استفاده از نشانگرهای SSR جهت تفکیک ژنتیکی برخی ارقام تجاری نخل خرما

مهدی رضائی[۱،*] و عبدالرضا کاوند[۲]

۱- استادیار، موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج
۲- دکتری، موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۱۷ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۸/۱۷)

چکیده

در نخل خرما، تشخیص رقم در نهال‌های جوان حاصل از ریزازدیادی با استفاده از صفات مورفولوژیک دشوار و زمان‌بر بوده و بنابراین استفاده از نشانگرهای مولکولی جهت تسهیل و تسریع این موارد ضروری به نظر می‌رسد. هدف از این مطالعه بررسی قابلیت هشت جفت نشانگر ریزماهواره برای تفکیک و تشخیص رقم در برخی ارقام تجاری و متعاقباً استفاده از داده‌ها برای تشخیص رقم در گیاهچه‌های خرمای حاصل از ریزازدیادی بود. ارقام مورد مطالعه شامل پیارم، زاهدی، مجول، برحی، استعمران، دیری، غنامی سبز، غنامی قرمز و گنطار بودند. با توجه به دشواری کوبیدن برگ خرما با استفاده از هاون در حضور ازت مایع، روشی کارآمد برای کوبیدن برگ‌های خرما با استفاده از دستگاه Tissue Lyser II بهینه‌سازی شد. برای انجام واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز از هشت جفت آغازگر ریزماهواره استفاده شد. نتایج نشان داد که در صورت استفاده از این سیستم نشانگری و در دسترس بودن ارقام شاهد قابل‌اطمینان، می‌توان اصالت گیاهچه‌های حاصل از ریزازدیادی را ارزیابی کرد. گروه‌بندی ارقام نشان داد که تمامی ارقام مورد مطالعه با استفاده از پنج جفت آغازگر ریزماهواره شامل mPdCIR025، mPdCIR057، mPdCIR070، PDAG1003 و DP175 قابل تفکیک بودند. نتایج حاصل از تهیه بارکد اختصاصی برای هر رقم نشان داد که آلل شماره c1 (با اندازه تقریبی ۲۳۵ جفت‌باز) در رقم پیارم و آلل d3 (با اندازه تقریبی ۲۳۰ جفت‌باز) در رقم مجول اختصاصی بودند. در نهایت برای ایجاد قابلیت رجوع به نتایج، دیاگرام تفکیک ارقام ترسیم شد.

واژگان کلیدی: آلل اختصاصی، دیاگرام تفکیک رقم، ریزازدیادی، نشانگر مولکولی، یکپارچگی ژنتیکی

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: **meh.rezaee@areeo.ac.ir**

مقدمه

خرما (*Phoenix dactylifera* L.) (2*n* = 2*x* = 36) به‌عنوان یکی از مهم‌ترین منابع اقتصادی–اجتماعی در خاورمیانه و کشورهای عربی شناخته می‌شود و حدود ۳۰۰۰ رقم از آن در سراسر جهان وجود دارد (Khierallah *et al*., 2017). طبق آمار فائو، بر اساس میانگین تولید از سال ۲۰۰۰ تا ۲۰۱۷ ایران بعد از مصر، دومین تولیدکننده بزرگ خرما در جهان است. این در حالی است که بر اساس همین آمار، سطح زیرکشت خرما در ایران قریب به ۳/۵ برابر کشور مصر می‌باشد. بر اساس آخرین آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی، سطح باغات بارور نخل خرما، ۲۱۵۵٤۵ هکتار بوده که از این میزان باغ ۱۲۲۳۱٤۲ تن خرما برداشت شده است. بیش‌ترین سطح بارور باغات (آبی و دیم) به‌ترتیب در استان‌های سیستان و بلوچستان (٤۳۱٦۳ هکتار)، خوزستان (۳۱۱۷۰ هکتار)، هرمزگان (۳۰۳۵٦ هکتار)، بوشهر (۳۰۲٤٦ هکتار)، جنوب استان کرمان (۲۸۹۱۸ هکتار)، کرمان (۲٤۲۰۰ هکتار) و فارس (۲٤۱۲۵ هکتار) قرار دارد. خرما به صورت جنسی و غیرجنسی تکثیر می‌شود. تکثیر با پاجوش، روش معمول تکثیر غیرجنسی است که در آن یکپارچگی ژنتیکی ارقام (تا حدود زیادی) حفظ می‌شود. یکی از محدودیت‌های این روش، تعداد محدود پاجوش تولیدی از هر نخل، در طول عمر آن است. تعداد پاجوش تولید شده در ارقام مختلف به‌شدت متغیر بوده و همه پاجوش‌ها دارای حجم ریشه کافی برای زنده ماندن نیستند (Saker *et al*., 2000; Zaid and De Wet, 2002). ریزازدیادی، روشی برای تکثیر رویشی است که در آن کلون‌هایی که از نظر ژنتیکی و فنوتیپی یکسان هستند، در سطح وسیع و تجاری، تولید می‌شوند. هرچند که در برخی موارد، عدم رعایت شرایط بهینه طی فرایند ریزازدیادی، منجر به ایجاد تغییر در ژنوم هسته، میتوکندری و کلروپلاست (تنوع سوماکلونال) در گیاهان حاصل از باززایی می‌شود (Khierallah, 2015). همچنین در برخی موارد، به‌دلیل عدم دقت کافی کاربر، طی مراحل تکثیر در آزمایشگاه، نگهداری در اتاق‌های رشد و در نهایت جابجایی مواد گیاهی در گلخانه، ممکن است اختلاط فیزیکی ارقام رخ بدهد که مشکلات عدیده‌ای را به‌همراه خواهد داشت. لذا بر این اساس، ارزیابی اصالت و یکنواختی ژنتیکی در گیاهچه‌های خرمای حاصل از کشت‌بافت برای تصدیق هویت ژنتیکی، ضروری به‌نظر می‌رسد. اولین باردهی خرما در ۵ تا ۷ سالگی اتفاق می‌افتد که این مساله تشخیص رقم با استفاده از صفات مورفولوژیک را با تأخیر مواجه می‌کند. بنابراین تشخیص رقم و بررسی یکنواختی در نهال‌های حاصل از ریزازدیادی، طی فرآیند تولید نهال و در مرحله چندبرگی با استفاده از صفات مورفولوژیک، دشوار بوده و این امر مستلزم استفاده از نشانگرهای مولکولی است (Al-Khalifah, 2006). نشانگرها در زمینه حفظ کلکسیون‌های ذخایر ژنتیکی گیاهی، تشخیص ارقام و واریته‌ها، مکان‌یابی و تعیین تعداد ژن‌های کنترل کننده صفات به‌کار گرفته می‌شوند (Gheitarani *et al*., 2020). انتخاب نشانگر مولکولی مناسب برای انجام هر مطالعه به عوامل مختلفی از جمله ماهیت ژنتیکی مواد گیاهی مورد بررسی، هدف از کاربرد نشانگر، سهولت دسترسی و کاربرد و تکرارپذیری نتایج بستگی دارد (MirMohammadi Maibody and Golkar, 2019). علی و همکاران (Ali *et al*., 2006) از تکنیک RAPD برای شناسایی پایداری ژنتیکی در گیاهچه‌های حاصل از باززایی رقم برحی استفاده کردند. الگوهای تکرارپذیر RAPD با استفاده از ۳۰ آغازگر حاصل شدند. هنگامی که انگشت‌نگاره پاجوش‌های مادری با نمونه‌های حاصل از باززایی مورد مقایسه قرار گرفت، سه آغازگر OPC.16، OPG.O8 و OPN.16 باندهای چندشکل نشان دادند. در مطالعه بدر و همکاران (Bader *et al*., 2007) از ۲۵ نشانگر RAPD برای بررسی گیاهان مادری و گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت ارقام برحی و مکتوم استفاده شد. الگوهای تکرارپذیر RAPD در مورد ۲۰ آغازگر حاصل شد. ۱۷ آغازگر الگوی تک‌شکل در مورد گیاهان مادری و نمونه‌های کشت بافتی نشان دادند. آغازگر OPD.01، در مورد رقم برحی و آغازگرهای OPB.07 و OPC.08 در مورد رقم مکتوم باندهای چند شکل نشان دادند. به غیر از نشانگر RAPD از نشانگرهای دیگری نیز مانند AFLP و ISSR نیز برای مطالعه پایداری ژنتیکی در گیاهچه‌های حاصل از ریزازدیادی استفاده شده است (Khierallah *et al*., 2008; Abd-Alla, 2010; Ahmed *et al*., 2012).

نشانگرهای ریزماهواره دارای مزایایی هم‌چون فراوانی بالا در ژنوم، سطح بالای چندشکلی، توزیع تقریبا یکنواخت در ژنوم، آسانی آزمون با استفاده از PCR و سهولت انتشار نتایج میان آزمایشگاه‌ها برای مطالعات جمعیتی بوده و در نقشه‌یابی ژنتیکی و شناسایی ارقام

خویشاوند از کارایی بالایی برخوردار هستند (Al-Faifi *et al.*, 2016). با توجه به لزوم کنترل و نظارت بر اصالت ژنتیکی گیاهچه‌های خرمای حاصل از کشت بافت و متعاقباً لزوم استفاده از ابزاری نسبتا دقیق برای تمایز ارقام، هدف از این مطالعه، تفکیک ژنتیکی ۹ رقم نخل خرما شامل پیارم، زاهدی، مجول، برحی، استعمران، دیری، غنامی سبز، غنامی قرمز و گنطار با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره و استفاده از اطلاعات آن جهت تفکیک رقم در گیاهچه‌های خرمای حاصل از ریزازدیادی و در نهایت تهیه دیاگرام تفکیک ارقام برای ایجاد قابلیت رجوع به داده‌ها و استفاده مجدد از آن‌ها بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: برای انجام این مطالعه نمونه‌های برگ مربوط به ارقام پیارم، زاهدی، مجول، برحی، استعمران، دیری و گنطار از نخل‌های اصیل تهیه شد. سپس ۱۵ نمونه برگی مربوط به گیاهچه‌های خرمای حاصل از ریزازدیادی که جزء ارقام مورد مطالعه بودند به صورت کد شده و بدون نام (جدول ۱) از یکی از شرکت‌های تولید کننده نهال خرما به روش ریزازدیادی تهیه شد.

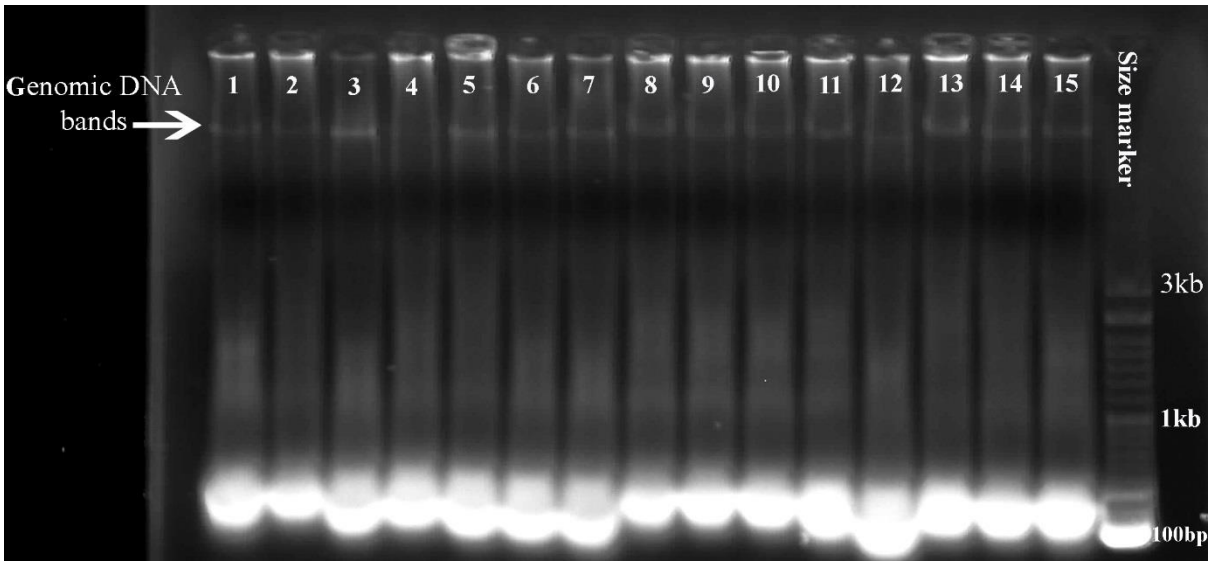
استخراج DNA: با توجه به استحکام بالای بافت برگ خرما، کوبیدن آن با استفاده از هاون در حضور ازت مایع، بسیار دشوار و زمان‌بر می‌باشد. همچنین به‌دلیل نیاز به استفاده زیاد از ازت مایع برای پودر کردن نمونه‌های برگی نخل، احتمال سوختگی پوست و آسیب به کاربر زیاد است. برای رفع این مشکل، برگچه‌های خرما با استفاده از قیچی استریل ابتدا با چند برش طولی و سپس با برش‌های عرضی به قطعات کوچک تقسیم شده و به میزان ۰/۱ تا ۰/۱۵ گرم از این قطعات به تیوب‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل شد. سپس ۳۰۰ میکرولیتر بافر TE به هر تیوب اضافه و داخل هر تیوب یک عدد ساچمه استیل استریل، انداخته شد. در مرحله بعد، تیوب‌ها داخل رک‌های مخصوص دستگاه Tissue Lyser II (QIAGEN) (که به‌مدت یک شب در فریزر منفی ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته بودند) چیده و رک‌ها بر روی دستگاه نصب شدند. تنظیمات دستگاه روی فرکانس ۲۵ حرکت در ثانیه برای مدت یک دقیقه تنظیم و فرآیند کوبش دوبار (طبق دستورالعمل دستگاه) انجام شد. پس از پودر شدن نمونه‌های برگی، به هر تیوب مقدار یک میلی‌لیتر از بافر استخراج (Tris 100 mM, NaCl 1.4 M, EDTA, 20mM, CTAB 2%, DTT 30mM) اضافه و رسوب DNA با ایزوپروپانول سرد انجام و تیوب‌ها به‌مدت یک شب در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت کاهش میزان پلی‌ساکاریدها در رسوب اسیدنوکلئیک که باعث کاهش شدید کیفیت اسیدنوکلئیک استخراج شده می‌شود، شستشو با NaCl (1.5 M) انجام شد. بقیه مراحل استخراج DNA به روش سقایی معروف و همکاران (Saghai-Maroof *et al.*, 1984) انجام شد.

کیفیت و کمیت DNAهای استخراج شده با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸ درصد و اسپکتروفتومتری (Nano Drop 1000) در طول‌موج‌های ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر سنجیده شد. نتایج نشان داد که DNA استخراج شده با این روش دارای کمیت، کیفیت و یکپارچگی مطلوب بوده و از آن می‌توان برای واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز استفاده کرد. با استفاده از این روش برای همگن‌سازی نمونه‌ها، می‌توان ٤٨ نمونه را در مدت دو دقیقه پودر و برای استخراج DNA آماده کرد در حالی که کوبیدن این تعداد نمونه برگ خرما با استفاده از هاون و ازت مایع به دو روز کاری زمان نیاز دارد. علاوه‌بر این در این روش مخاطرات و هزینه استفاده از ازت مایع نیز حذف می‌شود.

جدول ۱- فهرست ۱۵ نمونه‌ی کد شده برگ خرمای ارسال شده به آزمایشگاه نشانگرهای مولکولی در موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال برای تشخیص رقم

Table 1. The list of 15 unknown coded leaf samples of date palm were sent to molecular marker laboratory of seed and plant certification and registration institute for cultivar identification

شماره نمونه Sample number	کد نمونه Sample code	شماره نمونه Sample number	کد نمونه Sample code
1	4M5UV	9	7H6TM
2	12P2UJ	10	14D7DT
3	1E1YK	11	8O4BN
4	5J5CA	12	9B3FI
5	6S4IL	13	15F2XZ
6	2Q8LM	14	3G9KH
7	11Ž3OY	15	13V0SU
8	10R28L		



شکل ۱– الکتروفورز DNA ژنومی استخراج شده از ۱۵ نمونه معرفی شده در جدول ۱ با روش بهینه‌سازی شده برای استخراج DNA از برگ ارقام مختلف نخل بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد

Figure 1. Electrophoresis of extracted genomic DNA from 15 samples introduced in table 1 on 0.8% agarose gel.
چاهک آخر از سمت راست مربوط به نشانگر اندازه از ۱۰۰ جفت باز تا ۳۰۰۰ جفت‌باز
The last lane in the right: size marker 100 to 3000 bp

واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز: واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر و با استفاده از واکنش‌گرهای زیر در دستگاه ترموسایکلر اپندورف (Mastercycler® pro 6325) انجام شد. آغازگرها بر مبنای اطلاعات (Al-Faifi *et al*., 2016; Elmeer and Mattat, 2015; Elmeer *et al*., 2011; Arabnejad *et al*., 2010; Mardi *et al*., 2010) و از شرکت Metabion (آلمان) تهیه شدند. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۲ آورده شده است. برنامه چرخه‌های دمایی واکنش‌هایPCR به صورت: واسرشت‌سازی اولیه ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤ دقیقه، ۳۰ چرخه واکنش (در شرایط ۹٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال هر آغازگر به‌مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه) و بسط نهایی ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۵ دقیقه انجام شد. اجزا و غلظت نهایی واکنش‌گرهای مورد استفاده در واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز در جدول ۳ آورده شده است.

الکتروفورز و تجزیه داده‌ها: محصولات واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز بر روی ژل پلی‌اکریلامید واسرشت‌ساز ٦ درصد و ژل پلی‌اکریلامید غیر واسرشته‌ساز ۱۰ درصد الکتروفورز شدند. رنگ‌آمیزی ژل واسرشت‌ساز، با استفاده از محلول نیترات نقره و ژل غیر واسرشت‌ساز با استفاده از ژل‌رد انجام شد. نمره‌دهی باندها به‌صورت عدد یک برای حضور باند و عدد صفر برای عدم حضور باند انجام شد. ترسیم دندروگرام با استفاده از نرم‌افزار PAST، الگوریتم Paired Group و ماتریس تشابه اقلیدسی انجام شد. نحوه تهیه بارکد مربوط به هر رقم به شرح زیر انجام شد. به‌طور مثال اگر یک نشانگر ریزماهواره دارای سه آلل چندشکل باشد، در صورت مشاهده آلل شماره یک در هر نمونه، کد یک و در صورت عدم مشاهده آن آلل کد صفر داده می‌شود. به‌همین شکل در صورت مشاهده آلل شماره دو در هر نمونه، کد دو و در صورت عدم مشاهده آن آلل کد صفرداده می‌شود. این عمل در مورد بقیه جایگاه‌ها و آلل‌های آن‌ها تکرار شد و در نهایت با کنار هم قرار گرفتن کدهای مربوط به آلل‌های هر مکان‌ژنی، بارکد مکان‌ژنی مورد مطالعه برای هر نمونه بدست می‌آید.

جدول ۲- نام، توالی و دمای اتصال آغازگرهای مورد استفاده برای تشخیص نمونه‌های برگ کد شده ارسال شده برای تشخیص رقم

Table 2. Name, sequence and annealing temperature of primers used for cultivar identification in coded date palm leaf samples

نام آغازگر Primer name	توالی آغازگر ('5-'3) Primer sequences (5'-3')	دمای اتصال (°C) Annealing temperature (°C)
mPdCIR025	F: GCACGAGAAGGCTTATAG	55.2
	R: CCCCTCATTAGGATTCTA	55.2
mPdCIR057	F: AAGCAGCAGCCCTTCCGTAG	62.5
	R: GTTCTCACTCGCCCAAAAATA	60.3
mPdCIR070	F: CAAGACCCAAGGCTAAC	52.4
	R: GGAGGTGGCTTTGTAGTA	55.2
PDAG1003	F: GACTGGGAATATAAAGCGATGTC	61.1
	R: CCATCTCCCCTAACTCTCCTC	63.3
DP175	F: ACACACACACACACACACACC	61.3
	R: GTGGCTTCTTTTTGGCTGCTGTC	58.4
KSU-PDL4	F: CCACATAAGGAAAAATGATGC	53.5
	R: TGCATCACTCTGGGTATAAAT	55.5
DP152	F: ACGAGTTTTTGGGAGAGCAA	56.4
	R: GCAAGTTGCCAACATTCTTGT	57.4
MPA6	F: ACAAACGGCGATGGGATTAC	55
	R: CCGCAGCTCACCTCTTCTAT	55

جدول ۳- اجزا و غلظت نهایی واکنش‌گرهای مورد استفاده برای واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز

Table 3- Components and their final concentration in polymerase chain reactions

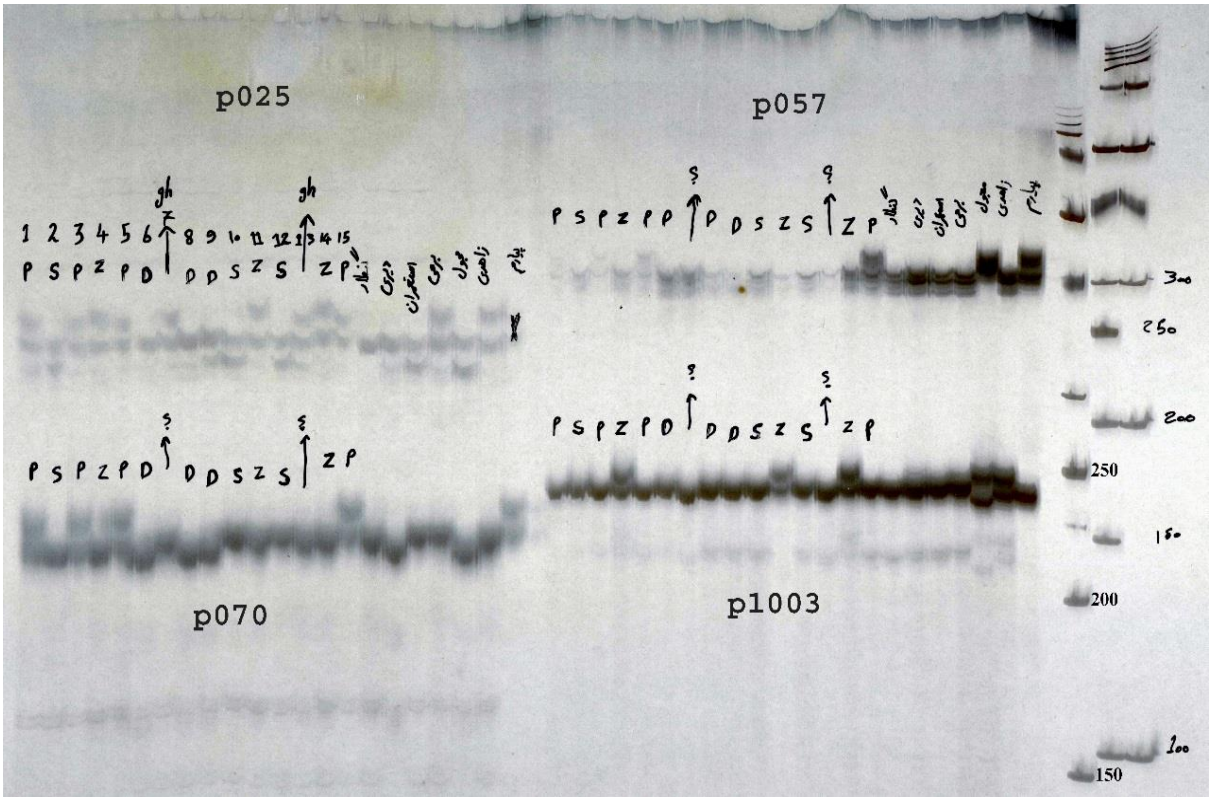
ماده Material	مقدار Quantity	غلظت نهایی Final concentration
2X PCR master mix	7.5 µL	1X
Forward primer	0.4 µL	0.2 pmol
Reverse primer	0.4 µL	0.2 pmol
DNA	2 µL	7.5 ng/µL
H_2O	4.7	–

نتایج و بحث

نتایج نشان داد که چهار لوکوس mPdCIR025، mPdCIR057، mPdCIR070 و PDAG1003 قادر به آشکار کردن تنوع موجود میان ارقام بودند. الکتروفورز محصولات واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز مربوط به DNAهای نمونه‌های حاصل از ریزازدیادی (نمونه‌های ۱ تا ۱۵ از سمت چپ تصویر) و ارقام مورد مطالعه (چاهک‌های ۱۶ تا ۲۲) و چهار لوکوس mPdCIR025، mPdCIR057، mPdCIR070 و PDAG1003 بر روی ژل پلی‌اکریلامید واسرشت‌ساز در شکل ۲ نشان داده شده است. دندروگرام حاصل از داده‌ها (شکل ۳) نشان داد که نمونه‌های 4M5UV، 1E1YK، 6S4IL و 13V0SU مربوط به رقم پیارم، نمونه‌های 12P2UJ، 14D7dT و 9B3FI مربوط به رقم استعمران، نمونه‌های 5J5CA، 8O4BN و 3G9KH مربوط به رقم زاهدی، نمونه‌های 2Q8LM، 10R28L و 7H6TM مربوط به رقم دیری بودند (شکل ۲). نتایج نشان داد که الگوی باندی دو نمونه 11Z3OY و 15F2XZ با ارقام شاهد هم‌خوانی نداشت (شکل۲). سپس جهت اطمینان از صحت نتایج مربوط به تعیین رقم نمونه‌های کد شده، نام رقم مربوط به هر کد از شرکت تولید کننده استعلام و نتایج نشان داد که ترکیب نشانگرهای مورد استفاده به‌خوبی قادر به تشخیص رقم نمونه‌های مورد سوال (۱۵ نمونه) بودند. نتیجه استعلام نام رقم نمونه‌های 11Z3OY و 15F2XZ نشان داد که این کدها به‌ترتیب مربوط به نر غنامی سبز و نر غنامی قرمز بودند و با توجه به اینکه این ارقام جزء ارقام مورد مطالعه (که به‌عنوان شاهد در الکتروفورز استفاده شدند) نبودند تعیین رقم آن‌ها امکان‌پذیر نبود و چهار لکوس مورد استفاده قادر به تفکیک این دور رقم از یکدیگر نبودند. در مرحله بعد برای تفکیک ارقام غنامی سبز و قرمز از یکدیگر از آغازگرهای DP175، PDL4، DP152 و MPA6 استفاده شد و محصولات PCR بر روی ژل پلی‌اکریلامید غیر واسرشت‌ساز مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد که آغازگرهای PDL4، DP152 و MPA6 قادر به تفکیک ارقام غنامی سبز و قرمز نبودند.

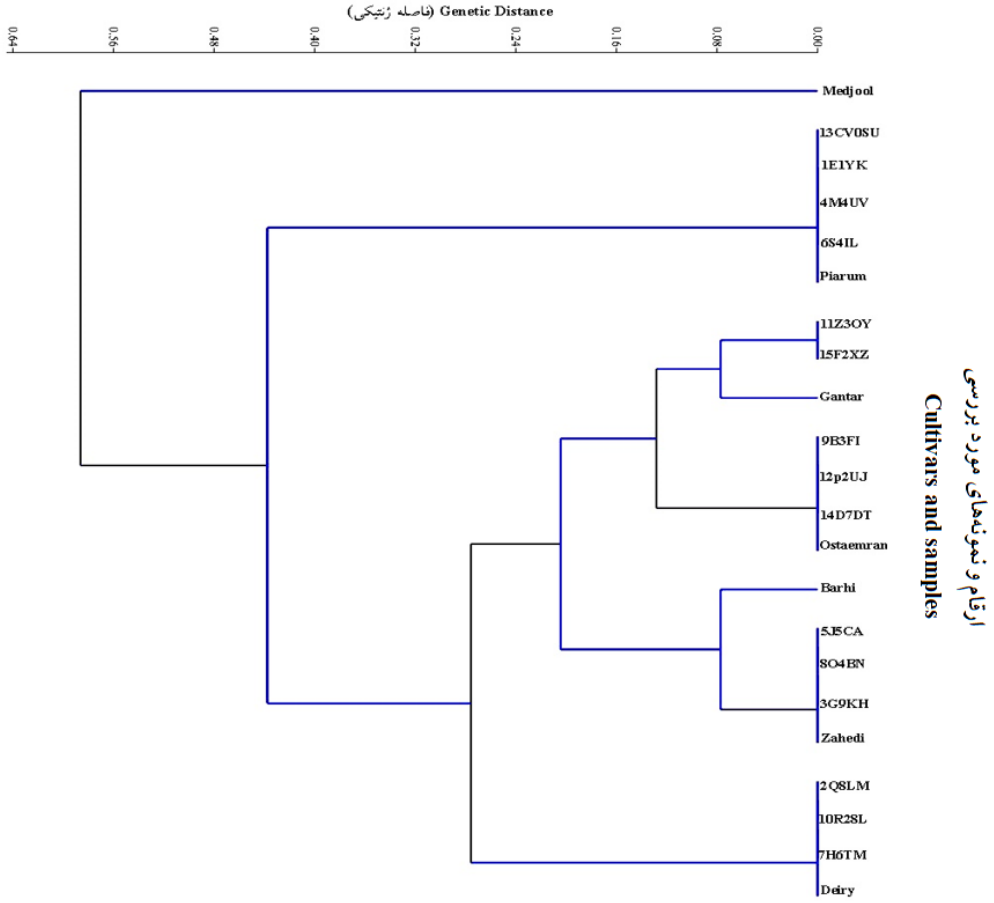
نتایج مربوط به آغازگر DP175 نشان داد که نمونه 11Z3OY مربوط به غنامی سبز و نمونه 15F2XZ مربوط به غنامی قرمز بود (شکل ٤). شاتا و همکاران (Shatha *et al.*, 2014) با استفاده از نشانگرهای RAPD پنج رقم خرمای عراقی را انگشت‌نگاری

کردند. به‌دلیل دشواری تشخیص ارقام خویشاوند از طریق ریخت‌شناسی، هدف آن‌ها از این مطالعه به‌دست آوردن اطلاعاتی برای تفکیک این ارقام بود. این محققین در مطالعه خود موفق به شناسایی آلل‌های منحصر به فرد در مورد ارقام Khidrawi Mandli، Teberzal و Ostaemran و تفکیک پنج رقم مورد مطالعه شدند (Shatha *et al*., 2014). یکی از چالش‌های ارائه نتایج حاصل از تشخیص رقم با استفاده از دندروگرام حاصل از داده‌های نشانگرهای مولکولی، عدم قابلیت رجوع برای مطالعات بعدی است که این مسئله به‌دلیل مشخص نبودن توانایی تفکیک هر آغازگر و آلل‌های اختصاصی مربوط به هر رقم در دندروگرام می‌باشد (Korir *et al*., 2013). برای رفع این چالش می‌توان نتایج حاصله را در قالب جدول بارکد اختصاصی هر رقم و دیاگرام تفکیک ارقام ارائه نمود (جدول ٤ و شکل ٥). برای نشان دادن الگوی تفکیک ارقام توسط هر یک از پنج آغازگر مورد استفاده، دیاگرام تفکیک ارقام (شکل ٥) ترسیم شد.



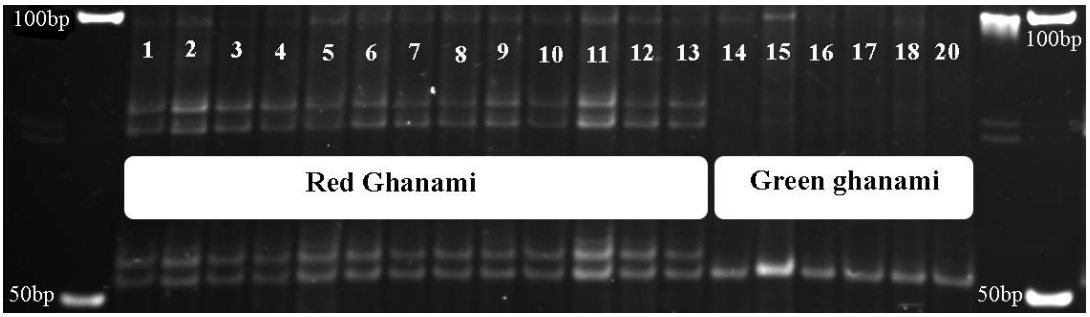
شکل ۲- الکتروفورز محصولات واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز مربوط به نمونه‌های مورد سؤال (۱۵ نمونه اول از سمت راست) و ارقام شاهد (۱٦ تا ۲۲ شامل ارقام گنطار، دیری، استعمران، برحی، مجول، زاهدی و پیارم) ارسال شده از پژوهشکده خرما و میوه‌های گرمسیری با استفاده از آغازگرهای mPdCIR025، mPdCIR057، mPdCIR070 و PDAG1003. نمونه‌های سمت راست مربوط به نشانگر اندازه هستند. حرف P نمایانگر پیارم، S نمایانگر استعمران، Z نمایانگر زاهدی و D نمایانگر دیری است. الگوی باندی دو نمونه‌ای که با نشانه علامت سوال مشخص شده‌اند با ارقام مورد مطالعه همخوانی نداشت. نشانگرهای اندازه ۵۰ تا ۱۰۰۰ و ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ در سمت راست تصویر مشخص شده است

Figure 2. Electrophoresis of PCR products on denaturing polyacrylamide gel. 15 lanes (from the left) of each part are related to coded samples and next 7 lane are related to controls (16 to 22 including Gantar, Deiry, Ostaemran, Berhy, Medjool, Zahedi, Piarum). Control samples provided by Dates and tropical fruits research institute. Part 1 (the top left): multiplicated fragments using mPdCIR025 Primer pair. Part 2 (the top right): multiplicated fragments using mPdCIR057 primer pair. Part 3 (the bottom left): multiplicated fragments using mPdCIR070 primer pair. Part 4 (the bottom right): multiplicated fragments using PDAG1003 primer pair. Size markers (50 to 1000 and 100 to 1000 bp) have been shown in the right lanes. Abbreviations: P (Piarum), S (Ostaemran), Z (Zahedi) and D (Deiry). The banding pattern of samples which are shown by '?' symbol, were not consistent with control samples



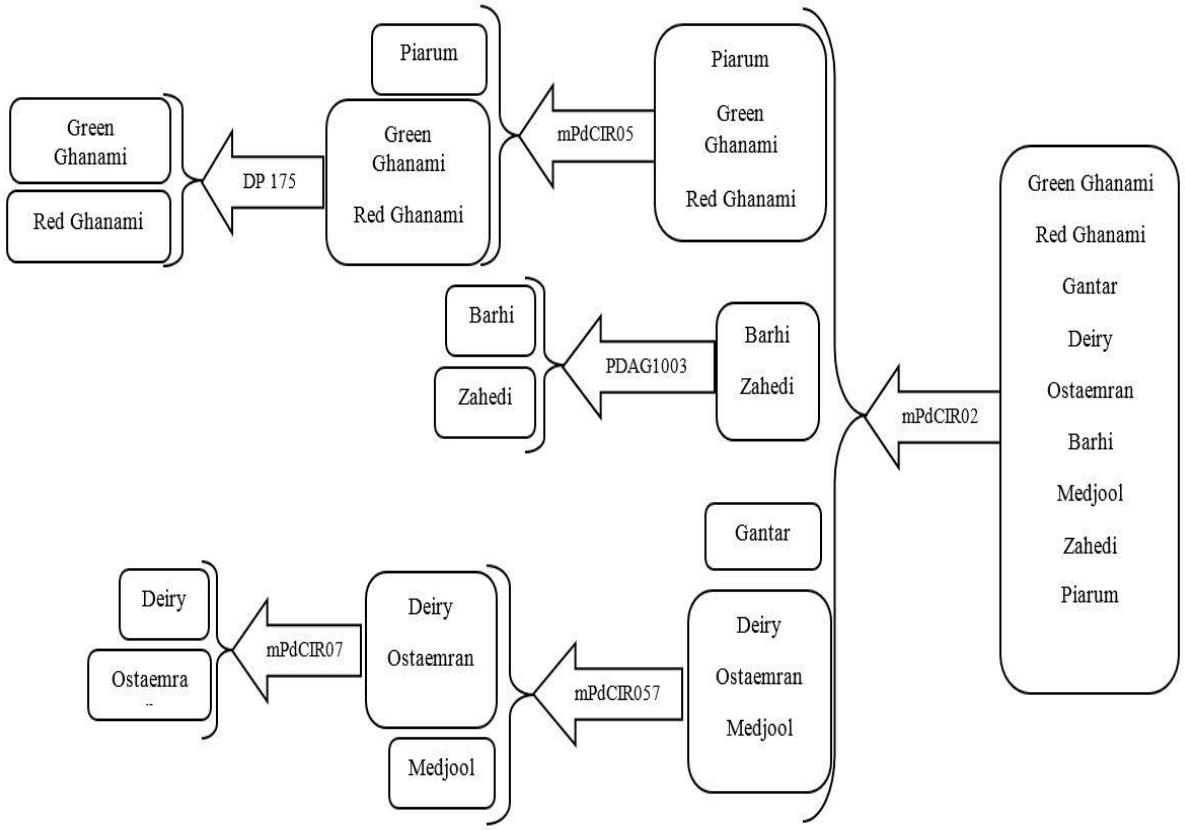
شکل ۳- دندروگرام ترسیم شده بر اساس داده‌های آغازگرهای ریزماهواره mPdCIR025، mPdCIR057، mPdCIR070 و PDAG1003 با استفاده از ماتریس تشابه اقلیدسی و الگوریتم Paired Group. کدهای موجود در دندروگرام مربوط به نمونه‌های گیاهی معرفی شده در جدول ۱ هستند

Figure 3. Depicted dendrogram based on mPdCIR025، mPdCIR057، mPdCIR070 and PDAG1003 primers data using Euclidean similarity matrix and Paired Group algorithm. Codes which are combination of English numbers and characters represent query samples based on Table 1



شکل ٤- مقایسه الگوی باندی حاصل از آغازگر dp175 بر روی نمونه‌های غنامی قرمز شاهد (شماره ۱ تا ۱۳) و غنامی سبز شاهد (شماره ١٤ تا ٢٠)

Figure 4. Comparison of banding pattern of dP175 primer in Red Ghanami (1 to 13) and Green Ghanami (14 to 20).
دو چاهک از سمت راست و چپ مربوط به نشانگر اندازه ۵۰ و ۱۰۰ جفت‌بازی است
2 Lane from right and left: size marker 50 bp and 100 bp



شکل ۵- دیاگرام تفکیک ارقام غنامی سبز، غنامی قرمز، گنطار، دیری، استعمران، برحی، مجول، زاهدی و پیارم با استفاده از آغازگرهای ریزماهواره mPdCIR025، mPdCIR057، mPdCIR070، PDAG1003 و DP175

Figure 5. Cultivar identification diagram depicted based on distinction of date palm cultivars including Green Ghanami, Red Ghanami, Gantar, Deiry, Ostaemran, Barhi, Medjool, Zahedi and Piarum by mPdCIR025, mPdCIR057, mPdCIR070, PDAG1003 and DP175

نتایج حاصل از تهیه بارکد اختصاصی برای هر رقم (جدول ٤) نشان داد که آلل شماره c1 در مورد رقم پیارم و آلل d3 در مورد رقم مجول اختصاصی بودند. بنابراین از این آلل‌ها می‌توان به‌عنوان کلید اختصاصی شناسایی این دو رقم یاد کرد. به‌طور مشابه در تحقیقی که توسط مردی و همکاران (Mardi *et al.*, 2010) انجام شد، برخی از آغازگرهای مورد استفاده توانستند در ارقام مورد مطالعه باندهای چند شکل اختصاصی تولید کنند. الرقیشی و همکاران (Al-Ruqaishi *et al.*, 2008) از نشانگرهای ریز ماهواره برای بررسی روابط ژنتیکی و تشخیص رقم در خرما استفاده کردند. آن‌ها در مطالعه خود ١٤ رقم عمانی، ٥ رقم بحرینی، یک رقم عراقی و یک رقم مراکشی را بررسی کردند و نتایج آن‌ها نشان داد که رقم مراکشی Medjool فاصله ژنتیکی زیادی از بقیه ارقام داشت. به‌طور مشابه دندروگرام ترسیم شده در این مطالعه نیز نشان داد که رقم مجول تفاوت ژنتیکی بیشتری با سایر ارقام داشت به‌طوری که این رقم به صورت جداگانه در یک گروه و مابقی ارقام در گروه دیگر قرار گرفتند (شکل ٣).

با توجه به اهمیت تعیین اصالت ژنتیکی گیاهچه‌های خرمای حاصل از ریزازدیادی و لزوم یکسان بودن زمینه ژنتیکی گیاهچه‌های تکثیر شده با پاجوش مادری مورد استفاده جهت استحصال ریزنمونه، بهینه‌سازی استفاده از نشانگرهای مولکولی برای شناسایی و تفکیک ارقام خرمای رایج در فرآیند ریزازدیادی ضروری به نظر می‌رسد. هرچند شاید استفاده از نشانگرها (به‌دلیل تعداد محدود) قادر به تشخیص تنوع سوماکلونال نباشد ولی به‌خوبی می‌توان از آن‌ها برای تشخیص رقم استفاده کرد.

جدول ٤- اندازه آلل و بارکدهای اختصاص یافته به ارقام غنامی، گنطار، دیری، استعمران، برحی، مجول، زاهدی و پیارم بر اساس داده‌های حاصل از نشانگرهای mPdCIR025، mPdCIR057، mPdCIR070 و PDAG1003

Table 4. Assigned allele sizes and barcodes to the date palm cultivars including Ghanami, Gantar, Deiry, Ostaemran, Barhi, Medjool, Zahedi and Piarum based on scored data of mPdCIR0, mPdCIR057 ،mPdCIR070 and PDAG1003

نام آغازگر Primer name	mPdCIR025				mPdCIR057			mPdCIR070			PDAG1003			Barcode
نام آلل Allele name	a1	a2	a3	a4	b1	b2	b3	c1	c2	c3	d1	d2	d3	
اندازه آلل(جفت باز) Allele size(bp)	265	260	240	225	328	315	300	235	228	218	247	240	230	
غنامی Ghanami	0	2	3	0	0	2	3	0	2	0	0	2	0	0230-003-020-020
گنطار Gantar	0	0	3	0	0	2	3	0	2	0	0	2	0	0030-003-020-020
دیری Deiry	0	0	3	4	0	2	3	0	0	3	0	2	0	0034-003-003-020
استعمران Ostaemran	0	0	3	4	0	2	3	0	2	0	0	2	0	0034-003-020-020
برحی Barhi	1	0	3	0	0	2	3	0	2	0	0	2	0	1030-003-030-020
مجول Medjool	0	0	3	4	1	0	0	0	0	3	1	0	3	0034-020-003-103
زاهدی Zahedi	1	0	3	0	0	2	3	0	2	0	1	2	0	1030-003-020-120
پیارم Piarum	0	2	3	0	1	2	3	1	0	3	0	2	0	0230-103-103-020

بنابراین در این مطالعه از نشانگرهای ریزماهواره به‌دلیل تکرارپذیری بالای نتایج و چندشکلی بالا برای انگشت‌نگاری و تشخیص ارقام استفاده شد. نتایج نشان داد که در صورت دسترسی به ارقام اصیل مورد اطمینان و پاجوش‌های مادری مورد استفاده برای ریزازدیادی خرما، می‌توان از نشانگرهای ریزماهواره جهت تشخیص رقم استفاده کرد. بر اساس نتایج حاصله، پنج آغازگر mPdCIR025، mPdCIR057، mPdCIR070، PDAG1003 و DP175 توانستند ۹ رقم خرما شامل غنامی سبز، غنامی قرمز، گنطار، دیری، استعمران، برحی، مجول، زاهدی و پیارم را از یکدیگر تفکیک کنند. دو رقم پیارم و مجول (که از ارقام مرغوب خرما محسوب می‌شوند) دارای آلل‌های مخصوص به خود بودند که می‌توان از آن‌ها به‌عنوان کلید اختصاصی شناسایی این ارقام استفاده کرد. با ترسیم دیاگرام تفکیک ارقام و قابلیت رجوع به داده‌ها می‌توان در آینده از نتایج این مطالعه برای تفکیک ارقام مذکور استفاده کرد.

References

Abd-Alla, M.M. (2010). Genetic stability on *Phoenix dactylifera* var. Karama produced *in vitro*. *New York Science Journal*, **3:** 70-75.

Ahmed, T.A., Alsamaraee Zaidan, S.A. and Elmeer, K. (2012). Inter-simple sequence repeat (ISSR) Analysis of soma clonal variation in date palm plantlets regenerated from callus. *2nd International Conference on Environment and Industrial Innovation*, Hong Kong.

Al-Ameri, A.A., Al-Qurainy, F., Gaafar, A.R.Z., Khan, S. and Nadeem, M. (2016). Molecular Identification of sex in *Phoenix dactylifera* using inter simple sequence repeat markers. *BioMed Research International*, **1:** 1-5.

Al-Faifi, S.A., Migdadi, H.M., Algamdi, S.S., Khan, M.A., Ammar, M.H., Al-Obeed, R.S. and **Jakse, J**. (2016). Development, characterization and use of genomic SSR markers for assessment of genetic diversity in some Saudi date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. *Electronic Journal of Biotechnology*, **21:** 18-25.

Ali, T.A., Jasim, A.M. and Jubrail, J.M. (2006). The use of RAPDs for the detection of genetic stability of regenerated plantlets of Barhee palm in Iraq. *3rd International Date Palm Conference*, Abu Dhabi, United Arab Emirates.

Al-Khalifah, N.S. (2006). Micro propagation and DNA fingerprinting of date palm trees of Saudi Arabia. *Association of Agricultural Research Institutions in the Near East and North Africa*, Amman, Jordan.

Al-Ruqaishi, I.A., Davey, M., Alderson, P. and Mayes, S. (2008). Genetic relationships and genotype tracing in date palms (*Phoenix dactylifera* L.) in Oman, based on microsatellite markers. *Plant Genetic Resources*, **6(1):** 70-72.

Bader, S.M., Baum, M., Khierallah, H.S. and Choumane, W. (2007). The Use of RAPDs technique for the detection of genetic stability of date palm plantlets derived from *In Vitro* culture of Inflorescence. *Education*, **4:** 151-159.

Elmeer, K. and Mattat, I. (2015). Genetic diversity of Qatari date palm using SSR markers. *Genetics and Molecular Research*, **14(1):** 1624-1635.

Elmeer, K., Sarwath, H., Malek, J., Baum, M. and Hamwieh, A. (2011). New microsatellite markers for assessment of genetic diversity in date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Biotechnology*, **1(2):** 91-97.

Gheitarani, B., Erfani-Moghadam, J. and Fazeli, A. (2020). Evaluation of genetic diversity among some common fig using RAPD and ISSR molecular markers. *Plant Genetic Researches*, **6(2):** 43-54 (In Persian).

Khierallah, H.S.M. (2015). *Applications of Molecular Markers in Date Palm Genome Analysis and Breeding*. Research Signpost, Kerala, IND.

Khierallah, H.S.M., Bader, S.M., Baum, M. and Choumane, W. (2008). Assessment of AFLP variations in date palm in vitro plantlets derived from inflorescence explant. *The 4th Symposium Date Palm*, Abu Dhabi, United Arab Emirates.

Khierallah, H.S., Bader, S.M., Hamwieh, A. and Baum, M. (2017). Date palm genetic diversity analysis using microsatellite polymorphism. *Methods in Molecular Biology*, **1638:** 113-124

Korir, N.K., Han, J., Shangguan, L., Wang, C., Kayesh, E., Zhang, Y. and Fang, J. (2013). Plant variety and cultivar identification: advances and prospects. *Critical Reviews in Biotechnology*, **33(2):** 111-125.

Mardi, M., Torahi, A. and Kavand, A.R. (2010). *Application of Microsatellite Markers for Identification and Registration of Date Palm Cultivars. (Final Report).* Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, IR (In Persian).

MirMohammadi Maibody, S.A.M. and Golkar, P. (2019). Application of DNA molecular markers in plant breeding. *Plant Genetic Researches*, **6(1):**1-30 (In Persian).

Saghai-Maroof, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A. and Allard R.W. (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **81:** 8014-8019.

Saker, M.M., Bekheet, S.A., Taha, H.S., Fahmy, A.S. and Moursy, H.A. (2000). Detection of somaclonal variations in tissue culture-derived date palm plants using isozyme analysis and RAPD fingerprints. *Biologia Plantarum*, **43(3):** 347-351.

Shatha, A.Y., Lina, A.H. and Tagreed, A.A.J. (2014). DNA fingerprinting of some Iraqi date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. *The 5th International Date Palm Conference*, United Arab Emirates.

Zaid, A. and De Wet, P.F. (2002). Date palm propagation. In: Zaid, A., Eds., *Date Palm Cultivation*. pp: 73-105. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Rome, IT.

Application of SSR Markers for Genetic Segregation of Some Commercial Date Palm Cultivars

Mahdi Rezaei[1,*] and Abdoreza Kavand[2]

1- Assistant Professor, Seed and Plant Certification and Registration Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
2- Ph.D., Seed and Plant Certification and Registration Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

(Received: January 7, 2020 – Accepted: November 7, 2020)

Abstract

Cultivar identification in micro-propagated date palm seedlings is laborious so that application of molecular markers to facilitate and acceleration of the procedure seems inevitable. Given the need for control the originality of micro- propagated date palm seedlings, the aim of this study was evaluation of SSR markers usability to cultivar identification in micro-propagated date palm seedlings. Original samples of Green Ghanami, Red Ghanami, Gantar, Deiry, Ostaemran, Barhi, Medjool, Zahedi and Piarum cultivars were used control. Taking into account the rigidity of leaves and subsequently high consumption of liquid nitrogen to powder leaves, an efficient method for powdering of leaves using Tissue Lyser II instrument was optimized. Eight SSR primer pairs were used for polymerase chain reaction. The Results showed that by using these molecular markers and reliable controls, determination of micro- propagated date palm cultivars is feasible. Clustering of cultivars showed that all of them were differentiated using five SSR primer pairs including mPdCIR025, mPdCIR057, mPdCIR070, PDAG1003 and DP175. Also, barcoding of scored band illustrated that c1 allele (230 to 240 bp) for Piarum cultivar and d3 allele (220 to 230 bp) for Medjool cultivar were exclusive. Totally to make the results referable, cultivar identification diagram was drawn up.

Keywords: Specific allele, Cultivar identification diagram, Micro-propagation, Molecular markers, Genetic fidelity

* **Corresponding Author, E-mail: meh.rezaee@areeo.ac.ir**