در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه است. نتایج این تحقیق نشان داد که نشانگر ISSR برای شناسایی ژنوتیپ‌های ماده پسته و تهیه‌ی شناسنامه مولکولی کامل برای توده‌های پسته ایرانی مناسب است.

کلید واژه: *پسته، تنوع ژنتیکی، ضریب تشابه جاکارد، تجزیه خوشه‌ای، ISSR.*

*نویسنده مسئول: ایرج توسلیان تلفن: ۰۳٤۳۱۳۲۲٦۳۳ Email: itavasoli@uk.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

پسته به عنوان یکی از مهمترین محصولات باغی و سومین کالای صادراتی کشور به لحاظ ارزآوری، از اهمیت ویژه ای برخوردار است. گسترش روزافزون کشت پسته در دیگر مناطق جهان و میانگین تولید بالاتر در واحد سطح در مقایسه با ایران، تهدید جدی برای صادرات این محصول در کشور می باشد. از طرف دیگر برای احداث باغ های یکدست و با عملکرد و کیفیت بالای هر محصول از طریق بهنژادی، در مرحله اول نیازمند بررسی صفات مهم مورفولوژیکی وشناسایی ژنوتیپ‌های برتر هستیم (Al-saghir and Porter, 2006). جنس پسته متعلق به خانواده پسته‌سانان[1] و راسته Sapindales است (Zohary, 1952). پسته به عنوان گیاهی که نقش مهمی در تغذیه و اقتصاد کشورهایی مانند ایران، ترکیه و سوریه دارد دارای تنوع ژنتیکی بالایی می‌باشد (Ozden-Tokatli *et al*., 2010). این جنس دارای بیش از ۱۳ گونه است که به صورت درخت یا درختچه‌های خزان پذیر یا همیشه‌سبز و دوپایه می‌باشند. گل آذین در گونه‌های این جنس به‌صورت خوشه یا پانیکول و میوه از نوع شفت می‌باشد. در بین گونه‌های پسته فقط گونه ورا[2] دارای خشک‌میوه‌ی خندان است و ارزش تجاری دارد (Zohary, 1952). سایر گونه‌ها و زیرگونه‌ها خشک میوه‌های کوچکتری تولید می‌کنند و به‌طور عمده به عنوان پایه و یا استخراج روغن، جنگل‌کاری و تولید الوار استفاده می‌شوند (Barghchi & Alderson, 1989). همه گونه‌های جنس پسته دوپایه هستند و با باد گرده افشانی می‌شوند. مجموعه‌ای از درختان آتلانتیکا (*P. atlantica*) در کوه‌های یانت[3] ترکیه یافت شده است که به صورت یک‌پایه بوده است (Kafkas *et al*.,2000).اعتقاد بر این است که قدیمی‌ترین گونه موجود در جنس پسته، گونه ورا می‌باشد و احتمالاً دیگر گونه‌ها از آن مشتق شده‌اند (Zohary, 1952). تا کنون جامع‌ترین رده‌بندی جنس پسته توسط زهری گزارش شده است که جنس پسته را به ٤ بخش و ۱۱ گونه بر اساس خصوصیات برگ و مورفولوژی میوه تقسیم کرده است (Zohary, 1952). اولین طبقه بندی گونه‌های پسته در سطح مولکولی با استفاده ازDNA کلروپلاستی انجام شد و گزارش شد که جنس پسته در دو بخش تربینتوس (*Terebinthus*) و لنتیسکوس (*Lentiscus*) به ترتیب خزان‌پذیر و همیشه‌سبز تقسیم می‌شود (Parfitt & Badenes, 1997). ایران منشا سه گونه ورا، خنجوک و موتیکا (*P. vera, P. mutica, P. khinjuk*) از جنس پسته می‌باشد.

به این منظور طی دهه‌های گذشته عمده ژنوتیپ‌های پسته کشورهای ایران، آمریکا، ایتالیا، سوریه و ... شناسایی و از لحاظ مورفولوژیکی و مولکولی مورد بررسی قرار گرفته‌اند. در مطالعات اولیه مربوط به تنوع ژنتیکی پسته، نشانگرهای مورفولوژیکی مانند شکل میوه و برگ مورد

[1]- Anacardiaceae

[2]-*P.vera* L.

[3]- Yunt

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده محققین قرار گرفتند (Zohary, 1952). در مراحل بعدی مطالعات آیزوزایمی متعددی با هدف تمایز بین گونه‌ها و ارقام پسته انجام شد (Dyszel & Petitt, 1990) که در تمامی موارد، ناکافی بودن چندشکلی آیزوزایم‌ها در بین ارقام نزدیک به هم، قابلیت آن‌ها را در تشخیص 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 (Golan-Goldhirsh *et al.*, 2004). تحقیقات مختلفی با روش‌های متفاوتی چون RAPD و AFLP (Katsiotis *et al.*, 2003; Golan-Goldhrish *et al.*, 2004)، روش SSRs (Vandramin *et al.*, 2009) و ایزوآنزیم-ها (Baron *et al.*, 1996) به منظور بررسی تفاوت‌های ژنتیکی بین گونه‌های مختلف پسته انجام شده است. تنوع ژنتیکی ۳۰ ژنوتیپ پسته شامل ۲٤ رقم پسته ورا، واریته سرخس، گونه‌های خنجوک، بنه، بنه باغی، اینتگریما و پالستینا را با سه سیستم ایزوزایمی (استراز، پراکسیداز و مالات دهیدروژناز) مورد بررسی قرار گرفت (Alami *et al.*, 2003). براساس پژوهش آنها تجزیه کلاستر ژنوتیپ‌ها را به هشت گروه اصلی و ۲۰ گروه فرعی تقسیم نمود به طوری‌که پنج گروه اول، به ارقام پسته اختصاص یافت و سه گروه پایانی گونه‌ها را شامل شد. نتایج حاصل از مطالعه ایشان نشان داد که خنجوک بیشترین قرابت را با ارقام رایج پسته دارد. بررسی روابط درون گونه‌ای تعدادی از گونه‌های جنس پسته با استفاده از نشانگر RAPD نشان داد که گونه‌های مورد بررسی تشکیل دو گروه مجزا می‌دهد که گروه اول شامل گونه‌های ورا، آتلانتیکا، خنجوک، یوریکارپا و انتیگریما[1] و گروه دوم شامل گونه‌های تربینتوس، مکزیکانا[2]، پالستینا[3] و لنتیسکوس[4] می‌باشد (Kafkas & Perl-Treves, 2002). در پژوهش ایشان، ۲۰ آغازگر مورد استفاده توانست ۲۲۸ باند چندشکل در سطح درون گونه‌ای ایجاد نماید.

از نشانگرهای RAPD و AFLP برای مطالعه روابط ژنتیکی گونه‌های پسته موجود در یونان استفاده شد و بر اساس داده‌های مولکولی بدست آمده، گونه‌های مورد بررسی به دو دسته همیشه سبز و خزان پذیر تفکیک شدند (Katsiotis *et al.*, 2003).

الصغیر و پرتر مطالعه فیلوژنی ٤ گونه پسته (خنجوک، لنتیسکوس، تربینتوس و ورا) بوسیله نشانگر RAPD راگزارش کردند. در این گزارش۲۳ آغازگر مورد استفاده، ۲٤۸ باند تولید کرد که ۱۳۹ عدد آن در سطح درون گونه‌ای چند شکلی نشان داد. تجزیه کلاستر داده‌ها نشان داد که خنجوک نزدیک‌ترین‌گونه به ورا می‌باشد (Al-Saghir, & Porter, 2006).

کفکاس روابط فیلوژنی بین گونه‌های پسته موجود در ترکیه را بوسیله نشانگر AFLP بررسی نمود و گزارش کرد که ژنوتیپ‌های خنجوک در ترکیه رابطه ژنتیکی نزدیک‌تری به گونه‌های

[1]-*P. integerrima*
[2]-*P. mexicana*
[3]-*P. palaestina*
[4]-*P. lentiscus*

www.SID.ir

Archive of SID

یوریکارپا و آتلانتیکا دارد که دلیل آن به خاطر تعیین هویت اشتباه نمونه‌های خنجوک می‌باشد (Kafkas, 2006).

میرزایی و همکاران با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD روابط فیلوژنی گونه‌های وحشی و برخی ارقام پسته موجود در ایران را بررسی نمودند. از مجموع ۷۷ آغازگر مورد استفاده در پژوهش ایشان، ۱۵ آغازگر تولید الگوهای چند شکل نمودند که مجموعاً ۵۷ قطعه چند شکل تولید شد (Mirzaei *et al*., 2002). تجزیه کلاستر بر اساس ضریب تشابه جاکارد و به روش UPGMA[1] ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را در سه گروه گونه ورا، فرم وحشی ورا و گونه وحشی بنه قرار داد. نتایج حاصل نشان داد، ارقام پسته مورد بررسی سطح تشابه بالایی دارند و واریته سرخس بیشترین رابطه ژنتیکی را با ارقام اهلی پسته دارد، در حالی‌که خنجوک و بنه کم‌ترین رابطه را نشان می‌دهند. آنها گزارش دادند که تفاوت‌های موجود در ارقام رایج باغی به علت موتاسیون در اندام‌های رویشی و زایشی و همچنین به علت تکثیر رویشی می‌باشد.

بررسی تنوع ژنتیکی ارقام و گونه‌های وحشی پسته موجود در ایران به همراه ۲۲ رقم خارجی با استفاده از نشانگر SSR انجام شد. نتایج حاصل از مطالعه نشان داد که تنوع ژنتیکی در زیر گونه کردیکا[2] پایین‌تر از گونه ورا و خنجوک است. تجزیه به مولفه های اصلی[3] به‌طور واضحی ارقام و گونه‌های ایرانی را از غیر ایرانی تفکیک نمود و نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که، جریان ژنی بین ارقام ایرانی و جمعیت‌های وحشی پسته ورا وجود دارد (*et* Pazouki *al*., 2010).

بررسی تعیین جنسیت چهار رقم پسته ماده (اکبری، احمدآقایی، فندقی، کله قوچی) و یک ژنوتیپ پسته نر با استفاده از نه آغازگر ISSR (تکثیر بین ردیف‌های تکراری ساده) نشان داد که دو آغازگر (AC)8CG و (AC)8TA قادر به تعیین هویت گیاهان ماده و نر بوسیله تولید باندهای DNA وابسته به جنسیت در گیاهان ماده شدند و گزارش شد که نشانگر ISSR جهت تعیین جنسیت گیاهان پسته در مرحله نونهالی مناسب است (Ehsanpour *et al*., 2008). با توجه به موارد فوق و این که استفاده از نشانگرهای ISSR نیازی به اطلاعات توالی ژنوم ندارد و منجر به ایجاد الگوهای چندجایگاهی و بسیار چندشکل می‌شود (Askari *et al*., 2011; Ghasemi *et al*., 2010; Zamani *et al*., 2011; Zamani *et al*., 2015) هدف از اجرای این پژوهش ارزیابی تنوع ژنتیکی و شناسایی چند شکلی ژنتیکی بین ارقام پسته با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR می‌باشد.

[1]- Unnerighted Paired Group Method Using Aritmatic Average
[2]- *P. atlantica* subsp. *Kurdica*
[3]-Principle coordinate analysis

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش ها

در این مطالعه نمونه برگ ۲۵ ژنوتیپ ماده پسته گونه ورا، از ایستگاه شماره دو مؤسسه تحقیقات پسته کشور واقع در رفسنجان جمع‌آوری گردید و بر روی یخ به آزمایشگاه اصلاح نباتات دانشگاه شهید باهنر کرمان انتقال داده شد. از هر ژنوتیپ، برگ‌های جوان و سالم به طور مجزا در پاکت‌های نایلونی زیپ‌دار قرار داده شد، سپس نام آن بر روی پاکت درج گردید و بلافاصله نمونه‌ها به فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد (جدول ۱).

DNA ژنومی از بافت برگ تازه، به روش CTAB[1] مطابق مقاله دویل و دویل با کمی تغییرات استخراج گردید (Doyle & Doyle, 1987). ترکیب بافر استخراج شامل Tris-HCl، NaCl، EDTA، CTAB، $Na_2S_2O_5$، PVP، β-mercaptoethanol طبق جدول ۲ تهیه شده و در ادامه کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از روش های اسپکتوفتومتری و الکتروفورز با ژل آگارز ۰/۸٪ تعیین گردید.

واکنش تکثیر قطعات DNA با استفاده از ۱۷ آغازگر ISSR به طول ۱۸ تا ۲٤ نوکلئوتیدی (جدول۳) انجام گرفت. هر واکنش در حجم ۱۵ میکرولیتر و با استفاده ازمواد جدول ٤ صورت گرفت.

پس از اتمام واکنش PCR به هر میکروتیوب، ۵ میکرولیتر بافر بارگذاری اضافه شد و مقدار ۱۰ میکرولیتر از مخلوط حاصله به عنوان پیش بار استفاده شد. جهت پیش لود کردن، از غلظت ۰/۸ درصد آگارز و جهت بارگذاری نهایی، از غلظت ۱/۵ درصد آگارز و ولتاژ ثابت ۱۰۰ ولت به مدت ۳ ساعت استفاده شد. ژل ۱/۵ درصد آگارز، در داخل قالب ریخته و پس از سرد شدن کامل ژل، شانه را با دقت از ژل جدا نموده و DNA مربوط به همراه بافر لودگذاری در چاهک‌ها لود شد و محصولات تکثیر توسط دستگاه الکتروفورز تفکیک شد. سپس ژل‌ها در محلول اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد. پس از شستشو ژل با آب مقطر به دستگاه ژل داک جهت مشاهده باندهای تکثیر شده زیر نور فرابنفش منتقل شد و از ژل‌ها عکس برداری شد.

پس از انجام آزمایشات ISSR، الگوهای باندی، بر اساس حضور و عدم حضور باند، به صورت یک و صفر امتیازدهی شدند. بعد از تشکیل ماتریس صفر و یک ، ماتریس تشابه ژنوتیپ‌ها با استفاده از ضریب تشابه جاکارد (Jaccard, 1908) و دندروگرام براساس ماتریس تشابه و به روش UPGMA بدست آمد. تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارNTSYS Ver 2.02. انجام گرفت. به منظور انجام تجزیه به مختصات اصلی بر اساس نشانگرهای ISSR که هدف از این تجزیه (PCoA)[2]، یافتن ترکیباتی از P متغیر جهت ایجاد شاخص‌های مستقل به نام مؤلفه‌های اصلی (PC) می‌باشد. نیز از نرم افزار NTSYS Ver 2.02 استفاده گردید.

[1]- cetyltrimethylammonium bromide

[2] principle coordinate analysis

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- لیست ژنوتیپ های ماده پسته مورد مطالعه با نشانگرهای ISSR.

Table 1- List of the female genotypes were tested in this study by ISSR markers.

شماره Number	نام رقم Cultivar	شماره Number	نام رقم Cultivar	شماره Number	نام رقم Cultivar
1	هراتی (Harati)	10	سیریزی (Cirizi)	19	ایتالیایی (Italian)
2	خنجری دامغان (Khanjari Damghan)	11	سبزپسته نوق (Sabzpesteh Nogh)	20	بادامی راور (Badami Ravar)
3	ممتاز (Momtaz)	12	ابراهیم آبادی (Ebrahim Abadi)	21	شستی (Shasti)
4	ابراهیمی (Ebrahimi)	13	ممتاز تاج آبادی (Momtaz Taj Abadi)	22	فندقی زودرس (Fandoghi Zodras)
5	فندقی٤٨ (Fandoghi48)	14	جندقی (Jandaghi)	23	فندقی ریز (Fandoghi Riz)
6	شاهپسند (Shah Pasand)	15	خنجری راور (Khanjari Ravar)	24	سفیدپسته نوق (Sefidpesteh Nogh)
7	بادامی زرند (Badami Zarand)	16	قزوینی (Ghazvini)	25	امیری (Amiri)
8	موسی آبادی (Mosa Abadi)	17	اوحدی (Ohadi)		
9	حسن زاده (Hassan Zadeh)	18	بادامی نیش کلاغی (Badami Nishklaghi)		

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- آغازگرهای ISSR مورد استفاده در این تحقیق.

Table 2- ISSR Primers used in the present study.

No	Oligo Name	Oligo Sequence	Tm ºC	Length (Mer)
1	**(GA)8-RC**	GAGAGAGAGAGAGAGARC	551	18 Mer
2	**(AG)8YT**	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	54	18 Mer
3	**(AC)8YG**	ACACACACACACACACYG	54	18 Mer
4	**(TG)8RT**	TGTGTGTGTGTGTGTGRT	51	18 Mer
5	**(CA)8RT**	CACACACACACACACART	51	18 Mer
6	**(CT)8RG**	CTCTCTCTCTCTCTCTRG	54	18 Mer
7	**BDB(TCC)7**	BDBTCCTCCTCCTCCTCCTCC	65	24 Mer
8	**CCA(CT)8**	CCACTCTCTCTCTCTCTCT	56	19 Mer
9	**(AG)8SC**	AGAGAGAGAGAGAGAGSC	56	18 Mer
10	**(GACA)5**	GACAGACAGACAGACAGACA	55	20 Mer
11	**(GAA)6**	GAAGAAGAAGAAGAAGAA	47	18 Mer
12	**(CA)8-GT**	CACACACACACACACAGT	54	18 Mer
13	**(GT)8-YC**	GTGTGTGTGTGTGTGTYC	55	18Mer
14	**(TG)8G**	TGTGTGTGTGTGTGTGG	52	17Mer
15	**(AC)8YT**	ACACACACACACACACYG	55	18 Mer
16	**(AG)8T**	AGAGAGAGAGAGAGAGT	50	17 Mer
17	**(CA)8RT**	CACACACACACACACART	52	18 Mer

جدول ۳- مواد لازم و مقادیر مربوطه برای تهیه محلول واکنش ISSR-PCR.

Table 3- Reagents and their concentrations for ISSR-PCR reactions.

مواد Materials	غلظت پایه Basic level	غلظت نهایی Final level	یک واکنش One reaction	24واکنش×1/1* 24 reactions
آب دوبار تقطیر استریل (Double Distillated water)	–	–	8.4µl	221.76 µl
بافر PCR (PCR buffer)	10 x	1x	1.5 µl	39.6 µl
$MgCl_2$	50 mM	1.75mM	0.6 µl	15.84 µl
dNTPs	10 mM	10 mM	0.3 µl	7.92 µl
آغازگر Primers	10µM	0.2 µM	2 µl	52.8 µl
الگو DNA (Template DNA)	30 ng/µl	30 ng/µl۰	2 µl	–
آنزیم Taq (Taq DNA Polymerase)	5 Unit/µl	1 Unit/µl	0.2 µl	5.28 µl
جمع کل (Total volume)			15 µl	

* ضریب خطای نمونه برداری **(Sampling error coefficient)**

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ٤- برنامه زمانی و دمای مورد نیاز برای انجام مراحل واکنش ISSR- PCR.

Table 4- PCR protocol for the amplification of ISSR-PCR.

مرحله Step	مرحله انجام شده Phase	تعدادسیکل Number of cycle	دما Temperature	زمان Time (minute)
1	شروع باز شدن DNA کروموزومی (Initial Denaturation)	1	94 ºC	4
2	تک رشته‌ای شدن DNA (Denaturation)	40 (40 سیکل cycles)	94 ºC	2
	اتصال آغازگر (Annealing)		متفاوت است (Variable)	1
	بسط آغازگر (Extension)		72 ºC	2
3	تکمیل بسط (final extension)	1	72 ºC	7
			4 ºC	1

نتایج و بحث

برای بررسی چندشکلی DNA بین ژنوتیپ‌های پسته مورد آزمایش از ۱۷ آغازگر ISSR استفاده گردید. اندازه قطعات در تمام آغازگرها بین ٢٤- ۱۸ نوکلئوتید بود و فقط باندهای با وضوح بالا مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. ۱۷ آغازگر مذکور، مجموعاً ۱٤۸ قطعه DNA را تکثیر کردند که از بین آن‌ها تعداد ۱۲۳ قطعه چند شکل و ۲۵ قطعه یک شکل بودند. متوسط باند تولید شده برای هر آغازگر، ۸/۷۰ باند و متوسط چندشکلی ایجاد شده برای هر آغازگر، ۷/۲۳ باند بود (جدول ٦). در پژوهشی مطالعه تنوع ژنتیکی برخی از ژنوتیپ های پسته با استفاده از آغازگرهای ISSR گزارش گردید که از ۱۱٤ باند تولید شده، ۷۳ باند (٦٤درصد) چندشکلی نشان دادند (Taghizadeh et al, 2010). دلیل چندشکلی کمتر ایجاد شده در پژوهش آن‌ها احتمالا، تعداد ژنوتیپ‌های کمتر (۱۹) و همچنین متفاوت بودن آغازگرهای به‌کار رفته می‌باشد. تعداد باند تکثیر شده با آغازگرهای مختلف، متفاوت بود، به‌طوری‌که بیشترین تعداد باندهای تولید شده متعلق به آغازگر (AC)8YG ۱۵ باند و کمترین باند متعلق به آغازگر (TG)8G چهار باند بود. بیشترین درصد چندشکلی مربوط به آغازگرهای (CT)8RC، (AG)8YT، (AC)8YG، BDB(TCC)7، (GACA)5، (CA)8-GT، (AC)8YT، (۱۰۰٪) و کمترین درصد چندشکلی مربوط به آغازگر (AG)8T (۲۰٪) بود (جدول۵).

الگوهای باندی نشانگرهای چندشکل ISSR بر اساس وجود یا عدم وجود باند به‌صورت اعداد یک و صفر، برای بدست آوردن ماتریس تشابه

www.SID.ir

Archive of SID

ژنوتیپ‌ها بر اساس ضریب تشابه جاکارد استفاده شد. ضریب تشابه جاکارد، بیشترین استفاده را برای بررسی میزان تنوع ژنتیکی بدست آمده از نشانگرهای غالب است، زیرا شباهت‌ها را براساس وجود و یا عدم وجود باند گروه‌بندی می‌کند (Naghavi et al, 2009). ماتریس تشابه میزان تشابه دو به دوی بین ژنوتیپ‌ها را نشان می‌دهد. بنابراین هر چه دو ژنوتیپ از نظر نشانگرهای مختلف الگوی شبیه‌تری با هم داشته باشند، تشابه ژنتیکی آنها بیشتر خواهد بود و بالعکس.

جدول ۵- لیست آغازگرهای مورد استفاده و درصد چندشکلی حاصل از آن‌ها.

Table 5- List of the ISSR Primers used and their polymorphism percentage.

ردیف Number	آغازگر Primers name	تعداد کل قطعات تکثیر شده (a) Number of amplified fragments (a)	تعداد قطعات چندشکل (b) Number of polymorphic fragments (b)	درصد چندشکلی (b/a) Percentage of polymorphism
1	(GA)8-RC	4	4	100
2	(CT)8RC	8	8	100
3	(AG)8YT	8	8	100
4	(AC)8YG	5	5	100
5	(TG)8RT	7	1	100
6	(CA)8RT	8	7	87.5
7	BDB(TCC)7	8	8	100
8	CCA(CT)8	8	7	87.5
9	(AG)8SC	7	6	85.71
10	(GACA)5	6	6	100
11	(GAA)6	4	3	75
12	(CA)8-GT	7	7	100
13	(GT)8-YC	3	3	100
14	(TG)8G	4	3	75
15	(AC)8YT	7	7	100
16	(AG)8T	5	4	80
17	(CA)8RT	6	5	83.3
کل (Total)	–	115	107	–
میانگین (Means)	–	5	4.65	93.20

www.SID.ir

Archive of SID

براساس نتایج حاصل از ماتریس تشابه، بیشترین شباهت (٦٣٪) بین ژنوتیپ‌های خنجری دامغان و فندقی٤٨ و کمترین شباهت (٢٪) بین ژنوتیپ‌های ابراهیمی با شستی و ممتازتاج آبادی و خنجری دامغان و فندقی٤٨ وجود داشت که نشان دهنده سطح بالای چندشکلی در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه است. همچنین شباهت بین ژنوتیپ‌های خنجری راور و اوحدی (٦٢٪)، بادامی راور و خنجری راور (٦٠٪)، بدست آمد. در بررسی ١٩ ژنوتیپ پسته اهلی با استفاده از ٢٠ آغازگر ISSR، ٦٤ درصد چندشکلی گزارش گردید (Taghizadeh et al, 2010). در مطالعات مشابهی میرزایی و همکاران (٢٠٠٢) ضمن مطالعه تنوع ژنتیکی گونه‌های وحشی و ارقام پسته موجود در ایران با استفاده از نشانگر RAPD، درصد چندشکلی ایجاد شده را ٧٤/٧٣ درصد گزارش کردند (Mirzaei *et al.*, 2002). در پژوهش دیگری کمترین فاصله بین ارقام کله-قوچی و احمدآقایی با میزان تشابه ٠/٨٣ و بیشترین فاصله ژنتیکی بین ارقام کله‌قوچی، حسین‌خانی و ابراهیم‌آبادی با میزان تشابه ٠/٥٤ مشاهده شد (Taghizadeh et al, 2012).

تجزیه خوشه ای حاصل از داده‌های مولکولی

دندروگرام بر اساس ماتریس تشابه و به روش UPGMA بدست آمد. ضریب همبستگی کوفنتیک به‌دست آمده از دندروگرام و ماتریس تشابه ٠/٩٤ بود که نشان‌دهنده برازش خیلی خوب بین ماتریس تشابه و دندروگرام است. در مطالعه باقی‌زاده و همکاران (٢٠١٠) دندروگرام حاصل از داده‌های بدست آمده بر اساس ترکیب هر سه مارکر RAPD، ISSR و SSR با دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای جداگانه داده‌های هر مارکر به صورت جداگانه مطابقت داشت.

در فاصله تشابه ٠/٣٦ ژنوتیپ‌ها در هفت گروه مجزا قرار گرفتند (شکل ١)، که به شرح زیر می‌باشند.

گروه اول: به دو زیر گروه تقسیم شد. زیرگروه اول شامل ژنوتیپ‌های هراتی، خنجری دامغان، فندقی٤٨، موسی آبادی و زیرگروه دوم شامل ژنوتیپ های فندقی زودرس و سفیدپسته نوق می‌باشد. در این گروه بیشترین تشابه بین ژنوتیپ‌های خنجری دامغان، فندقی٤٨ (٦٣٪) و کمترین تشابه بین ژنوتیپ‌های هراتی و سفیدپسته نوق (٢٤٪) مشاهده شد.

گروه دوم: شامل ژنوتیپ های ممتاز، ابراهیم آبادی، ممتازتاج آبادی، که بیشترین تشابه (٠/٥١) بین ژنوتیپ ابراهیم آبادی و ممتازتاج آبادی و کمترین تشابه (٠/٤٢) بین ارقام ممتاز و ابراهیم-آبادی مشاهده شد. نتایج فوق با نتایج میرزایی و همکاران مبنی بر قرار گرفتن ارقام ممتاز تاج آبادی و ممتاز در یک گروه مطابقت دارد (Mirzaei *et al.*, 2002).

گروه سوم: شامل ژنوتیپ های شاهپسند، بادامی زرند، سیریزی، سبزپسته نوق، قزوینی، که بیشترین تشابه (٠/٤٨) بین ژنوتیپ سبزپسته نوق و قزوینی و کمترین تشابه (٠/٣٤) بین ارقام

www.SID.ir

Archive of SID

شاهپسند و قزوینی مشاهده شد. تشابه ژنوتیپ های سبزپسته نوق و بادامی زرند و تشابه بادامی زرند و سیریزی طی گزارشی منتشر گردیده است (Mirzaei *et al*., 2002 ; Baghizadeh *et al*., 2010). گروه چهارم: در برگیرنده ژنوتیپ‌های خنجری راور، اوحدی، شستی، ایتالیایی، بادامی راور، بادامی نیش کلاغی، امیری می باشد که بادامی نیش کلاغی و امیری جدا از بقیه در زیر گروه دیگری قرار گرفته اند. در این گروه بیشترین تشابه بین ژنوتیپ‌های خنجری راور و اوحدی (٦۲٪) و کمترین تشابه بین ژنوتیپ‌های اوحدی و بادامی نیش کلاغی (۳۲٪) مشاهده شد. شباهت بالای ژنوتیپ های خنجری راور و اوحدی توسط نوروزی و همکاران، نیز گزارش شده است (Noroozi *et al*., 2009). در پژوهشی تشابه ژنوتیپ اوحدی و بادامی نیش کلاغی گزارش شد (Baghizadeh *et al*., 2010).

همچنین ارقام اوحدی و ایتالیایی در مطالعه‌ای در یک گروه واقع شدند (Alami *et al*., 2003). ژنوتیپ های ایتالیایی و بادامی نیش کلاغی طی بررسی با استفاده از نشانگر مولکولی SSR، در یک گروه قرار گرفتند (Arabnezhad *et al*., 2008).

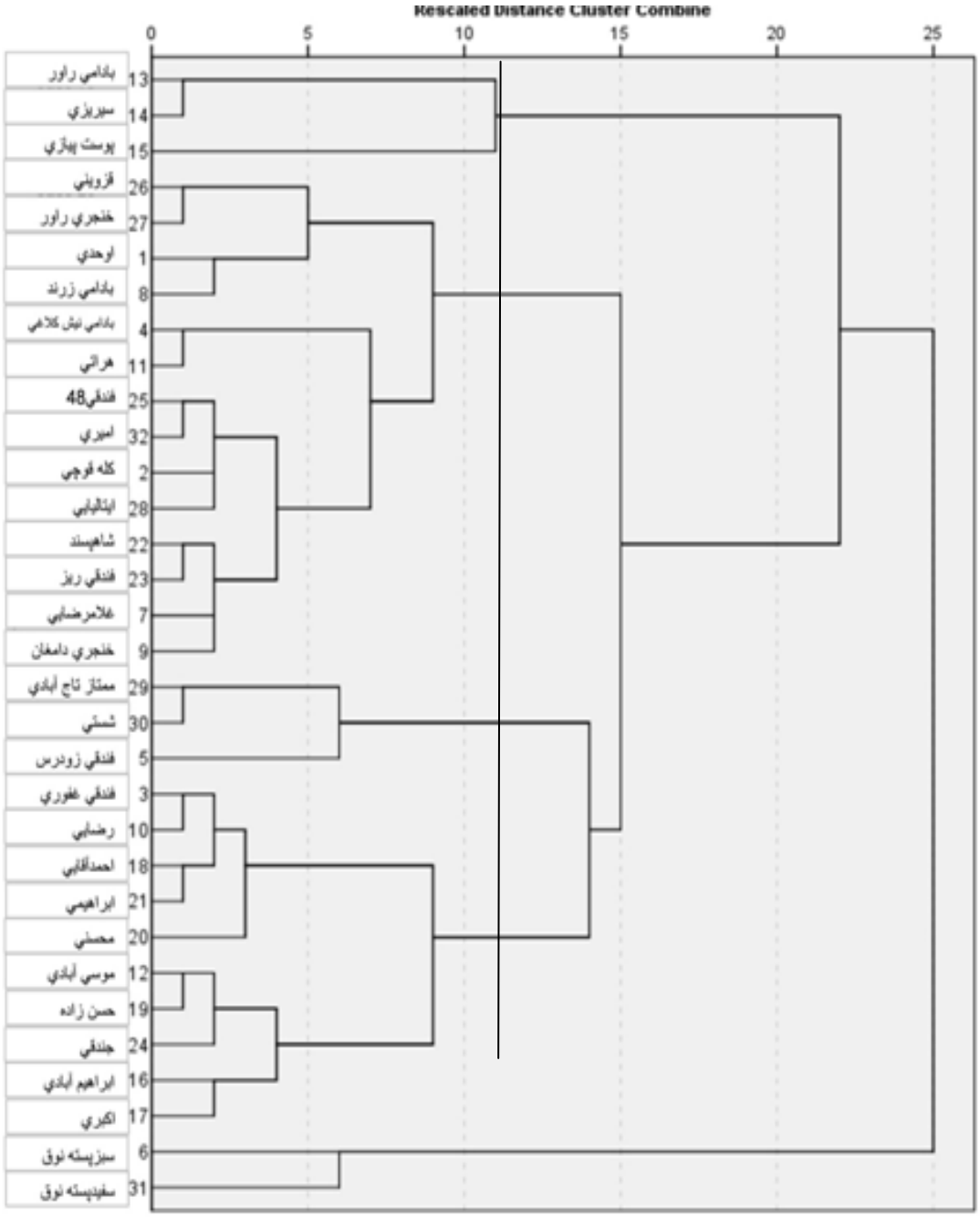
گروه پنجم: این گروه شامل ژنوتیپ حسن زاده و جندقی می باشد.

گروه ششم: ژنوتیپ فندقی ریز در این گروه جداگانه قرار گرفت.

گروه هفتم: در این گروه ژنوتیپ ابراهیمی به تنهایی قرار گرفت که در گزارشی آمده است رقم ابراهیمی از سایر ارقام پسته مجزا شده و در یک گروه جدا، واقع می‌شود (Baghizadeh *et al*., 2010). بای‌پلات و تری‌پلات (شکل ۲و۳) براساس دو و سه مولفه اصلی اولیه ترسیم شده‌اند و پراکندگی ارقام را نشان می‌دهند.

www.SID.ir

Archive of SID

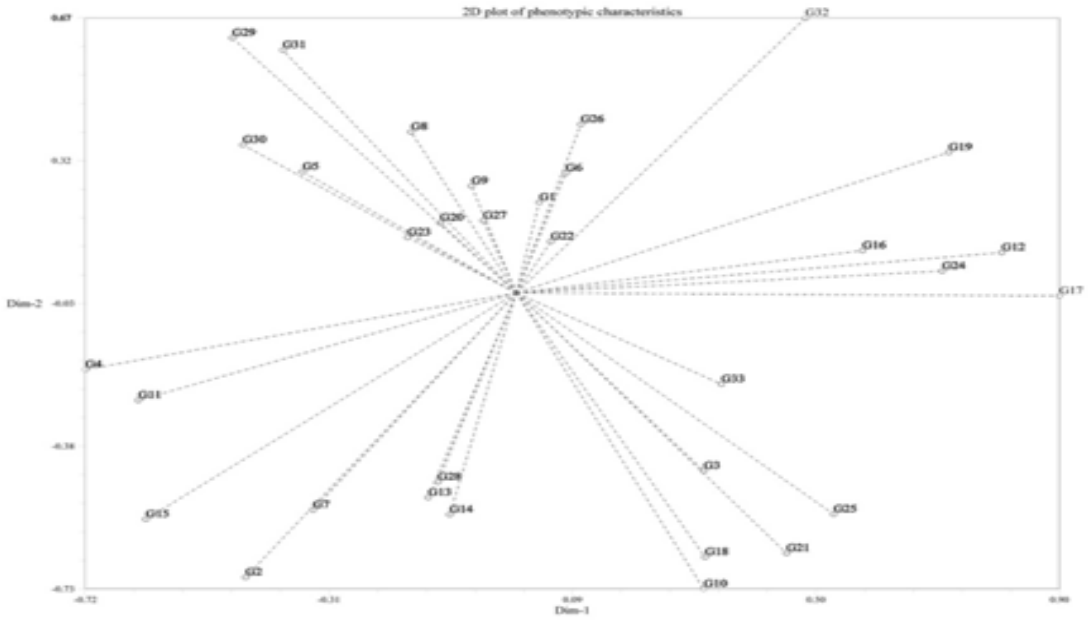


شکل ۱- دندروگرام حاصل از داده‌های نشانگرهای ISSR مربوط به ۲۵ ژنوتیپ ماده پسته به روش UPGMA.

Figure 1- UPGMA dendrogram revealed by 25 female genotypes of pistachio based on ISSR markers.

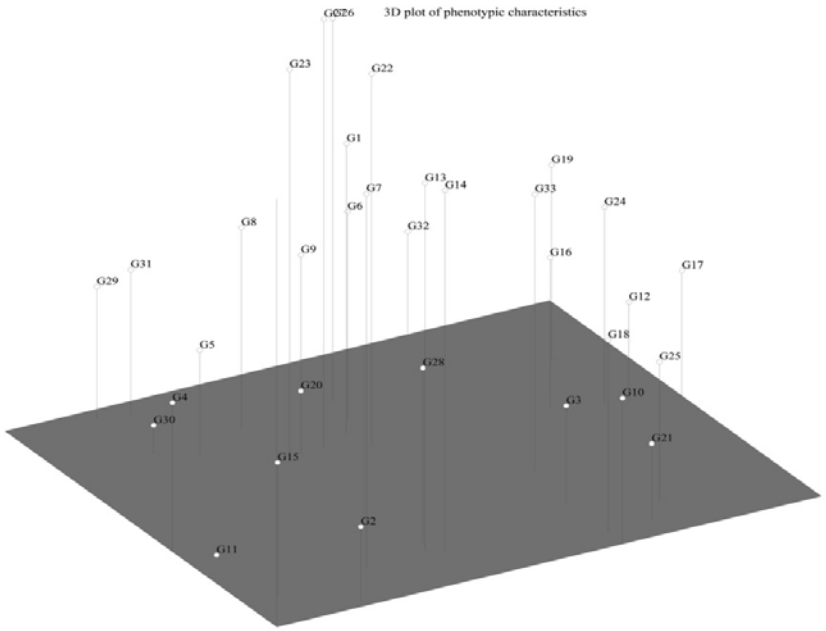
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- نتایج تجزیه پلات دو بعدی ژنوتیپ‌های پسته مورد مطالعه با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR.

Figure 2- Results of two dimentional plot showing relationship among 25 female genotypes of pistachio using ISSR markers.



شکل ۳- نتایج تجزیه پلات سه بعدی ژنوتیپ‌های پسته مورد مطالعه با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR.

Figure 3- Results of three dimentional plot showing relationship among 25 female genotypes of pistachio using ISSR markers.

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر درصد چندشکلی کل به دست آمده ۸۳/۱۰ درصد بود. بیشترین تعداد باندهای تولید شده متعلق به آغازگر (AC)8YG ۱۵ باند و کمترین باند متعلق به آغازگر (TG)8G چهار باند بود. بیشترین شباهت (٦۳٪) بین ژنوتیپ‌های خنجری دامغان و فندقی٤۸ و کمترین شباهت (۲٪) بین ژنوتیپ‌های ابراهیمی با شستی و ممتازتاج آبادی و خنجری دامغان و فندقی٤۸ وجود داشت. با توجه به مقایسات انجام شده می‌توان گفت که نشانگر ISSR به خصوص نشانگرهای مورد استفادهی این پژوهش که بالاترین درصد چند شکلی را نشان دادند(CT)8RC، (AG)8YT، (AC)8YG، BDB(TCC)7، (GACA)5، (CA)8-GT، (AC)8YT))، برای شناسایی ژنوتیپ‌های پسته مناسب می‌باشد.

منابع

Ahmadiafzadi M, Tabatabaei S B, Mohammadi SA, Tajabadipour A (2007). Comparison of genetic diversity in species and cultivars of Pistachio (*Pistacia* sp.) based on Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) markers. Iranian Journal of Agricultural Biotechnology 3: 147-152.

Alami E, Taeb M, Lotfi E, Sadeghian Motahar I (2003). Study of polymorphic esterase isosymes, peroxidase and mallat dehydrogenase in Iranian pistachio cultivars and species. Agricultural and environmental science and technology 7: 107 – 113.

Al-saghir MG, Porter DM (2006). Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers of Pistacia species (Anacardiaceae). Asian Journal of Plant Sciences 5: 1002-1006.

Arabnezhad HM, Bahar A, Tajabadi Pour (2008). Assessment of genetic diversity among Iranian pistachios using microsatellites isolated from *Pistacia khinjuk*. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources 45: 218-228.

Askari N, Mohammad Abadi MR, Baghizadeh A (2011). ISSR markers for assessing DNA polymorphism and genetic characterization of cattle, goat and sheep populations. Iranian Journal of Biotechnology 9: 222–229.

Baghizadeh A, Noroozi Sh, Jalili Javaran M (2010). Study on genetic diversity of some Iranian pistachio (*Pistacia vera* L.) cultivars using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Inter Sequence Repeat (ISSR) and Simple Sequence Repeat (SSR) markers: A comparative study. African Journal of Biotechnology 9: 7632-7640.

Barghchi M, Alderson PG (1989). Pistachio (*Pistacia vera* L.). In: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Bajaj, Y.P.S. (ed.). Springer Verlag, Berlin 5: 68-98.

Baron, E, Marco L.D, Marra F.P, Sidari M (1996). Isozymes and canonical discriminant analysis to identify pistachio (*Pistacia vera* L.) germplasm. Horticulture Science 31, 134-138.

www.SID.ir

Archive of SID

Doyle JJ, Doyle JL (1987). A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bulletin 19:11–15.

Dyszel SM, Petitt BC (1990). Determination of the country of origin of pistachio nut by DSC and HPLC. Journal of the American Oil Chemists' Society 67:947-951.

Ehsanpour AA, Tavassoli M, Arab L (2008). Sex determination of *Pistacia vera* L. using ISSR markers. Malaysian Applied Biology Journal 37: 25-28.

Ghasemi M, Baghizadeh A, Mohammadabadi MR (2010). Determination ofgenetic polymorphism in Kerman Holstein and Jersey cattle population using ISSR markers. Australian Journal of Basic Applied Science 4: 5758–5760.

Golan-Goldhirsh A, Barazani O, Wang Z S , 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.

Jaccard P (1908). Nouvellesrecherchessur la distribution.florale. Bulletin de la Société vaudoise des sciences naturelles. 44: 223-270.

Kafkas S, Perl-Treves RN, Kaska (2000). Unusual *Pistacia atlantica* Desf. monoecious sex types in the Yunt Mountains of the Manisa province of Turkey. Israel Journal of Plant Sciences 48: 277-280.

Kafkas S, Ebru K, Perl-Treves R (2002). Morphological diversity and germplasm survey of three wild *Pistacia* species in Turkey. Genetic Resources and Crop Evolution 49: 261-270.

Kafkas S (2006). Phylogenetic analysis of the genus *Pistacia* by AFLP markers. Plant Systematics and Evolution 262: 113-124.

Katsiotis A, Hagidimitriou M, Drossou A, Pontikis C, Loukas M (2003). Genetic relationships among species and cultivars of Pistaciausing RAPDs and AFLPs. Euphytica 132, 279–86.

Mirzaei S, Bahar M, Sharif Nabi B,Vatan Pour Azghadi E, Bani Nasab B (2002). Genetic diversity among Iranian pistachio cultivars using RAPD molecular marker. MSc. Thesis. Isfahan University of Technology.

Naghavi, M. Gharyazi, B. Hossini Salekdeh, G. (2009). Molecular Markers). Tehran University Publication. 340 Pages. Noroozi Sh, Baghizadehand AM, Javaran J (2009). The genetic diversity of Iranian pistachio (*Pistacia vera* L.) cultivars revealed by ISSR markers. Bio.Di Con 2: 50-56.

Ozbek S, Ayfer M (1957). Pistacia tuleriuzerin desitolojikarastirmalar. Ankara Univeristies iZiraat Facultesi Yilliji. 3: 203-222.

Ozden-Tokatli Y, Akdemir H, Tilkat E, Onay A (2010). Current status and conservation of Pistacia germplasm. Biotechnology Advances 28, 130–141.

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, SalehiShanjani P, Hagidimitrio M, Pirseyedi S.M, Naghavi MR, Avanzato D, Vendramin E, Kafkas S, Ghareyazie B, Ghaffari MR, KhayamNekoui SM (2010). Genetic diversity and relationship among *Pistacia* species and cultivars. Conservation Genetics 11: 311-318.

www.SID.ir

Archive of SID

Rohlf FJ (1992). NTSYS-pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System).Version 1.70.Exeter, Setauket, NY.

Taghizadeh A, Ahmadi J, Haddad R, Zarrabi M. (2010). A comparative analysis of ISSR and RAPD markers for studying genetic diversity in Iranian pistachio cultivars. Iranian Journal of Genetics and plant Breeding 1: 6-16.

Vendramin E, Dettori M T, Verde I, Micali S, Giovinazzi J, Mardi M (2009). Molecular characterization of *Pistacia* genus by microsatellite markers. Acta Horticulturae 825: 55–61.

Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR (2015). Associations of Inter-Simple Sequence Repeat loci with predicted breeding values of body weight in Sheep. Small Ruminant Research 132: 123–127.

Zamani P, Akhondi M, Mohammadabadi MR, Saki AA, Ershadi A, Banabazi MH, Abdolmohammadi AR (2011). Genetic variation of Mehraban sheepusing two inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. African Journal of Biotechnology 10: 1812–1817.

Zohary M (1952). A monographic study of the genus *Pistacia Palestine.* American Journal of Botany 5: 187-228.

www.SID.ir

Archive of SID

Evaluation of genetic diversity in 25 Iranian pistachio genotypes using ISSR markers

Arjmand Ghahestani R.[1], Tavassolian I.[*2], Mohammadi Nejad Gh.[2]

[1]Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.
[2]Horticultural Research Institute, Shahid Bahonar University of Kerman, Kerman, Iran.

Abstract

In this study 17 ISSR molecular markers were employed to investigate the genetic diversity among 25 female pistachio genotypes. The markers produced 148 bands in total, of which 123 (83%) was polymorphic and the average of polymorphism for each primer was 7.23 band per primer. Cluster analyses of genotypes were estimated based on Jaccard's similarity algorithm and UPGMA clustering method and placed the genotypes in seven groups. The results obtained by similarity matrix revealed the highest similarity between cultivars "Khanjari Damghan" and "Fandoghi 48" (63%) and the lowest similarity between cultivars "Ebrahimi" and "Shasti" (2%) which is due to high amount of polymorphism among the genotypes. This experiment shows that ISSR markers are reliable for assessment of pistachio female genotypes and genetic diversity study. Moreover, these markers can be used to provide molecular genetics identity for Iranian pistachio populations.

Keywords: *Pistachio, Genetic diversity, Jaccard similarity coefficient, Cluster analysis, ISSR.*

[*] Corresponding Author: Tavassolian I. Tel: 03431322633 Email: itavasoli@uk.ac.ir

www.SID.ir