بررسی تنوع پروتئینی ژنوتیپ‌های زیتون (*Olea europaea* L.) از طریق الکتروفورز پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه

Investigation of Protein Diversity of Olive (*Olea europaea* L.) Genotypes Through Electrophoresis of Seed Storage Proteins

نصیبه شایگان[۱]، علیرضا قنبری[۲*] و ستار طهماسبی انفرادی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۶/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۰۴

چکیده

ذخایر توارثی گیاهی و حفاظت از آنها در امر به‌نژادی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. از نیازهای اساسی توسعه کشت زیتون در کشور، شناسایی و معرفی ارقام سازگار با اقلیم‌های مناطق مختلف می‌باشد. ایران دارای تنوع زیادی در ژنوتیپ‌های زیتون می‌باشد و معرفی و شناخت این تنوع ژنتیکی می‌تواند به‌عنوان راهکاری در جهت توسعه گونه‌ها قرار گیرد. این پژوهش به‌منظور بررسی تنوع پروتئینی ۲۳ ژنوتیپ زیتون، الگوهای الکتروفورتیک پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه انجام شد. نتایج الکتروفورز پروتئین‌های استخراجی، حضور ۱۵ نوار را بر مبنای حرکت نسبی روی ژل آشکار ساخت و سه گروه پلی‌پپتیدی که شامل شش باند تکرارپذیر به‌صورت {P1 (21 K Da), P2 (25 K Da), P3 (28 K Da), P4 (31 K Da), P5 (35 K Da), P6 (45 K Da)} در همه ژنوتیپ‌ها دیده شد و تنها نه باند از آنها در میان ژنوتیپ‌ها چندشکلی نشان دادند. تنوع قابل ملاحظه‌ای در الگوی نه باند پروتئین‌های مورد بررسی بین ژنوتیپ‌ها مشاهده شد. برش دندروگرام حاصل از تجزیه‌ی خوشه‌ای براساس شکل‌های مختلف پروتئینی ژنوتیپ‌ها را در سه خوشه گروه‌بندی کرد. خوشه اول شامل یک ژنوتیپ، خوشه دوم دو ژنوتیپ و بیست ژنوتیپ در خوشه سوم قرار گرفتند.

واژه‌های کلیدی: تجزیه‌ی خوشه‌ای، ذخایر توارثی، تنوع ژنتیکی، پلی‌پپتید، دندروگرام

۱. دانشجوی کارشناسی‌ارشد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۲. دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
۳. استادیار موسسه ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی، تهران، ایران
*: نویسنده مسئول Email: ghanbari66@yahoo.com

مقدمه

زیتون با نام علمی (*Olea europaea* L.) از خانواده Oleaceae می‌باشد. این خانواده گیاهی تقریباً دارای ۲۹ جنس و ۶۰۰ گونه است. زیتون یکی از گیاهان روغنی مهم است که با ویژگی بارزی همچون تحمل زیاد در برابر شرایط نامساعد محیطی، کم توقع بودن، امکان کشت در محدوده وسیع، بالا بودن کیفیت روغن از نظر تغذیه و امکان صادرات به سایر کشورها بسیار مورد توجه است. آگاهی از تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌ها اهمیت زیادی دارد. کاشت ارقام یکنواخت اصلاح شده به‌جای ارقام محلی به تدریج تنوع ژنتیکی را کاهش می‌دهند و این کاهش می‌تواند برای آینده برنامه‌های اصلاحی خطر آفرین باشد. مدتهاست که به‌کارگیری نشانگرهای پروتئینی با استفاده از روش SDS-PAGE برای شناسایی تنوع ژنتیکی بین گونه‌ها، واریته‌ها و ارقام زراعی در گیاهان مورد توجه قرار گرفته است.

این روش برای مقایسه الگوهای پروتئینی ارقام مختلف گیاهی معتبر، قابل تکرار، سریع و ارزان است. حضور یا عدم حضور و سطح بیان باندهای پروتئینی، شاخص مهمی برای شناسایی گیاهان است (*فوفا*[1] و همکاران، 2005؛ *دوراسک*[2] و همکاران، 2003). به علت پایداری پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر[3] در مطالعات طبقه‌بندی شیمیایی کاربرد وسیعی یافته است. بررسی الکتروفورزی پروتئین بذر، تفاوت بسیاری را میان ژنوتیپ‌ها نشان می‌دهد درحالی‌که در داخل ژنوتیپ‌ها یکنواختی مشاهده می‌شود (*کریشنان*[4] و همکاران، 1997). مدل‌های پروتئینی در میان افراد یک جمعیت با جمعیت دیگر برای ارزشیابی تفاوت‌های بین جمعیت‌های مختلف گیاهان استفاده می‌شود که می‌تواند جهت ارزشیابی خلوص مواد ژنتیکی، تفاوت و همگنی آن‌ها مورد توجه قرار گیرد (کینگ اسنورز[5]، 2003). توانایی تفکیک بین دو گونه یا رقم به ویژه در زمان تصمیم‌گیری برای تلاقی بین ارقام، در اصلاح نباتات و نیز در ثبت ارقام حائز اهمیت می‌باشد این تشخیص از اهمیت فزآینده‌ای برخوردار است. در این زمینه، پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر بسیار کارآ بوده، زیرا عوامل محیطی روی پروتئین‌های بذور رسیده بی‌تأثیر و یا کم‌تأثیر هستند، بنابراین پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای نسبتاً قابل اعتمادی مورد استفاده قرار گیرند (*رادیک*[6]، 1998). *کروس*[7] و همکاران (1994) اختلاف بین ارقام مختلف درختان زیتون را با استفاده از صفات فنوتیپی وابسته به تنه، برگ، گل و شکل میوه مورد بررسی قرار دادند. ضعف این روش در تعیین اختلافات بین ارقام این است که صفات مورد بررسی تحت تأثیر تغییرات محیطی قرار می‌گیرند (*موتاسا-کوتگن*[8]، 2000). پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر ضمن داشتن چندشکلی زیاد، بسیار باثبات هستند (*ولی‌زاده*[9]، 2001). از آنجایی‌که عوامل محیطی روی پروتئین‌های بذور رسیده بی‌تأثیر و یا کم‌تأثیر بوده و نحوه توارث آنها به‌صورت همبارز است. با این تفاسیر الگوهای الکتروفورزی پروتئین‌های بذور رسیده چه به تنهایی و یا با سایر نشانگرها معیار خوبی برای شناسایی جوامع مختلف گیاهی و ارقام می‌باشد (عبدمیشانی و بوشهری، ۱۳۹۰). هدف از این پژوهش بررسی تنوع پروتئینی ۲۳ ژنوتیپ زیتون،با استفاده از الگوهای الکتروفورتیک پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه می‌باشد.

شناساگرهای مولکولی نظیر نشانگرهای DNAی و پروتئینی می‌توانند به‌عنوان ابزارهای مفید و تکرارپذیر در شناسایی، تعیین تنوع ژنتیکی و بررسی روابط خویشاوندی ارقام و گونه‌های گیاهی استفاده شوند. الگوی الکتروفورزی پروتئین‌ها می‌تواند باندهایی را به‌عنوان شناساگرهای مولکولی معرفی کند (*کریلی*[10] و همکاران، 2008؛ *تامکوک و ارسلان*[11]، 2010). در این خصوص، بررسی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر و پروتئین‌های جنینی به‌دلیل عدم تأثیرپذیری از نوسان‌های محیطی به‌عنوان تکنولوژی قدرتمندی مورد توجه قرار گرفته‌اند و در شناسایی گونه‌ها و روابط فیلوژنتیک بین آن‌ها مفید می‌باشد (*کریلی* و همکاران، 2008؛ *اقبال*[12] و همکاران، 2005؛ *جاوید*[13] و همکاران، 2004).

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده در این مطالعه ۲۳ ژنوتیپ متفاوت زیتون می‌باشد که از بین درختان کلکسیونی از ژنوتیپ‌های زیتون واقع در باغ طارم (زنجان) انتخاب شدند. این ژنوتیپ‌ها فاقد هرگونه اطلاعات مولکولی مبنی بر شناسایی بودند، از این رو ژنوتیپ‌ها با نام اختصاری Tn و با شماره ۱ تا ۲۳ نام‌گذاری شدند. با پاکت‌گذاری بر روی شاخه‌های موردنظر خودگرده افشانی آن‌ها، کنترل گردید و بنابراین نتایج به‌دست آمده از

1. Fufa
2. Dvoracek
3. Seed Storage Proteins (SSPs)
4. Krishnan
5. Kingsnorth
6. Radic
7. Kruse
8. Mutasa-Göttgens
9. Valizadeh
10. Criley
11. Tamkoc and Arsalan
12. Iqbal
13. Javid

پروتئین ذخیره‌ای بذر معرف ژنوتیپ می‌باشد. به‌منظور استخراج پروتیئن‌های ذخیره‌ای دانه از میوه‌هایی استفاده شد که در اواسط پاییز ۱۳۹۰ در زمان رسیدن میوه‌ها برداشت و در دمای (۲۰-) درجه سانتی‌گراد در فریزر نگهداری شده بودند. از همه درختان مورد نظر، میوه به‌همراه برگ‌های همان شاخه-های حامل میوه برداشت شد و پس از انتقال به آزمایشگاه، شستشو و سپس خشک گردیدند و پس از گرفتن آب آن‌ها، در فریزر (۲۰-) درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برای استخراج پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه از روش *طهماسبی*[1] و همکاران (1998) استفاده شد. بافر استخراج شامل Tris-Hcl (pH=7.4)، Urea 6M، β-Mercaptoetanol (2.5%)، SDS 2%) بود. برای استخراج پروتئین‌ها، ابتدا بذر از پوسته چوبی جدا و سپس به‌وسیله ازت مایع در هاون کوبیده شد. مقدار دو میلی‌لیتر بافر استخراج به آن اضافه و پس از این-که به خوبی سائیده شد محلول حاصل به داخل تیوپ دو میلی‌لیتری منتقل و به‌مدت ده دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد با ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. محتوی رویی شناور جدا و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا قبل از انجام مرحله بعدی نگهداری شد. الکتروفورز در ژل SDS-PAGE براساس روش *لاملی*[2] (1997) که شامل ژل جداکننده ۱۲ درصد و ژل متراکم پنج درصد، انجام گرفت. سپس برای ظاهرسازی باندهای پروتئینی ژل را در کوماسی آبی R-250 رنگ‌آمیزی و در پایان برای وضوح باندهای پروتئینی رنگ‌زدایی ژل انجام شد و سپس از ژل‌ها عکس‌برداری صورت گرفت.

تجزیه آماری داده‌ها

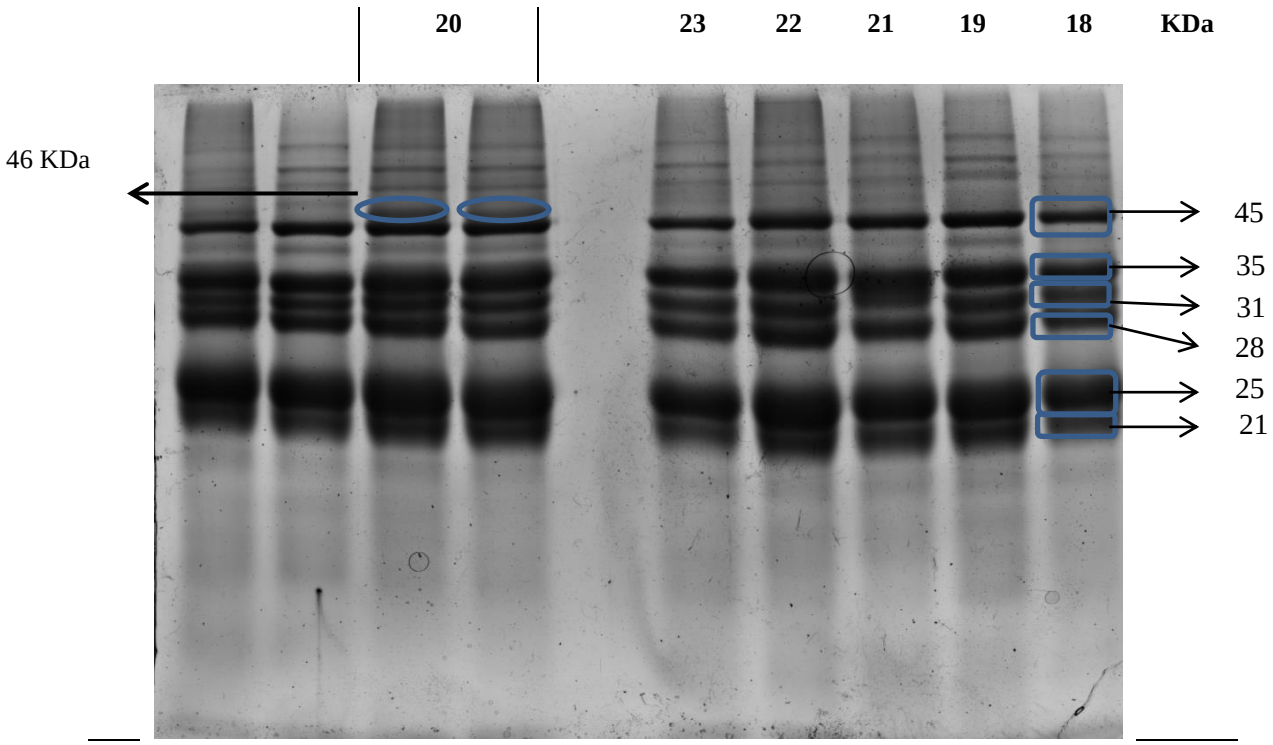
در محاسبه تعداد و مکان باندهای پروتئینی هر نمونه حرکت نسبی هر باند براساس نسبت حرکت باند پروتئینی به حرکت رنگ از ابتدای ژل تعیین شده و با استفاده از منحنی استاندارد وزن مولکول تقریبی هر باند مورد شناسایی قرار گرفت. براساس حضور یا عدم حضور هر باند کدگذاری گردید و با استفاده از قانون جوربندی ساده و ضریب تشابه، تشابه هر نمونه با سایر نمونه‌ها محاسبه و براساس آن ماتریس تشابه برای پروتئین‌ها ترسیم گردید در نهایت آنالیز خوشه‌ای با استفاده از نرم‌افزار SPSS به روش UPGMA و ضرایب تشابه جاکارد انجام و نتایج حاصل به‌صورت دندروگرام نشان داده شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از روش‌های مختلف استخراج پروتئین ذخیره‌ای دانه‌ی زیتون حاکی از آن بود که در روش استخراج *طهماسبی* و همکاران (2008)، که قبلاً در گیاه آفتابگردان مورد بررسی قرار گرفته بود، کلیه باندهای پروتئینی با وضوح بالاقابل رویت بودند (شکل ۱) اما در روش استخراج *وانگ* و همکاران (2007)، به‌وسیله کلروفرم با وجود اینکه کلیه باندهای پروتئینی قابل رویت بودند اما ژل‌ها دارای باندهای غیرقابل تفکیک بودند که این امر باعث گردید وضوح باندهای پروتئینی کاهش یابد و در نتیجه منجر به حذف تعدادی از باندهای پروتئینی محلول در چربی، پلی فنل‌ها و غیره گردید.

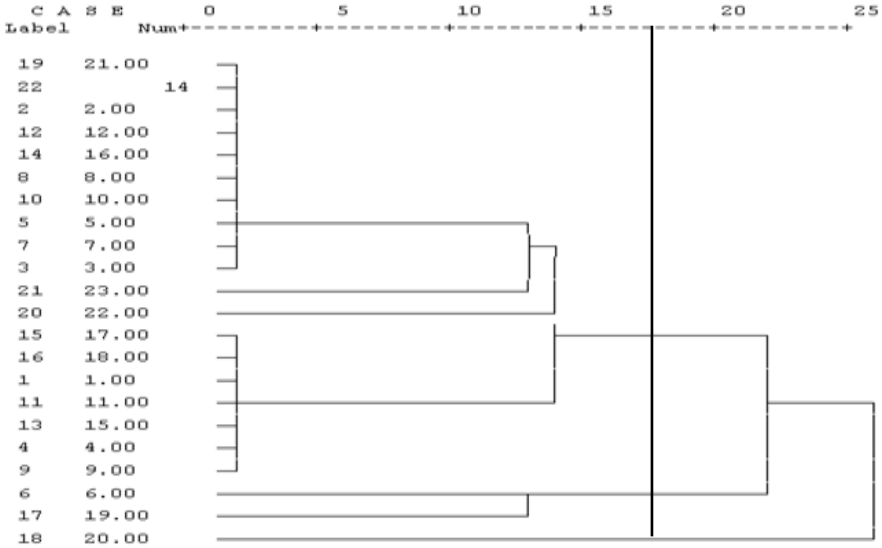
تجزیه‌ی SDS–PAGE پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر موجود در دانه زیتون بالغ در دو تکرار نشان داد که نتایج این فاز تکرارپذیر بوده و ذخیره پروتئین‌های دانه زیتون شامل سه گروه پاکت پلی‌پپتیدی شامل شش باند تکرارپذیر به شرح: {P_1 (21 KD), P_2 (25 KD), P_3 (28 KD), P_4 (31 KD), P_5 (35KD), P_6 (45 KD)} می‌باشند. این نتایج به‌دست آمده مطابق با شکل (۱) به‌عنوان نشانگر پروتئینی استاندارد برای شناسایی ژنوتیپ‌های گیاه زیتون جهت غربال‌گری و شناسایی آنها با سایر گیاهان روغنی کاربرد دارد. در بررسی انجام شده به‌وسیله *وانگ* و همکاران (2007) در شش رقم زیتون تفاوت واضحی در الگوی پروتئینی به‌خصوص از نظر اندازه و اجزای پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه مشخص نگردید و پیشنهاد شد که سنتز پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه در این گونه‌ها کاملاً حفاظت شده می‌باشد. نتایج به‌دست آمده تصدیق این پیشنهاد بود که دانه‌های بالغ زیتون شامل شش باند برجسته به‌ترتیب با درصد ظهور بالا با تکرارپذیری معنی‌دار شامل {P_1 (21 KD), P_2 (25 KD), P_3 (28 KD), P_4 (31 KD), P_5 (35KD), P_6 (45 KD)} هستند که به جزء P_6، کلیه آنها قبلاً با استفاده از آنتی‌بادی و ایمینوبلاتینگ در گیاه زیتون گزارش شده‌اند. در این مطالعه نشان داده شد که پروتئین‌های ذخیره‌ای دانه زیتون از دو قسمت ۴۱ کیلودالتونی و ۴۷/۵ کیلودالتونی تشکیل شده است که به‌وسیله پیوندهای هیدروژنی به یکدیگر متصل شده‌اند. باند ۴۱ کیلودالتونی تولید زیرواحدهای احیاء شده P_2, P_3, P_4 می‌نماید و باند ۴۷/۵ کیلودالتونی تولید باندهای P_1 و P_5 می نماید که این پاکت‌های فشرده از پروتئین ذخیره‌ای، در ژنوتیپ‌های ایرانی نیز مشاهده شد.

1. Tahmasebi
2. Laemmli



شکل ۱: الگوی الکتروفورزی SDS-PAGE پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر ژنوتیپ‌های ۱۸، ۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۲ و ۲۳

Fig. 1: Analysis electrophoresis SDS-PAGE of seed storage proteins in genotypes 18, 19, 20, 21, 22 and 23



شکل ۲: دندروگرام حاصل از تجزیه‌ی خوشه‌ای بر اساس داده‌های پروفایل پروتئین‌ها

Fig. 2: Dendrogram of cluster analysis based on the profile of proteins

در بررسی انجام شده توسط احسانپور و همکاران (۱۳۸۹)، بیشترین میزان باند ۴۵ کیلودالتونی در الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر (لپه‌ها) در رقم احمد آقایی پسته، آن را به‌عنوان شناساگر پروتئینی برای این رقم معرفی نمود. مشابه با مطالعه حاضر، الگوی SDS-PAGE پروتئین‌های بذر به‌عنوان شناساگرهای پروتئینی برای شناسایی و مقایسه ارقام جوی‌دوسر، گونه‌های وحشی آلو (*Prunus*) و گونه‌های Poapratensism و *Triticum aestivum* نیز استفاده شده‌اند (*فوفا* و همکاران، 2005؛ دوراسک و همکاران، 2003؛ *زین-العابدینی*[1] و همکاران، 2008). با توجه به اینکه نوع و میزان پروتئین‌ها در بذرهای بالغ به مراتب ثابت‌تر از سایر بافت‌های گیاهی است (مگنی[2] و همکاران، 2007) بنابراین الگوی پروتئینی دانه‌های زیتون براساس حضور یا عدم حضور باندهای پروتئینی، می‌تواند تنوع ژنتیکی این گیاه را مشخص سازد.

1. Zeinalabedini
2. Magni

نتایج تجزیه‌ی خوشه‌ای حاصل از باندهای پروتئینی نشان داد که برش دندروگرام حاصل از تجزیه‌ی خوشه‌ای براساس باندهای پروتئینی از فاصله ۱۵ واحدی، ژنوتیپ‌ها را به سه خوشه مطابق شکل (۲) گروه‌بندی کرد. نتایج تجزیه‌ی خوشه-ای شکل‌های پروتئین‌ها (شکل ۲) نشان داد که خوشه اول شامل ژنوتیپ شماره (۲۰)، خوشه دوم شامل ژنوتیپ‌های (۱۹ و ۶) و بقیه ژنوتیپ‌ها در خوشه سوم قرار گرفتند. خوشه سوم خود به دو زیر خوشه بزرگ تقسیم گردید. خوشه اول که فقط ژنوتیپ شماره ۲۰ را شامل شد دارای خصوصیات متفاوت از لحاظ بروز باندهای پروتئینی بود (شکل ۱). نتایج تجزیه حضور پروتئین ساختاری با وزن مولکولی ۴۶ کیلودالتون در کلیه ژنوتیپ‌های مورد آزمایش مشاهده نشد اما این باند در T20 در کلیه تجزیه‌های این ژنوتیپ مشاهده گردید و همین عامل مهمترین فاکتور برای گروه‌بندی این ژنوتیپ در خوشه جداگانه بود.

منابع

عبدمیشانی، س. و شاه‌نجات بوشهری، ع. ا. ۱۳۹۰. اصلاح نباتات تکمیلی (دو جلدی)، انتشارت دانشگاه تهران، ۳۵۲ صفحه.

Criley, R. A., Roh, M. S., Kikuchi, M. and Manshardt, R. M. 2008. A comparison of *Gardenia augusta* cultivars using isozymes and RAPD markers. Acta Horticulturae, 766: 461-468.

Dvoracek, V., Curn, V. and Moudry, J. 2003. Suitability of oat-seed storage-protein markers for identification of cultivars in grain and flour samples. Plant, Soil and Environment, 49: 486-491.

Ehsanpour, A. A., Shojaie, B. and Rostami, F. 2010. Using protein markers of embryo and seed storage proteins in identification of four pistachio cultivars. Taxonomy and Biosystematics, 3: 1-10.

Fufa, H., Baenziger, P. S., Beecher, B. S., Dweikat, I., Graybosch, R. A. and Eskridge, K. M. 2005. Comparison of phenotypic and molecular marker-based classifications of hard red winter wheat cultivars. Euphytica, 145: 133-146.

Iqbal, S. H., Ghafoor, A. and Ayub, N. 2005. Relationship between SDS-PAGE markers and *Ascochyta* blight in Chickpea. Pakistan Journal of Botany, 37: 87-96.

Javid, A., Ghafoor, A. and Anwar, R. 2004. Seed storage protein electrophoresis in ground nut for evaluating genetic diversity. Pakistan Journal of Botany, 36: 25-29.

Kingsnorth, C. S., Asher, M. J. C., Keane, G. J. P., Chwarszczynska, D. M., Luterbacher, M. C. and Mutasa-Göttgens, E. S. 2003. Development of a recombinant antibody ELISA test for the detection of *Polymyxa betae* and its use in resistance screening. Plant Pathology, 52: 673-680.

Krishnan, H. B. and Sleper, D. A. 1997. Identification of tall fescue cultivar by Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. Crop Science, 37: 215-219.

Kruse, M., Koenig, R., Hoffmann, A., Kaufmann, A., Commandeur, U. and Solovyev, A. G. 1994. Restriction fragment length polymorphism analysis of reverse transcription-PCR products reveals the existence of two major strain groups of Beet necrotic yellow vein virus. Journal of General Virology, 75: 1835-1842.

Laemmli, U. K. 1997. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 277: 680-685.

Magni, C., Scarafoni, A., Herndl, A., Sessa, F., Prinsi, B., Espen, L. and Duranti, M. 2007. Combined 2-D electrophoretic approaches for the study of white lupin mature seed storage proteome. Phytochemistry, 68: 997-1007.

Mutasa-Göttgens, E. S., Chwarszczynska, D., Halsey, K. and Asher, M. J. C. 2000. Specific polyclonal antibodies for the obligate plant parasite *Polymyxa*–a targeted recombinant DNA approach. Plant Pathology, 49: 276-287.

Radic, H. 1998. Characterization of Spelt (*Triticum spelta*) forms by electrophoretic analyses of seed storage proteins. Comparative analyses of spelt and central European winter wheat cultivars by SDS-PAGE and A-PAGE. Theoretical and Applied Genetics, 91: 1340-1346.

TahmasebiEnferadi, S., Gomez-Sanchez, D., Baldini, M. and Vannozzi, G. P. 1998. Effect of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary culture filtrate on sunflower characters, oxalic acid content and shikimate dehydrogenase activity. AGRIS, 28: 81-96.

Valizadeh, M. 2001. Seed storage protein profile of grain legumes grown in Iran, using SDS-PAGE. Journal of Agricultural Science Technology, 3: 287-292.

Wang, W., De-Dios-Alche J. and Rodriguez-Garcia, M. I. 2001. Characterization of seed storage proteins and their synthesis during seed development in *Olea europaea*. International Journal of Developmental Biology, 45: 63-64.

Wang, W., De-Dios-Alche, J. and Rodriguez-Garcia, M. I. 2007. Characterization of olive seed storage proteins. Acta Physiologiae Plantarum, 29: 439-444.

Investigation of Protein Diversity of Olive (*Olea europaea* L.) Genotypes Through Electrophoresis of Seed Storage Proteins

Shaigan[1], N., Ghanbari[2*], A. and Tahmasebi Enferadi[3], S.

Abstract

Botanical hereditary reserves have special importance in racial direction of plants and preserving them is very important in national and international viewpoint. Recognizing and introducing suitable species for different climates are among essential needs to develop olive cultivation in Iran. There are various olive genotypes in Iran that recognizing and introducing such variety can accelerate genetic basis development of these species. The current study has been performed in order to inspect protein diversity of 23 olive genotypes from the viewpoint of electrophoresis patterns of seed storage proteins. The electrophoresis results of extracted proteins revealed the existence of 15 strips according to proportional movement on gel that three poly-peptide groups have been noticed which had 6 repeatable strips of {P1 (21 KDa), P2 (25 KDa), P3 (28 KDa), P4 (31 KDa), P5 (35 KDa), P6 (45 KDa)} was observed in all genotypes. There were only 9 polymorphism strips among genotypes. The considerable diversity was seen in pattern of 9 bands of protein which were studied. Cluster analysis profile of proteins regrouped them into three clusters included one, two and twenty genotypes in each cluster.

Keywords: Cluster analysis, Germplasm, Genetic diversity, Polypeptide, Dendrogram

1. M.Sc. Student, Department of Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Shahed, Tehran, Iran
2. Associate Professor, Department of Horticultural sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
3. Assistant Professor, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
*:Corresponding author Email: ghanbari66@yahoo.com