

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه کشاورزی پشاور

دانشکده کشاورزی

گروه: باغبانی و گیاه پزشکی

بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ های انتخابی پسته ایستگاه تحقیقات پسته دامغان با نشانگرهای RAPD و ISSR

نگارنده: سمیرا نیشابوری

استاد راهنما :

دکتر مهدی رضایی

اساتید مشاور

دکتر پرویز حیدری

دکتر حسین حکم آبادی

تیر ۱۳۹۷

تقدیر و تشکر

نخستین سپاس و ستایش از آن خداوندی است که بزرگترین امید و یاور در لحظه لحظه زندگیست و به من این فرصت را داد تا به این مرحله از علم رسیده و از هیچ محبتی دریغ نکرد و در تمام مراحل زندگی مرا قوت قلب بود.

با تقدیر و تشکر شایسته از استاد فرهیخته و گرامیم جناب آقای دکتر مهدی رضایی چرا که بدون راهنمایی‌های ایشان تأمین این پایان‌نامه بسیار مشکل می‌نمود.

با سپاس فراوان از اساتید مشاور و گرامیم جناب آقای دکتر حسین حکم‌آبادی و بویژه جناب آقای دکتر پرویز حیدری که به دلیل یاری‌ها و راهنمایی‌های بی چشمداشت ایشان که بسیاری از سختی‌ها را برایم آسانتر نمودند و با احترام فراوان از جناب آقای دکتر امین ابراهیمی که با راهنمایی‌های اندیشمند و علمی خود مرا یاری نمودند، کمال تشکر را دارم.

برای تمامی این بزرگواران آرزوی سلامتی و سعادت روزافزون را از خداوند متعال خواستارم.

تقدیم به:

تقدیم به آنان که وجودم جز هدیه وجودشان نیست. مقدس‌ترین واژه‌ها در لغت‌نامه‌ی دلم، پدر بزرگوارم و مادر مهربانم که زندگیم را مدیون مهر و عطوفت ایشان می‌دانم. آن دو فرشته‌ای که بودنشان تاج افتخاری است بر سرم و نامشان دلیلی است بر بودنم چرا که این دو وجود پس از پروردگار مایه هستی‌ام بوده‌اند، دستم را گرفتند و راه رفتن را در این وادی زندگی پر از فراز و نشیب آموختند. تقدیم به پدر و مادر عزیز و مهربانم که در سختی‌ها و دشواری‌های زندگی همواره یابوری دلسوز و فداکار و پشتیبانی محکم و مطمئن برایم بوده‌اند.

تقدیم به:

برادر و خواهرانم، همراهان همیشگی و پشتوانه‌های زندگیم.

تقدیم به گل‌نازم...

که کودکی گمشده‌ام را در چهره معصومش پیدا کردم.

تقدیم به دوستان عزیز و همراهان واقعی‌ام بویژه خانم مهندس زهرا فتحی

تعهد نامه

اینجانب سمیرا نیشابوری دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته مهندسی کشاورزی - علوم باغبانی دانشکده کشاورزی بسطام دانشگاه شاهرود نویسنده پایان نامه: بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ های انتخابی پسته ایستگاه تحقیقات پسته دامغان با نشانگرهای RAPD و ISSR تحت راهنمایی دکتر مهدی رضایی متعهد می شوم .

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهش های محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافت های آن ها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

تاریخ

امضای دانشجو : سمیرا نیشابوری

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه شاهرود می باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

چکیده

در این پژوهش تنوع ژنتیکی ۴۵ ژنوتیپ پسته شامل ۲۰ ژنوتیپ نر و ۲۰ ژنوتیپ ماده انتخابی به همراه پنج رقم پسته تجاری از کلکسیون بذری ایستگاه تحقیقات پسته دامغان با استفاده از خصوصیات مورفولوژیکی، فنولوژیکی و همچنین دو نشانگر ISSR و RAPD مورد ارزیابی قرار گرفتند. ۱۰ نشانگر مولکولی ISSR در مجموع ۲۲۷ باند تولید کردند که تمام آن‌ها ۱۰۰ درصد چند شکلی نشان دادند. میانگین تعداد باندهای چند شکل ۲۲/۷ باند برای هر نشانگر بود. بیشترین قدرت تفکیک ژنی را نشانگر UBC888 با میزان Rp ۱۴/۷۱ داشت. از ۱۰ نشانگر RAPD ۲۱۳ باند تولید شد که تعداد ۲۰۵ باند از آن‌ها چند شکل بود. میانگین تعداد باندهای چند شکلی برای هر نشانگر ۲۰/۵ باند بود و ۹۵/۹ درصد چند شکلی مشاهده شد. نشانگر BD12 با میزان ۱۳/۶۴ بیشترین Rp را به خود اختصاص داد. برای تعیین روابط بین صفات، ضریب همبستگی میان آن‌ها محاسبه شد. نتایج تجزیه نشان داد که ژنوتیپ‌ها در برخی از صفات مورد مطالعه از قبیل وزن ۱۰۰ دانه و طول میوه، میزان پوکی، خندانی میوه، تاریخ آغاز گلدهی، طول دوره گلدهی، تاریخ برداشت میوه و همچنین صفات ابعادی برگ و طول شاخه سال جاری با داشتن واریانس و ضریب تغییرات بالا، تنوع بیشتری نشان دادند. ژنوتیپ FG18 بیشترین وزن پسته خشک (۱۲۸/۴ گرم) و FG3 بیشترین وزن مغز (۵۱ گرم) و ژنوتیپ نر MG20 طولانی‌ترین دوره گلدهی (۱۱ روز) ژنوتیپ‌های برتر معرفی شدند. ضریب همبستگی صفات بین بسیاری از داده‌های مورفولوژیکی به ویژه خصوصیات کمی اختلاف معنی‌دار و مثبتی نشان داد. تجزیه خوشه‌ای به روش Ward و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی حاصل از سه مؤلفه اول در مجموع با ۵۲/۴۵ درصد، حاصل از داده‌های مورفولوژیکی توانست تنوع بین دو گروه ژنوتیپ‌های ماده و ارقام تجاری را توجیه نماید و تفکیک مناسبی از ژنوتیپ‌های ماده نشان دهد. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA توانست هر سه گروه ژنوتیپ‌های نر و ماده بذری و ارقام تجاری را در شش گروه از هم تفکیک کند، به طوری که ارقام تجاری به جز رقم اکبری و کله‌قوچی بیشتر در بین گروه ژنوتیپ‌های نر مشاهده شدند.

کلمات کلیدی: پسته، داده‌های مورفولوژیکی، UPGMA، تنوع ژنتیکی، نشانگرهای ISSR و RAPD

فهرست مطالب

شماره صفحه

فصل اول مقدمه و کلیات.....	۱
۱-۱-تاریخچه و منشأ پیدایش پسته.....	۴
۲-۱-ارزش اقتصادی.....	۵
۳-۱-گیاهشناسی پسته.....	۷
۴-۱-وضعیت سطح زیر کشت، تولید و عملکرد پسته در ایران و سایر کشورهای جهان.....	۹
۵-۱-ارقام پسته.....	۱۰
۶-۱-ارزش غذایی.....	۱۰
۷-۱-تنوع ژنتیکی.....	۱۱
۸-۱-نشانگرها و انواع آن.....	۱۲
۱-۸-۱-نشانگرهای مورفولوژیک.....	۱۳
۲-۸-۱-نشانگرهای بیوشیمیایی.....	۱۴
۳-۸-۱-نشانگرهای مولکولی در سطح DNA,RNA.....	۱۵
۱-۳-۸-۱-نشانگرهای DNA مبتنی بر هیبریداسیون.....	۱۶
۲-۳-۸-۱-نشانگرهای DNA مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز PCR.....	۱۷
۴-۸-۱-PCR با آغازگرهای اختیاری (تصادفی) RAPD.....	۱۷
۵-۸-۱-نشانگر مولکولی ISSR.....	۱۸
۶-۸-۱-نحوه طراحی آغازگر ISSR.....	۲۰
۹-۱-تجزیه و تحلیل آماری.....	۲۱
۱-۹-۱-روش‌های آماری تعیین فاصله ژنتیکی.....	۲۱
۲-۹-۱-اندازه‌گیری فواصل و تشابه‌های ژنتیکی.....	۲۱
۳-۹-۱-تجزیه‌های چند متغیره آماری.....	۲۲
۴-۹-۱-تجزیه خوشه‌ای.....	۲۲
۵-۹-۱-تجزیه به مؤلفه‌های اصلی.....	۲۳
۶-۹-۱-شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC).....	۲۴
فصل دوم بررسی منابع.....	۲۵
۱-۲-بررسی تنوع ژنتیکی برخی از ارقام پسته با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیک.....	۲۶
۲-۲-بررسی تنوع ژنتیکی برخی از ارقام پسته با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR.....	۲۷
۳-۲-بررسی تنوع ژنتیکی برخی از ارقام پسته با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD.....	۲۹
فصل سوم مواد و روش‌ها.....	۳۵

۳-۱- معرفی منطقه مورد مطالعه	۳۶
۳-۱-۱- موقعیت جغرافیایی شهرستان دامغان و حومه آن	۳۶
۳-۲- نمونه‌های گیاهی و صفات مورد استفاده	۳۷
۳-۳- تعیین کمیت و کیفیت DNA	۴۱
۳-۳-۱- تعیین کمیت و کیفیت DNA با استفاده از نانودراپ	۴۱
۳-۳-۲- تعیین کیفیت DNA توسط ژل آگارز و الکتروفورز افقی	۴۱
۳-۴- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) و اجزای آن	۴۲
۳-۵- آغازگرها	۴۲
۳-۶- بهینه‌سازی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)	۴۳
۳-۷- الگوی دمایی آغازگرها	۴۴
۳-۸- الکتروفورز افقی جهت کیفیت‌سنجی و بارگیری فرآورده‌های PCR	۴۴
۳-۸-۱- آماده‌سازی ژل آگارز و بارگیری محصول PCR	۴۴
۳-۸-۲- خواندن آلل‌ها در جایگاه‌های مورد نظر	۴۵
۳-۹- تجزیه و تحلیل داده‌های مورفولوژیکی	۴۵
۳-۱۰- تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی	۴۶
فصل چهارم نتایج و بحث	۴۷
۴-۱- بهینه‌سازی روش استخراج DNA	۴۸
۴-۲- بررسی تنوع صفات مورفولوژیکی	۴۹
۴-۲-۱- صفات مربوط به آغاز گلدهی و طول دوره گلدهی ژنوتیپ‌های نر پسته و تاریخ برداشت در ژنوتیپ‌های ماده و ۵ رقم تجاری	۴۹
۴-۲-۲- خصوصیات رشدی ژنوتیپ‌های پسته مورد ارزیابی	۵۲
۴-۲-۳- خصوصیات پمولوژیکی میوه در ژنوتیپ‌های ماده	۵۳
۴-۲-۴- همبستگی بین صفات کمی در ژنوتیپ‌های پسته	۵۷
۴-۲-۵- همبستگی بین صفات کیفی پسته	۶۳
۴-۲-۶- تجزیه کلاستر ژنوتیپ‌های ماده به همراه ۵ رقم تجاری بر اساس ۴۱ صفت مورفولوژیکی	۶۵
۴-۲-۷- تجزیه کلاستر ۱۳ صفت رویشی و برای تمامی ژنوتیپ‌ها	۶۸
۴-۲-۸- نتایج حاصل از تجزیه به مولفه‌های اصلی صفات	۷۰
۴-۲-۹- معرفی ژنوتیپ‌های برتر از میان ژنوتیپ‌های مورد بررسی	۷۲
۴-۳- تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای مولکولی	۷۳
۴-۳-۱- بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای RAPD	۷۴

۷۶	۴-۳-۱-۱- رابطه ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های پسته حاصل از داده‌های RAPD
۷۸	۴-۳-۱-۲- گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس نتایج نشانگرهای RAPD
۸۲	۴-۳-۲- بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با استفاده از نشانگرهای ISSR
۸۵	۴-۳-۱-۲- رابطه ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های پسته حاصل از داده‌های ISSR
۸۶	۴-۳-۲-۲- گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس نتایج نشانگرهای ISSR
۹۰	۴-۳-۳- رابطه ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های پسته با استفاده از مجموع نشانگرهای RAPD و ISSR
۹۱	۴-۳-۴- گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس نشانگرهای RAPD و ISSR به طور ترکیبی
۹۵	فصل پنجم نتیجه‌گیری و پیشنهادات
۹۶	۵-۱- نتیجه‌گیری کلی
۹۸	۵-۲- پیشنهادات
۱۰۰	پیوست‌ها
۱۰۴	منابع

فهرست جداول

- جدول ۱-۱: میزان صادرات پسته در سال ۱۳۹۴-۱۳۹۵ از نظر قیمت دلاری و وزنی پسته ۵
- جدول ۱-۳: صفات کیفی رشدی مربوط به درخت بررسی شده در ۴۵ ژنوتیپ پسته ۳۸
- جدول ۲-۳: صفات کیفی برگری بررسی شده در ۴۵ ژنوتیپ پسته ۳۸
- جدول ۳-۳: صفات کیفی مرتبط با میوه بررسی شده در ۴۵ ژنوتیپ پسته ۳۹
- جدول ۴-۳: صفات کمی مرتبط با میوه بررسی شده در ۴۵ ژنوتیپ پسته ۳۹
- جدول ۵-۳: صفات کمی برگری بررسی شده در ۴۵ ژنوتیپ پسته ۴۱
- جدول ۶-۳: آغازگرهای ISSR مورد استفاده در این پژوهش ۴۲
- جدول ۷-۳: آغازگرهای RAPD مورد استفاده در این پژوهش ۴۳
- جدول ۸-۳: شرایط بهینه‌سازی برای PCR آغازگرهای مورد آزمایش ۴۳
- جدول ۹-۳: برنامه دمایی برای تکثیر جایگاه‌های ایجادشده توسط آغازگرهای ISSR ۴۴
- جدول ۱۰-۳: برنامه دمایی برای تکثیر جایگاه‌های ایجادشده توسط آغازگرهای RAPD ۴۴
- جدول ۱-۴: خصوصیات فنولوژیکی مربوط به تاریخ گلدهی و برداشت محصول ۵۱
- جدول ۲-۴: ارزیابی هم‌پوشانی ژنوتیپ‌های نر انتخابی با ۵ رقم تجاری پسته ۵۱
- جدول ۳-۴: تشریح خصوصیات رشدی و کیفی درخت در ۲۰ ژنوتیپ ماده و ۲۰ ژنوتیپ نر و ۵ رقم تجاری پسته ۵۳
- جدول ۴-۴: تشریح خصوصیات کمی و کیفی میوه در ژنوتیپ‌های ماده انتخابی و ۵ رقم تجاری پسته ۵۵
- جدول ۵-۴: ضرایب همبستگی پیرسون بین داده‌های مورفولوژیکی کمی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه ۶۰
- ادامه جدول ۵-۴: جدول ضرایب همبستگی پیرسون بین داده‌های مورفولوژیکی کمی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه ۶۲
- جدول ۶-۴: ضرایب همبستگی پیرسون بین داده‌های کیفی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه ۶۴
- جدول ۷-۴: نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی صفات زراعی-مورفولوژیک ۷۱
- جدول ۸-۴: برخی از خصوصیات پمولوژیکی چند ژنوتیپ برتر ۷۳
- جدول ۹-۴: نتایج حاصل از نشانگرهای RAPD مورد استفاده در بررسی ژنوتیپ‌ها ۷۶
- جدول ۱۰-۴: مقادیر ویژه محاسبه شده برای PCOA بر اساس ماتریس عدم تشابه ۸۱
- جدول ۱۱-۴: نتایج حاصل از نشانگرهای ISSR مورد استفاده در بررسی تنوع ژنوتیپ‌ها ۸۴
- جدول ۱۲-۴: مقادیر ویژه محاسبه شده برای PCOA^۱ بر اساس ماتریس عدم تشابه ۹۰
- جدول ۱۳-۴: مقادیر ویژه به دست آمده برای PCOA بر اساس ماتریس عدم تشابه ۹۳

فهرست شکل‌ها

- شکل ۱-۱- میزان صادرات پسته ایران نمودار سمت راست از نظر ارزش اقتصادی و نمودار سمت چپ از نظر وزنی را نشان می‌دهد (منبع گمرک جمهوری اسلامی ایران). ۶
- شکل ۲-۱- مقایسه وضعیت صادرات پسته ایران و آمریکا از سال ۲۰۰۹ تا سال ۲۰۱۴ (منبع USDA, 2016). ۶
- شکل ۳-۱- برخی از ارقام مهم پسته در ایران (اقتباس <http://www.nahalpistachio.com>) ۱۰
- شکل ۴-۱- ویتامین‌ها و مواد معدنی موجود در ۱۰۰ گرم پسته (منبع، کانال جهانی پسته، pri.ir/pri/pagecontent.phprQV) ۱۱
- شکل ۵-۱- ISSR-PCR : واکنش PCR یک نشانگر تکی با یک موتیف تکراری 8 (AG) (a) غیرلنگردار (b) لنگردار انتهای ۳' (c) لنگردار انتهای ۵' (Segman et al. 2006) ۲۱
- شکل ۳-۱- نقشه موقعیت کلی مکان جمع‌آوری ژنوتیپ‌های بذری پسته شهرستان دامغان ۳۶
- شکل ۴-۱- نمونه ای از الگوی باندهای DNA استخراج شده پسته از چند ژنوتیپ/ از سمت چپ به راست کدهای ژنوتیپ ۴۸
- با نام FG13, FG15, FG16, FG20, شاه‌پسند، کله‌قوچی، MG2, MG3, MG4 و ۴۸
- شکل ۴-۲- دندروگرام مورفولوژیکی ۲۰ ژنوتیپ انتخابی ماده پسته در کنار پنج رقم تجاری پسته بر اساس ۴۱ صفت مورفولوژیکی و فنولوژیکی مربوط به خصوصیات رویشی، برگ و میوه ۶۵
- شکل ۴-۳- دندروگرام مورفولوژیکی ۴۵ ژنوتیپ پسته بذری و ارقام تجاری بر اساس ۱۳ صفت مورفولوژیکی مربوط به خصوصیات رویشی، برگ ۶۹
- شکل ۴-۴- نمودار تجزیه دوبعدی بر مبنای سه مؤلفه اول حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس ۴۱ صفت مورفولوژیکی در ۲۰ ژنوتیپ انتخابی ماده و ۵ ژنوتیپ تجاری ۷۱
- شکل ۴-۵- نمودار تجزیه سه بعدی بر مبنای سه مؤلفه اول حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس ۴۱ صفت مورفولوژیکی در ۲۰ ژنوتیپ انتخابی ماده و ۵ ژنوتیپ تجاری ۷۲
- شکل ۴-۶- قطعات تکثیر یافته DNA با نشانگر OPN11 توسط لدر ۵۰ bp بر روی ژل ۱/۵ درصد که از سمت چپ به راست: لدر، ژنوتیپ‌های FG1, FG2, FG3, FG4, FG5, FG6, FG7, FG8, FG9, چاهک خالی، FG10, FG11, FG12, FG13, FG14, FG15, FG16, FG17 ۷۴
- شکل ۴-۷- میزان فراوانی ضرایب عدم تشابه در ماتریس عدم تشابه بین ژنوتیپ‌های پسته با استفاده از نشانگر RAPD ۷۷
- شکل ۴-۸- نمودار حاصل از تجزیه گروه ای ۴۵ ژنوتیپ پسته با الگوریتم UPGMA با استفاده از ماتریس تشابه داده‌های مولکولی RAPD ۷۹
- شکل ۴-۹- تجزیه دوبعدی ۴۵ ژنوتیپ پسته بر اساس ماتریس عدم تشابه به دست آمده از ۱۰ نشانگر RAPD ۸۲
- شکل ۴-۱۰- قطعات DNA تکثیر یافته توسط نشانگر UBC886 بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. از چپ به راست به ترتیب: لدر و ژنوتیپ‌های MG8, MG9, MG10, MG11, MG12, MG13, MG14, MG15 ۸۳
- شکل ۴-۱۱- میزان فراوانی ضرایب عدم تشابه در ماتریس عدم تشابه بین ژنوتیپ‌های پسته با استفاده از نشانگر ISSR ۸۶

- شکل ۴-۱۲: نمودار حاصل از تجزیه گروه ای با الگوریتم UPGMA با استفاده از ماتریس عدم تشابه داده های مولکولی ۱۰
 پرایمر ISSR ۸۸
- شکل ۴-۱۳: تجزیه دوبعدی ۴۵ نمونه ژنوتیپ های پسته بر اساس ماتریس عدم تشابه به دست آمده از ۱۰ نشانگر ISSR ۸۹
- شکل ۴-۱۴: میزان فراوانی ضرایب عدم تشابه در ماتریس عدم تشابه بین ژنوتیپ های پسته با استفاده از مجموع نشانگرهای
 RAPD, ISSR ۹۰
- شکل ۴-۱۵: نمودار UPGMA بر اساس ضریب عدم تشابه محاسبه شده از داده های ۱۰ نشانگر ISSR و ۱۰ نشانگر RAPD
 به طور ترکیبی ۹۲
- شکل ۴-۱۶: تجزیه دوبعدی ۴۵ نمونه ژنوتیپ پسته بر اساس عدم تشابه دایس به دست آمده از ۱۰ نشانگر ISSR و ۱۰ نشانگر
 RAPD به طور ترکیبی ۹۳

فصل اول

مقدمه و کلیات

مقدمه

پسته (*Pistacia vera* L.) یکی از مهم‌ترین محصولات باغی و صادراتی کشور، معروف به طلای سبز است (Fares *et al.*, 2009) که از اهمیت اقتصادی و تجاری بسیاری برخوردار می‌باشد (نوروزی، ۱۳۸۷). در اقتصاد متکی بر نفت ایران، توجه هر چه بیشتر به این محصول مهم باغی می‌تواند کمک شایان توجهی به بهبود وضع درآمدهای ارزی این کشور نماید (اسفندیاری، ۱۳۸۹). از طرف دیگر سازگاری با شرایط نامساعد محیطی از جمله شوری آب و خاک مقاومت به خشکی و کم آبی سبب گردیده تا به‌عنوان مهم‌ترین محصول اقتصادی جایگاه ویژه‌ای در مناطقی که دارای شرایط نامناسب کشت (بسیاری از مناطق کویری و خشک و در نواحی حاشیه‌ای قابل توصیه است) برای سایر محصولات (زراعی و باغی) هستند، پیدا نماید (Chatti *et al.*, 2017). اگرچه ایران از مهم‌ترین کشورهای تولیدکننده‌ی پسته در دنیاست، اما عملکرد تولید این محصول در مقایسه با سایر تولیدکنندگان عمده‌ی دیگر نظیر آمریکا پایین است. این کاهش عملکرد به دلایل متنوعی از جمله گرده افشانی نامطلوب به علت عدم رعایت تناسب مناسب درختان نر و ماده در باغ، عدم تلقیح به موقع ارقام مختلف پسته و عدم هم‌پوشانی گل‌های نر و ماده به علت نبود رقم مناسب با آن منطقه جغرافیایی و نیز معرفی تعداد انگشت شماری از ارقام تجاری بوده است (اسفندیاری، ۱۳۸۹). ارقام تجاری موجود به‌طور تصادفی و در اثر تفرق صفات ناشی از کشت بذری به‌وجود آمده‌اند. با توجه به هتروزیگوتی شدید پسته، نتایج حاصل از کشت بذور مختلف حتی یک درخت هم دارای صفات و خصوصیات بسیار متنوعی هستند (عوض‌آبادیان و همکاران، ۱۳۹۳). ایران به عنوان یکی از خاستگاه‌های اصلی پسته دارای غنی‌ترین ذخایر ژنتیکی پسته در جهان می‌باشد و به این سبب تنوع و تعداد ارقام پسته ایران در جهان بی نظیر است (Mahmoodabadi *et al.*, 2012; Karimi *et al.*, 2012). پتانسیل لازم برای ایجاد اصلاحات از طریق انتخاب به وجود تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های در حال اصلاح وابسته است (Hormaza *et al.*, 1998). در همین راستا شاید مفیدترین و اساسی‌ترین

ابزار برای درک شناخت هرچه بهتر شباهت‌ها و تفاوت‌های ژنتیکی گیاهان نشانگرهای DNA می‌باشند که تجزیه و تحلیل‌های گوناگون از فیلوژنی تا همسانه کردن ژن‌ها را فراهم می‌کنند. توسعه سریع نقشه‌های ژنتیکی اشباع شده بر اساس نشانگرهای مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، مکان‌یابی یا نشانمند کردن ژن‌های کنترل‌کننده صفات مختلف را امکان‌پذیر ساخته است. انتخاب به کمک نشانگر ابزاری مفید در جهت شناسایی وراثت صفات مهم در طی مراحل اصلاحی درختان میوه می‌باشد (اسفندیاری، ۱۳۸۹). با وجود اطلاعات مفید به‌دست آمده از این نشانگرها در تعیین روابط خویشاوندی، تنوع ژنتیکی و انگشت نگاری ژنوتیپ‌های این گیاه، هرکدام از این روش‌ها محدودیت‌های خاص مربوط به خود را دارند. بنابراین با توجه به کاربرد آسان، سرعت و سادگی نشانگر ISSR (Wang *et al.*, 2012; Shafiey-Astiani *et al.*, 2015) و تحقیقات بسیار اندک در خصوص انگشت نگاری پسته ایرانی و همچنین پسته در دنیا، در این مطالعه از نشانگر ISSR برای انگشت نگاری و شناسایی چندشکلی ژنتیکی بین ارقام پسته ایرانی (*Pistacia vera* L.) استفاده گردید.

اهداف پژوهش حاضر

هدف از انجام این تحقیق بررسی ویژگی‌های پمولوژیکی^۱ این ژنوتیپ‌ها و تعیین میزان قرابت خویشاوندی و تنوع ژنتیکی در بین این ژنوتیپ‌ها می‌باشد. با توجه به اینکه استفاده بهینه از هر گیاه نیازمند درک منطقی و صحیح از سطح تنوع ژنتیکی آن محصول در طبیعت می‌باشد و چنین اطلاعاتی منجر به توجه بیشتر کشاورزان، اصلاح‌کنندگان و دیگر دست‌اندرکاران حفظ منابع گیاهی به مسئله تنوع زیستی شده و از فرسایش ژنتیکی جلوگیری می‌نماید در این تحقیق سعی شد تا با بررسی مولکولی ۴۵ ژنوتیپ موجود در مرکز تحقیقات پسته دامغان، واقع در استان سمنان که ۲۰ ژنوتیپ نر و ۲۰ ژنوتیپ ماده از کلکسیون بذری پسته و ۵ ژنوتیپ محلی از همان مرکز

¹ - Pemological features

تحقیقات جمع‌آوری شدند، زمینه‌ای برای بهبود حفظ تنوع ژنتیکی و رونق اقتصادی کشور فراهم شود، برای ارزیابی میزان تنوع ژنتیکی بخشی از ژرم‌پلاسما پسته و تعیین فاصله ژنتیکی و خویشاوندی ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد نظر، از دو نشانگر مولکولی ISSR و RAPD استفاده شد.

۱- کلیات

۱-۱- تاریخچه و منشأ پیدایش پسته

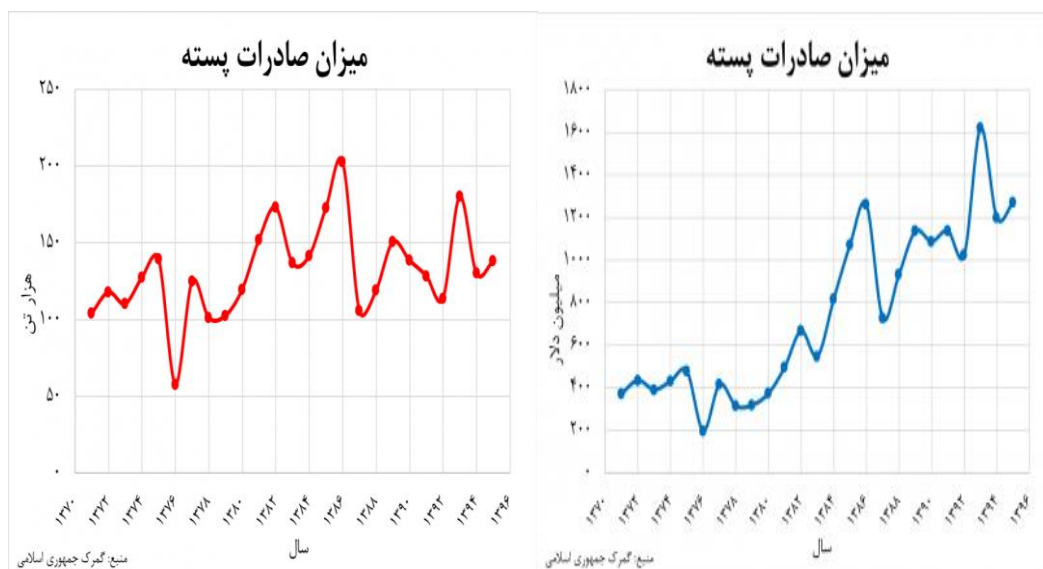
اصطلاح لاتین پسته *Pistacia* از ریشه کلمه فارسی آن *pista* یا *psta* مشتق شده است (اسفندیاری و همکاران، ۱۳۸۹). خاستگاه اولیه پسته به زمان هخامنشیان حدود ۴۰۰۰ تا ۵۰۰۰ سال پیش و نواحی کرمان نسبت داده شده است. تصور می‌شود جنگل‌های وحشی و خودروی پسته در ایران، حدود ۳ الی ۴ هزار سال قبل اهلی شده و مورد کشت و کار قرار گرفته است. سپس از ایران به سایر نقاط جهان بخصوص کشورهای اطراف دریای مدیترانه منتقل گردیده است و اولین نوشته‌ها درباره پسته‌ی دامغان، سمنان و قزوین به قرن هفتم و پسته‌کاری در کرمان به قرن ۱۲ نسبت داده شده است. برخی از محققین منشأ احتمالی پسته را آسیای مرکزی می‌دانند (Zohary, 1952; Whitehouse, 1957, Maghsoudi, 2012). امروزه این ناحیه که محل اصلی رویش این گیاه، شمال شرق ایران، منطقه‌ای بین مرز سه کشور ایران، ترکمنستان و افغانستان (Browicz, 1988; Kafkas, 2006) ناحیه سرخس و مناطق جنوبی می‌باشد. در قرن اول میلادی پسته از سوریه و از طریق رومانی به ایتالیا معرفی شده است و از آنجا به دیگر نواحی غرب مدیترانه گسترش پیدا کرده است (Hormaza et al., 1998). دو مرکز تنوع برای پسته (*Pistacia vera* L.) معرفی شده است، ناحیه اول از ایران تا شرق ترکیه و ناحیه دوم در شمال افغانستان و جنوب ترکمنستان است (نوروزی، ۱۳۸۷). (Whitehouse, 1957)

۱-۲- ارزش اقتصادی

پسته به عنوان یک محصول استراتژیک جایگاه خاصی را در بین تولیدات دارا می باشد. محصول پسته سهم ۹۸ درصدی از کل صادرات خشکبار کشور را دارد (اسفندیاری، ۱۳۸۹). صادرات مانع از محدودیت بازار و رکود تولید می شود و می تواند بازارهای سرمایه، نیروی کار و کالا را رونق بخشد. ارزش اقتصادی و ارزآوری این محصول از سایر محصولات کشاورزی ایران بالاتر بوده و نقش عمده ای در صادرات غیرنفتی داشته به طوری که طبق گزارش وزارت جهاد کشاورزی و گمرک ایران، صادرات پسته به صورت میانگین سالانه حدود ۱/۵ میلیارد دلار درآمد ارزی عاید کشور کرده است. میزان صادرات پسته در سال ۱۳۹۵ مطابق (جدول ۱-۱) و (شکل ۱-۱) برابر با ۱۳۸ هزار تن به ارزش یک میلیارد و ۲۷۱ میلیون دلار بود که بر این اساس ۴۷ درصد از ارزش صادرات محصولات باغی به پسته اختصاص دارد (FAO, 2015). پسته ایران به بیش از ۷۰ کشور جهان صادر می شود و مهم ترین مقاصد پسته ایران هنگ کنگ، ویتنام، امارات، آلمان، هند، قزاقستان، عراق، پاکستان، ترکیه و لبنان است (آمارنامه گمرک جمهوری اسلامی ایران، ۱۳۹۵).

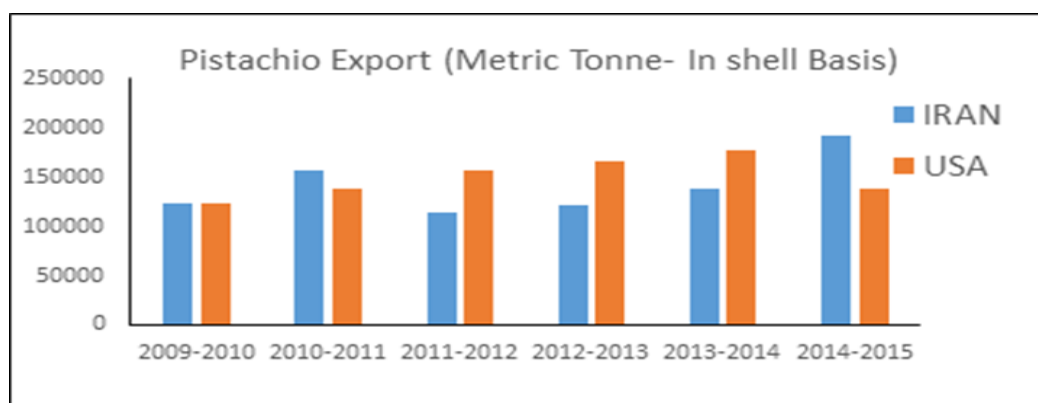
جدول ۱-۱: میزان صادرات پسته در سال ۱۳۹۵-۱۳۹۴ از نظر قیمت دلاری و وزنی پسته

آمار صادرات پسته					
میزان صادرات سال ۱۳۹۵		میزان صادرات سال ۱۳۹۴		درصد تغییر	
هزار تن	میلیون دلار	هزار تن	میلیون دلار	وزنی	دلاری
۱۳۸	۱۲۷۱	۱۳۰	۱۲۰۱	۶۰	۵۰۸



شکل ۱-۱- میزان صادرات پسته ایران نمودار سمت راست از نظر ارزش اقتصادی و نمودار سمت چپ از نظر وزنی را نشان می‌دهد (منبع: گمرک جمهوری اسلامی ایران).

این محصول نه فقط در ایران، بلکه در کشور آمریکا که فعلاً تنها رقیب ایران در تولید و صادرات این محصول است نیز اهمیت ویژه‌ای دارد، به‌طوری‌که صادرات پسته، ارزش افزایی بالاتری نسبت به سایر محصولات کشاورزی این کشور داشته است (گزارش وزارت کشاورزی آمریکا (USDA)، 2015). ایران تا سال ۲۰۱۱، بزرگ‌ترین تولیدکننده پسته جهان به شمار می‌آمد، اما از سال ۲۰۱۲، آمریکا در تولید و صادرات این محصول از ایران پیشی گرفت (شکل ۱-۲). اما آنچه مشخص است اینکه دو کشور تا ۸۰ درصد تولید پسته جهان را در اختیاردارند و جایگاه رتبه اولی تولید و صادرات بین این دو کشور مرتب در حال تغییر است (FAO, 2014).



شکل ۱-۲- مقایسه وضعیت صادرات پسته ایران و آمریکا از سال ۲۰۰۹ تا سال ۲۰۱۴ (منبع: USDA, 2016).

۱-۳- گیاه‌شناسی پسته

درخت پسته اهلی با نام علمی *Pistacia vera* از شاخه فانرگامه^۱، زیرشاخه آنژیوسپرم^۲، رده دولپه‌ای‌ها^۳، زیررده جداگلبرگان^۴، راسته سپندالز^۵، تیره آناکاردیاسه Anacardiaceae است (Zohary, 1952; Baghizadeh, 2010). جنس *Pistachio* دارای عدد کروموزومی $n=2x=30$ است (Zohary, 1996). (تقی زاد و همکاران، ۱۳۹۰). درخت پسته‌ی اهلی، گیاهی نیمه گرمسیری است و گونه‌های مورد استفاده در ایران: *P. vera* (پسته معمولی)، *p. motica* (پسته وحشی یا بنه)، *p. khinjuck* است (تقی زاد و همکاران، ۱۳۹۰)، (Ehsanpour et al., 2008). گیاهان این خانواده دارای ۷۵ جنس و ۶۰۰ گونه است که بیشتر در مناطق بین استوایی تا معتدله پراکنده است (تقی‌زاد و همکاران، ۱۳۹۰). جنس *Pistachio* دارای ۱۱ گونه است، برخی از گونه‌ها، دارای ترشحاتی مانند تربانتین یا سقز می‌باشند. این محصول در سال ۱۷۳۷ میلادی توسط فردی به نام (لینه) از اسپانیا تحت نام علمی (آناکاردیاسی) (Anacardiaceae) نام‌گذاری شده است. محصول پسته دارای سال‌آوری است. پسته گیاهی خزان کننده (گونه‌های موجود در ایران)، به بلندی و ارتفاع ۲ - ۵ متر (بلندی درختان پیر تا حدود ۱۰ متر) می‌رسد، گیاهان این تیره به‌صورت درخت یا درختچه و دارای برگ‌های مرکب شانه‌ای ۳ تا ۵ برگچه‌ای و بدون گوشوارک می‌باشند و هر برگ یک جوانه جانبی را در برمی‌گیرد. گل‌آذین درخت پسته به‌طور کلی خوشه‌ای است و در گروه نر که گل‌های آن فاقد گلبرگ است، به یکدیگر فشرده و متراکم هستند. گل‌های ماده دارای یک تخمدان و یک تخمک هستند، ولی کلاله منشعب و دارای سه شاخه است. پرچم‌ها به تعداد دو برابر گلبرگ یا معادل تعداد آن‌ها است، در بعضی از گیاهان نیز گل‌ها، فقط شامل یک پرچم زایا است. گل‌ها بدون گلبرگ و کاسبرگ حقیقی هستند (Zohary, 1952) بنابراین زنبورعسل را به خود جلب نمی‌کند و گرده گل توسط باد پراکنده

1- Phanergamae
2- Angiosperm
3- Dicotyledonea
4- Choripetales
5- Sapindales

می‌شوند. هر گل نر مشتمل بر ۵ پرچم بیضی‌شکل با میله کوتاه سبزرنگ است. اکثر جوانه‌های جانبی به گل‌آذین اولیه مبدل می‌شوند که در سال بعد خوشه پسته را تولید می‌کنند. نیاز سرمایی درختان پسته، بسته به رقم متفاوت بوده و در ارقام پسته ایران رقم کله‌قوچی پایین‌ترین نیاز سرمایی (۶۰۰ ساعت) و رقم اکبری بالاترین نیاز سرمایی (۱۲۰۰ ساعت) را داراست (حکم‌آبادی، ۱۳۹۰). ارقام احمدآقایی و فندق‌ی بین این دو رقم قرار دارند. عدم تأمین نیاز سرمایی در پسته سبب کاهش رشد رویشی، تولید برگ‌های غیرطبیعی، تأخیر در گل‌دهی و میزان عملکرد پایین می‌شود. درخت پسته برخلاف بادام و گردو جزء درختان دوپایه است (Kebour et al., 2012). جنین گیاه خمیده و درشت است، رشد ریشه درخت پسته به‌صورت محوری و عمودی است و تا عمق بیش از دو متر در داخل خاک فرو می‌رود. از ۱۰ تا ۱۲ سالگی باردهی کامل و اقتصادی درخت آغاز می‌شود. بنابراین باغدار اقدام به کاشت گیاهان مناسب در فاصله بین درختان پسته می‌کند. از گیاهان زراعی مناسب و متداول در کشت مخلوط می‌توان گندم، جو، یونجه، چغندر، شلغم، منداب و زعفران را نام برد. در گیاهان باغی می‌توان انگور، انار، بادام، زردآلو و سیب را نام برد. درخت پسته عادت به رشد عمودی دارد. از نظر گیاه‌شناسی میوه پسته در ردیف میوه‌های شفت طبقه‌بندی می‌شود و معمولاً محتوی یک‌دانه است (نوروزی، ۱۳۸۷). تفاوت میوه‌های شفت در بخش خوراکی آن‌ها است. در پسته و بادام، هسته (مغز) به‌صورت خوراکی می‌رسد، درحالی‌که سایر میوه‌جات شفت (زردآلو، هلو)، هسته سخت دارند و میان‌بر گوشتی بخش خوراکی میوه است. میوه در زمان نارس بودن سبزرنگ و سپس به رنگ کرم درمی‌آید. آندوکارپ در هنگام رسیدن میوه از نوک به‌صورت طولی شکافته می‌شود (نوروزی، ۱۳۸۷). پس‌یل معمولی پسته، مهم‌ترین آفت پسته است که باغداران به آن شیرۀ خشک می‌گویند. فاصله مناسب بین دو ردیف ۶-۸ متر و روی پشته ۳-۴ متر توصیه می‌شود. هرس باردهی پسته شامل هرس تنک شاخه، هرس سر برداری و حذف پاجوش است. پیوند اسکنه‌ای و پیوند شکمی از قدیم‌الایام در ایران کاربرد داشته، که به‌تدریج کنار گذاشته شده است. هم‌اکنون استفاده از پیوند لوله‌ای به دلیل سادگی، سرعت

عملیات و درصد بالای جوش خوردن بین پایه با پیوندک رواج یافته و ۹۹ درصد درختان پسته با استفاده از این روش تکثیر می‌شوند. زمانی که درصد پوست رویی میوه پسته به راحتی از پوست سخت استخوانی جدا شود، زمان برداشت فرارسیده است.

۱-۴- وضعیت سطح زیر کشت، تولید و عملکرد پسته در ایران و سایر

کشورهای جهان

بررسی میزان تولید پسته کشور نشان می‌دهد که تولید این محصول از ۶۰۰۰ تن در سال ۱۹۶۱ به ۴۷۲۰۰۰ تن در سال ۲۰۱۱ رسیده است (FAO, 2015). در سال ۱۳۹۵ سطح زیر کشت باغ‌های پسته ایران ۴۵۷ هزار هکتار (۹۸ هزار هکتار نهال، ۳۵۹ هزار هکتار بارور)، که میزان تولید آن‌ها به ۳۰۴ هزار تن و عملکرد به ۸۴۷ کیلوگرم در هکتار رسید (آمارنامه باغی وزارت جهاد کشاورزی، ۱۳۹۵). همچنین در این گزارش بیشترین سطح زیر کشت و تولید مربوط به استان کرمان (حدود ۲۰۰ هزار هکتار و ۹۲ هزار تن) بود، ضمن اینکه کشت و کار پسته در سایر استان‌های کشور مانند استان سمنان، سیستان و بلوچستان و قم در حال گسترش است (خبرگزاری کشاورزی ایران، مسعود خضری، ۲۰۱۳). طبق آخرین آمارهای فائو مربوط به سال ۲۰۱۴، تولید پسته کل دنیا به ۸۵۸ هزار تن رسید. کشورهای ترکیه و سوریه مهم‌ترین کشورهای تولیدکننده پسته بعد از ایران و آمریکا هستند. مطابق آخرین آمارنامه فائو، سطح زیر کشت پسته کشور ترکیه حدود ۵۳ هزار هکتار و کشور سوریه حدود ۴۰ هزار هکتار است. مطابق گزارش USDA، کشور ترکیه در سال ۲۰۱۴ - ۲۰۱۵، حدود ۸۵ هزار تن و کشور سوریه ۵۷ هزار تن و کشور چین ۷۵ هزار تن پسته تولید کرده‌اند. هرچند ایران از نظر تولید و صادرات پسته در جایگاه مناسبی قرار دارد، اما عملکرد پسته در واحد سطح بسیار پایین‌تر از کشور رقیب یعنی آمریکا است. کشت و کار پسته در کشور استرالیا، برخی کشورهای اروپایی مانند اسپانیا، ایتالیا و یونان و برخی کشورهای آفریقایی مانند تونس و مغرب هم انجام شده است (FAO, 2016).

۱-۵- ارقام پسته

اکبری، کله‌قوچی، احمدآقایی، اوحدی، بادامی زرند، ممتاز، خنجری دامغان، شاه‌پسند، سفیدپسته‌نوق و قزوینی از مهم‌ترین ارقام پسته در ایران محسوب می‌شود. ارقام مهم و صادراتی پسته شامل اکبری، کله‌قوچی، احمد آقایی، فندق و بادامی است (شکل ۱-۳)، که برداشت این محصول در ارقام و مناطق مختلف از مرداد تا مهر بر اساس زودرسی و دیررسی صورت می‌گیرد. از این ارقام ذکرشده رقم اکبری دارای بالاترین ارزش تجاری و اقتصادی می‌باشد. رقم اوحدی هم یکی از گسترده‌ترین ارقام تجاری است (پناهی و همکاران، ۱۳۸۲)

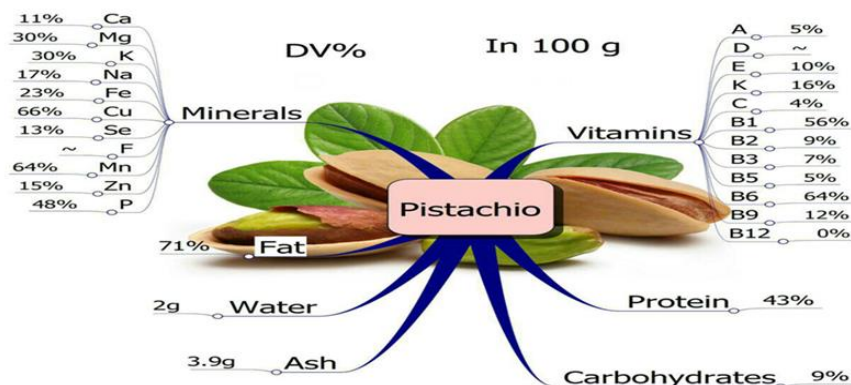


شکل ۱-۳- برخی از ارقام مهم پسته در ایران (اقتباس <http://www.nahalpistachio.com>)

۱-۶- ارزش غذایی

دانش امروز برتری‌های پسته را از پاره‌ای جهات بر بسیاری از خوراکی‌های مقوی و مغذی ازجمله خاویار، گوشت قرمز و سفید، انواع حبوبات، کنجد، انجیر، کشمش، گردو، فندق، بادام، به اثبات رسانیده است (تاج‌آبادی پور، ۱۳۷۶). در بسیاری از منابع از پسته به‌عنوان خوراکی خون‌ساز یادشده است و به میزان زیادی آهن قابل‌جذب دارد. ترکیب مغز پسته بر اساس نوع رقم، مرحله رسیدن و زمان برداشت محصول می‌تواند متفاوت باشد. مصرف آگاهانه آن در سلامتی انسان می‌تواند تأثیر بسزایی داشته باشد، چه اینکه در برخی موارد مضر بوده و بایستی از خوردن آن پرهیز نمود. هر انس از مغز خشک پسته (هر انس برابر ۲۸/۳۵ گرم است) حاوی ۱۶۰ کالری است. پسته مانند اکثر محصولات گیاهی کلسترول ندارد و یک منبع غنی از پروتئین محسوب می‌شود. مقادیر بالایی از

ویتامین B1 (تیامین) و B6 (پیرودوکسین) در پسته موجود است (شکل ۱-۴). پسته همچنین حاوی مقادیر بالایی از مس، منگنز، فسفر و به نسبت زیادی منیزیم، پتاسیم و آهن است و البته دارای مقادیر نسبتاً کمی از کلسیم، روی، و سلنیم می‌باشد. اسیدهای چرب ضروری موجود در پسته لینولئیک اسید و آلفا لینولئیک اسید است.



شکل ۱-۴- ویتامین‌ها و مواد معدنی موجود در ۱۰۰ گرم پسته (منبع، کانال جهانی پسته. pri.ir/pri/pagecontent.phprQV)

نسبت اسید چرب امگا ۶ به امگا ۳ در پسته حدود ۷۵ به ۱ است. بعضی از محققان بر این باورند نسبت بالای امگا ۶ به امگا ۳ در وعده غذایی موجب تحریک التهاب بدن انسان می‌شود که یکی از مضرات خوردن پسته به حساب می‌آید. برای اثبات این موضوع تحقیقات بیشتری مورد نیاز است (پورقیومی، ۱۳۹۶).

۷-۱- تنوع ژنتیکی^۱

تنوع ژنتیکی جز بنیادی تنوع زیستی است که به همه ویژگی‌های ژنتیکی در ساختار ژنتیکی یک گونه اشاره دارد و در افراد داخل یک جمعیت و یا جمعیت‌های مختلف یک گونه بیانگر وضعیت تکاملی آن گونه است. منابع تنوع ژنتیکی عبارت‌اند از: توده‌های وحشی جمع‌آوری شده از طبیعت، توده‌های موجود در مجموعه‌های ژرم‌پلاس (بانک ژن و باغ گیاه‌شناسی)، ارقام اولیه بومی و نژادهای

^۱ -Genetic diversity

سرزمینی قدیمی و ارقام رایج مورد استفاده است. ارزیابی تعیین تنوع ژنتیکی معمولاً بر اساس نشانگرهای فنوتیپی، بیوشیمیایی (پروتئین و آیزوایمها)، سیتوژنتیکی (انواع نواریندی کروموزومی و سیتوژنتیک مولکولی) و مولکولی (نشانگرهای DNA^۱ مبتنی بر PCR و غیرمبتنی بر PCR) انجام می‌گیرد. هر یک از این نشانگرها دارای نقاط قوت و ضعفی هستند که می‌بایست در موقع مناسب از آن‌ها استفاده شود.

۸-۱- نشانگرها^۲ و انواع آن

هر صفتی که بین افراد جمعیت متفاوت باشد، یا به عبارتی هر آنچه میان افراد، لاین‌ها، جمعیت‌ها، گونه‌ها، نژادها و یا سویه‌های مختلف تفاوت ایجاد کند و سبب تمایز آن‌ها از یکدیگر می‌شود به‌عنوان نشانگر ژنتیکی شناخته می‌شود که ناشی از تفاوت موجود بین ردیف DNA کروموزوم‌های آن‌هاست که به نتاج نیز منتقل می‌شود (Chauhan & Kumar, 2015). به‌صورت علمی، شاید مندل نخستین کسی بود که نشانگرهای مورفولوژی یا نشانگرهای مبتنی بر فنوتیپ را برای مطالعه چگونگی توارث صفات در نخودفرنگی استفاده کرد (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶). شاید اساسی‌ترین و مفیدترین این ابزارها نشانگرهای DNA باشند که امروزه اطلاعات به‌دست‌آمده از نشانگرهای DNA کاربردهای زیادی ایجاد کردند، که عمده‌ترین آن‌ها در پزشکی قانونی، تشخیص بیماری‌های گیاهی و انسانی، قرنطینه‌ی گیاهی، پژوهش‌های ژنتیک تکاملی و فیلوژنتیک^۳، طبقه‌بندی موجودات زنده و اصلاح نباتات است (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶).

^۱ Deoxyribo Nucleic Acid (DNA)

^۲ Markers

^۳ Phylogenetics

به‌طور کلی نشانگرهای ژنتیکی در سه گروه تقسیم می‌شوند:

۱- گروهی که بر اساس تنوعات به وجود آمده می‌توانند قابل‌مشاهده باشند مانند صفات مورفولوژیکی و صفات زراعی که به نشانگرهای مورفولوژیکی^۱ مشهورند (Chauhan and Kumar, 2015).

۲- گروهی که بر اساس تنوعات محصول ژن (پروتئین) شناسایی و معرفی می‌شوند، که می‌توانند بازتابی از تنوع موجود در سطح ژنوم باشند و به نشانگرهای بیوشیمیایی^۲ مشهورند (Chauhan and Kumar, 2015).

۳- گروهی که بر اساس تنوع تفاوت‌های موجود در ردیف بازی DNA قابل‌شناسایی می‌باشند که درواقع توارث در سطح ژنوم را نشان می‌دهند و به نشانگرهای مولکولی مشهورند (Chauhan and Kumar, 2015).

۱-۸-۱- نشانگرهای مورفولوژیک

برخی از تفاوت‌های موجود در توالی DNA در صفات ظاهری و قابل‌رؤیت تجلی پیدا می‌کنند که نشانگر مورفولوژیک نامیده می‌شوند. قبل از شناسایی و معرفی روش‌های نوین مارکرهای مولکولی، در ارزیابی روابط بین ژنوتیپ‌ها در یک گونه خاص، غالباً صفات مورفولوژیک نقش عمده را ایفا می‌نمودند. نشانگرهای مولکولی و صفات مورفولوژی هر دو می‌توانند تکمیل‌کننده یکدیگر باشند. گزارش‌های مختلف مبنی بر ارتباط توأم صفات مورفولوژیکی و مولکولی با استفاده از روش‌های آماری بیان‌شده است (Martinez et al., 2004). درواقع اولین نشانگرها در ارزیابی تنوع میان جمعیت‌ها، صفات مورفولوژیکی می‌باشند. کارایی این نشانگرها با وجود کم‌هزینه و آسان بودن آن‌ها، به علت وابستگی بالای صفات با شرایط محیطی، چندشکلی کم، توارث پذیری کم و بیان پایین، تحت تأثیر قرار می‌گیرد که منجر به ارزیابی نادرست آن‌ها می‌شود و درنهایت کاربرد این نشانگر را محدود

¹-Morphologyic Markers

²-Biochemical Markers

می‌کند (Smith and Smith, 1992). از دیگر معایب این نشانگرها که می‌توان به آن‌ها اشاره کرد: اغلب دارای توارث غالب و مغلوب بوده و آثار اپیستازی و پلیوتروپی دارند، فراوانی و تنوع کمی دارند. تحت تأثیر شرایط محیطی و مرحله رشد موجود قرار می‌گیرند. گاهی برای مشاهده و ثبت آن‌ها باید تا زمان ظهور آن‌ها منتظر ماند. این کار در مورد گیاهان چندساله بسیار مشکل است (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶).

۱-۸-۲- نشانگرهای بیوشیمیایی

نشانگرهای بیوشیمیایی در واقع نشانگرهای پروتئینی هستند که محصول نهایی ژن‌های ساختاری می‌باشند و درواقع بازتابی از تنوع موجود در سطح ردیف بازی ژنوم هستند. اساس این تکنیک آنزیمی است و یک روش نسبتاً ارزان و قدرتمند برای اندازه‌گیری فراوانی آلل‌ها برای یک ژن خاص می‌باشند (Chauhan and Kumar, 2015). از آنجایی که محصولات از روی قطعه‌ای از DNA ساخته می‌شوند، لذا در برگیرنده همه تغییرات در تنوع ژنتیکی در سطح DNA نیستند. معمول‌ترین نشانگرهای پروتئینی آیزوایم‌ها^۱ و آلوزایم‌ها^۲ می‌باشند. آیزوایم‌ها به‌طور کلی شکل‌های مشابهی از آنزیم‌ها هستند و آلوزایم‌ها شکل‌های متفاوت از آنزیم‌های مشابه هستند که این تفاوت‌ها نتیجه تنوع آللی موجود در سطح آنزیم می‌باشد (Tanksley and Orton, 1983). نشانگرهای پروتئینی، تفاوت‌ها را در سطح ردیف و عمل ژن و به‌صورت نشانگرهای هم‌بارز نشان می‌دهند. این نشانگرها تحت تأثیر تغییرات پس از ترجمه بوده و تظاهر کمی از آنزیم‌ها و پروتئین‌ها تحت تأثیر مرحله رشد گیاه قرار می‌گیرند (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶). از نکات منفی دیگر نشانگرهای پروتئینی، این است که تعدادشان محدود بوده، چندشکلی و تفاوت قابل ثبت در آن‌ها چندان زیاد نیست، پیچیدگی فنوتیپ‌های الکتروفورزی، که به دلیل دخیل بودن آنزیم‌های مرکب از چند پلی‌پپتید مستقل، در ترکیب برخی از آیزوایم‌هاست، امتیازبندی را دشوار می‌کند.

^۱ - Isozymes

^۲ - Allusions

۱-۸-۳- نشانگرهای مولکولی در سطح DNA, RNA^۱

نشانگر مولکولی می‌تواند با یکی از تعاریف زیر شناخته شود:

- یک کروموزوم مشخص یا آلی که امکان ردیابی ناحیه بخصوصی از DNA را فراهم می‌کند.
 - ژنی که معمولاً با بیان فنوتیپی به آسانی تشخیص داده می‌شود، که برای شناسایی یک قطعه مشخص، سلول حامل آن، یا پروب برای علامت‌گذاری هسته، کروموزوم و یا جایگاه به کار می‌رود.
 - قطعه مشخصی از DNA که جایگاه آن بر روی ژنوم تعیین شده است.
- این نوع نشانگرها در توالی‌های DNA و در نقاط خاصی قابل‌شناسایی هستند، و قابل توارث از یک نسل به نسل دیگر می‌باشند (Semagn *et al.*, 2006). این نشانگرها تحت تأثیر محیط، آثار غالبیت، اپیستازی و پلیوتروپی قرار نمی‌گیرند. تفاوت در بین افراد در شرایط محیطی یکسان، بازتاب تفاوت‌های موجود در ردیف‌های DNA هستند. نشانگرهای مولکولی بر اساس نوع روش آشکارسازی آن‌ها که می‌تواند روش هیبریداسیون^۲ اسیدهای نوکلئیک یا روش‌های مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) و یا ترکیبی از هر دو باشد، توانایی ارزیابی یک یا چند مکان ژنومی را دارند، بنابراین توانایی تشخیص حضور یا عدم حضور یک آلل را برای یک مکان ژنی دارند. تشخیص حالت‌های هتروزیگوت برای آلل‌های مشابه بستگی به نوع نشانگر مولکولی مورد استفاده دارد. نشانگرهایی که توانایی تشخیص مکان‌های هموزیگوت را از هتروزیگوت دارا می‌باشند، نشانگرهای هم‌بارز نامیده می‌شوند (Mondini *et al.*, 2009). کشف انواع آنزیم‌های محدود کننده توسط (Smith & Wilcox, 1970)، همچنین کشف واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) توسط (Mollis., 1983)، فرصت مناسبی را برای بررسی تنوع و تفاوت موجودات مختلف در سطح DNA امکان‌پذیر کرده است، علاوه بر RFLP^۳ که هنوز هم از قدرتمندترین و معتبرترین نشانگرهای DNA است، انواع دیگری از نشانگرهای DNA با تفاوت‌های زیادی از نظر فن و روش تولید، نحوه کاربرد، امتیازبندی، تجزیه و تحلیل و تفسیر نتایج

^۱ - Ribo Nucleic Acid (RNA)

^۲ - Hybridization

^۳ - Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

به سرعت ابداع و معرفی شدند که برای محصول پسته هم مورد کاربرد قرار گرفته‌اند. Parfitt *et al.*, (1997). این آنزیم‌ها، آنزیم‌های بسیار اختصاصی هستند که ردیف‌های ویژه‌ای را روی مولکول DNA شناسایی کرده و آن‌ها را از محل خاصی برش می‌دهند. شناسایی واحدهای تاکسونومیک^۱ در سطح گونه و تعیین ویژگی‌های منحصربه‌فرد آن، اطلاعات بالارزشی را برای حفاظت ژرم‌پلاسما^۲، سیستماتیک^۳، اکولوژی و تکامل گونه به ما می‌دهد. به دلیل وجود تکنیک‌های مختلف مولکولی و تفاوت آن‌ها در اصول و دقت موردنیاز در روش کار یکی از انواع نشانگرها برای انجام کار تحقیقاتی انتخاب می‌شود.

۱-۳-۸-۱- نشانگرهای DNA مبتنی بر هیبریداسیون

این دسته از نشانگرهای DNA بدون استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تولید و مورد استفاده قرار می‌گیرند. از بین نشانگرهای DNA، چندشکلی‌های ناشی از تفاوت در طول قطعه‌های برش‌یافته (RFLP)، اولین نشانگرهایی بودند که برای نقشه‌یابی ژنوم انسان توسط (Botstin *et al.*, 1980) و پس از آن برای نقشه‌یابی ژنوم گیاهان مورد استفاده قرار گرفته‌اند. RFLP اولین بار توسط (Grodziker *et al.*, 1974) جهت بررسی نژادهای جهش‌یافته آدنوویروس مورد استفاده قرار گرفت. این نشانگر از توارث هم‌بارز و تکرارپذیری بالایی برخوردار است و به‌خوبی توانایی آشکارسازی تفاوت‌های بین دو گونه مشابه را داراست، اما به دلیل نیاز به DNA باکیفیت بالا (Potter and Jones, 1991; Roy *et al.*, 1992; Yung *et al.*, 1992)، مواد رادیواکتیویته گران‌قیمت و سمی (Yu *et al.*, 1993) و وقت‌گیر بودن، امروزه کاربرد وسیعی ندارند. این محدودیت‌ها در این گروه از نشانگرها باعث شده است که روش‌هایی با پیچیدگی کمتر مانند نشانگرهای مبتنی بر PCR توسعه یابند.

¹ - Taxonomic

² - Germplasm

³ - systematic

۱-۸-۳-۲- نشانگرهای DNA مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز PCR

این نشانگرها با بهره‌گیری از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در آن‌ها، نیاز به کاوشگر و در نتیجه دورگ‌گیری در آن‌ها، حذف می‌شود. این گروه از نشانگرها از توالی الیگونوکلوئوتیدی به‌عنوان آغازگر برای تکثیر قطعه خاصی از DNA استفاده می‌کنند. پس از کشف واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز توسط (Molys et al., 1983) نشانگرهای زیادی معرفی و ابداع گردید. PCR یک تکنیک بیولوژی مولکولی برای تکثیر تعداد زیادی قطعات کوچک DNA بدون نیاز به موجود زنده می‌باشد. نشانگرهای موجود در این گروه، در طول و توالی آغازگرها، سختی شرایط PCR و روش‌های جداسازی و آشکار کردن قطعات باهم‌دیگر فرق دارند. نشانگرهای ^۱RAPD، ^۲AFLP، ^۳ISSR و ^۴SSR از جمله نشانگرهایی است که در این گروه ذکر می‌شوند. از مزایای مهم تکنیک PCR نسبت به روش‌های بر پایه هیبریداسیون می‌توان به حذف مواد رادیو اکتیویته، توانایی تکثیر DNA در نقاط محافظت‌شده، تکرارپذیری بالا، نیاز به مقدار کم DNA و عدم نیاز به زمان طولانی و هزینه زیاد، اشاره کرد (Wolf and Lison, 1998).

۱-۸-۴- PCR با آغازگرهای اختیاری (تصادفی) RAPD

از اواسط دهه ۱۹۸۰ انتخاب و تعیین هویت ژنوم با کمک نشانگرهای مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به سرعت پیشرفت کرد. نشانگر RAPD یکی از متداول‌ترین آن‌هاست (Hosseinzadeh et al., 2012) که در مطالعه تنوع ژنتیکی پسته کاربرد دارد (Kafkas et al., 2002). این تکنیک بر مبنای تکثیر قطعات تصادفی DNA انجام می‌شود و نیازی به اطلاع از توالی DNA الگو نیست (Maciel et al., 2001). از مزایای این روش آسانی کار، ارزان بودن آن در مقایسه با سایر روش‌ها، نیاز نداشتن به آگاهی قبلی از توالی ژنوم و درصد چندشکلی بالای آن است (Williams et al., 1993). با توجه به تمام مزایای ذکرشده، معایب این نشانگر عبارت است از

^۱ -Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

^۲ -Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

^۳ - Inter-simple Sequence Repeat

^۴ -Simple Sequence Repeat

تکرارپذیری و هم‌بارز نبودن، البته بخش زیادی از باندهای RAPD در صورتی که آزمایش با دقت لازم تکرار شود، تکرارپذیری بالایی دارند و همچنین نتایج مطمئنی به دست می‌آید (Carcia *et al.*, 2002). در این روش از آغازگرهای منفرد با ۱۰ نوکلئوتید و با دست کم ۵۰ درصد محتوای GC استفاده می‌شود. DNA چندشکلی تکثیر یافته تصادفی (RAPD)، که برای نخستین بار توسط ویلیامز و همکاران، (۱۵۴۶) معرفی شد. مهم‌ترین زمینه‌های کاربردی این نشانگرها شامل: تشخیص ارقام زراعی و همسانه‌ها، نقشه‌یابی ژنتیکی، گزینش به کمک نشانگر، ژنتیک جمعیت و رده‌بندی مولکولی در سطح گونه‌ها می‌باشد. به‌منظور تکثیر قطعات PCR نامشخص از DNA ژنومی الگو، از آغازگرهایی با توالی‌های نوکلئوتیدی اختیاری استفاده می‌شود (Williams *et al.*, 1990, Pezhman mehr and Baghizadeh, 2008). SCAR یک روش نشانگری جدید مشتق شده از نشانگر RAPD است که توانست بر چندین عیب عمده که جز جدانشدنی نشانگرهای RAPD می‌باشد، غلبه کند. این نشانگرهای جدید با همسانه‌سازی و توالی‌یابی قطعه‌های RAPD همراه بوده و بدین منظور آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی درازی (۲۴ نوکلئوتیدی) طراحی می‌شوند که با انتهای قطعه RAPD اولیه مکمل می‌باشند. تا به حال سه دسته اصلی از PCR با آغازگرهای تصادفی قابل تشخیص و تمایز می‌باشند.

۱-۸-۵- نشانگر مولکولی ISSR

پس از کشف واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در سال ۱۹۸۳، نشانگرهای مولکولی بر پایه PCR به سرعت توسعه یافتند. در سال ۱۹۹۰، نشانگری به نام "Inter-simple sequence repeat" (ISSR) توسط گروهی از محققان معرفی شد (Meyer *et al.*, 1993; Gupta *et al.*, 1994; Zitzke *et al.*, 1994). ISSR-PCR فنی است که از توالی‌های ریزماهواره به‌عنوان آغازگر در واکنش پلی‌مراز برای ایجاد نشانگرهای چندژنی استفاده می‌کند. نشانگر ISSR به گروه نشانگرهای چندمکانی تعلق دارد، اغلب نشانگرهای ژنتیکی مانند چندشکلی طول قطعات تکثیر یافته (AFLP)، چندشکلی تکثیر

یافته تصادفی (RAPD) و دیگر مشتقات آن‌ها بارز^۱ هستند. نشانگرهای هم‌بارز^۲ به‌طور واضح تمایزات بین هموزیگوت‌ها و هتروزیگوت‌ها را آشکار نمی‌سازند. البته از این مارکرهای ذکرشده هم پیش‌ازاین برای ارزیابی تنوع ژنتیکی پسته و رابطه ژنتیکی بین آن‌ها مورد استفاده قرار گرفته است (Golan-Goldhirsh *et al.*, 2004; Katsiotis *et al.*, 2003; Ibrahim *et al.*, 2007).

ISSRها شامل تکثیر یک قطعه DNAی موجود در فاصلهٔ تکثیرپذیر میان دو ناحیهٔ تکراری ریزماهورای منحصربه‌فرد با جهات مخالف می‌باشد. تکنیک ISSR-PCR، اغلب مزایای ریز ماهورها (SSR) ها و تفاوت طول قطعات حاصل از تکثیر (AFLP) را با عمومیت DNA چندشکلی تکثیرشده تصادفی (RAPD)، در هم می‌آمیزد. از دیگر مزایای این نشانگرها، چندشکلی فراوان، توانایی شناسایی تمامی تغییرات و تنوع موجود در سراسر ژنوم، روشی آسان و با قدرت تکرارپذیری بالاتر نسبت به نشانگر RAPD (تقی‌زاد و همکاران، ۱۳۹۰) در زمان مشابه و همچنین هزینه و زمان کمتر نسبت به نشانگر AFLP را دارند. با توجه به مزیت‌های نشانگر ISSR، این نشانگر بیشترین کاربرد و برتری را در مطالعات شناسایی تنوع ژنتیکی (Wang *et al.*, 2012; Shafiey-Astiani *et al.*, 2015) انگشتنگاری DNA^۲ (Shin *et al.*, 2006) و فیلوژنتیکی (Iruela *et al.*, 2002) دارا است. برای این روش آغازگری طراحی می‌شود که توالی آن دارای قسمتی از توالی SSR و قسمتی از توالی آن بازهای اختیاری مورد استفاده باشند. PCR به‌طور هم‌زمان قطعات مختلف بخش‌های نزدیک SSRها را که دارای چندشکلی بالایی هستند، تکثیر خواهد کرد. این تکنیک کاربرد جالبی در ژنتیک گیاهی دارد، خصوصاً برای مطالعات تنوع و مطالعات ژنتیکی جمعیت در گونه‌های گیاهی که هیچ‌گونه اطلاعی از توالی آن در دسترس نمی‌باشد (بابائیان جلودار و همکاران، ۱۳۸۷).

¹ Dominant

² Non Dominant

۱-۸-۶- نحوه طراحی آغازگر ISSR

یک آغازگر ISSR معمولاً دارای طولی در حدود ۲۵-۱۶ جفت باز^۱ (bp) است و به طور معمول شامل موتیف‌های DNA تکراری (۲-۴ جفت باز)، مکمل نواحی ریز ماهواره در ژنوم می‌باشد. اساس تکثیر این نوع نشانگر معمولاً بازهای متصل (۲ تا ۴ بازی) به انتهای ۳' یا ۵' می‌باشد. با توجه به کاربرد این نوع نشانگر، سه شکل از آغازگرهای ISSR وجود دارد: غیرلنگردار^۲، (آغازگر شامل یک موتیف تکراری می‌باشد، مانند ۵'-(AC)₈-3')، انتهای ۵' لنگردار شده، (آغازگر شامل یک موتیف تکرار شده متصل به یک یا چند نوکلئوتید غیر موتیف در انتهای ۵' می‌باشد، مانند 5'_GA (AC)₈-3')، و انتهای ۳' لنگردار، (آغازگر شامل یک موتیف تکرار شده متصل به یک یا چند نوکلئوتید غیر موتیف در انتهای ۳' مانند ۳'-(AC)₈GA-5') است. شکل (۱-۵).

(Reddy *et al.*, 2002)، برای مطالعاتی که هدف ارزیابی تنوع ژنتیکی است، به استفاده از آغازگرهای ISSR که دارای اتصالات تکراری توکلئوتیدی در انتهای ۵' یا ۳' خود هستند، توصیه می‌کنند. معمولاً این نوع آغازگرها چندشکلی فراوانی را نشان می‌دهند (Blair *et al.*, 1999). نشانگرهایی که دارای اتصال انتهای ۳' هستند الگوی باندی واضح‌تری نسبت به اتصال انتهای ۵' نشان می‌دهند (Tsumora *et al.*, 1996). عموماً نشانگرهایی با تکرارهای (AG)، (GA)، (CT)، (TC)، (AC) و (CA) چندشکلی‌های بالاتری را نسبت به تکرارهای (AT) که تمایل زیاد به خود اتصالی دارند، نشان می‌دهند.

^۱ - Base Pairs

^۲ - Non- anchored

روش‌های آماری گوناگونی می‌توان فواصل یا تشابه‌های ژنتیکی بین دو ژنوتیپ، جمعیت یا فرد را بسته به نوع داده‌ها محاسبه کرد. از معمول‌ترین روش‌های بررسی فاصله ژنتیکی یا تشابه ژنتیکی برای داده‌های مولکولی می‌توان به ضریب تشابه جاکارد (Jacquard, 1912)، تطابق ساده (Sokal et al., 1958) و دایس اشاره کرد.

۱-۹-۳- تجزیه‌های چند متغیره آماری

یکی از بهترین راهکارهای طبقه‌بندی ذخایر توارثی و تجزیه و تحلیل روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها، استفاده از الگوریتم‌های آماری چند متغیره است. این تکنیک‌ها امروزه به‌طور گسترده‌ای برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی داده‌های مختلف از قبیل داده‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و نشانگرهای مولکولی کاربرد دارند، از بین این الگوریتم‌ها تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بیشتر از سایر روش‌ها حائز اهمیت می‌باشند.

۱-۹-۴- تجزیه خوشه‌ای

هدف اولیه تجزیه خوشه‌ای^۱، گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس صفات مختلف می‌باشد که می‌تواند روشی مؤثر در تعیین روابط ژنوتیپ‌ها و یا تعیین فاصله خویشاوندی آن‌ها باشد. در این نوع تجزیه ژنوتیپ‌های مشابه بر اساس صفات مورد بررسی در یک خوشه واحد کنار هم قرار می‌گیرند. در نتیجه ژنوتیپ‌هایی که در یک گروه قرار می‌گیرند دارای شباهت زیاد و افرادی که در گروه جداگانه قرار می‌گیرند ناهمگن هستند. در بین روش‌های تجزیه خوشه‌ای، بیشتر از الگوریتم‌های مبتنی بر فاصله استفاده می‌شود. در روش‌های مبتنی بر فاصله، ماتریس فاصله به‌عنوان ورودی و خروجی به‌صورت درختچه‌ای ارائه می‌گردد در این میان الگوریتم $UPGMA^2$ و حداقل واریانس (Ward) بیشترین کاربرد را برای تجزیه خوشه‌ای دارند. هرچند سایر روش‌ها توسط برخی از محققین برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی به‌کاربرده می‌شود.

¹ - Cluster analysis

² -Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

۱-۹-۵- تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی یکی دیگر از تکنیک‌های چند متغیره محسوب می‌شود. این تکنیک را می‌توان برای نمایش دوبعدی پراکنش افراد به کار برد. تجمع افراد در یک ناحیه از نمودار، تشابه ژنتیکی آن افراد را در آن جمعیت نشان می‌دهد. از روش ^۱PCA می‌توان برای کاستن حجم داده‌ها به منظور آشکار ساختن روابط بین دو یا چند متغیر و توجیه تغییرات کل داده‌های اصلی و اولیه به وسیله تعداد محدودی از متغیرهای جدید مستقل به نام مؤلفه‌های اصلی استفاده کرد. کاهش حجم داده‌ها به وسیله تبدیل خطی داده‌های اصلی به متغیرهای مستقل جدید (مؤلفه‌های اصلی) انجام می‌گیرد.

به طوری که بیشترین مقدار تغییرات داده‌های اولیه توسط اولین مؤلفه و بیشترین مقدار تغییرات باقی‌مانده توسط مؤلفه دوم و بعد از آن توجیه می‌شود. لازم به ذکر است که هر مؤلفه تغییراتی را توجیه می‌کند که توسط مؤلفه‌های قبلی بیان نشده باشد. به علت مستقل بودن مؤلفه‌ها از یکدیگر، هر مؤلفه نشان‌دهنده خصوصیات متفاوتی از داده‌های اصلی می‌باشند و به صورت مستقل از یکدیگر هم باید تفسیر شوند. در صورتی ۲ تا ۳ مؤلفه‌ی نخست تغییرات بیشتری را توجیه می‌کنند که همبستگی میان متغیرها بیشتر باشد، و هر چه همبستگی پایین‌تر باشد نشان‌دهنده تصادفی بودن این متغیرها است. اگر سه مؤلفه نخست کمتر از ۰/۲۵ تغییرات را توجیه نماید، نمودارهای دوبعدی و سه‌بعدی برای گروه‌بندی داده‌ها ناکارآمد بوده چراکه همبستگی میان این سه مؤلفه بسیار پایین خواهد بود و مؤلفه‌های دیگر، بخش بسیاری از تغییرات را توجیه کرده‌اند و نمودارهای دوبعدی و سه‌بعدی دسته‌بندی قابل قبولی را انجام نداده ولی این رویداد نشان می‌دهد که نشانگرهای مولکولی در سطح ژنوم پراکنش خوبی خواهند داشت.

^۱ - Principal Component Analysis (PCA)

۱-۹-۶- شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)

به منظور بررسی کارایی نشانگرها در تمایز بین ژنوتیپها، از شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی استفاده می‌شود. ^۱ PIC چندشکلی حاصل نشانگرها یا مکان‌های ژنی تکثیرشده توسط هر نشانگر را محاسبه می‌کند. در این شاخص، تنها موردی که حائز اهمیت می‌باشد، چندشکلی‌های درون هر نشانگر است و تعداد آلل‌های تولیدشده توسط هر نشانگر تأثیری در برآورد نخواهد داشت. محتوای اطلاعات چندشکلی (شاخص PIC) با استفاده از فرمول زیر محاسبه می‌شود:

$$PIC = 2f_i (1 - f_i)$$

در این فرمول f_i فراوانی قطعه (آلل) تکثیرشده در یک مکان مشخص و $1 - f_i$ فراوانی عدم وجود آلل (فاقد نوار) می‌باشد (Roldin-Day *et al.*, 2000).

¹ Polymorphism Information Content

فصل دوم

بررسی منابع

۲- بررسی منابع

۲-۱- بررسی تنوع ژنتیکی برخی از ارقام پسته با استفاده از نشانگرهای

مورفولوژیکی

اولین گام در زمینه بهنژادی پسته، دستیابی به منابع ژنتیکی آن، بررسی تنوع ژنتیکی و روابط ژنتیکی بین ارقام می‌باشد. ارزیابی تنوع ساختار ظاهری (مورفولوژیکی) درون یک توده‌بذری پسته رقم بادامی ریز زرد و همبستگی بین ویژگی‌های بذرها با دانهال‌های حاصل از آن‌ها توسط ۲۰ صفت کمی در ۶۷ نمونه خشک میوه و دانهال‌های حاصل از کشت توسط (نصراله پورمقدم و همکاران، ۱۳۹۳) بررسی شد. نتایج نشان داد که همبستگی معنی‌دار و مثبتی بین ابعاد خشک میوه و مغز و همچنین ارتفاع دانهال‌ها با قطر طوقه وجود دارد. با استفاده از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های مورد بررسی در سه گروه جداگانه گروه‌بندی شدند. در مجموع نتایج این پژوهش نشان داد که در پسته رقم بادامی ریز زرد به رقم یکسان بودن والد مادری در بذرهای استفاده شده از یک توده‌بذری، تنوع ساختار ظاهری بالایی وجود دارد. تنوع ژنتیکی ۲۰ اکوتیپ پسته که از جنوب تونس جمع‌آوری شده بود توسط (Chatti et al., 2017) و با استفاده از پارامترهای مورفولوژیکی برگ تنوع بین آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت و بررسی آن‌ها به برجسته نمودن سطح نسبتاً بالایی از تنوع و ارتباط فیلوژنتیک کمک بزرگی کرد، علاوه بر این تجزیه و تحلیل مؤلفه اصلی و UPGMA (روش گروه جفت نشده با میانگین ارقام) که اختلاف بین اکوتیپ‌های مختلف را در سراسر نمونه‌های مورد مطالعه بررسی می‌کند. این تغییرات صفات برگ در میان گونه‌هایی که در یک محیط نسبتاً همگن کشت شده‌اند ممکن است نتیجه انطباق با شرایط محیطی متنوع خروج در منطقه توزیع *Pistacia vera.L* باشد. تجزیه و تحلیل واریانس نشان داد که به‌طور کلی، پارامترهای استفاده شده برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در نمونه‌های مورد مطالعه بسیار موفق بود، به‌استثنای پارامتر مورفولوژیکی قطر درخت (PD) که نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری بین اکوتیپ‌ها نبود، در کل سایر تفاوت‌های بسیار مهمی را نشان داد

بررسی تنوع ژنتیکی ارقام پسته در استان کرمان توسط (Baghizadeh et al., 2012) که بر اساس صفات مورفولوژیکی و با استفاده از تجزیه و تحلیل خوشه‌ای انجام گرفت و تفکیک پذیری خوبی از ژنوتیپ‌ها ارائه داد. در مطالعه (رستمی کیا و همکاران، ۱۳۸۸) برای ارزیابی تنوع ژنتیکی بنه (گونه پسته وحشی) در شهرستان خلخال، تعداد شش رویشگاه و در هر رویشگاه ۲۰ پایه از درختان بنه انتخاب شدند و نمونه‌های برگ و میوه جمع‌آوری گردید. هفت صفت برگ و هفت صفت میوه مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند. داده‌های به دست آمده تجزیه و تحلیل شدند و برای تعیین روابط بین صفات، ضریب‌های همبستگی میان آن‌ها محاسبه شد. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که مناطق مورد مطالعه از نظر کلیه صفات به جز طول برگ اختلاف معنی داری در سطح ۱ درصد دارند. تنوع و روابط بین صفات رویشی در دانه‌های حاصل از هیبرید طبیعی بنه باغی به عنوان یک پایه در پسته توسط (صادقی سرشت و همکاران، ۱۳۹۳) به منظور بررسی تنوع و همبستگی بین صفات مورفولوژیکی آزمایشی بر روی ۱۰۸ دانه‌های بنه باغی حاصل از یک توده بذری طراحی شد و ۱۴ صفت مورفولوژیکی از جمله تیپ رویش اولیه، طول و قطر ساقه، ابعاد برگ و برگچه، تعداد برگچه و دوصفت فیزیولوژیکی ارزیابی شد و بر اساس نتایج به دست آمده در بین دانه‌های بنه باغی تنوع مورفولوژیکی بالایی مشاهده شد و در هر دو تیپ رشدی همبستگی مثبت و معنی داری بین صفات مرتبط با قدرت رشد دانه‌ها همچون ارتفاع، تعداد برگ، قطر و شاخص سبزینه‌ی مشاهده شد.

۲-۲- بررسی تنوع ژنتیکی برخی از ارقام پسته با استفاده از نشانگر

مولکولی ISSR

اولین مطالعاتی که با استفاده از نشانگر ISSR بر روی گونه‌های کشت‌شده متمرکز بود در سال ۱۹۹۴ منتشر شد (Wolfe & Liston, 1998). در بررسی تنوع ژنتیکی ۱۹ توده پسته ایرانی که با استفاده از ۲۰ نشانگر ISSR مورد ارزیابی قرار گرفت که از این تعداد ۱۰ نشانگر باندهای تکرارپذیر مناسبی ایجاد کردند. در این بررسی درمجموع ۱۱۴ قطعه DNA (مکان ژنی) تکثیر و امتیازبندی

شدند که از میان آن‌ها ۷۳ قطعه حدود ۶۴ درصد چندشکلی نشان دادند. میانگین محتوای چندشکلی اطلاعات (PIC) برای نشانگرهای مورد استفاده از حداقل ۸۵ درصد تا حداکثر ۹۱ درصد متغیر بود. در این تحقیق نشانگر ISSR برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و تهیه‌ی شناسنامه مولکولی کامل برای تمام توده‌های پسته مورد مطالعه مناسب تشخیص داده شد. به‌منظور ارزیابی تفاوت‌ها و شباهت‌های ژنومی بین ارقام از ضریب تشابه جاکارد استفاده شد (تقی‌زاد و همکاران، ۱۳۹۰). تنوع ژنتیکی در بین ۲۰ ژنوتیپ پسته نر و ۳۶ ژنوتیپ ماده با استفاده از نشانگر ISSR توسط (Farzad Amirebrahimi et al., 2017) مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع ۱۷۸ باند DNA با استفاده از ۱۲ آغازگر تکثیر شدند و ۱۶۹ باند آن پلی‌مورفیک بود. محتوای اطلاعات پلی‌مورفیسم (PIC) بین ۱۶ تا ۳۵ درصد متغیر بود و ژنوتیپ‌های پسته با استفاده از تجزیه خوشه‌ای به ۵ دسته اصلی تقسیم شدند.

در تحقیق دیگری که برای مطالعه پلی‌مورفیسم ژنتیکی پسته در نواحی الجزایر با استفاده از نشانگر ISSR صورت گرفت. در این تحقیق ارتباط ژنتیکی بین ۱۰ گونه با استفاده از ۶ آغازگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت و در مجموع ۱۱۱ باند که تعداد ۶۰ باند آن حدود ۵۴/۰۴ درصد آن‌ها پلی‌مورفیک بودند که متوسط میانگین باند تکثیرشده در هر نشانگر ۷ باند بود (Kebour et al., 2012). به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۲۵ ژنوتیپ ماده پسته از ۱۷ نشانگر ISSR استفاده گردید. با استفاده از این نشانگرها ۱۴۸ قطعه DNA تکثیر شد که از بین آن‌ها تعداد ۱۲۳ قطعه (۸۳ درصد) چندشکلی بودند. نتایج این تحقیق نشان داد که نشانگر ISSR برای شناسایی ژنوتیپ‌های ماده پسته و تهیه شناسنامه مولکولی کامل برای توده‌های پسته ایرانی مناسب است (ارجمند قهستانی و همکاران، ۱۳۹۴). در پژوهشی روابط ژنتیکی بین ۳۱ رقم پسته با استفاده از ۴ جفت آغازگر اختصاصی ریز ماهواره (SSR) و ۱۰ آغازگر تصادفی RAPD و ۳ آغازگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش تعداد ۸۴ باند قابل امتیازدهی با میانگین ۸/۴ توسط نشانگر RAPD تولید شد، به‌طوری‌که ۵۹/۵۲ درصد از آن‌ها چندشکلی بودند. با استفاده از نشانگر ISSR تعداد ۲۸ باند با میانگین ۹/۳ تولید شد که ۴۶/۴۲ درصد آن‌ها چندشکل بودند و در مجموع ۴ نشانگر SSR هم ۱۱ آلل را در میان ۳۱ ژنوتیپ

پسته با میانگین ۲/۷۵ تولید کرد که در تمام جایگاه‌ها ۱۰۰ درصد چندشکلی مشاهده شد. برای بررسی ارتباط ژنتیکی گونه‌های پسته مدیریتانه‌ای از نشانگرهای RAPD و ISSR استفاده کردند که طبق نتایج آن‌ها، همبستگی بالایی بین ماتریس‌های شباهت حاصل از دو نشانگر مشاهده گردید (Golan-Goldhirsh *et al.*, 2004).

نتایج نشان داد که نشانگرهای RAPD سپس ISSR و SSR بیشترین قابلیت تفکیک‌پذیری ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را دارند. نشانگرهای ISSR و SSR به دلیل باندهایی با تکرارپذیری بیشتر معتبرترند و نشانگر ISSR بر RAPD ترجیح داده می‌شود (نوروزی و همکاران، ۱۳۸۷). در طی مطالعه‌ای با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و نشانگر ISSR به بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های پسته پرداختند که در این بررسی نشانگر ISSR، نقش مؤثری در تعیین چندشکلی مولکولی و بررسی ارتباط ژنتیکی در مطالعات ژرمپلاسم پسته نشان داد (Fares *et al.*, 2009). در پژوهش (Noroozi *et al.*, 2009) روابط ژنتیکی ۳۰ رقم ماده پسته اهلی و یک ژنوتیپ نر با استفاده از نشانگرهای ISSR بررسی و مشخص شد که تنوع ژنتیکی نسبتاً پایینی در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه وجود دارد، با وجود این نشانگر مورد استفاده این تنوع را به‌وضوح نشان داد.

۲-۳- بررسی تنوع ژنتیکی برخی از ارقام پسته با استفاده از نشانگر مولکولی

RAPD

تا چندین سال قبل، به‌منظور ارزیابی و مقایسه‌ی ژنوتیپ‌ها و ارقام با یکدیگر، از نشانگرهای مورفولوژیکی مانند شکل میوه و برگ، اطلاعات شجره‌ای و نشانگرهای پروتئینی استفاده می‌شد. اما از اواسط سال ۱۹۸۰ شناسایی ژنومی و انتخاب با استفاده از فناوری نشانگرهای مبتنی بر PCR توسعه یافت که از میان آن‌ها RAPD بیشترین کاربرد را در مورد پسته، داشته است (تقی زاد و همکاران، ۱۳۹۰). (Williams *et al.*, 1990).

کارهای مولکولی کمی در رابطه با بررسی فیلوژنی و تنوع ژنتیکی پسته انجام شده بود، تا اینکه کارهایی توسط هارمازا^۱، پارفیت^۲ و بادنس^۳، پرل-تروز^۴، کفکاس^۵ و گلدهریس در این رابطه صورت گرفت. هارمازا الگوی خویشاوندی بین ۲۹ کالتیوار پسته را با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD مورد بررسی قرارداد، نتایج این تحقیق حاکی از این بود که مقادیر زیادی از پلی مورفیسم در گونه‌های مورد مطالعه وجود دارد و نشان از اهمیت هرچه بیشتر نشانگرهای مولکولی در نگهداری کلکسیون‌های ژرم پلاسمی برای گونه‌های تکثیر یافته به صورت کلونی بود. پرل - تروز و کفکاس نیز از تکنیک RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی و فیلوژنی برخی ارقام ترکیه و فلسطین اشغالی استفاده کردند. در این پژوهش‌ها از ۱۰ پرایمر RAPD استفاده شد. ۱۳۸ باند پلی مورفیک قابل بررسی مشاهده گردید و از آن‌ها برای انگشتنگاری DNA این ژنوتیپ‌ها استفاده شد و ۴ گونه پسته مورد مطالعه به طور کاملاً واضح از یکدیگر جدا شدند (Kafkas et al., 2002). به منظور مطالعه‌ی ارتباط فیلوژنتیکی گونه‌های بومی پسته‌ی موجود در یونان از دو نشانگر AFLP و RAPD استفاده شد که فنوگرام‌های حاصل از هر دو نشانگر مشابه بودند اما تفاوت‌های جزئی در دندروگرام‌های حاصله مشاهده شد (Katsotis et al., 2003).

در پژوهشی دیگر از نشانگر RAPD برای تعیین مشخصات ظاهری و مولکولی گونه‌های *P. atlantica*، *P. terebintus*، *P. khinjuk*، استفاده شد که بر اساس نتایج آن گونه‌ها از هم متمایز بوده و *P. terebintus* متنوع‌ترین گونه معرفی شد (Kafkas et al., 2001). میرزایی و شریف (۱۳۸۳) با استفاده از مارکر مولکولی RAPD، ۲۲ ژنوتیپ پسته را در سه گروه ارقام زراعی، گونه‌های اهلی *P. vera* و گونه وحشی بنه *P. mutica* قراردادند. در این تحقیق با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD مشخص شد که ارتباط کمی بین این نشانگر با جنسیت پسته وحشی وجود دارد. در پژوهش دیگری

¹ - Hormaz

² - Parfitt

³ - Badenes

⁴ - Perl-treves

⁵ - Kafkas

روی پسته، با استفاده از نشانگر RAPD، تنوع ژنتیکی ۳۲ ژنوتیپ کشت شده در استان کرمان مورد بررسی قرار گرفت که ۱۳۶ باند پلی مورف از ۱۰ آغازگر به دست آمد. بر این اساس، ژنوتیپ‌های بررسی شده در ۶ گروه قرار گرفتند. دندروگرام ماتریس صفر و یک حاصل از مهاجرت باندی با استفاده نرم افزار NTSYS و ضریب تشابه دایس رسم گردید (حاجی‌رضایی و همکاران، ۱۳۸۸). ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با توجه به نشانگرهای مورد استفاده در این پژوهش، در گروه‌های متفاوتی قرار داده شدند. اگرچه کشت و بهره‌برداری از *Pistacia* به‌طور کامل بهره‌برداری می‌شود، تاریخ تکامل جنس *Pistacia* و روابط بین گونه‌ها و درون گونه‌ها هنوز کاملاً درک نشده است، هدف از تحقیق (Iranjo et al., 2015)، تجزیه و تحلیل DNA پلی مورفیکی تصادفی تکثیر شده (RAPD) در مجموع ۵۰ نمونه از گونه‌های پسته وحشی بود که شامل پنج گونه *P. vera*، *P. khinjuk*، *P. atlantica*، *P. mutica* و *P. eurycarpa* بودند. از ۱۴۹ واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز که ۱۴۶ واکنش زنجیره‌ای (۹۷/۹۸ درصد) پلی‌مورف بود، شباهت ژنتیکی از ۰/۳ تا ۰/۸۶ درصد متغیر بودند، شاخص‌های مارکر از ۲/۹۸ به ۱۷/۷۴ درصد متغیر بودند و PICها از ۰/۸۰ تا ۰/۹۹ درصد متغیر بودند. نتایج، شناسایی مولکولی عالی تمام ژنوتیپ‌های مورد آزمایش را نشان داد که نشان از تنوع بالای ژنتیکی در میان گونه‌های پسته می‌باشد. به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی و ذخایر پسته، ۳۳ رقم ماده پسته ایرانی از شهرستان دامغان با استفاده از نشانگر RAPD و صفات مورفولوژیکی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS و Ntcyc صورت گرفت و گروه‌بندی ژنتیکی با استفاده از تجزیه گروه‌ای به روش UPGMA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. دندروگرام حاصل دو گروه ایجاد کرد که رقم شاه‌پسند در یک گروه و ارقام عباسعلی و خنجری در خوشه دیگری قرار گرفتند. این نتایج حاکی از این بود که تفاوت معنی‌داری بین سه رقم وجود دارد و بیشترین شباهت بین ارقام خنجری و عباسعلی وجود دارد هرچند که تقریباً همین میزان شباهت بین ارقام خنجری و شاه‌پسند هم به چشم خورد (مقبلی و همکاران، ۱۳۹۱).

ارزیابی تنوع ژنتیکی برای شناسایی ژن‌های مختلف و برآورد فاصله بین افراد و جمعیت‌ها، همچنین تعیین میزان هتروزیس بسیار ضروری است. با استفاده از نشانگرهای RAPD تنوع ژنتیکی ۳۸ ژنوتیپ پسته در منطقه فیض‌آباد خراسان مورد بررسی قرار گرفت. ۱۵ آغازگر مورد استفاده در مجموع ۱۱۵ باند چند شکل تولید نمودند. بیشترین تعداد مکان‌های تولیدی ۱۲ عدد که توسط آغازگر BC18 به دست آمد. متوسط درصد چندشکلی در بین تمام آغازگرها ۹۲/۸۳ درصد بود. قدرت تفکیک آغازگرها از ۱/۳۶ تا ۷/۸۹ متغیر و میانگین آن ۴/۹۷ بود. تجزیه کلاستر بر اساس ضریب تشابه دایس و روش UPCMA در حد تشابه ۰/۴۱ ژنوتیپ‌های مورد بررسی را در هشت گروه قرارداد. نتایج به دست آمده نشان از تنوع بالا بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بود که این کارایی مطلوب آغازگر RAPD را نشان می‌داد (Aliakbarkhany et al., 2015). مطالعه فیلوژنتیکی گونه‌های وحشی پسته و برخی از ارقام باغی کلکسیون پسته‌ی مؤسسات تحقیقات پسته کشور، توسط ۷۷ نشانگر RAPD انجام گرفت. در این تحقیق ارتباط میان گونه‌های وحشی پسته، واریته سرخس، پسته آتلانتیکا زیرگونه موتیکا (بنه) *P.khinju* و *P.atlantica subsp.mutica* و شش رقم پسته اهلی شامل: خنجری دامغان، اوحدی، قزوینی، اکبری، بادامی نیش کلاغی و ایتالیایی که با استفاده از این نشانگر بررسی شده‌اند. از این تعداد نشانگر مورد استفاده ۱۵ نشانگر چندشکلی را بین ژنوتیپ‌ها نشان دادند. نتایج حاصل از تجزیه کلاستر که بر اساس ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را در چهار گروه قرارداد. در کل نتایج حاصل نشان داد که واریته سرخس بیشترین ارتباط را با ارقام پسته‌ی اهلی و کمترین ارتباط را با گونه‌های آتلانتیکا و خینجوک داشت (میرزایی و همکاران، ۱۳۸۳). در پژوهشی دیگر با استفاده از نشانگر RAPD و صفات مورفولوژیکی، تنوع ژنتیکی ارقام پسته مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه از ۱۵ نشانگر RAPD استفاده شد. تنوع ژنتیکی و الگوهای خویشاوندی ۱۵ رقم پسته *P.vera* با استفاده از نشانگرهای RAPD مورد مطالعه قرار گرفت. در مجموع ۱۴۳ باند تولید شد که ۳۷ عدد از آن‌ها در بین نمونه‌ها چندشکلی بودند. تجزیه گروه‌ای هم با استفاده از الگوریتم UPGMA انجام گرفت (Hormoza et al., 1998). دندروگرام حاصل از تجزیه گروه‌ای ۱۱۴ صفت

مورفولوژیک کمی و کیفی به روش UPGMA و ترسیم دو خوشه بزرگ و اصلی که رقم پوست‌پیزی را هم از همه ارقام جدا نموده است. با ایجاد خط برش در فاصله ی ۳۰۱۹۸/۳۱ (مربع فاصله) پنج گروه متمایز ایجاد شد که ارقام اوحدی و کله‌قوچی در یک گروه و بقیه ارقام در شاخه دیگری که شامل چهار گروه بود قرار گرفتند. در این شاخه هم رقم رضائی زودرس‌تر از دیگر ارقام بود (Hormoza et al., 1998). در پژوهشی دیگر برای ارزیابی مولکولی *P.palaestina* با استفاده از نشانگر RAPD در بین نه گونه‌ی دیگر از پسته انجام شد که از ترکیه، اسرائیل و آمریکا جمع‌آوری شده بودند. تجزیه پارسیمونی نشان داد که بهترین جفت گونه‌ها *P.palaestina* و *P.terebintus* بودند. نتایج نشان داد که درواقع *P.palaestina* یک وارسته از *P.terebintus* می‌باشد که از کوچک شدن فاصله‌ی ژنتیکی میان آن‌ها حاصل شده است (Kafkas et al., 2001). از تکنیک RAPD برای یافتن نشانگرهایی که با ژن‌های تعیین جنسیت در گونه‌های دوپایه پسته مرتبط هستند استفاده شد و برای این منظور نتایج دو والد ماده را که به وسیله یک والد پدری تلقیح شده بودند مورد بررسی قرار گرفت. در هر یک از دو تلاقی دو توده DNA از ارقام ماده و نر به‌طور جداگانه به همراه DNA ی ۱۴ رقم *P.vera* و از ۹۴ دانهال با سن چند هفته و جنسیت نامعلوم تهیه شد. در بین نشانگرهای الیگونوکلوئوتیدی که برای تکثیر DNA مورد استفاده قرار گرفت که از میان آن‌ها فقط نشانگر OPO 08 یک نوار ۹۴۵ جفت بازی را در توده ماده‌ی پسته تکثیر کرد که توده نر فاقد آن بود. با توجه به این که الگوهای تکثیر دیگر نشانگرهای مورد استفاده هیچ‌گونه اختلافی را بین دو توده DNA نشان ندادند. درنهایت نتیجه این شد که این نشانگر به زن یا زن‌های کنترل‌کننده‌ی جنسیت در پسته پیوسته است و می‌توان از آن به‌عنوان یک نشانگر معتبر و قابل اطمینان برای تعیین جنسیت در پسته استفاده کرد (Hormoza et al., 1994).

فصل سوم

مواد و روش‌ها

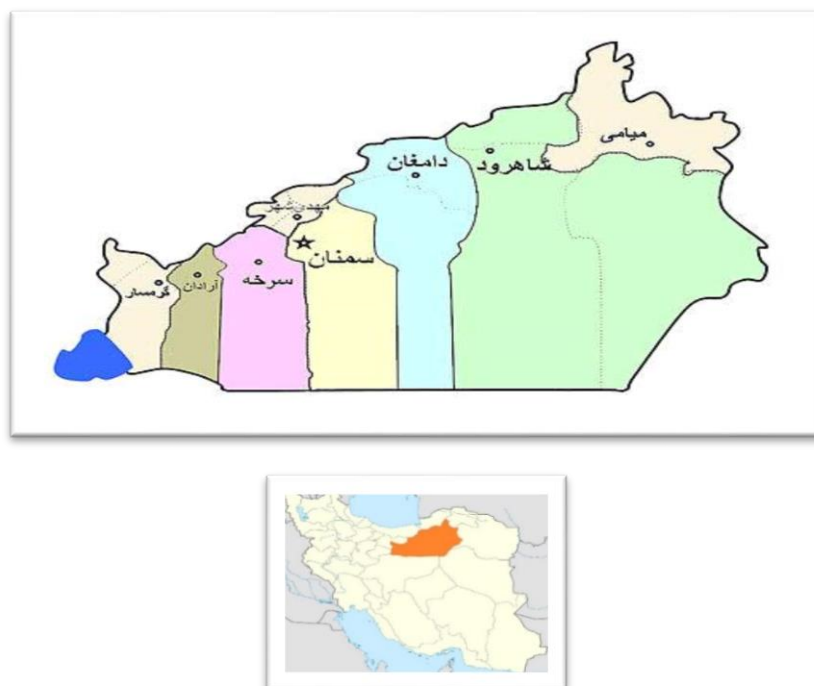
۳- مواد و روش‌ها

در این فصل در رابطه با نمونه‌های گیاهی، صفات مورد بررسی، محلول‌های مورد استفاده و روش‌های به‌کاررفته در انجام این پژوهش توضیحاتی داده می‌شود.

۳-۱- معرفی منطقه مورد مطالعه

۳-۱-۱- موقعیت جغرافیایی شهرستان دامغان و حومه آن

شهرستان دامغان با مساحت ۱۴۰۲۷ کیلومترمربع از طرف شرق به شهرستان شاهرود، از غرب به شهرستان سمنان و از شمال به کوه‌های البرز و استان‌های گلستان و مازندران، از جنوب هم به دشت کویر مرکزی ایران و استان اصفهان منتهی می‌شود (شکل ۳-۱). حداقل عرض شمال جغرافیایی شهرستان دامغان، ۳۴ درجه و ۱۵ دقیقه و حداقل طول شرقی جغرافیایی این شهرستان ۵۳ درجه و ۴۲ دقیقه می‌باشد.



شکل ۳-۱- نقشه موقعیت کلی مکان جمع‌آوری ژنوتیپ‌های بذری پسته شهرستان دامغان

ارتفاع شهرستان از سطح دریا در کنار ایستگاه هواشناسی ۱۱۵۵/۴ متر است. این شهرستان به دلیل وزش بادهای شمالی و بارندگی‌ها در نواحی گرگان و مازندران، دارای زمستان‌های سرد و تابستان‌های

معتدل است. لذا این شهرستان به دلیل برخورداری از اقلیم‌های مختلف و شرایط آب و هوایی گوناگون از نظر پوشش‌های گیاهی متنوع بوده و دارای جنگل، مرتع، بیابان و کویر است و یکی از مناطق مناسب برای کشت محصولات متنوع باغی (دانه‌دار، هسته‌دار، گردو و به‌ویژه پسته) و زراعی (گندم، جو، سبزیجات و صیفی‌جات) به حساب می‌آید. سطح زیر کشت باغ‌های پسته‌ی بارور در این شهرستان ۹۰۴۰/۹ هکتار است که می‌تواند سهم بسزایی را در تولید این محصول استراتژیک و اقتصادی داشته (عوض‌آبادیان و همکاران، ۱۳۹۳).

۳-۲- نمونه‌های گیاهی و صفات مورد استفاده

در ایستگاه مرکز تحقیقات پسته دامغان یک کلکسیون از باغ بذری پسته توسط آقای مهندس مرتضوی و همکاران در سال ۱۳۷۵ ایجاد گردید که تنوع خوبی به لحاظ ویژگی‌های ژنوتیپ‌های نر و ماده در آن می‌توان یافت. در کارهای تحقیقاتی که توسط عوض‌آبادیان و همکاران در سال ۱۳۹۳ انجام گردید، بر اساس برخی از ویژگی‌های مورفولوژیکی تعدادی ژنوتیپ نر و ماده پسته به‌عنوان ژنوتیپ‌های امیدبخش انتخاب شدند. نمونه برگی ژنوتیپ‌های مورد استفاده در این پژوهش ۱۰ تا ۱۵ برگ که به‌صورت تصادفی، از کلکسیون باغ بذری پسته در مرکز تحقیقات جمع‌آوری شد. ۴۵ ژنوتیپ در این پژوهش مورد مطالعه قرار گرفتند که شامل ۲۰ ژنوتیپ ماده با کدهای FG1 تا FG20، ۲۰ ژنوتیپ نر با کدهای MG1 تا MG20 و ۵ رقم محلی با نام‌های شاه‌پسند، کله‌فوجی، احمدآقایی، فندق‌ی و اکبری می‌شود. در این تحقیق صفات مورفولوژیکی و پمولوژیکی میوه در (جدول ۳-۳، ۳-۴) که ژنوتیپ‌های ماده بر اساس دیسکریپتور پسته (Anonymous, 1997) و همچنین (IPGRI, 1997) به همراه صفات فنولوژیکی (جدول ۳-۵) ژنوتیپ‌های نر و ماده به‌علاوه تاریخ گلدهی ژنوتیپ‌های نر و تاریخ برداشت ژنوتیپ‌های ماده اندازه‌گیری می‌شود. در این تحقیق حدود ۲۸ صفت کمی و ۱۳ صفت کیفی مورد ارزیابی قرار می‌گیرد (جدول ۳-۱، ۳-۲).

جدول ۳-۱: صفات کیفی رشدی مربوط به درخت بررسی شده در ۴۵ ژنوتیپ پسته

شماره	صفت	نام لاتین صفت	نام اختصاری	نحوه اندازه گیری
۱	زمان شروع گلدهی در ژنوتیپ‌های نر	First bloom date	FBD	تعداد روز از اولین روز پس از شروع فصل بهار و زمان باز شدن ۵ درصد گل‌ها
۲	زمان خاتمه گلدهی	Last bloom date	LBD	زمان باز شدن در صد ۱۰۰ گل‌ها
۳	عادت انشعاب شاخه‌ها	Branching habit	BH	۳-پراکنده، ۵-متوسط، ۷-انبوه
۴	عادت رشد درخت	Growth habit	GH	۱-عمودی، ۲-نیمه عمودی آلفا، ۳-گسترده، ۴-خیزان
۵	تاریخ برداشت میوه	Date of harvesting fruit	DHF	رسیدن میوه و جدا شدن اگزوکارپ و مزوکارپ آر آندوکارپ میوه

جدول ۳-۲: صفات کیفی برگ‌ی بررسی شده در ۴۵ ژنوتیپ پسته

شماره	صفت	نام لاتین صفت	نام اختصاری	نحوه اندازه گیری
۱	شکل برگچه انتهایی	Terminal leaflet shape	TLSh	۱-پهن نیزه مانند، ۲-بیضی، ۳-تخم‌مرغی نوک‌تیز، ۴-تخم‌مرغی گرد، ۵-مدور گردنما ۹۹-سایر
۲	نوک برگچه انتهایی	Terminal leaflet apex	TLA	۱-نوک‌دار کشیده، ۲-سرتیز، ۳-دارای نوک کوچک در رأس، ۴-سر پهن، ۵-نادر، دارای فرورفتگی ۹۹-سایر
۳	پایه برگچه انتهایی	Terminal leaflet base	TLB	۱-لاغر و نحیف، ۲-پهن، ۳-نوک‌تیز متقارن، ۴-گونیا مانند
۴	سایز برگچه انتهایی نسبت به برگچه‌های پایه	Terminal leaflet size	TLS	۱-شبه برگچه‌های پایه، ۲-بزرگ‌تر از برگچه‌های پایه
۵	رنگ برگ	Color of the leaves	CL	۱-سبز روشن، ۲-سبز، ۳-سبز تیره

جدول ۳-۳: صفات کیفی مرتبط با میوه بررسی شده در ۴۵ ژنوتیپ پسته

شماره	صفت	نام لاتین صفت	نام اختصاری	نحوه اندازه گیری
۱	شکل میوه	Nut shape	NSh	۱-گرد، ۲-تخم مرغی، ۳-کشیده، ۴-قلبی کشیده، ۵-قلبی شکل
۲	شکل نوک میوه	Shell apex	ShA	۱-مسطح، ۲-گرد، ۳-به طور متقارن نوک تیز، ۴-نامتقارن نوک تیز
۳	فرورفتگی پوسته در نزدیکی اسکار	Shell depression	ShD	۰-بدون فرورفتگی، ۱-کم، ۲-فرورفتگی واضح
۴	باز بودن بخیه یا چاک میوه	Suture opening	SO	۳-باریک اوزون، ۵-متوسط، ۷-پهنوار یا زیاد
۵	برآمدگی و صافی چاک میوه	Suture elevation	SE	۳-کم، ۷-زیاد
۶	برجستگی اسکار (انتهایی میوه)	Pedicel scar elevation	PSE	۱-مسطح، ۲-دارای پیشانی

جدول ۴-۳: صفات کمی مرتبط با میوه بررسی شده در ۴۵ ژنوتیپ پسته

شماره	صفت	نام لاتین صفت	نام اختصاری	واحد	توضیحات
۱	طول شاخه سال جاری	The length of this year's branch	LYB	CM	۴- عدد شاخه سال جاری تصادفی انتخاب و با خط کش اندازه گیری شد.
۲	طول گروه	Fruit spike length	FSL	CM	۱۰- گروه به طور تصادفی انتخاب شد و با خط کش اندازه گیری شد.
۳	عرض گروه	Width of fruit cluster	WFC	CM	۱۰- گروه تصادفی انتخاب شد و با خط کش اندازه گیری شد.
۴	طول مغز	Nut length	Nl	MM	۲۰- عدد پسته به طور تصادفی انتخاب و با کولیس اندازه گیری شد.
۵	عرض مغز	Nut width	NW	MM	۲۰- عدد پسته به طور تصادفی انتخاب و با کولیس اندازه گیری شد.
۶	ضخامت مغز	Nut thickness	NT	MM	۲۰- عدد پسته به طور تصادفی انتخاب و با کولیس اندازه گیری شد.
۷	طول هسته	Kernel length	KL	MM	۲۰- عدد پسته به طور تصادفی انتخاب و با کولیس اندازه گیری شد.

ادامه جدول ۳-۴

شماره	صفت	نام لاتین صفت	نام اختصاری	واحد اندازه گیری	توضیحات
۸	عرض هسته	Kernel width	KW	MM	۲۰ عدد پسته به طور تصادفی انتخاب و با کولیس اندازه گیری شد.
۹	ضخامت هسته	Kernel thickness	KT	MM	۲۰- عدد پسته به طور تصادفی انتخاب و با کولیس اندازه گیری شد.
۱۰	وزن تر همراه پوست رویی در ۱۰۰ دانه	Pistachio fresh weight with skin	PFWS	G	۱۰۰- عدد پسته تازه به طور تصادفی جمع آوری شده و با ترازو وزن شد.
۱۱	وزن تر پسته در ۱۰۰ دانه	Pistachio fresh weight	PFW	G	۱۰۰- عدد پسته جدا از پوست به طور تصادفی انتخاب شده و با ترازو وزن شد.
۱۲	وزن پوست در ۱۰۰ دانه	Skin Weight	SW	G	- وزن پوست ۱۰۰ عدد پسته با ترازو اندازه گرفته شد.
۱۳	وزن پسته خشک در ۱۰۰ دانه	Nut Dry Weight	NDW	G	- وزن ۱۰۰ عدد پسته خشک شده پس از گذشت ۱۵ روز از زمان برداشت اندازه گرفته شد.
۱۴	تعداد پسته با پوست در ۱۰۰ گرم	Number of pistachios with skin in 100 grams	NPWS-100g	تعداد	- در ۱۰۰ گرم، تعداد پسته تازه با پوست شمرده شد.
۱۵	تعداد پسته تر در ۱۰۰ گرم	The number of pistachios fresh in 100 grams	NPF-100g	تعداد	- تعداد پسته تازه از پوست جدا شده در ۱۰۰ گرم شمرده شد.
۱۶	تعداد پسته خشک در ۱۰۰ گرم	Number of nuts in 100 g	NN-100g	تعداد	- تعداد پسته خشک در ۱۰۰ گرم وزن شد و شمرده شد.
۱۷	وزن پوسته در ۱۰۰ دانه	Shell weight	ShW	G	- وزن پوسته ۱۰۰ عدد پسته بعد از جدا شدن از هسته اندازه گیری شد.
۱۸	وزن هسته در ۱۰۰ دانه	Kernel dry weight	KDW	G	- وزن هسته ۱۰۰ عدد پسته با ترازو اندازه گیری شد.
۱۹	تولید خالی یا پسته پوک	Blank production	BP	درصد	- تعداد پسته پوک در ۱۰۰ عدد پسته که به طور تصادفی چیده شده بود.
۲۰	پسته خندان	Split nuts	SN	درصد	تعداد پسته خندان در ۱۰۰ عدد پسته که به طور تصادفی چیده شده بود.

جدول ۳-۵: صفات کمی برگ‌ی بررسی شده در ۴۵ ژنوتیپ پسته

شماره	صفت	نام لاتین	نام اختصاری	واحد اندازه‌گیری	توضیحات
۱	طول برگ	Leaf length	LL	CM	۲۰- عدد برگ تصادفی جمع‌آوری‌شده و با خط‌کش اندازه‌گیری شد.
۲	عرض برگ	Leaf width	LW	CM	۲۰- عدد برگ با خط‌کش اندازه‌گیری شد.
۳	تعداد برگچه	Number of leaflets	NL	تعداد	- تعداد برگچه در ۲۰ عدد برگ شمرده شد.
۴	طول برگچه انتهایی	Terminal leaflet length	TLL	CM	۲۰- عدد برگچه تصادفی انتخاب و با خط‌کش اندازه‌گیری شد.
۵	عرض برگچه انتهایی	Terminal leaflet width	TLW	CM	۲۰- عدد برگچه توسط خط‌کش اندازه‌گیری شد.

۳-۳- تعیین کمیت و کیفیت DNA

۳-۳-۱- تعیین کمیت و کیفیت DNA با استفاده از نانودراپ

به‌منظور بررسی کمیت DNA از دستگاه نانودراپ مدل (N60 UV/Vis Spectrophotometer) استفاده شد. ابتدا با آب دیونیزه دستگاه کالیبره گردید، سپس یک میکرولیتر از نمونه DNA در محل مورد نظر بر روی دستگاه قرارگرفت و میزان جذب نور در طول موج ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر خوانده شد. میزان غلظت ۱/۸-۲ نانومتر در این طول‌موج بهترین کیفیت DNA استخراج‌شده منظور می‌شود.

۳-۳-۲- تعیین کیفیت DNA توسط ژل آگارز و الکتروفورز افقی

برای بررسی کیفیت DNA از نظر شکستگی رشته DNA یا وجود آلودگی RNA از الکتروفورز ژل افقی با ژل آگارز ۰/۸ درصد، حاوی اتیدیوم بروماید استفاده گردید. برای ارزیابی کیفی بهتر نمونه‌ها در یکی از چاهک‌ها از یک نمونه DNA مقیاس^۱ با اندازه مشخص یا لدر و تحت جریان الکتریکی با ولتاژ ۹۰ ولت و به مدت ۳۰ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. پس از پایان الکتروفورز، ژل بر

^۱ - DNA Ladder

روی دستگاه ژل داک^۱ قرار داده شد و تحت اشعه ماوراءبنفش (UV) قرار گرفته و از آن عکس برداری گردید. وجود باندهای کاملاً واضح^۲ و فاقد کشیدگی^۳ نشان از کیفیت مطلوب DNA می باشد.

۳-۴- واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) و اجزای آن

برای تکثیر DNA از مسترکیت PCR شرکت ویراژن با ترکیبات (Tris-HCl, pH=8.5), (0.2 Tween ,) $2SO_4$, 4mM $MgCl_2$, (0.4 mM dNTPs), units/ μ l Ampliqon Taq DNA polymerase (20,0.2 درصد NH_4) که حاوی رنگ قرمز و خنثی کننده بود و آغازگرهای تهیه شده از شرکت سیناکلون با استفاده از دستگاه ترموسایکلر^۱ انجام شد.

۳-۵- آغازگرها

آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش از مطالعات قبلی انجام شده انتخاب شدند. جدول معیار انتخاب آغازگرها به ترتیب میزان چندشکلی، میزان Rp و تعداد آللهای مشاهده شده در سایر پژوهش ها بود. آغازگرهای انتخاب شده در جدول (۳-۷)، (۳-۸) پس از حل کردن و رقیق سازی در غلظت ۱۰۰ نانوگرم با آب دو بار تقطیر (فاقدیون) طبق دستورالعمل مربوطه، در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

جدول ۳-۶: آغازگرهای ISSR مورد استفاده در این پژوهش

نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال
UBC826	(AC) ₈ C	52
UBC840	(GA) ₈ YT	53
UBC850	(GT) ₇ YC	52
UBC853	(TC) ₈ RT	53
UBC884	HBH (AG) ₇	50
UBC886	VDV (CT) ₇	52
UBC887	DVD(TC) ₇	51
UBC888	BDB(CA) ₇	52
UBC890	VHV(GT) ₇	53
S14	(AG) ₈ T	48

Y = (C,T), R = (A,G) , B = (C,G,T) , D = (A,G,T)

¹ - Gel Documentation

² - Sharp

³ - Smear

جدول ۳-۷: آغازگرهای RAPD مورد استفاده در این پژوهش

نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال
TIBMBE08	GGGAAGCGTC	34
TIBMBE17	GGGAAAAGCC	32
BD12	CCTCCACCAG	34
BC13	CCTGGCACAG	34
OPN13	AGCGTCACTC	34
OPA18	AGGTGACCGT	32
OPO07	CAGCACTGAC	32
OPK02	GTCTCCGCAA	34
OPM16	GTAACCAGCC	32
OPN11	TCGCCGCAAA	32

۳-۶- بهینه‌سازی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

بهینه‌سازی واکنش PCR بر اساس دو عامل میزان غلظت DNA و دمای اتصال انجام گرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تمامی نمونه‌ها در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر مطابق جدول (۳-۹) با غلظت و مقدار مشخصی صورت گرفت.

جدول ۳-۸: شرایط بهینه‌سازی برای PCR آغازگرهای مورد آزمایش

مقدار مواد	غلظت مواد	اجزای واکنش
۶ میکرولیتر	۱X	مستر
۱ میکرولیتر	۱ پیکومول	آغازگر
۱ میکرولیتر	۲۰-۳۰ نانوگرم	DNA الگو
۴/۵ میکرولیتر	-	آب دیونیزه
۱۲/۵ میکرولیتر	-	حجم نهایی

^۱ - Thermocycler

۳-۷- الگوی دمایی آغازگرها

در این پژوهش پس از چند مرحله آزمایش و آزمودن دماها و برنامه‌های مختلف، برنامه حرارتی مناسب به‌منظور تکثیر نمونه‌های مورد مطالعه، مطابق جدول (۳-۱۰)، (۳-۱۱) برای آغازگرهای مورد مطالعه به دست آمد.

جدول ۳-۹: برنامه دمایی برای تکثیر جایگاه‌های ایجادشده توسط آغازگرهای ISSR

مرحله	دما ($^{\circ}\text{C}$)	زمان (ثانیه)	تعداد چرخه
واسرشته سازی اولیه	۹۴	۲۴۰	۱
واسرشته سازی	۹۴	۳۰	
اتصال آغازگرها	۴۸-۵۴	۳۰	۳۶
تکثیر	۷۲	۶۰	
تکثیر نهایی	۷۲	۴۲۰	۱
پایان برنامه	۴	۳۰۰	

جدول ۳-۱۰: برنامه دمایی برای تکثیر جایگاه‌های ایجادشده توسط آغازگرهای RAPD

مرحله	دما ($^{\circ}\text{C}$)	زمان (ثانیه)	تعداد چرخه
واسرشته سازی اولیه	۹۴	۱۸۰	۱
واسرشته سازی	۹۴	۳۰	
اتصال آغازگرها	۳۴-۳۶	۳۰	۴۲
تکثیر	۷۲	۶۰	
تکثیر نهایی	۷۲	۲۴۰	۱
پایان برنامه	۴	۲۴۰	

۳-۸- الکتروفورز افقی جهت کیفیت‌سنجی و بارگیری فرآورده‌های PCR

۳-۸-۱- آماده‌سازی ژل آگارز و بارگیری محصول PCR

برای تفکیک و نمایش آلل‌های جایگاه‌های مورد نظر از ژل آگارز با غلظت ۱/۵ درصد با دستگاه الکتروفورز افقی استفاده شد که مقدار آگارز با توجه به ابعاد صفحه‌های نگهدارنده ژل و میزان محلول مورد استفاده متغیر است. البته برای این منظور اغلب از صفحه نگهدارنده بزرگ که حدود ۱۲۰ میلی‌لیتر از ژل مورد نظر (مخلوط ۱۲۰ میلی‌لیتر بافر TBE 0/5X، ۱/۸ گرم آگارز و ۸ میکرولیتر

اتیدیوم بروماید جهت رنگ آمیزی ژل) گنجایش داشت، استفاده شد. به این واکنش حدود ۱ تا ۱/۵ ساعت و با ولتاژ ثابت ۱۰۰ ولت با شدت جریان متغیر زمان می دهیم.

۳-۸-۲- خواندن آلل‌ها در جایگاه‌های مورد نظر

با توجه به اشتباهات DNA پلی‌مراز در طی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، تقریباً همیشه باندهای غیراختصاصی در روی ژل قابل مشاهده است که شدت و تعداد این باندها که بسته به انواع آغازگرها، غلظت اجزای واکنش و یا برنامه PCR و غیره ممکن است، متفاوت باشد. امتیازدهی باندها به‌طور دستی و با خط‌کش انجام گرفت و با در نظر گرفتن رابطه خطی بین این اندازه‌ها، اندازه واقعی بر اساس جفت باز برای چاهک‌ها به‌دست آمد و داده‌ها به‌صورت یک و صفر، حضور یا عدم حضور باند برای هر ژنوتیپ در Excel ثبت شد. ژنوتیپ‌های هر فرد نیز با توجه به نوع آلل‌ها تعیین و سپس فراوانی‌های ژنوتیپی محاسبه گردید. برای هر آغازگر دامنه باندهای تکثیری، تعداد کل باند، تعداد باندهای چند شکل، درصد چند شکلی، قدرت تفکیک کنندگی^۱ (Rp) تعیین گردید و اندازه آلل برحسب جفت باز در نرم‌افزار Excel ثبت شد.

۳-۹- تجزیه و تحلیل داده‌های مورفولوژیکی

تجزیه و تحلیل داده‌های مورفولوژیکی توسط نرم افزار SPSS17 انجام شد. در مطالعه حاضر تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضریب جاکارد و ماتریس عدم تشابه با روش Ward حاصل از ماتریس تشابه یک‌بار برای تمام ژنوتیپ‌ها بر اساس ۱۳ صفت رشدی درخت و یک‌بار برای ۲۰ ژنوتیپ ماده و ۵ ژنوتیپ تجاری بر اساس ۴۱ صفت مورد مطالعه ترسیم شد. نمودار تجزیه دوبعدی و سه بعدی حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس ۴۱ صفت مورد ارزیابی برای ۲۰ ژنوتیپ ماده به همراه ۵ رقم تجاری ترسیم شد.

¹Resolving power

۳-۱۰- تجزیه و تحلیل داده‌های مولکولی

به‌منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها و تعیین فاصله ژنتیکی، وجود و عدم وجود نوار با اعداد یک و صفر مشخص شدند. برای آنالیز داده‌های مولکولی از نرم افزار DARWin 6/0 استفاده شد. معمول‌ترین روش‌های بررسی فاصله ژنتیکی یا تشابه ژنتیکی که برای داده‌های مولکولی به‌کاررفته، شامل ضریب تشابه جاکارد (Jacquard, 1912)، تطابق ساده (Sokal *et al.*, 1958) و دایس می‌باشند. تجزیه خوشه‌ای براساس ضریب جاکارد و ماتریس عدم تشابه با روش UPGMA و با استفاده از نرم‌افزار DARWin 6/0 رسم گردید. نمودار تجزیه دو بعدی هم برای هر کدام از نشانگرها به طور جداگانه رسم شد. در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی هر مؤلفه به طور مستقل تغییراتی را توجیه و تفسیر می‌کند. بیشترین، کمترین و متوسط عدم تشابه و تعیین فاصله و نزدیکی بین ژنوتیپ‌ها از طریق ضرایب عدم تشابه جاکارد در بررسی تمام ژنوتیپ‌ها و برای هر نشانگر به طور جداگانه مشخص شد.

فصل چہارم

نتایج و بحث

۴- نتایج و بحث

۴-۱- بهینه سازی روش استخراج DNA

در هر مطالعه مولکولی قبل از هر چیز کمیت و کیفیت DNA استخراج شده بسیار حائز اهمیت می باشد. در گیاه پسته به دلیل وجود پروتئین ها و فنول ها و متابولیت های گیاهی، استخراج DNA با کیفیت مورد نظر دشوار می باشد. قبل از تعیین مرحله استخراج (Doyle & Doyle, 1987)، چندین روش انجام گرفت. یک نمونه از آن روش ها، روش SDS ۱ درصد (Thompson *et al*; 1994) و همچنین روش های متفاوتی از CTAB با کمی تغییر (Simon *et al* 1996, Allen *et al*, 2012) و چندین روش دیگر انجام شد تا در نهایت روش مورد نظر که بهترین کمیت و کیفیت DNA استخراجی را داشت (شکل ۴-۱)، انتخاب شد. این روش که به سبب داشتن محلول CTAB ۲ درصد و PVP-40 ۲ درصد و همچنین تکرار مرحله شستشو با کلروفرم - ایزوآمیل الکل و نمک توانست تفکیک پذیری بهتری از نمونه DNA را از دیگر اجزای عصاره برگی نشان دهد.



شکل ۴-۱ نمونه ای از الگوی باندهای DNA استخراج شده پسته از چند ژنوتیپ/ از سمت چپ به راست کدهای ژنوتیپ

با نام FG13, FG15, FG16, FG20, شاهپسند، کله قوچی، MG2، MG3 و MG4 است.

۴-۲- بررسی تنوع صفات مورفولوژیکی

در مطالعه‌ی حاضر تجزیه داده‌های مورفولوژیکی حاکی از این بود که بین ژنوتیپ‌های پسته در اغلب صفات مورد بررسی اختلاف معنی‌داری وجود دارد که باز این موضوع خود، نشان دهنده تنوع بالا بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در مطالعه‌ی صفات مورد نظر می‌باشد.

۴-۲-۱ صفات مربوط به آغاز گلدهی و طول دوره گلدهی ژنوتیپ‌های نر پسته و تاریخ

برداشت در ژنوتیپ‌های ماده و ۵ رقم تجاری

زمان گلدهی و طول دوره گلدهی ارقام مختلف بستگی به شرایط آب و هوایی، نحوه‌ی تغذیه و کوددهی، شرایط آبیاری و خاک هر منطقه دارد (حکم‌آبادی، ۱۳۹۰، حسنی مقدم، ۱۳۸۷). انتخاب ارقام نر و ماده‌هایی که زمان گلدهی یکسانی داشته باشد، تطابق زمان گلدهی ایجاد کرده و درصد موفقیت را بالا می‌برد (حکم‌آبادی، ۱۳۹۰). در پژوهش حاضر با توجه به داده‌ها و نتایجی که مشاهده شد (جدول ۴-۱ و ۴-۲). رقم MG3 زودتر از بقیه وارد مرحله گلدهی شد و بیشترین هم‌پوشانی آن با ارقام تجاری شاه‌پسند، احمدآقایی و فندق‌ی مشاهده شد. رقم MG9 دیرتر از بقیه وارد مرحله گلدهی شد و بیشترین هم‌پوشانی را با رقم‌های کله‌قوچی، فندق‌ی و اکبری داشت. بیشترین طول دوره گلدهی در رقم MG20 به میزان ۱۱ روز مشاهده شد و با تمام ژنوتیپ‌ها هم‌پوشانی داشت. ژنوتیپ‌های MG5، MG9، MG13، MG17 دارای کمترین طول دوره گلدهی بودند. اگر به طور مقایسه‌ای به میزان هم‌پوشانی ارقام تجاری و ژنوتیپ‌های نر دقت شود، ژنوتیپ‌های MG9، MG5، MG1 و MG15 بیشترین هم‌پوشانی را با رقم‌های اکبری و فندق‌ی دارند. ژنوتیپ‌های MG6، MG7، MG8، MG12، MG14، MG17 و MG18 بیشترین هم‌پوشانی را با رقم‌های احمدآقایی و شاه‌پسند نشان دادند و ژنوتیپ‌های MG13، MG1 و MG19 بیشترین هم‌پوشانی را با رقم کله‌قوچی دارند. برای ارقام محلی در ارزیابی گلدهی در شرایط آب و هوایی ایستگاه پسته دامغان رقم شاه‌پسند و احمدآقایی زودگل‌ترین و رقم اکبری و کله‌قوچی دیرگل‌ترین بودند که با نتایج ارزیابی در مطالعه (عوض‌آبادیان و

همکاران، ۱۳۹۳) هم‌خوانی داشت. از نظر زمان گلدهی در شرایط آب و هوایی رفسنجان ارقام سفید پسته نوقی و کله قوچی در گروه زودگل، ارقام اوحدی، احمدآقایی در گروه متوسط گل و رقم اکبری در گروه دیر گل گروه بندی می شوند (اسماعیل‌پور، ۱۳۸۴، نائینی، ۱۳۹۶) که با نتایج این ارزیابی تناقض‌هایی داشت که البته ممکن است به دلیل شرایط آب و هوایی سرد و معتدل این منطقه و یا شرایط تغذیه‌ای و آبیاری مرسوم در این منطقه باشد. بطور کلی گلدهی ارقام نر حدود ۵ تا ۷ روز زودتر از ارقام ماده می باشد و زمان شکوفایی در ارقام مختلف متفاوت است و طول دوره گلدهی در ارقام مختلف متفاوت و بین ۳ تا ۱۲ روز است (نائینی، ۱۳۹۶). گلدهی ارقام ماده از ۷ تا ۳۰ فروردین ماه می‌باشد و نهایت تا ۲ اردیبهشت به طول می‌انجامد و طول دوره گلدهی در ارقام ماده اغلب ۹ تا ۱۴ روز طول می‌کشد (حسنی مقدم، ۱۳۸۷). طبق پژوهش‌های صورت گرفته بر روی پسته ماده رقم کرمان و رقم نر پیتز در کالیفرنیا، مشخص شد که در هر دو جنس نر و ماده در فروردین ماه و پس از باز شدن گل‌ها، انگیزش گلدهی آغاز و سر آغازهای گل تشکیل می‌شوند و انگیزش پرچم‌ها در اردیبهشت انجام می‌گیرد. در پایان پرچم‌ها تحلیل رفته و جذب اندام ماده می‌شوند. به دنبال آن تمایزایی اندام ماده تکمیل شده و در فروردین شکوفایی گل‌های ماده انجام می‌شود (Hormaza, 1996؛ (میرزایی و همکاران، ۲۰۰۳) و زمان گلدهی و زمان تمام گل را با بالاترین ضریب تغییرات تنوع داشتند. طول دوران گلدهی در ژنوتیپ‌های نر مورد مطالعه ۱۱-۴ روز بود که با نتایج (Martinez & Herrur, 1994) و طول دوره گلدهی ۱۴ روز مطابقت نداشت. در مطالعه (Hansen, 1998) بر روی ارقام محلی سوریه، طول دوره گلدهی یک هفته گزارش شد و در پژوهشی که در اسپانیا روی ارقام نر مختلف با منشأ مختلف انجام شد، طول دوره یک ماه گزارش شد که تأیید بر تأثیر محیط و شرایط آب و هوایی متفاوت بر طول دوره گلدهی. بود. زمانی که درصد پوست رویی میوه پسته به‌راحتی از پوست سخت استخوانی جدا شود، زمان برداشت فرارسیده است. تغییر رنگ پوست رویی از سبز به گلی تا ارغوانی نیز نشانه‌های دیگر از رسیدن میوه‌ها است.

جدول ۴-۱: خصوصیات فنولوژیکی مربوط به تاریخ گلدهی و برداشت محصول

شماره	صفات اندازه گیری شده	تعداد ژنوتیپ	کمترین	بیشترین	میانگین	انحراف معیار	واریانس
۱	تاریخ برداشت میوه *	۲۵	-۳	۲۷	۱۲/۳۶	۹/۷۸	۹۵/۷۴
۲	آغاز گلدهی در ژنوتیپ های نر ** *	۲۵	-۴	۴	-۰/۲۰	۲/۳۱	۵/۸۳
۳	طول دوره گلدهی	۲۵	۳	۱۱	۵/۳۶	۱/۸۲	۳/۳۲

* تاریخ برداشت در رقم شاه پسند به عنوان استاندارد صفر در نظر گرفته شد و بقیه ارقام در مقایسه با آن یا مثبت و یا منفی از آن ثبت شدند.

** آغاز گلدهی در رقم شاه پسند به عنوان استاندارد صفر در نظر گرفته شد و بقیه ارقام در مقایسه با آن یا مثبت و یا منفی از آن ثبت شدند.

جدول ۴-۲: ارزیابی هم پوشانی ژنوتیپ های نر انتخابی با ۵ رقم تجاری پسته

کد	ماه	فروردین											اردیبهشت				
		21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	1	2	3	4	5
MG1																	
MG2																	
MG3																	
MG4																	
MG5																	
MG6																	
MG7																	
MG8																	
MG9																	
MG10																	
MG11																	
MG12																	
MG13																	
MG14																	
MG15																	
MG16																	
MG17																	
MG18																	
MG19																	
MG20																	
AhmadAgaei																	
Akbari																	
ShahPasand																	
Fandogi																	
KaleGhochi																	

از لحاظ زمان رسیدگی میوه در پژوهش حاضر زودرس‌ترین ژنوتیپ FG10 و دیررس‌ترین ژنوتیپ، رقم اکبری و FG17 و رقم FG13 به‌عنوان رقم میان‌رس شناخته شد. در تقسیم بندی انواع پسته از نظر زمان رسیدن محصول به ۳ گروه زودرس رقم اوحدی و قزوینی، متوسط‌رس رقم کله‌قوچی و دیررس رقم اکبری در شرایط آب و هوایی رفسنجان اشاره کرد (اسماعیل‌پور، ۱۳۸۴).

۴-۲-۲- خصوصیات رشدی ژنوتیپ‌های پسته مورد ارزیابی

تشریح خصوصیات رشدی ژنوتیپ‌های ۴۵ پسته مورد ارزیابی در جدول ۳-۴ ارائه شده است. متوسط طول شاخه سال جاری در ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی ۱۸/۳۸ سانتی‌متر و دامنه تغییرات آن بین ۱۲ تا ۲۷ سانتی‌متر متغیر بود و در این پژوهش ژنوتیپ اکبری کمترین و ژنوتیپ‌های FG19، FG17 بیشترین رشد طول شاخه سال جاری را دارا بودند (جدول ۳-۴). در بین ۴۵ ژنوتیپ به ترتیب MG17 بیشترین (۱۸/۹۹) سانتی‌متر و MG11 کمترین (۱۱/۰۸) سانتی‌متر طول برگ را دارا بودند و میانگین این صفت در ژنوتیپ‌های مورد بررسی برابر ۱۶/۱۹ سانتی‌متر بود. در صفت عرض برگ ژنوتیپ MG15 با ۱۲/۸۶ سانتی‌متر و ژنوتیپ MG1 با ۱۸/۲۹ سانتی‌متر به ترتیب کمترین و بیشترین عرض برگ را نشان دادند. متوسط عرض برگ برابر با ۱۵/۵۳ سانتی‌متر بود. در صفت طول برگچه به ترتیب ژنوتیپ FG12 با ۱۱/۱۴ سانتی‌متر بیشترین و FG11 با ۷ سانتی‌متر کمترین طول را و متوسط این صفت برابر با ۹/۱۲ سانتی‌متر بود. متوسط عرض برگچه ۵/۲۱ سانتی‌متر و ژنوتیپ MG1 با ۷/۱۵ سانتی‌متر بیشترین و ژنوتیپ MG15 با ۳/۸۲ سانتی‌متر کمترین عرض برگچه را داشت. در مطالعه (Chatti et al, 2017) به منظور ارزیابی منابع ژنتیکی ۲۰ اکوتیپ پسته از جنوب تونس گزارش شد که به طور کلی پارامترهای مورفولوژیک برگ‌ی استفاده شده به استثنای پارامتر مورفولوژیکی قطر تنه درخت برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در نمونه‌های مورد مطالعه سیار موفق بود و همچنین نشان دهنده تفاوت معنی‌داری بودند. در این ارزیابی متوسط تعداد برگچه ۴/۲۴ بود که دامنه تغییرات آن بین ۳ تا ۶ متغیر بود. بیشترین تعداد برگچه برای ژنوتیپ‌های اکبری، FG1، FG2 و FG13 مشاهده شد و کمترین تعداد هم مربوط به ژنوتیپ‌های MG1، MG3، MG5، MG9.

MG10, MG11, MG16, MG18, FG4, FG9, FG14 و FG15 بود. نتایج بررسی ژنوتیپ‌های مورد

مطالعه نشان داد که عادت رشد نیمه عمودی آلفا و گسترده بیشتر از عادت رشد عمودی است.

جدول ۳-۴: تشریح خصوصیات رشدی و کیفی درخت در ۲۰ ژنوتیپ ماده و ۲۰ ژنوتیپ نر و ۵ رقم تجاری پسته

شماره	صفات اندازه‌گیری شده	تعداد ژنوتیپ	کمترین	بیشترین	میانگین	انحراف معیار	واریانس
۱	عادت رشد درخت	۴۵	۱	۳	۲/۳۱	۰/۶۳	۰/۴۰
۲	عادت انشعاب شاخه‌ها	۴۵	۳	۷	۴/۹۱	۱/۳۵	۱/۸۱
۳	رنگ برگ	۴۵	۱	۳	۲/۰۰	۰/۴۸	۰/۲۳
۴	سایز برگچه انتهایی نسبت به برگچه‌های پایه	۴۵	۱	۲	۱/۷۳	۰/۴۵	۰/۲۰
۵	شکل برگچه انتهایی	۴۵	۱	۵	۱/۸۴	۱/۰۴	۱/۰۹
۶	نوک برگچه انتهایی	۴۵	۱	۵	۱/۹۸	۱/۱۸	۱/۳۹
۷	انتهای برگچه انتهایی	۴۵	۱	۳	۲/۰۰	۰/۹۰	۰/۳۲
۸	تعداد برگچه	۴۵	۳	۶	۴/۲۴	۰/۹۶	۰/۹۲
۹	طول برگ	۴۵	۱۳/۰۸	۱۹/۹۹	۱۶/۱۹	۱/۵۰	۲/۲۶
۱۰	عرض برگ	۴۵	۱۲/۴۸	۱۸/۳	۱۵/۵۳	۱/۵۰	۲/۲۵
۱۱	طول برگچه انتهایی	۴۵	۷	۱۱/۱۴	۹/۱۲	۰/۹۳	۰/۸۶
۱۲	عرض برگچه انتهایی	۴۵	۳/۸۲	۷/۱۶	۵/۲۱	۰/۶۷	۰/۴۵
۱۳	طول شاخه سال جاری	۴۵	۱۲	۲۷	۱۸/۳۸	۳/۸۵	۱۴/۸۰

۴-۲-۳- خصوصیات پمولوژیکی میوه در ژنوتیپ‌های ماده

تشریح خصوصیات پمولوژیکی میوه ژنوتیپ‌های پسته مورد مطالعه در جدول ۴-۴ ارائه شده

است. متوسط وزن تر میوه همراه پوست رویی در میان ۲۵ ژنوتیپ برابر با ۲۰۹/۹۰ گرم بود و به

ترتیب ژنوتیپ‌های FG6 با ۲۷۹/۳ گرم و FG10 با ۱۳۹/۲ گرم دارای بیشترین و کمترین وزن تر

میوه بودند. میانگین وزن میوه و وزن پوست میوه در میان ۲۵ ژنوتیپ به ترتیب ۱۳۰/۳۳ و ۷۸/۴۰

گرم بود. بیشترین وزن میوه به میزان ۱۶۹/۷ گرم در ژنوتیپ FG18 و کمترین وزن میوه به میزان ۸۵

گرم در ژنوتیپ FG10 مشاهده گردید. بیشترین وزن پوست ۱۱۸/۶ گرم برای ژنوتیپ FG6 و

کمترین میزان وزن پوست ۵۳/۴ گرم در ژنوتیپ FG9 مشاهده گردید.

میانگین وزن پسته خشک، وزن هسته و وزن پوسته به ترتیب ۹۵/۶۲ ، ۴۶/۶۵ و ۴۸/۴۳ گرم بود.

بیشترین و کمترین وزن پسته خشک به ترتیب در ژنوتیپ‌های FG18 ۱۲۸/۴ گرم و FG16 ۷۰/۵

گرم مشاهده گردید. در صفت وزنی پسته رقم FG18 به‌طور میانگین حدود ۲۷ گرم نسبت به ژنوتیپ‌های تجاری وزن بیشتری داشت این نشان دهنده این است که در ارقام ماده انتخابی مورد مطالعه از کلکسیون بذری می‌توان یک سری ارقام را که از لحاظ صفات کمی و اقتصادی ارقام برتر هسته را مفید معرفی کرد. در صفت وزن هسته بیشترین وزن را به ترتیب ژنوتیپ‌های FG3 و FG4 ۵۱ گرم و کمترین وزن هسته در ژنوتیپ FG10 مشاهده شد و همچنین متوسط تعداد پسته با پوست و تعداد پسته تازه بدون پوست و همچنین تعداد پسته خشک در ۱۰۰ گرم به ترتیب برای ۲۵ ژنوتیپ به ترتیب برابر با ۴۹، ۸۰ و ۱۰۶ بود (جدول ۴-۴).

کمترین تعداد در سه صفت فوق مربوط به تعداد پسته تازه با پوست و بدون پوست به ترتیب در ژنوتیپ‌های FG6 ۳۶ عدد و FG18 ۵۹ عدد و تعداد پسته خشک FG18 ۷۸ عدد مشاهده شد که می‌توان نتیجه گرفت هر چه تعداد پسته در ۱۰۰ گرم بیشتر باشد نشان دهنده این است که پسته‌ها ابعاد کوچک‌تری داشتند و یا به لحاظ درصد پوکی دارای درصد بیشتری هستند. میانگین طول مغز، عرض مغز و همچنین ضخامت مغز در این ارزیابی به ترتیب ۱۹/۵۱، ۱۱/۷۱ و ۱۰/۷۶ میلی‌متر بود. بیشترین و کمترین طول مغز مربوط به ژنوتیپ‌های FG17 ۲۳/۶۸ و FG16 ۱۶/۶ میلی‌متر بود. بیشترین عرض مغز با ۱۳/۷ میلی‌متر را ژنوتیپ اکبری به خود اختصاص داد. در صفت ضخامت مغز بیشترین و کمترین به ترتیب در ژنوتیپ‌های اکبری ۱۲/۱۹ و FG16 با ۹/۰۳ میلی‌متر مشاهده شد. برای صفت عرض گروه بیشترین و کمترین به ترتیب با ۱۹/۶۰ سانتی‌متر مربوط به ژنوتیپ احمدآقایی و ۷/۱۶ سانتی‌متر در ژنوتیپ FG2 مشاهده شد. متوسط عرض خوشه و طول خوشه هم به ترتیب ۱۰/۴۲ و ۱۱/۱۸ سانتی‌متر به‌دست آمد. در صفت طول گروه هم بیشترین در ژنوتیپ FG9 ۱۸/۰۵ سانتی‌متر و کمترین FG5 با ۸/۶۳ سانتی‌متر به دست آمد.

جدول ۴-۴: تشریح خصوصیات کمی و کیفی میوه در ژنوتیپ‌های ماده انتخابی و ۵ رقم تجاری پسته

شماره	صفات اندازه‌گیری شده	تعداد ژنوتیپ	کمترین	بیشترین	میانگین	انحراف معیار	واریانس
۱	شکل میوه	۲۵	۱	۵	۳/۱۶	۱/۳۴	۱/۸۱
۲	شکل نوک میوه	۲۵	۱	۴	۲/۵۶	۱/۰۴	۱/۰۹
۳	فرورفتگی پوسته در نزدیکی اسکار	۲۵	۰	۲	۱/۰۰	۰/۸۲	۰/۶۷
۴	برجستگی اسکار (انتهایی میوه)	۲۵	۱	۲	۱/۴۰	۰/۵۰	۰/۲۵
۵	برآمدگی و صافی چاک میوه	۲۵	۳	۷	۵/۴۰	۲/۰۰	۴/۰۰
۶	بازبودن بخیه یا چاک میوه	۲۵	۳	۷	۵/۱۶	۱/۷۲	۲/۷۹
۷	وزن تر همراه پوست رویی	۲۵	۱۳۹/۲	۲۷۹/۳	۲۰۹/۹۰	۳۸/۳۲	۱۴۶۸/۰۰
۸	وزن تر پسته	۲۵	۸۵	۱۶۹/۷	۱۳۰/۳۳	۲۱/۴۷	۴۶۰/۷۸
۹	وزن پوست	۲۵	۵۳/۴	۱۱۸/۶	۷۸/۴۰	۱۸/۳۸	۳۳۷/۸۳
۱۰	تعداد پسته تر در ۱۰۰ گرم	۲۵	۵۹	۱۱۹	۷۹/۶۸	۱۴/۱۶	۲۰۰/۳۹
۱۱	تعداد پسته خشک در ۱۰۰ گرم	۲۵	۷۸	۱۴۰	۱۰۶/۸۸	۱۴/۲۸	۲۰۳/۸۶
۱۲	وزن پسته خشک	۲۵	۷۰/۵	۱۲۸/۴	۹۵/۶۲	۱۳/۱۲	۱۷۲/۰۶
۱۳	وزن هسته	۲۵	۳۴/۳	۶۳/۵	۴۶/۶۵	۶/۲۴	۳۸/۹۵
۱۴	وزن پوسته	۲۵	۳۴	۶۴/۸	۴۸/۴۳	۸/۳۴	۶۹/۵۳
۱۵	تعداد پسته با پوست در ۱۰۰ گرم	۲۵	۳۶	۷۰	۴۹/۴۸	۹/۲۹	۸۶/۲۶
۱۶	پسته پوک	۲۵	۱	۲۳	۱۰/۹۲	۵/۵۹	۳۱/۲۴
۱۷	پسته خندان	۲۵	۵۸	۹۳	۸۰/۱۶	۸/۵۰	۷۲/۲۲
۱۸	طول مغز	۲۵	۱۶/۶	۲۳/۶۸	۱۹/۵۱	۱/۹۰	۳/۶۰
۱۹	عرض مغز	۲۵	۱۰/۴۶	۱۳/۷	۱۱/۷۱	۰/۸۴	۰/۷۰
۲۰	ضخامت مغز	۲۵	۹/۰۳	۱۲/۱۹	۱۰/۷۶	۰/۷۹	۰/۶۲
۲۱	طول هسته	۲۵	۱۵/۰۴	۱۹/۳۲	۱۷/۱۰	۱/۱۰	۱/۲۲
۲۲	عرض هسته	۲۵	۸/۳۷	۱۱/۴۷	۹/۴۴	۰/۸۴	۰/۷۰
۲۳	ضخامت هسته	۲۵	۷/۵۱	۹/۶۵	۸/۸۳	۰/۵۴	۰/۲۹
۲۴	طول گروه	۲۵	۸/۶۳	۱۸/۰۵	۱۱/۱۸	۲/۰۱	۴/۰۳
۲۵	عرض گروه	۲۵	۷/۱۶	۱۹/۰۶	۱۰/۴۲	۲/۵۸	۶/۶۷

برای صفت عرض خوشه بیشترین و کمترین به ترتیب با ۱۹/۶۰ سانتی‌متر مربوط به ژنوتیپ احمدآقایی و ۷/۱۶ سانتی‌متر در ژنوتیپ FG2 مشاهده شد. متوسط عرض خوشه و طول خوشه هم به ترتیب ۱۰/۴۲ و ۱۱/۱۸ سانتی‌متر به دست آمد. در صفت طول خوشه هم بیشترین در ژنوتیپ FG9 ۱۸/۰۵ سانتی‌متر و کمترین FG5 با ۸/۶۳ سانتی‌متر به دست آمد. متوسط صفت‌های طول هسته، عرض و ضخامت هسته برای ۲۵ ژنوتیپ به ترتیب ۱۷/۱۰، ۹/۴۴ و ۸/۸۳ میلی‌متر بود اما بیشترین طول برای ژنوتیپ FG17 ۱۹/۳۲ میلی‌متر و بیشترین عرض هسته مربوط به ژنوتیپ‌های اکبری و احمدآقایی با ۱۱/۴۷ میلی‌متر بود. ژنوتیپ FG6 با ۹/۶۵ میلی‌متر بیشترین ضخامت هسته را به خود

اختصاص دادند. میانگین پسته خندان ۸۰/۱۶ و پسته پوک ۱۰/۹۲ درصد به دست آمد. بیشترین پسته خندان ۹۳ درصد مربوط به ژنوتیپ FG13 و کمترین آن برای ژنوتیپ FG14 ۵۸ درصد بود. بیشترین پوکی پسته مربوط به ژنوتیپ FG6 ۲۳ عدد و کمترین پسته پوک ۱ عدد در ۱۰۰ دانه برای ژنوتیپ FG18 به دست آمد. می‌توانیم نتیجه کلی از این نتایج را این چنین بازگو کنیم که در صفات بسیار مهم و با تنوع بالا ژنوتیپ‌های FG2, FG8, FG9, FG10, FG14 به لحاظ خصوصیات ابعاد میوه (طول، عرض و ضخامت میوه و مغز میوه) به رقم فندق نزدیک‌ترند و ژنوتیپ‌های FG6, FG17, FG18, FG19 و FG20 از نظر ابعاد میوه و مغز آن نزدیک به سایر رقم‌های تجاری و حتی در یک سری صفات ابعادی بهتر از آن‌ها هستند. ژنوتیپ‌های FG6, FG3, FG18 در صفت تعداد پسته در ۱۰۰ گرم و به لحاظ وزنی از سایر ژنوتیپ‌ها بهتر بودند. تعداد پسته در ۱۰۰ گرم می‌تواند رابطه مستقیمی با درصد پوکی میوه و یا کوچک بودن ابعاد میوه داشته باشد. از ژنوتیپ‌هایی که درصد پوکی کمتری دارند می‌توان FG2, FG13, FG18, FG16 را نام برد و در صفت درصد بالای خندانی ژنوتیپ‌های FG2, FG13, FG16, FG12 و FG8 را می‌توان معرفی کرد. ژنوتیپ‌های FG3, FG6, FG17, FG18, FG20 و FG12 بیشترین وزن میوه در ۱۰۰ دانه را دارا بودند. خصوصیات وزن، اندازه و درصد پوست، شکل و خندانی پسته‌ها جهت شناسایی و تفکیک ژنوتیپ‌ها از یکدیگر مهم و تأثیرگذار است (Vargas et al., 1998) که در این پژوهش هم از تنوع بالای این صفات برخوردار بود.

صفات کیفی می‌توانند در بازارپسندی و اقتصاد محصول صادراتی بسیار موثر باشند که در پژوهش حاضر ارزیابی فرم و شکل میوه، شکل نوک و برآمدگی انتهای میوه‌ها صورت گرفت و فرم تخم‌مرغی شکل، قلبی شکل و کم پهنا دراز شکل بیشتر از سایر اشکال می‌باشد. در ارزیابی صفت مربوط به شکل نوک پسته، نوک مدوری شکل میوه به میزان ۴۸ درصد و بیشتر از سایر اشکال مشاهده شدند.

۴-۲-۴- همبستگی بین صفات کمی در ژنوتیپ‌های پسته

نتایج همبستگی صفات کمی و کیفی مورد مطالعه در جدول (۴-۵) ارائه شده است در میزان همبستگی بسیاری از صفات رابطه معنی داری مشاهده شد اما در بعضی از صفات میزان همبستگی مثبت و پایین بود، به حدی که با توجه به جدول (۴-۵) معنی دار شناخته نشدند. با استفاده از ضریب همبستگی می‌توان میزان ارتباط بین متغیرهای مختلف را مشخص کرد. تعیین ارتباط بین متغیرها در کشف روابط بین صفات مختلف، جهت بهبود عملکرد و دیگر خصوصیات اقتصادی در گیاهان کاربرد بسیار دارد (Chadhary et al., 2016).

طول و عرض برگ با طول و عرض برگچه رابطه مثبت و معنی داری در سطح ۵ درصد و با تعداد برگچه رابطه منفی و معنی داری در سطح ۱ درصد نشان داد که این رابطه نشان می‌دهد هرچه تعداد برگچه‌ها در برگ بیشتر باشد اندازه برگچه‌ها به لحاظ ابعادی کمتر است و این نتیجه با نتایج مطالعه (Karimi et al., 2012) بر روی *P.khinjuk* که در صفت طول و عرض برگچه با طول برگ همبستگی مثبت نشان داد و همچنین نتایج این پژوهش حاضر با مطالعه (Karimi et al., 2009) در تیپ رشدی پسته مشخصات برگچه انتهایی با تعداد برگچه همبستگی منفی گزارش شد، همخوانی دارد. نتایج ارزیابی (صادقی سرشت و همکاران، ۱۳۹۳) بر روی ۱۰۸ ژنوتیپ پسته و در کل دو نوع تیپ رشدی پسته و بنه بود، طول و عرض برگچه انتهایی در هر دوتیپ رشدی با صفات ارتفاع درخت، طول و عرض برگ همبستگی مثبت و معنی داری نشان دادند که با نتایج حاضر همخوانی داشت. رابطه مثبت و معنی داری در سطح ۱ درصد بین طول شاخه سال جاری با طول برگ دیده شد که با مطالعه (Nikomansh et al., 2011) که بر روی بادام گزارش شد که صفاتی مانند طول و عرض برگ و سطح برگ همبستگی بالایی با صفات مرتبط با قدرت رشد مانند ارتفاع و قطر شاخه که منجر به رشد بهتر اندام هوایی می‌شوند، دارند همخوانی داشت. در واقع نقش سطح برگ کل گیاه در فتوسنتز و رشد قطری دانهال مرتبط است. در صفت وزن تر میوه همراه پوست رویی با صفات طول برگ و طول شاخه سال جاری رابطه مثبت و معنی داری در سطح ۱ درصد و بین صفات طول و عرض برگ و همچنین

وزن تر میوه با صفت وزن پسته تازه رابطه مثبت و معنی داری در سطح ۵ درصد مشاهده شد که با پژوهش (رستمی کیا و همکاران، ۱۳۸۸) همخوانی نشان می‌دهد، در این پژوهش به منظور بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های بنه در شهرستان خلخال ۲۰ پایه از هر رویشگاه انتخاب و ۷ صفت برگ و ۷ صفت میوه مورد بررسی قرارگرفت و نتایج نشان داد که بین طول برگچه و وزن صد میوه و طول و عرض برگ و برگچه با طول شاخه سال جاری همبستگی مثبت و معنی داری وجود دارد. وزن پوست رویی میوه رابطه مثبت و معنی داری با وزن تر پسته همراه پوست و وزن پسته تازه در سطح ۵ درصد و با عرض برگ و برگچه رابطه مثبت و معنی داری در سطح ۱ درصد نشان داد. تعداد پسته تازه در ۱۰۰ گرم با طول و عرض برگ رابطه مثبت و معنی داری نشان داد که این به این معنی است که هرچه طول و عرض برگ بیشتر باشد، ابعاد میوه کوچکتر خواهد بود و در نتیجه تعداد پسته تازه در ۱۰۰ گرم بیشتر است و همچنین رابطه منفی و معنی داری بین تعداد پسته در ۱۰۰ گرم با طول و عرض برگچه و صفات وزنی در ۱۰۰ دانه در سطح ۵ درصد به چشم خورد که به این معنی است که هرچه طول و عرض برگچه بیشتر باشد، ابعاد پسته درشت‌تر و در نهایت تعداد پسته در ۱۰۰ گرم کمتر خواهد بود.

اگر وزن تر پسته با پوست و وزن پسته تازه پسته در ۱۰۰ دانه بیشتر باشد، در نتیجه نشان‌دهنده ابعاد درشت میوه خواهد بود که دلیل خوبی بر تعداد کم پسته در ۱۰۰ گرم خواهد بود. تعداد پسته خشک در ۱۰۰ گرم با طول برگ رابطه منفی و معنی داری در سطح ۱ درصد که به عبارتی هر چه طول برگ بیشتر باشد، روند تشکیل و پرشدن محتوای مغز کامل‌تر است و در نتیجه نشان‌دهنده بیشتر بودن وزن میوه خواهد بود و تعداد پسته در ۱۰۰ گرم کمتر خواهد شد. تعداد پسته خشک با تعداد پسته تازه در ۱۰۰ گرم و عرض برگ رابطه مثبت و معنی داری در سطح ۵ درصد نشان دادند که به این معنی است که هر چه عرض برگ بیشتر باشد، ابعاد میوه کوچکتر و در نتیجه تعداد پسته تازه و خشک در ۱۰۰ گرم بیشتر خواهد بود. بین صفات وزن پسته خشک با طول و عرض برگچه و صفات وزنی میوه در ۱۰۰ گرم همبستگی مثبت و معنی داری در سطح ۵ درصد مشاهده شد. که با نتایج

مطالعه (پورمقدم و همکاران، ۱۳۹۳) بر روی ارقام پسته بادامی ریز زرد و دانه‌های حاصل از آن که همبستگی مثبت و معنی‌داری بین ضخامت خشک میوه و عرض مغز و قطر طوقه با طول برگ گزارش کردند، مطابقت داشت. تعداد پسته با پوست در ۱۰۰ گرم با طول برگ رابطه مثبت و معنی‌داری نشان داد به این معنی که هرچه برگ‌ها طول‌تر باشند پسته‌ها ریزتر و به تعداد بیشتری در ۱۰۰ گرم وجود دارند. بین درصد پسته خندان و پسته پوک رابطه منفی و معنی‌داری در سطح ۵ درصد وجود داشت. به‌طور کلی می‌توان این‌طور برداشت کرد که هر چه تعداد پسته و باروری درخت بیشتر میزان پوکی بیشتر اما درصد خدانی کمتر است و برعکس هرچه میزان باروری درخت کمتر درصد پوکی کمتر و تعداد پسته خندان بیشتر است. یا به عبارتی هر چه صفات رویشی و سطح برگ بیشتر باشد سنتر کربوهیدرات‌ها بیشتر و در نتیجه خدانی بیشتر نمایان خواهد شد. در پژوهشی روی ۳۵ ژنوتیپ فندق با استفاده از نشانگرهای ISSR و RAPD بین صفات مهم میوه (طول نات و وزن مغز) رابطه مثبت و معنی‌داری مشاهده شد (فتاحی مقدم و همکاران، ۱۳۹۳) که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت.

بین صفت ابعاد مغز پسته با وزن میوه پسته در ۱۰۰ دانه در سطح ۵ درصد و با تعداد پسته پوک در ۱۰۰ دانه همبستگی در سطح ۱ درصد مثبت و معنی‌داری گزارش شد. و با تعداد پسته تازه و خشک در ۱۰۰ گرم همبستگی منفی و معنی‌داری مشاهده شد که این مطلب گویای این است که هر چه ضخامت مغز بیشتر باشد تعداد پسته در ۱۰۰ گرم کمتر خواهد بود. بین ابعاد مغز و هسته میوه با عرض خوشه میوه که نشان‌دهنده این است که عرض گروه هر چه بیشتر باشد پسته‌های گروه هم درشت‌تر و در نتیجه حاکی از طول و ضخامت بیشتر پسته‌ها است. بین صفت تاریخ برداشت با تعداد پسته تازه و تعداد پسته خشک رابطه منفی و معنی‌داری در سطح ۵ درصد وجود داشت. با توجه به زمان برداشت میوه در زمان مناسب آن اگر زودتر میوه برداشت شود شاید مغز میوه خوب پر نشده باشد و به همین علت تعداد پسته در ۱۰۰ گرم بیشتر مشاهده خواهد شد که به لحاظ کیفی و کمی مطلوب نمی‌باشد.

جدول ۴-۵: ضرایب همبستگی پیرسون بین داده‌های مورفولوژیکی کمی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

وزن هسته	وزن پسته خشک	تعداد پسته خشک	تعداد پسته تازه در g ۱۰۰	وزن پوست تازه	وزن پسته تازه	وزن تر میوه	طول شاخه سال جاری	عرض برگچه	طول برگچه	عرض برگ	طول برگ	تعداد برگچه
KDW	NDW	NN	NPF	SW	PFW	PFWS	LYB	TLW	TLL	LW	LL	NL
NL												۱
LL											۱	-۰/۰۱۱
LW										۱	۰/۶۰۷**	-۰/۲۸
TLL									۱	۰/۸۸۹**	۰/۴۹۸**	-۰/۲۹۶*
TLW								۱	۰/۶۴۷**	۰/۶۵۳**	۰/۴۴۸**	-۰/۳۸۰*
LYB							۱	۰/۱۵۹	۰/۱۴۱	۰/۲۷۲	۰/۳۱۱*	۰/۰۲۷
PFWS						۱	۰/۴۰۸*	۰/۵۷۳**	۰/۵۲۸**	۰/۵۴۸**	۰/۴۵۴*	-۰/۰۸۷
PFW					۱	۰/۹۶۰**	۰/۴۳۴*	۰/۶۷۵**	۰/۶۲۴**	۰/۶۳۰**	۰/۵۲۴**	-۰/۰۴۹
SW				۱	۰/۸۱۳**	۰/۹۴۴**	۰/۳۴۶	۰/۳۹۹*	۰/۳۷۵	۰/۴۰۷*	۰/۳۳	-۰/۱۴۵
NPF			۱	-۰/۷۶۰**	-۰/۹۷۵**	-۰/۹۱۸**	-۰/۳۸۸	-۰/۶۶۳**	-۰/۶۰۷**	-۰/۶۱۳**	-۰/۴۷۰*	۰/۰۳۳
NN		۱	۰/۹۴۵**	-۰/۷۰۹**	-۰/۹۳۰**	-۰/۸۷۰**	-۰/۳۵	-۰/۷۲۱**	-۰/۵۸۸**	-۰/۵۸۲**	-۰/۴۰۱*	۰/۰۵۹
NDW	۱	-۰/۹۷۹**	-۰/۹۲۳**	۰/۷۳۷**	۰/۹۴۳**	۰/۸۹۰**	۰/۳۵۸	۰/۷۰۴**	۰/۵۹۴**	۰/۵۶۸**	۰/۴۰۵*	-۰/۰۵۸
KDW	۰/۸۷۶**	-۰/۸۷۵**	-۰/۷۸۷**	۰/۵۱۱**	۰/۷۷۹**	۰/۶۸۸**	۰/۲۲۹	۰/۶۷۷**	۰/۵۸۹**	۰/۶۰۳**	۰/۳۴	۰/۰۶۵
ShW	۰/۹۳۴**	-۰/۹۰۳**	-۰/۸۷۱**	۰/۷۷۷**	۰/۹۰۶**	۰/۸۸۹**	۰/۳۸۹	۰/۶۱۳**	۰/۵۰۰*	۰/۴۴۹*	۰/۳۷۵	-۰/۱۴۱
NPWS	-۰/۷۲۸**	۰/۸۹۶**	۰/۹۰۶**	۰/۹۴۸**	-۰/۹۱۳**	-۰/۹۵۵**	-۰/۹۸۳**	-۰/۵۷۹**	-۰/۵۲۹**	-۰/۵۴۶**	-۰/۴۳۱*	۰/۰۶۲

ادامه جدول ۴-۵: ضرایب همبستگی پیرسون بین داده‌های مورفولوژیکی کمی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

وزن هسته	وزن پسته خشک	تعداد پسته خشک	تعداد پسته تازه	وزن پوست	وزن پسته تازه	وزن تر میوه	طول شاخه سال جاری	عرض برگچه	طول برگچه	عرض برگ	طول برگ	تعداد برگچه
KDW	NDW	NN	NPF	SW	PFW	PFWS	LYB	TLW	TLL	LW	LL	NL
BP	-۰/۲۶۳	۰/۰۵	-۰/۰۸۶	-۰/۲۰۶	۰/۳۹	۰/۲۰۹	۰/۳۰۶	۰/۳۲۱	-۰/۱۲	-۰/۰۹۷	۰/۲۱۸	-۰/۱۰۱
SN	۰/۲۵۴	-۰/۰۰۴	-۰/۰۱۲	-۰/۰۲۳	-۰/۲۲۲	-۰/۰۵۲	-۰/۱۳۶	-۰/۲۵۱	-۰/۰۹۵	۰/۰۲۵	-۰/۲۹۳	۰/۳۴۷
NI	۰/۳۶۹	۰/۶۵۶**	-۰/۶۷۲**	-۰/۷۰۷**	۰/۷۳۵**	۰/۷۴۰**	۰/۷۷۶**	۰/۴۶۳*	۰/۴۱۶*	۰/۴۶۰*	۰/۵۱۴**	-۰/۱۹۸
NW	۰/۱۸۴	۰/۴۴۵*	-۰/۴۷۱*	-۰/۴۴۵*	۰/۵۵۱**	۰/۴۳۷*	۰/۵۲۱**	-۰/۰۲۵	۰/۰۳۹	-۰/۰۸۴	-۰/۰۶۱	-۰/۰۵۳
NT	۰/۴۹۹*	۰/۵۶۹**	-۰/۵۷۱**	-۰/۵۲۱**	۰/۴۷۱*	۰/۵۲۰**	۰/۵۲۹**	۰/۰۲۵	۰/۲۴۸	-۰/۰۶۳	۰/۰۶	۰/۱۲۴
KL	۰/۴۱۷*	۰/۶۸۸**	-۰/۶۹۷**	-۰/۷۰۹**	۰/۶۴۵**	۰/۷۳۰**	۰/۷۲۶**	۰/۳۷۳	۰/۴۲۹*	۰/۳۲۳	۰/۳۷۹	-۰/۱۷۵
KW	۰/۰۶۵	۰/۲۲۹	-۰/۲۱۸	-۰/۲۷۵	۰/۳۷۳	۰/۲۵۴	۰/۳۲۷	-۰/۳۴۲	-۰/۱۲۸	-۰/۲۶۸	-۰/۲۷۸	۰/۰۹۶
KT	۰/۴۴۹*	۰/۵۱۵**	-۰/۴۸۷*	-۰/۴۷۲*	۰/۵۰۱*	۰/۵۰۷**	۰/۵۳۷**	۰/۰۲۲	۰/۱۸۲	-۰/۰۶۳	۰/۰۱۳	۰/۲۱۴
FSL	-۰/۰۷۲	۰/۰۰۴	۰/۰۳۷	۰/۰۱۲	۰/۰۴۱	۰/۰۰۶	۰/۰۲۴	-۰/۰۶۸	-۰/۱۶۷	-۰/۱۹۵	-۰/۲۳۲	-۰/۲۴۴
WFC	۰/۱۴۹	۰/۲۹۷	-۰/۲۸۵	-۰/۲۱۶	۰/۳۲۹	۰/۲۱۴	۰/۲۸	-۰/۱۹۶	۰/۰۱۱	-۰/۰۹۸	-۰/۱۱۴	-۰/۰۶۴
DHF	۰/۲۳۷	۰/۵۰۳*	-۰/۵۳۱**	-۰/۵۵۳**	۰/۴۶۷*	۰/۵۲۰**	۰/۵۲۰**	۰/۳۵۶	۰/۲۳۶	۰/۱۷۶	۰/۳۵۶	۰/۱۲۷
FBD	-۰/۲۵۸	-۰/۱۵۸	۰/۱۲۴	۰/۰۳	-۰/۱۳۶	-۰/۱۰۵	-۰/۱۲۶	-۰/۰۳۸	-۰/۰۷	-۰/۱۳۴	-۰/۱۲۸	-۰/۰۴۹
FP	۰/۲۴۲	۰/۲۷	-۰/۲۴۵	-۰/۱۲۸	۰/۲۰۸	۰/۱۵۷	۰/۱۹۷	-۰/۰۰۴	-۰/۱۳۹	-۰/۰۰۷	-۰/۰۹۳	۰/۰۶۴

ادامهٔ جدول ۴-۵: جدول ضرایب همبستگی پیرسون بین داده‌های مورفولوژیکی کمی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

طول دوره گلدهی	آغاز گلدهی ژنوتیپ های ماده	تاریخ برداشت	عرض خوشه	طول خوشه	ضخامت هسته	عرض هسته	طول هسته	ضخامت مغز	عرض مغز	طول مغز	تعداد پسته خندان	تعداد پسته پوک	تعداد پسته با پوست در ۱۰۰ گرم	وزن پسته
FP	FBD	DHF	WFC	FSL	KT	KW	KL	NT	NW	NI	SN	BP	NPWS	ShW
ShW	۱													
NPWS	-۰/۸۷۰**	۱												
BP	۰/۲۶۵	-۰/۳۱۴	۱											
SN	-۰/۱۸۷	۰/۱۱۶	-۰/۵۶۳**	۱										
NI	۰/۷۶۳**	-۰/۷۶۱**	۰/۴۲۴*	-۰/۲۶۹	۱									
NW	۰/۵۷۱**	-۰/۵۳۵**	۰/۴۲۱*	-۰/۱۹۲	۰/۶۳۵**	۱								
NT	۰/۵۳۳**	-۰/۵۵۵**	۰/۱۷۷	-۰/۱۱۱	۰/۳۰۳	۰/۵۷۸**	۱							
KL	۰/۷۷۳**	-۰/۷۱۶**	۰/۳۱	-۰/۱۶۱	۰/۹۱۲**	۰/۶۵۴**	۰/۴۶۸*	۱						
KW	۰/۳۰۵	-۰/۳۳	۰/۲۱۹	۰/۱۲۴	۰/۲۲۶	۰/۷۱۹**	۰/۵۱۵**	۰/۳۷۸	۱					
KT	۰/۴۷۵*	-۰/۵۴۵**	۰/۲۵۱	-۰/۱۰۵	۰/۲۰۸	۰/۴۴۱*	۰/۸۹۶**	۰/۳۴۶	۰/۵۲۵**	۱				
FSL	۰/۰۵۹	۰/۰۲۴	۰/۰۰۹	-۰/۰۲۳	۰/۰۰۳	۰/۱۳	۰/۲۳۸	۰/۱۰۵	۰/۳۶۳	۰/۲۷۵	۱			
WFC	۰/۳۷۷	-۰/۲۶۷	۰/۰۳۶	۰/۰۵۵	۰/۳۲۵	۰/۵۴۱**	۰/۴۱۸*	۰/۴۱۴*	۰/۵۹۹**	۰/۲۳۹	۰/۲۲۴	۱		
DHF	۰/۶۱۹**	-۰/۵۵۸**	۰/۴۴۴*	-۰/۲۶۲	۰/۵۹۷**	۰/۵۱۲**	۰/۳۸۵	۰/۵۴۳**	۰/۳۰۹	۰/۳۴۶	۰/۰۳۷	۰/۲۸۷	۱	
FBD	-۰/۰۸	۰/۰۷۸	۰/۱۵۷	-۰/۱۷	-۰/۱۰۱	۰/۱۳۲	-۰/۰۱۸	-۰/۰۴	۰/۴۰۴*	۰/۰۴۶	۰/۳۲۹	۰/۰۶۸	۰/۳۲۲	۱
FP	۰/۲۶۹	-۰/۱۹	-۰/۰۵	۰/۱۶	۰/۳۳۸	۰/۴۰۶*	۰/۱۶۱	۰/۲۳۸	-۰/۰۲۶	۰/۰۴۷	-۰/۱۶۸	۰/۰۸۴	۰/۱۳	-
														۰/۵۸۶**

صفت تاریخ آغاز گلدهی و طول دوره گلدهی با هم رابطه منفی و معنی داری در سطح ۵ درصد نشان داد که باز این خود تأیید بر این موضوع است که هر چه گلدهی زودتر شروع شود ممکن است با سرمای زودرس بهاره مواجه شود و اینکه اگر طول دوره هم کم باشد ممکن است به طور مناسب گرده افشانی انجام نگیرد و بر تعداد و وزن پسته تأثیر خواهد گذاشت. بین طول دوره گلدهی و صفت عرض مغز رابطه مثبت و معنی داری در سطح ۱ درصد وجود داشت که نشان دهنده این است که با طول دوره گلدهی بیشتر زمان بیشتری برای گرده افشانی مناسب و از آن طرف فرصت بیشتر برای تکمیل فرآیند پر شدن مغز خواهد بود.

۴-۲-۵- همبستگی بین صفات کیفی پسته

بین عادت رشد درخت و عادت انشعاب شاخه ها رابطه منفی و معنی داری در سطح ۵ درصد وجود دارد که مطابق نتایج مطالعه (Karimi et al., 2012) بر روی *P.khinjuk* گزارش شد بین صفات نسبت طول به عرض برگ با قدرت رشد درخت، طول و قطر تنه اصلی درخت و انشعابات شاخه رابطه منفی و معنی داری نشان داد. یعنی هر چه این نسبت کمتر باشد قطر تنه درخت بیشتر و انشعابات بیشتر و در صورتی که طول برگ بیشتر درختان پر رشدتر خواهند بود. بین صفات سایز برگچه انتهایی، فرم انتهایی برگچه در سطح ۵ درصد و شکل انتهایی برگچه با فرم نوک برگچه در سطح ۱ درصد همبستگی مثبت و معنی داری مشاهده شد. هرچه سایز برگچه انتهایی بزرگتر فرم انتهایی برگچه پهن تر و با تقارن بیشتری خواهد بود. اما بین سایر صفات رابطه معنی داری وجود نداشت (جدول ۴-۶).

جدول ۴-۶: ضرایب همبستگی پیرسون بین داده‌های کیفی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

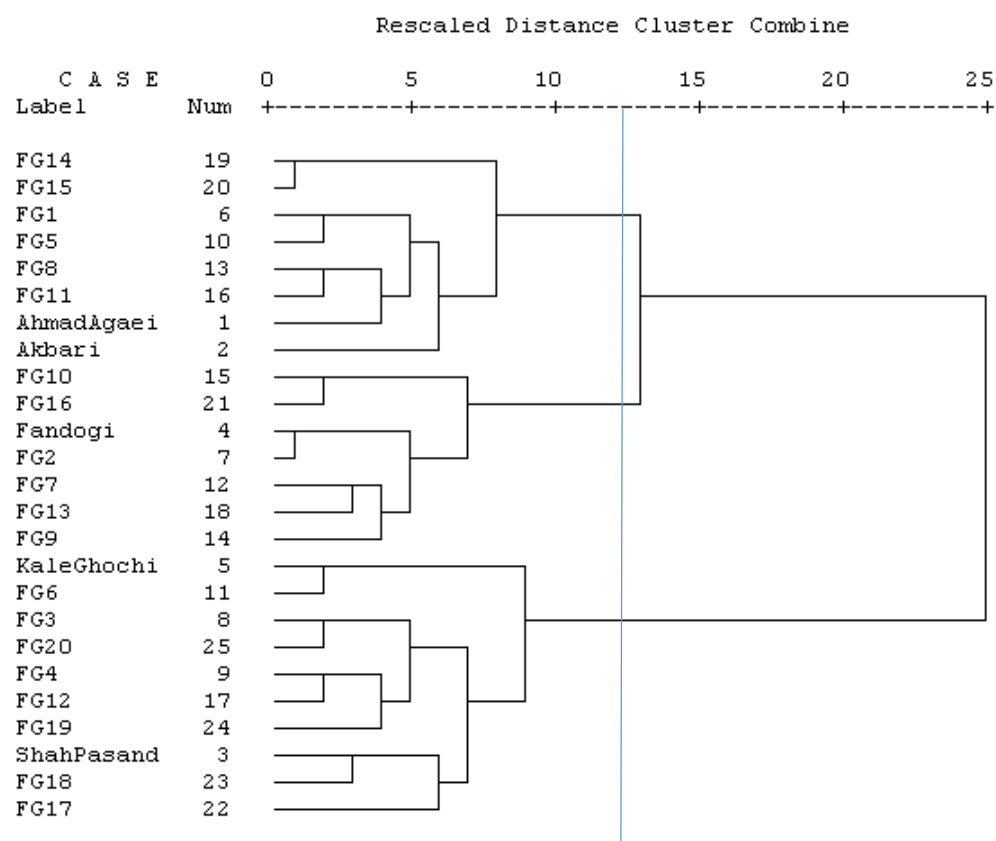
میزان باز بودن شکاف	برآمدگی شکاف پسته	برآمدگی اسکار پدیکال	فرورفتگی پوسته در نزدیکی اسکار	شکل نوک میوه	شکل میوه پسته	پایه و انتهای برگچه	نوک برگچه	شکل برگچه انتهایی	سایز برگچه انتهایی	رنگ برگ	عادت انشعاب شاخه‌ها	عادت رشد درخت
SO	SE	PSE	ShD	ShA	NSh	TLB	TLA	TLSh	TLS	CL	BH	GH
GH												۱
BH											۱	-۰/۴۱۳**
CL										۱	۰/۰۶۹	-۰/۰۸۳
TLS									۱	-۰/۱۰۷	۰/۱۱۲	-۰/۱۶۸
TLSh								۱	۰/۰۳۱	-۰/۱۵۳	-۰/۱۰۷	۰/۱۶۵
TLA							۱	-۰/۰۴۹	۰/۱۹۳	۰/۰۹۱	۰/۲۲۵	-۰/۲۱۷
TLB						۱	۰/۳۰۹*	-۰/۲۶۶	۰/۳۹۳**	۰/۰۵۳	-۰/۰۷۵	-۰/۰۸۸
NSh					۱	-۰/۲۷۴	-۰/۲۱۹	۰/۲۴۹	۰/۲۲۶	-۰/۰۶۱	-۰/۱۱۴	-۰/۱۱۷
ShA				۱	۰/۶۸۱**	۰/۰۶۷	۰	۰/۲۱۴	۰/۱۳۴	-۰/۳۸۳	۰/۱۱۱	۰/۰۳۶
ShD			۱	۰/۱۶۸	۰/۵۳۵**	-۰/۲۳۹	-۰/۰۳۴	۰/۰۹۷	۰/۳۲۲	۰/۲۶۱	۰/۰۷۵	-۰/۳
PSE		۱	۰	-۰/۱۲۲	۰/۰۷۲	-۰/۰۲۴	۰/۱۱	۰/۰۴۹	۰/۲۱	-۰/۰۳۶	۰/۱۷۱	-۰/۲۹۴
SE	۱	۰	-۰/۴۰۸*	-۰/۰۳	-۰/۲۶۳	۰/۲۰۷	۰/۰۲۸	۰/۲۴۴	۰/۳۱۵	-۰/۳۷۳	-۰/۱۹۵	۰/۱۳۱
SO	۰/۵۶۰**	۰/۲۱۱	-۰/۰۵۵	-۰/۳۰۳	-۰/۴۰۴*	۰/۳۲۲	-۰/۰۶۲	۰/۲۶۹	۰/۲۷۸	۰/۰۲۶	-۰/۱۸۴	۰/۰۰۶

۴-۲-۶- تجزیه کلاستر ژنوتیپ‌های ماده به همراه ۵ رقم تجاری بر اساس ۴۱ صفت

مورفولوژیکی

گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی و با استفاده از تجزیه گروه‌ای به روش Ward می‌تواند در تعیین تنوع ژنتیکی و مطالعه دقیق‌تر رابطه بین ژنوتیپ‌ها و فاصله خویشاوندی آنها مؤثر باشد. در فاصله ۱۲/۵ از ۲۵ در دندروگرام موجود از صفات مورفولوژیکی، نمونه‌های مورد مطالعه، همانطور که در شکل ۴-۲ قابل مشاهده است در سه گروه گروه‌بندی شدند.

Dendrogram using Ward Method



شکل ۴-۲- دندروگرام مورفولوژیکی ۲۰ ژنوتیپ انتخابی ماده پسته در کنار پنج رقم تجاری پسته بر اساس ۴۱ صفت

مورفولوژیکی و فنولوژیکی مربوط به خصوصیات رویشی، برگ و میوه

بیشتر ژنوتیپ‌ها در گروه ۳ قرار گرفتند و رقم‌های تجاری کله‌قوچی و شاه‌پسند هم در زیرگروه‌های جدا از هم و در این گروه قرار داشتند. هر گروه به زیر گروه‌های کوچکتری تقسیم بندی می‌شوند (شکل ۴-۲).

با توجه به جدول فوق همانطور که مشخص شده گروه سوم در صفت طول و عرض برگ و برگچه و همچنین طول شاخه سال جاری و صفات وزنی میوه و پسته تازه و خشک به استثنای وزن هسته بیشترین میانگین را نسبت به سایر گروه‌ها دارا بودند، که به ترتیب بیشترین میانگین طول و عرض برگ ۱۷/۲۹۵ و ۱۶/۷۷۴ سانتی متر بود و ژنوتیپ FG17 با ۱۹/۹ سانتی متر بیشترین طول برگ را به خود اختصاص داد و در صفت طول و عرض برگچه هم به ترتیب بیشترین میانگین ۹/۹۲ و ۵/۶۳ سانتی متر و نیز در صفت طول شاخه سال جاری با ۲۲/۳ سانتی متر بیشترین میانگین را دارا بود. گروه سوم بیشترین میانگین را در صفت وزن تر میوه با پوست، وزن پسته تازه، وزن پوست رویی و همچنین بیشترین وزن پسته خشک در ۱۰۰ دانه به ترتیب با مقادیر ۲۴۵/۴۱، ۱۵۰/۵۸، ۹۳/۴۹، ۱۰۶/۹۶ گرم برای این صفات نشان دادند. در این گروه همچنین طول مغز و هسته و درصد خندانی بیشتر از سایر گروه‌ها بود و در صفت تعداد پسته در ۱۰۰ گرم کمترین و میزان پوکی به نسبت کمتری مشاهده شد. تعداد پسته تازه و پسته خشک هر کدام در ۱۰۰ گرم در گروه دوم بیشترین میانگین را داشت که رقم FG6 کمترین تعداد و FG10 بیشترین تعداد را نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها داشتند. در صفت وزن پوسته با ۵۵/۳۵ گرم در گروه سوم و وزن هسته به ترتیب با ۵۱/۱۶ گرم در خوشه دوم بیشترین میانگین وزن مشاهده شد که رقم FG18 با ۶۴/۸ و ۶۳/۵ گرم بیشترین وزن را نسبت به کل ژنوتیپ‌ها دارا بود. گروه دوم در صفت طول و عرض هسته، عرض خوشه میوه و ضخامت هسته کمترین میانگین و در طول خوشه میوه بیشترین میانگین را به خود اختصاص داد. در خوشه اول بیشترین میانگین را در صفت درصد پوکی، عرض خوشه و عرض و ضخامت هسته، عرض و ضخامت نات و کمترین میانگین را در طول خوشه و درصد خندانی نشان داد. به ترتیب رقم FG6 بیشترین و FG18 وفندقی کمترین میزان پوکی را نسبت به سایر ارقام داشتند. در خوشه اول رقم‌های اکبری و احمدآقایی و FG8 کمترین میزان پوکی را داشتند. در محاسبه میزان خندانی رقم FG14 کمترین میزان را نشان داد. در کل گروه سوم با ۸۴/۸۵ درصد دارای بیشترین میانگین و گروه اول با

۳۷/۸۶ درصد دارای کمترین میانگین درصد خندانی بودند. رقم FG1 با ۱۶/۹ میلی متر در گروه دوم

کمترین و رقم FG17 با ۲۳/۶۸ میلی متر بیشترین طول مغز را داشت.

خوشه دوم با ۱۰/۱۴ میلی متر کمترین میانگین و خوشه اول با ۱۱/۲۴۸ میلی متر بیشترین میانگین را در صفت ضخامت مغز داشتند. در صفت طول خوشه میوه خوشه دوم با ۱۱/۷۵ میلی متر و خوشه اول با کمترین میانگین ۱۰/۸۱ میلی متر در بین سایر گروه‌ها مشخص بود. رقم‌های کله‌قوچی و اکبری با ۱۱/۴۷ میلی متر و FG14 با ۸/۳۷ بیشترین و کمترین عرض هسته را داشتند. در صفت طول هسته خوشه سوم با ۱۷/۸۶۹ میلی متر دارای بیشترین میانگین و خوشه دوم با ۱۶/۲۵۷ میلی متر دارای کمترین میانگین بود. به‌طور میانگین از نظر تاریخ برداشت خوشه سوم و خوشه اول دیررس و خوشه دوم زودرس‌تر بودند. از لحاظ آغاز گلدهی و همچنین طول دوره گلدهی به‌طور متوسط خوشه اول دیرگل‌ترین و خوشه سوم زودگل‌ترین و طولانی‌ترین دوره گلدهی مشاهده شد. رقم MG20 دارای طولانی‌ترین دوره گلدهی و MG5، MG9، MG13 و MG17 کمترین طول دوره گلدهی را داشتند. در صفت سائز برگچه انتهایی در اکثر ژنوتیپ‌ها بخصوص گروه اول و سوم سائز بزرگتری نسبت به برگچه‌های پایه مشاهده شد. در شکل کلی برگچه از تمام شکل‌ها به‌ویژه شکل‌های بیضوی و پهن نیزه مانند در گروه دوم بیشتر به چشم خورد. از لحاظ فرم نوک برگچه هم اکثر ژنوتیپ‌ها فرم سر سوزنی یا نوک‌باریک داشتند که در گروه سوم بیشتر مشاهده شد و از لحاظ شکل انتهایی برگچه هم اغلب فرم باریک‌مقارن در این گروه وجود داشت.

از نظر عادت رشد، اکثر ژنوتیپ‌ها رشد نیمه عمودی آلفا داشتند و در گروه دوم به‌جز رقم FG13 اغلب عادت رشدی درخت گسترده بود. در صفت عادت انشعاب شاخه‌ها به‌طور متوسط خوشه اول و دوم با تراکم پایین شاخه‌ها به‌جز رقم FG7 و FG13 که تراکم بالایی داشتند و در خوشه سوم هم به‌جز رقم FG19 که تراکم بالا بود، اکثراً تراکم پایین و متوسط مشاهده شد. در مطالعه (Chatti et al, 2017) به منظور ارزیابی منابع ژنتیکی ۲۰ اکوتیپ پسته از جنوب تونس با استفاده از پارامترهای مورفولوژیک برگ‌ی فاصله فنوتیپی با استفاده از داده‌های مورفولوژیکی محاسبه شد و کوتاهترین فاصله،

حداکثر شباهت بین ارقام مورد مطالعه ثبت شد و در حالی که بیشترین فاصله بین P3 و P7 مشاهده گردید و طبقه بندی ژنوتیپ‌ها به روش UPGMA انجام شد.

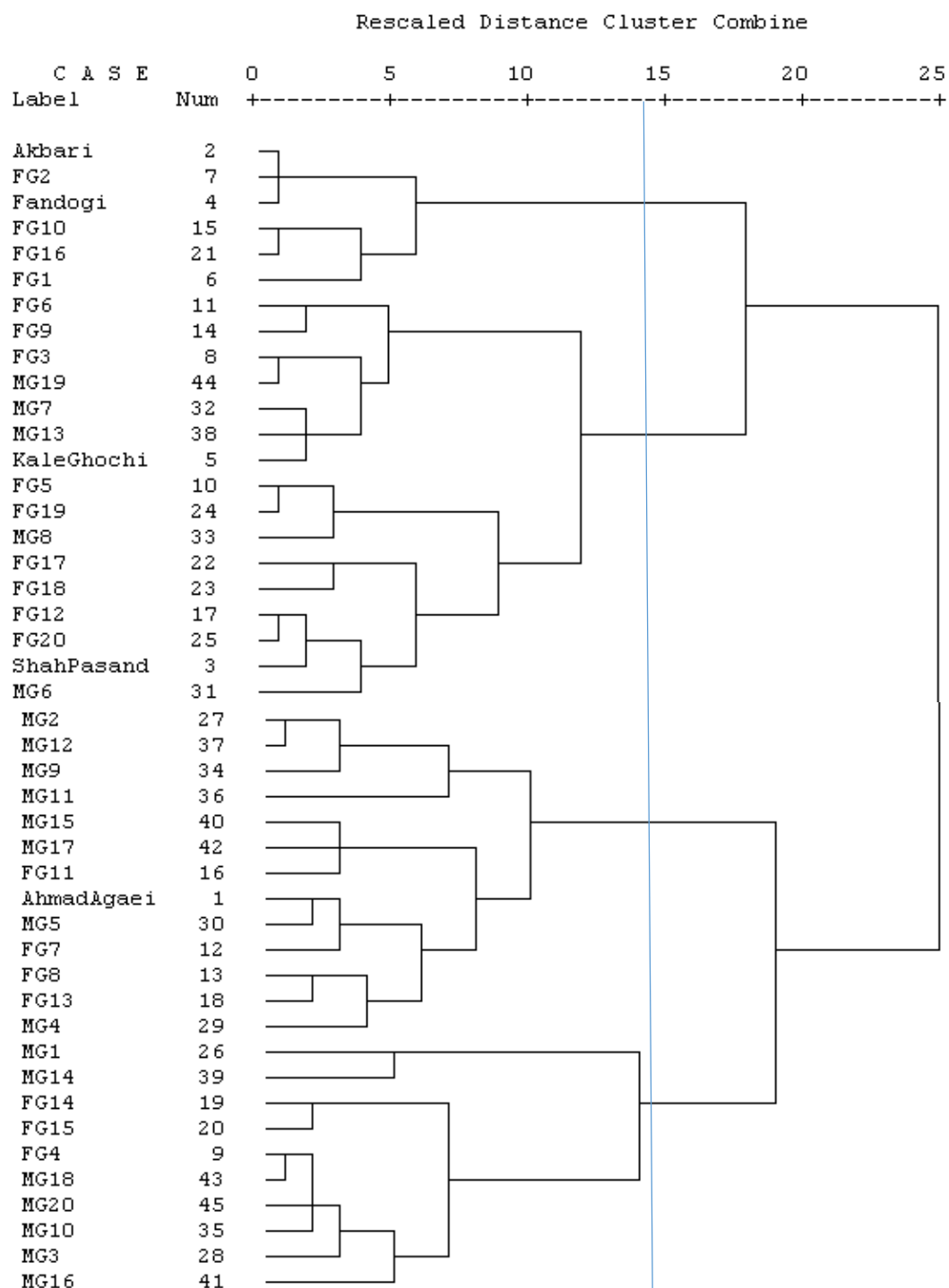
در گروه اول اکثر ژنوتیپ‌ها به جز FG1 و اکبری دارای نوک میوه با فرم مدور و رأس تیز بودند و برای فرم کلی میوه هم اکثر ژنوتیپ‌ها بخصوص گروه سوم دارای فرم تخم‌مرغی و قلبی‌شکل بودند و در کل در سایر گروه‌ها به طور متوسط از تمام شکل‌ها به جز فرم گرد متقارن مشاهده گردید.

۴-۲-۷- تجزیه کلاستر ۱۳ صفت رویشی و برای تمامی ژنوتیپ‌ها

در این ارزیابی گروه‌بندی ۴۵ ژنوتیپ‌ها بر اساس ۱۳ صفت کیفی و رویشی و با استفاده از تجزیه خوشه‌ای به روش Ward که می‌تواند به مطالعه دقیق‌تر رابطه بین ژنوتیپ‌ها و فاصله خویشاوندی آن‌ها کمک نماید، انجام شد. در فاصله ۱۴ از ۲۵ در دندروگرام موجود از صفات رویشی و مورفولوژیکی، نمونه‌های مورد مطالعه همان‌طور که در شکل ۳-۴ قابل مشاهده است به لحاظ کم بودن تعداد صفات و تعداد بالای ژنوتیپ‌ها در ۴ گروه قرار گرفتند. بیشترین تعداد برگچه در گروه اول بخصوص رقم‌های FG1، FG2 و FG13 وجود داشت.

از لحاظ شکل انتهایی برگچه گروه چهارم دارای فرم باریک متقارن و گروه‌های اول و دوم هم اکثراً به فرم انتهایی نازک و ضعیف شبیه بودند. به لحاظ فرم نوک برگچه گروه اول و دوم که رابطه نزدیکی را با هم نشان دادند در گروه فرم سر سوزنی یا نوک باریک‌ها جای گرفتند؛ اما ژنوتیپ‌های گروه سوم دارای فرم پهن با رأس نوک تیز بودند. در سائز برگچه انتهایی نسبت به برگچه‌های پایه از هر دو حالت شبیه به برگچه‌های پایه و بزرگتر از برگچه‌های پایه در تمام گروه‌ها مشاهده گردید. از نظر رنگ برگ از هر سه حالت در تمام گروه‌ها مشاهده شد. در صفت عادت انشعاب شاخه‌ها از دو حالت تراکم کم و متوسط در گروه اول و چهارم مشاهده شد به‌گونه‌ای که گروه اول به طور کامل تراکم پایین بودند و در سایر گروه‌ها تراکم بالا و متوسط از انشعاب شاخه‌ها به چشم خورد.

Dendrogram using Ward Method



شکل ۴-۳- دندروگرام مورفولوژیکی ۴۵ ژنوتیپ پسته بذری و ارقام تجاری بر اساس ۱۳ صفت مورفولوژیکی مربوط به خصوصیات

رویشی، برگ

در عادت رشد درخت هم گروه اول به جز ژنوتیپ FG1 عادت رشد گسترده داشتند و در سایر گروه‌ها از هر سه حالت عمودی، نیمه عمودی آلفا و گسترده مشاهده شد اما اکثر ژنوتیپ‌ها به‌ویژه گروه دوم نیمه عمودی آلفا بودند. در پژوهشی که توسط حاجی‌زاده حسین‌آبادی و همکاران، ۱۳۹۲ انجام شد ارقام ماده همگی در گروه‌های نزدیک به هم ولی ژنوتیپ‌های نر در دو انتهای دندروگرام قرار گرفتند و از یکدیگر تفکیک شدند. ویژگی برگ و خشک میوه از عوامل اصلی تفکیک کننده ارقام ماده پسته و ویژگی‌های برگ از عوامل اصلی تفکیک کنندگی ژنوتیپ‌های نر پسته است (Karimi et al., 2009). ژنوتیپ‌های نر پسته از تنوع بالایی برخوردار بودند که به دلیل پیوند نزدن ژنوتیپ‌های موجود در باغ می‌باشد (Arabnezhad et al., 2008).

۴-۲-۸- نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی صفات

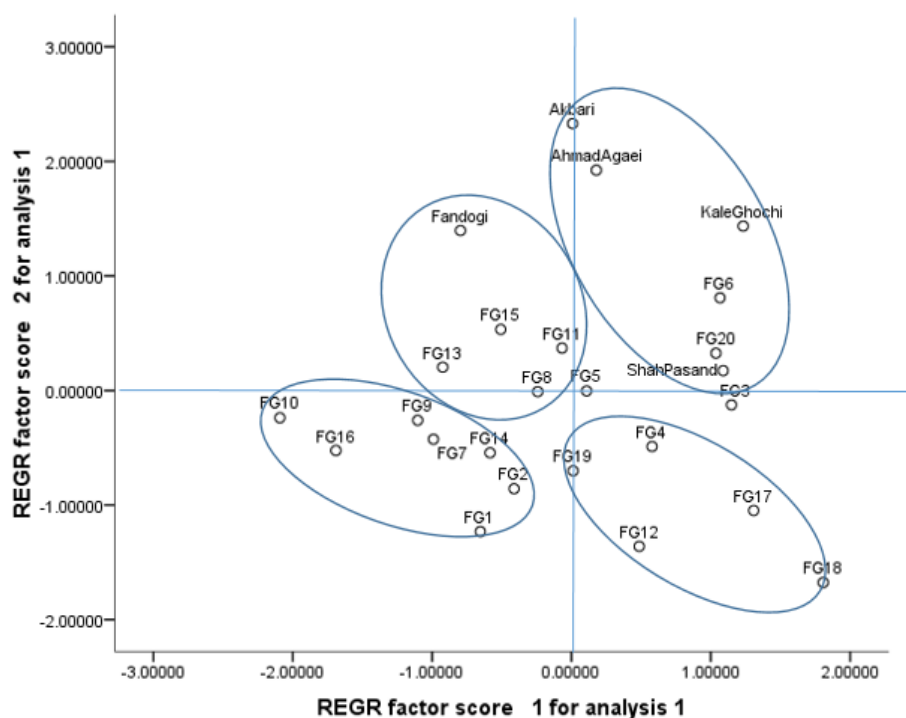
اگر تعداد متغیرهای مورد ارزیابی زیاد باشد به‌طور معمول تفسیر نتایج آن‌ها هم سخت و مشکل خواهد بود در نتیجه محققین با استفاده از روش‌هایی برای کاهش حجم داده‌ها به منظور آشکار ساختن روابط بین دو یا چند متغیر و توجیه تغییرات کل داده‌های اصلی و اولیه با استفاده از تبدیل خطی داده‌های اصلی به متغیرهای مستقل جدید (مؤلفه‌های اصلی) کمک می‌گیرند، به طوری که این مجموعه بتواند بیشترین واریانس داده‌ها را توجیه نماید. بر اساس نتایجی که از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی به دست آمد، در مجموع می‌توان گفت سه مؤلفه اول ۵۲/۴۵۸ درصد از واریانس کل را توجیه کردند (جدول ۴-۷)

نمودار دو بعدی و سه بعدی حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی در شکل ۴-۴ و ۴-۵ نشان داده شده است. سه گروه حاصل از گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس تجزیه خوشه‌ای کاملاً قابل تشخیص می‌باشند که این مسأله نشان دهنده قطع نمودار تجزیه خوشه‌ای در محل مناسب و گروه‌بندی صحیح ژنوتیپ‌ها می‌باشد. با توجه به بالابودن نتایج ماتریس در بعضی از صفات در سه مؤلفه اول، دوم و سوم ۵۲/۴۵ درصد، که بیش از ۰/۶ می‌باشند مشخص شد که صفاتی از قبیل وزن میوه هرکدام به‌طور مجزا و عرض برگ، طول و عرض برگچه انتهایی، طول مغز و هسته میوه در مؤلفه اول و صفت عرض

مغز و هسته میوه و عرض خوشه میوه در مؤلفه دوم و صفت ضخامت هسته در مؤلفه سوم در تفکیک پذیری بهتر ژنوتیپ‌ها از یکدیگر و گروه‌بندی بهتر و دقیق‌تر آن‌ها موثر واقع شدند. با توجه به نمودار حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی می‌توان نتیجه گرفت که ژنوتیپ‌های شاه‌پسند، احمدآقایی، اکبری و کله‌قوچی در یک گروه و در بین سه ژنوتیپ FG3، FG6 و FG2 در یک محل تجمع داشتند و رقم فندق در بین ژنوتیپ‌های FG8، FG11، FG15 و FG13 در یک قسمت از نمودار تجمع داشتند که نشان دهنده شباهت مورفولوژیکی بین این ژنوتیپ‌ها است.

جدول ۴-۷: نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی صفات زراعی-مورفولوژیک

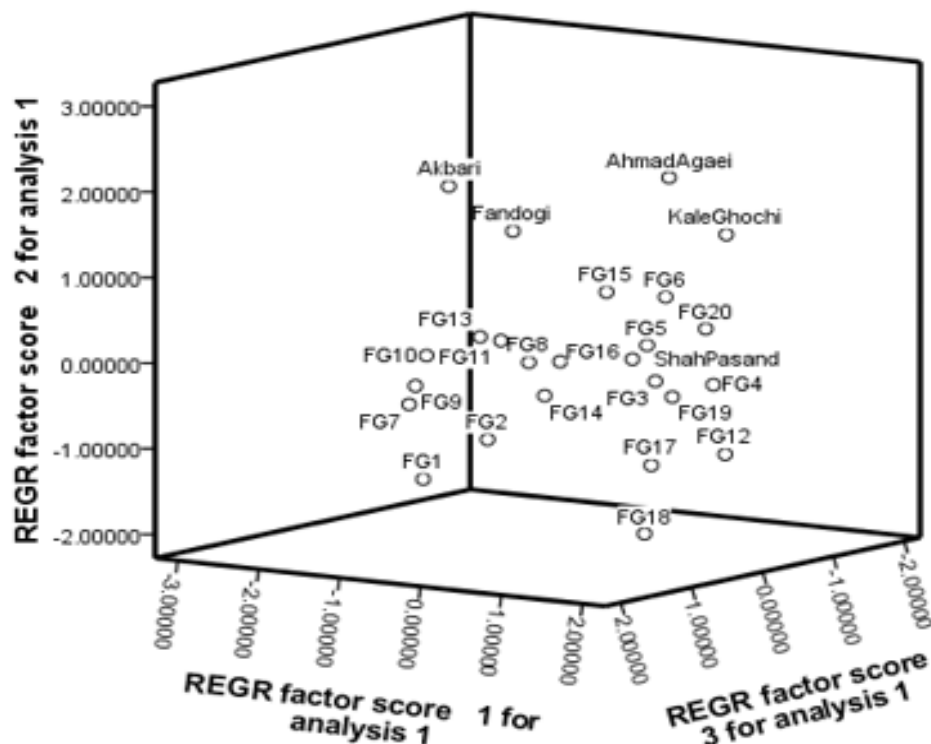
مؤلفه ها	مقادیر ویژه	درصد مقادیر ویژه	درصد تجمعی
۱	۱۲/۵۷۵	۳۰/۶۷	۳۰/۶۷
۲	۵/۲۱۷	۱۲/۷۲۴	۴۳/۳۹۴
۳	۳/۷۱۶	۹/۰۶۴	۵۲/۴۵۸



شکل ۴-۴: نمودار تجزیه دوبعدی بر مبنای سه مؤلفه اول حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس ۴۱ صفت مورفولوژیکی در

۲۰ ژنوتیپ انتخابی ماده و ۵ ژنوتیپ تجاری

در پژوهش (Chatti *et al.*, 2017) به منظور ارزیابی منابع ژنتیکی ۲۰ اکوتیپ پسته از جنوب تونس با استفاده از پارامترهای مورفولوژیکی برگ، تجزیه و تحلیل مؤلفه اصلی با تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA در کل نمونه‌های مورد مطالعه برای اکوتیپ‌های مختلف اختلاف نظر داشت. البته تجزیه و تحلیل مورفولوژیکی به برجسته کردن سطح نسبتاً بالایی از تنوع و برآورد روابط فیلوژنتیکی کمک کرد.



شکل ۴-۵- نمودار تجزیه سه بعدی بر مبنای سه مؤلفه اول حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس ۴۱ صفت مورفولوژیکی

در ۲۰ ژنوتیپ انتخابی ماده و ۵ ژنوتیپ تجاری

۴-۲-۹- معرفی ژنوتیپ‌های برتر از میان ژنوتیپ‌های مورد بررسی

از بین ۲۰ ژنوتیپ ماده که مورد پژوهش قرار گرفت پس از اندازه‌گیری صفات‌های مورد بررسی و تجزیه تحلیل آن‌ها، در مقایسه با ژنوتیپ‌های تجاری که به لحاظ صفات‌های کمی و کیفی در ارزش اقتصادی و صادراتی این محصول هم بی‌تأثیر نخواهند بود، به‌عنوان ژنوتیپ‌های برتر انتخاب شدند (جدول ۴-۸). در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه ژنوتیپ‌های FG3 و FG6 به دلیل وزن بالای میوه و

ژنوتیپ‌های FG18 و FG20 به لحاظ وزن بالای پسته خشک و ژنوتیپ‌های FG2، FG8 و FG13 در صفت خندانی میوه که به لحاظ ارزش پمولوژیکی میوه ژنوتیپ‌های برتر معرفی شدند. ژنوتیپ‌های FG13، FG16، FG18 درصد پوکی کمتری را نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها نشان دادند (جدول ۴-۸).

جدول ۴-۸: برخی از خصوصیات پمولوژیکی چند ژنوتیپ برتر

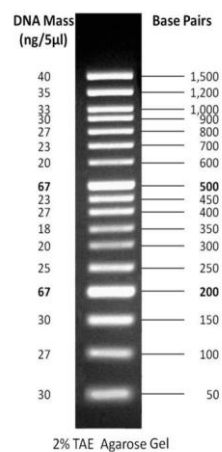
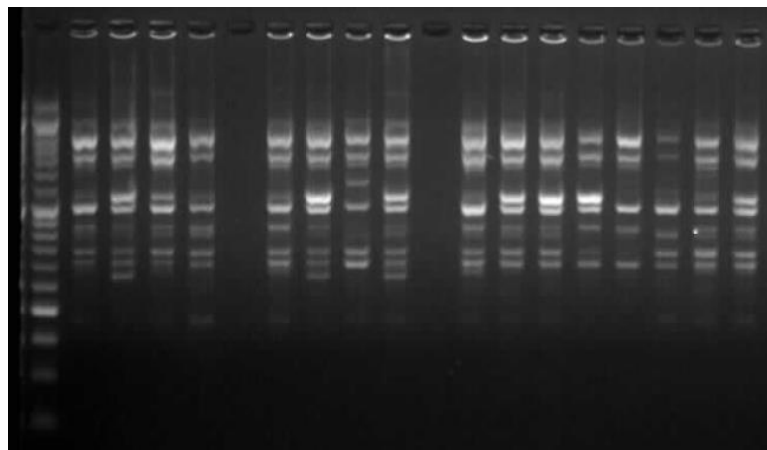
ژنوتیپ	وزن میوه (gr)	وزن مغز (gr)	خندانی میوه %	پوکی مغز %	طول مغز (mm)	ضخامت مغز (mm)	ضخامت هسته (mm)
FG3	۲۶۸/۵	۱۰۸	۷۸	۱۳	۲۲/۲۷	۱۱/۱	۹/۱۰
FG4	۲۲۴/۵	۹۸/۸	۸۱	۱۲	۲۰/۳۸	۱۰/۳۵	۸/۵
FG6	۲۷۹/۳	۱۰۶	۷۴	۲۳	۲۱/۷۵	۱۱/۳۹	۹/۶۵
FG2	۱۸۹/۵	۸۸	۹۲	۱۰	۱۷/۶۸	۱۰/۴۳	۸/۷۶
FG8	۱۹۳/۸	۹۸	۹۰	۸	۱۸/۲۲	۱۱/۹۷	۹/۳
FG18	۲۵۸	۱۲۸/۴	۷۸	۱	۱۹/۵۱	۹/۶۴	۸/۲۱
FG20	۲۴۳/۶	۱۱۰/۲	۸۶	۹	۲۲/۱۴	۱۰/۱۸	۸/۴۸
FG17	۲۶۲/۵	۱۰۳/۶	۶۶	۱۴	۲۳/۶۸	۹/۰۳	۷/۵۱
FG16	۱۴۹	۷۰/۵	۸۶	۳	۱۶/۶	۱۱/۳۱	۸/۹۷
FG13	۱۶۹/۴	۷۸/۵	۹۳	۴	۱۷/۲۲	۱۱/۵۵	۹/۵۴
FG12	۲۰۷/۸	۹۸/۶	۸۸	۶	۱۹/۱۳	۱۱/۰۲	۸/۸
اکبری	۲۱۲/۴	۹۹/۴	۷۵	۱۲	۲۰/۳۶	۱۱/۳۳	۸/۵۱
شاه‌پسند	۲۴۱/۵	۱۱۱	۸۹	۴	۱۹/۸۵	۱۲/۱۹	۹/۶۴
کله‌قوچی	۲۶۳	۱۱۰	۸۲	۱۷	۲۰/۷۸	۱۱/۱۲	۸/۷۱
فندق	۱۸۸/۶	۸۳/۵	۹۲	۲	۱۸/۲۶	۱۰/۲۲	۹/۴۴
احمدآقایی	۲۰۴/۵	۱۰۰	۸۱	۱۰	۲۱/۲۵	۱۱/۳۳	۸/۵۱

۴-۳- تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای مولکولی

در کل از ۴۵ ژنوتیپ مورد بررسی، که به‌طورکامل توسط ۱۰ نشانگر ISSR و ۱۰ نشانگر RAPD مورد بررسی تنوع ژنتیکی قرار گرفتند. پس از امتیازبندی باندها و شمارش تعداد کل باندها، درصد چندشکلی و باندهای چندشکلی که به وضوح مشخص بودند و تمام مشخصات مربوط به آلل‌ها و باندهای ایجاد شده حاصل از دو نوع نشانگر محاسبه شد که به طور مجزا در جدول (۴-۹) و (۴-۱۱) آمده است.

۴-۳-۱- بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای RAPD

در پژوهش حاضر از ۱۰ نشانگر RAPD برای تکثیر DNA ی ۴۵ ژنوتیپ مورد مطالعه استفاده شد. در شکل ۴-۶ نمونه ای از تصویر ژل حاوی قطعات DNA تکثیر یافته با استفاده از نشانگر OPN11 نشان داده شده است.



شکل ۴-۶- قطعات تکثیر یافته DNA با نشانگر OPN11 توسط لدر ۵۰ bp بر روی ژل ۱/۵ درصد که از سمت چپ به راست:

لدر، ژنوتیپ‌های FG1، FG2، FG3، FG4، FG5، FG6، FG7، FG8، FG9، چاهک خالی، FG10، FG11، FG12،

FG13، FG14، FG15، FG16، FG17

در مجموع ۱۰ نشانگر RAPD، ۲۱۳ باند تولید نمودند که از این تعداد قطعه DNA تکثیر شده، ۲۰۵ باند چندشکل و بقیه‌ی باندها تک شکل بودند جدول (۴-۱۱). در این ارزیابی توسط نشانگر RAPD میانگین اندازه‌ی باندهای تکثیر یافته از ۱۰۰ جفت باز در نشانگر BD12 تا ۱۸۰۰ جفت باز در نشانگر OPA18، BD12 متغیر بود و میانگین تعداد باندهای تکثیر شده برای هر نشانگر ۲۱/۳ باند بود. نشانگر BD12 با ۲۸ باند بیشترین تعداد باند و نشانگر OPK.02 با ۱۲ باند کمترین تعداد باند را نشان دادند و میانگین درصد چندشکلی حاصل از تکثیر کل نشانگرها ۹۵/۹ درصد و متوسط مکان‌های چندشکل برای هر نشانگر ۲۱/۳ مکان بود جدول (۴-۱۱). در تحقیقی که توسط (Shiran *et al.*, 2007) روی ارقام تجاری پسته با استفاده از نشانگر RAPD انجام گرفت و متوسط درصد چندشکلی ۹۱/۱ درصد گزارش شد و میانگین قدرت تفکیک (Rp) نشانگرها ۴/۹۷ بود. با توجه به محاسبات انجام شده میانگین قدرت تفکیک نشانگرها در این تحقیق ۱۰/۴۳۷ بود که بیشترین قدرت تفکیک ژنی با میزان ۱۳/۶۹ مربوط به نشانگر BD12 و کمترین ضریب Rp با میزان ۵/۹ در نشانگر OPM16 مشاهده شد. در مطالعه (Aliakbarkhany *et al.*, 1391) برای بررسی تنوع ژنتیکی ۳۸ ژنوتیپ، از ۱۵ نشانگر RAPD، ۱۱۵ باند چندشکل ایجاد شد که بیشترین تعداد ۱۲ باند مربوط به آغازگر BC18 بود و متوسط درصد چندشکلی در بین تمام نشانگرهای مورد استفاده ۹۲/۸۳ درصد و قدرت تفکیک نشانگرها از ۱/۳۶ تا ۷/۸۹ متغیر و میانگین آن ۴/۹۷ بود و بیشترین درصد چندشکلی مربوط به نشانگر OPN13 و با میزان ۱۰۰ درصد بود و بیشترین مقدار قدرت تفکیک مربوط به نشانگر BC12 با میزان ۷/۸۹ بود در پژوهش حاجی‌زاده حسین‌آبادی و همکاران، (۱۳۹۲) بیشترین درصد چندشکلی ۱۰۰ درصد مربوط به نشانگر TIBMBE.08 ۱۰۰ درصد بود و در نشانگر TIBMBE.17 ۸۳/۳۳ درصد بود که نشان دهنده‌ی کارایی بالای این نشانگرها در تفکیک ژنوتیپ‌های پسته است و تفکیک ژنوتیپ‌های نر و ماده به خوبی انجام گرفت. در مطالعه‌ای که توسط (Akdemit *et al.*, 2016) به منظور بررسی پایداری ژنتیکی گیاهچه‌های رشد یافته درون شیشه‌ای برای تولید بی خطر و سالم در مقیاس بزرگ درختان بالغ و تنوع ژنتیکی پسته‌های بالغ به مدت طولانی پراکنده و با رشد مجدد با

استفاده از جوانه‌های آپیکالی و برگ‌های مشتق شده در محیط آزمایشگاه که انجام شد، تعداد ۱۹ ژنوتیپ با نشانگر RAPD بررسی شد که در مجموع ۱۴۱ باند تکثیر نمود و تعداد باندهای پلی‌مورفیک ۸۳ (۵۸/۸ درصد) و بیشترین تعداد باندها توسط نشانگر K19 به ترتیب ۱۳ باند بود. بیشترین درصد باندهای چندشکل با نشانگر K18 ۹۰ درصد به دست آمد.

جدول ۴-۹: نتایج حاصل از نشانگرهای RAPD مورد استفاده در بررسی ژنوتیپ‌ها

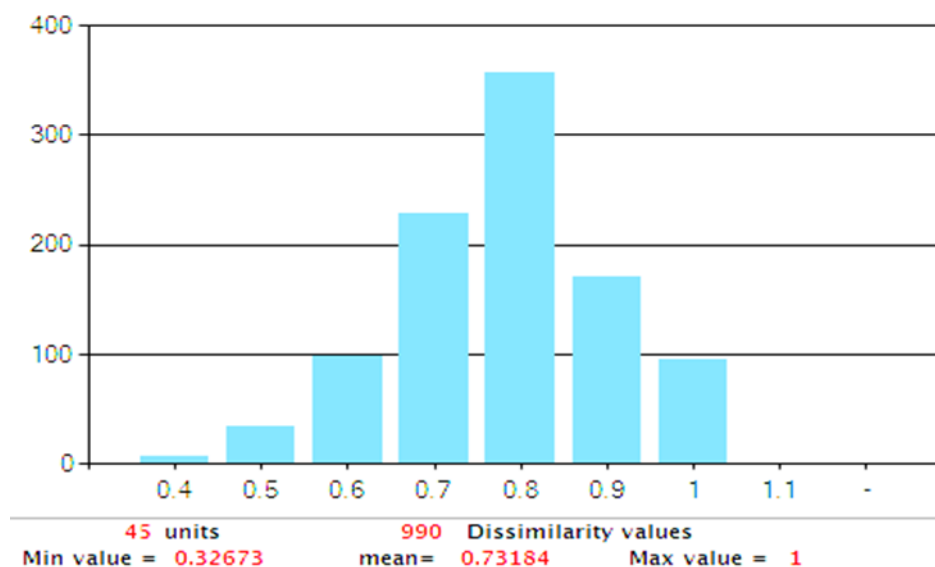
ردیف	نشانگر	کل باندها	باندهای چندشکل	درصد چندشکلی درصد	Rb
۱	OPM16	۱۴	۱۴	۱۰۰	۵/۹
۲	OPK.02	۱۲	۱۱	۹۱/۶	۶/۴
۳	OPN13	۲۲	۲۰	۹۰/۹۱	۱۰/۴
۴	TIBMBE17	۲۱	۲۰	۹۵/۲۴	۱۰/۸
۵	TIBMBE.08	۲۳	۲۰	۸۶/۹۵	۱۱/۶
۶	OPA18	۲۳	۲۳	۱۰۰	۱۳/۱۱
۷	BC13	۲۳	۲۳	۱۰۰	۸/۳۵
۸	BD12	۲۶	۲۶	۱۰۰	۱۳/۶۴
۹	OPN11	۲۸	۲۸	۱۰۰	۱۲/۸
۱۰	OPO.07	۲۱	۲۰	۹۵/۲۴	۱۱/۳۷
کل		۲۱۳	۲۰۵		
میانگین		۲۱/۳	۲۰/۵	۹۵/۹	۱۰/۴۳۷

۴-۳-۱-۱- رابطه ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های پسته حاصل از داده‌های RAPD

ضریب عدم تشابه جاکارد (شکل ۴-۷) در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی با میانگین ۰/۷۳ و در محدوده بین ۰/۳۳ تا ۱ قرار گرفت. بیشترین ضریب عدم تشابه ژنتیکی در بین ژنوتیپ‌های FG3 با FG1، FG12، FG13، FG15، FG16، FG18 و FG3 با FG19 و FG3 با MG5، MG17 با FG3، MG17 با MG1، MG16 با MG5، MG17 با MG5، MG19 با MG17، MG2 با MG1 دارای کمترین عدم تشابه

۰/۳۳ بودند یا به عبارتی دارای بیشترین شباهت ژنتیکی بودند. تنوع بالایی بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه مشاهده شد. در مطالعه علی‌اکبرخانی و همکاران، ۱۳۹۱ در بررسی تنوع ژنتیکی پسته منطقه فیض‌آباد خراسان نتایج حاصل از ماتریس تشابه نشان داد فاصله ژنتیکی میان ارقام و ژنوتیپ‌های مورد بررسی از ۳۱ تا ۷۰ درصد متغیر است. در مطالعه مشابهی این میزان بین ۴۰ تا ۸۶ درصد متغیر بود که توسط (Hajizade et al., 2009) گزارش شد و در تحقیق دیگری بین ۵۶ تا ۷۹ درصد شباهت متغیر بود (Taghizade et al., 2010). محدوده فاصله ژنتیکی نشان دهنده تنوع بالایی موجود در سطح ژنوم ارقام مورد مطالعه می‌باشد.

در پژوهشی که توسط (Akdemir et al., 2016) با استفاده از نشانگر RAPD بر روی گیاهچه‌های پسته درون‌شیشه‌ای ۱۹ نمونه انجام شد میزان شباهت بین ۰/۵۳۱ تا ۰/۹۹۱ و با میانگین ۰/۸۴ متغیر بود. در ارزیابی تنوع ژنتیکی برخی از گونه‌ها ارقام پسته با استفاده از نشانگر RAPD در بین ژنوتیپ‌های بنه بر اساس نتایج حاصل از ماتریس تشابه بیشترین تشابه ژنتیکی ۷۵ درصد و کمترین شباهت ژنتیکی ۲۸ درصد بین ارقام ماده با ژنوتیپ نر MO12 مشاهده شد.



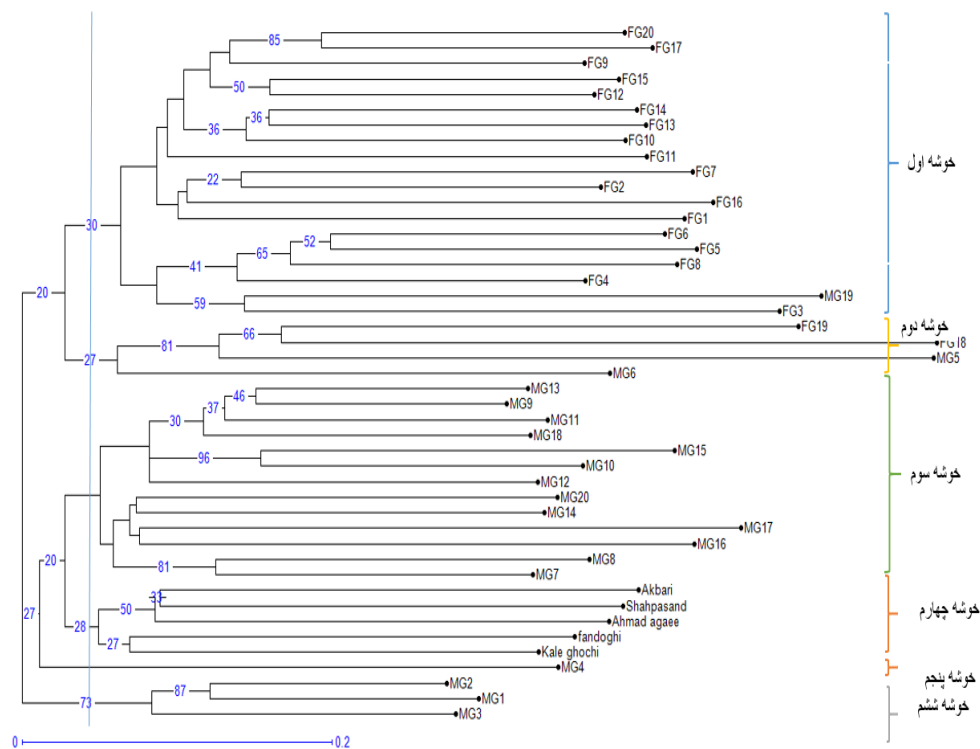
شکل ۴-۷- میزان فراوانی ضرایب عدم تشابه در ماتریس عدم تشابه بین ژنوتیپ‌های پسته با استفاده از نشانگر RAPD

۴-۳-۱-۲- گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس نتایج نشانگرهای RAPD

برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از داده‌های صفر و یک حاصل از امتیازدهی باندهای تکثیر یافته، توسط نشانگرهای RAPD ضریب جاکارد برای ژنوتیپ‌ها محاسبه شد. بر اساس نتایج گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در تجزیه گروه‌ای ژنوتیپ‌ها به ۶ دسته مشخص گروه بندی شدند و نمودار حاصل با الگوریتم UPGMA ترسیم گردید. (شکل ۴-۸) ژنوتیپ‌های FG2، FG9، FG17، FG15، FG12، FG14، FG13، FG10، FG11، FG7، FG20، FG16 و FG1 در زیرگروه اول و FG8، FG5، FG6 و FG4، MG19 و FG3 در زیرگروه دوم از گروه اول و ژنوتیپ‌های FG19، FG18، MG5 در زیر گروه اول و MG6 در زیرگروه دو از گروه دوم و در گروه سوم ژنوتیپ‌های MG13، MG9، MG11، MG15، MG18، MG10 و MG12 در زیرگروه اول و MG20، MG14، MG17، MG16، MG8 و MG7 در زیرگروه دوم گروه‌بندی شدند اما ۵ رقم تجاری مورد مطالعه در گروه چهار که رقم‌های احمدآقایی، اکبری و شاه‌پسند در زیرگروه اول هستند. ژنوتیپ MG4 در گروه پنجم و ژنوتیپ‌های MG1، MG2 و MG3 در گروه ششم قرار گرفتند. از گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای می‌توان این‌طور نتیجه گرفت که به طور کلی ژنوتیپ‌های نر و ماده و ژنوتیپ‌های تجاری در گروه‌های جداگانه‌ای قرار گرفتند. ژنوتیپ‌های تجاری در بین ژنوتیپ‌های نر واقع شده که این موضوع بیانگر نزدیک بودن و یا شباهت ژنتیکی بیشتری بین آن‌هاست و شباهت بیشتر ژنوتیپ‌های MG1، MG2 و MG3 که در این گروه‌بندی بیشتر بارز بود.

در مطالعه (علی‌اکبر خانی و همکاران، ۱۳۹۱) بر اساس تجزیه کلاستر به روش ضریب جاکارد و روش UPGMA در حد تشابه ۴۱ درصد، ژنوتیپ‌ها در هشت گروه قرار گرفتند. تنوع بالایی بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه مشاهده شد. در مطالعه (حاجی‌رضایی و همکاران، ۱۳۸۷) تنوع ژنتیکی ۳۲ ژنوتیپ کشت شده در کرمان توسط ۱۰ نشانگر RAPD مورد ارزیابی قرار گرفت و در تجزیه کلاستر حاصل از ضریب تشابه دایس ۳۲ ژنوتیپ در شش گروه اصلی گروه‌بندی شدند و ژنوتیپ‌های بنه و خنجری دامغان در یک گروه و ارقام کله‌قوچی و اوحدی در یک گروه قرار گرفتند که از نظر ژنتیکی قابل

توجیه می‌باشند و در نهایت رقم‌های کله‌قوچی، فندق، اوحدی و ممتاز در با هم، رقم‌های بنه و خنجری دامغان با هم و بادامی و کسور نیز با هم به لحاظ فیلوژنتیکی به هم نزدیک بوده و قرابت خویشاوندی بیشتری نشان دادند.



شکل ۴-۸- نمودار حاصل از تجزیه گروه ای ۴۵ ژنوتیپ پسته با الگوریتم UPGMA با استفاده از ماتریس تشابه داده های

مولکولی RAPD

در پژوهش (Akdemir *et al.*, 2016) شباهت‌های ژنتیکی بر اساس سه سیستم نشانگر برآورد شد و تجزیه و تحلیل خوشه‌ای بر اساس ضریب تشابه جاکارد به روش UPGMA در میان گیاهان اهداکننده و کلونی‌های حاصل از آن برای ۱۹ ژنوتیپ انجام شد و تجزیه و تحلیل دندروگرام برای سیستم مارکر ترکیبی نشان داد که به طور سطحی دو گروه اصلی (گیاهان اهداکننده و گلخانه‌ای و گیاهان زیرکشت شده ۵ و ۷ ساله) وجود دارد.

تجزیه به مولفه های اصلی (PCOA) تبدیلی به منظور کاهش حجم داده ها و آشکارسازی روابط بین دو یا چند متغیر با استفاده از تبدیل خطی داده های اصلی به متغیرهای مستقل جدید (مؤلفه های

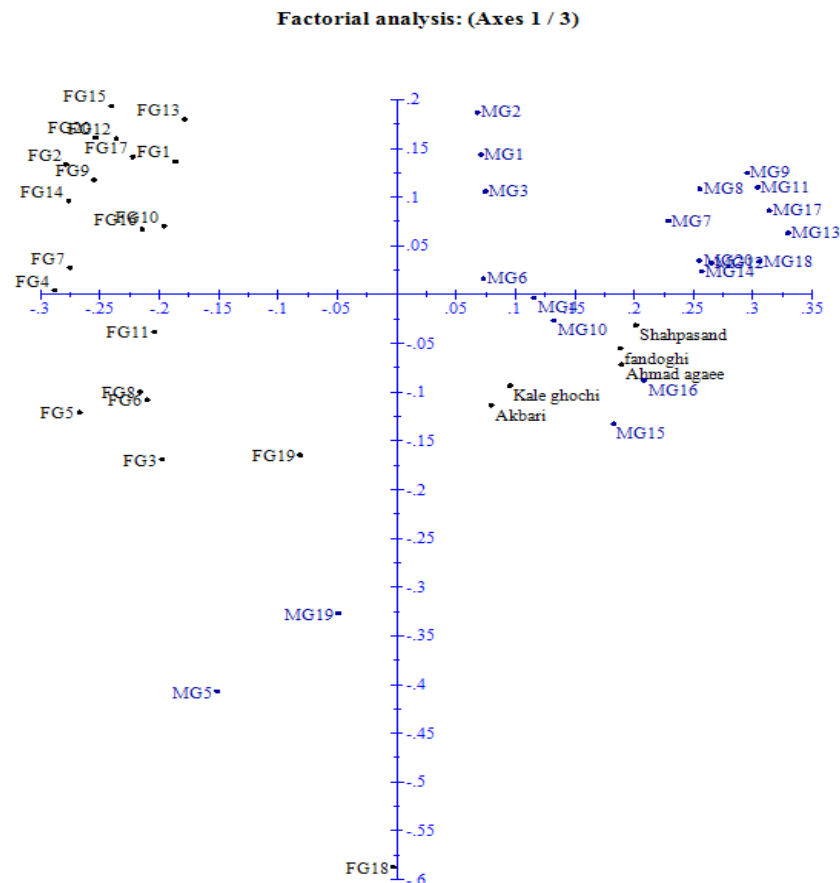
اصلی) در یک فضای برداری انجام می گیرد و در سال ۱۹۰۱ توسط پیرسون ارائه شد. این آنالیز شامل تجزیه به مقادیر ویژه ماتریس کواریانس است. به علت مستقل بودن مؤلفه‌ها از یکدیگر، هر مؤلفه نشان‌دهنده خصوصیات متفاوتی از داده‌های اصلی می‌باشند و به صورت مستقل از یکدیگر هم باید تفسیر شوند. در صورتی ۲ تا ۳ مؤلفه‌ی نخست تغییرات بیشتری را توجیه می‌کنند که همبستگی میان متغیرها بیشتر باشد، و هر چه این همبستگی پایین‌تر باشد نشان‌دهنده‌ی تصادفی بودن این متغیرها است (شکل ۴-۱۰) (جدول ۴-۱۰).

این تکنیک بر اساس داده‌های مولکولی بیشتر در تنوع ژنتیکی کاربرد دارد. این آنالیز در مطالعات مولکولی نشان‌دهنده‌ی نحوه‌ی توزیع نشانگرهای مورد استفاده در سطح ژنوم می‌باشد. تجمع افراد در یک ناحیه از نمودار نشان‌دهنده‌ی تشابه ژنتیکی افراد است (شکل ۴-۱۰) نمودار دو بعدی حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی تا حدودی گروه‌بندی حاصل از تجزیه گروه‌ای را تأیید کرد و توانست ژنوتیپ‌ها را تا حد مناسبی تفکیک کند. کم بودن درصد توجیه تغییرات مولکولی در تجزیه‌های چند متغیره به مانند تجزیه به مؤلفه‌های اصلی می‌تواند ناشی از توزیع نامناسب نشانگرهای مولکولی در سراسر ژنوم و در نهایت عدم کفایت سه مؤلفه‌ی اول برای توجیه حداکثر تغییرات مولکولی باشد. از طرف دیگر توزیع مناسب نشانگرها در سراسر ژنوم به مفهوم ارزیابی دقیق‌تر و بهتر تنوع مولکولی به دلیل نمونه برداری مناسب از کل ژنوم است (Fazeli & Chigamirza, 2011). در این نوع گروه‌بندی با توجه به نمودار تجزیه دو بعدی پراکنش ژنوتیپ‌ها نزدیک به گروه‌بندی حاصل از تجزیه گروه‌ای می‌باشد. با توجه به جدول (۴-۱۰) نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی در مجموع در سه مؤلفه‌ی اول به میزان ۳۶/۳۵ درصد از تنوع کل قابل توجیه است و در هر سه مؤلفه به ترتیب ۱۷/۱۱، ۱۰/۱۷، ۹/۰۷ درصد از کل تغییرات را توجیه نموده‌اند. با توجه به پراکنش ژنوتیپ‌ها در تجزیه دوبعدی حاصل از نشانگر RAPD این‌طور نتیجه می‌شود که ژنوتیپ‌های تجاری نزدیک به هم و در بین ژنوتیپ‌های نر قرار گرفته‌اند که نشان‌دهنده‌ی این است که ژنوتیپ‌های تجاری به لحاظ ژنتیکی شباهت بیشتری به ژنوتیپ‌های نر دارند و دو ژنوتیپ MG5 و MG19 جدا از سایر ژنوتیپ‌های نر قرار گرفتند که بیانگر

فاصله ژنتیکی آن‌ها با سار ارقام نر می‌باشد. در ارزیابی تنوع ژنتیکی ۳۲ ژنوتیپ پسته با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD توسط حاجی‌رضایی و همکاران، ۱۳۸۷ از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر روی داده‌های حاصل از نشانگر RAPD یک پلات دوبعدی و یک پلات سه بعدی حاصل شد. سه مؤلفه اصلی که بیشترین سهم را در ایجاد تنوع موجود داشتند به ترتیب ۱۲/۶۸، ۹/۵۵، ۷/۹۹ درصد از میزان کل تنوع را کنترل کردند و تطابق نسبی پلات سه بعدی و دو بعدی با نتایج حاصل از تجزیه گروه‌ای می‌تواند برای انتخاب نشانگر در تحقیقات بعدی کمک نماید. در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر روی داده‌های حاصل از RAPD در پژوهش علی‌اکبرخانی و همکاران، ۱۳۹۱ یک پلات دو بعدی و یک پلات سه بعدی حاصل شد که در مجموع سه مؤلفه اول به ترتیب با میزان ۱۱/۱۲، ۸/۴۹، ۷/۱۷ درصد از میزان کل تنوع را توجیه نمودند و با توجه به تطابق نسبی نتایج به دست آمده از پلات‌های سه بعدی و دو بعدی با نتایج حاصل از تجزیه گروه‌ای در این مطالعه می‌تواند در تحقیقات بعدی برای انتخاب نشانگر کمک کند. در این ارزیابی مشخص شد که ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده از یک منطقه دارای تنوع بالایی بودند که بسیار حائز اهمیت است بویژه در انتخاب پایه و پیوندک مناسب و اصلاح باغات موجود با توجه به شرایط آب و هوایی هر منطقه و قرابت خویشاوندی بین ارقام که در کارهای اصلاحی راهنمایی و کمک خاص نماید.

جدول ۴-۱۰: مقادیر ویژه محاسبه شده برای PCOA بر اساس ماتریس عدم تشابه

درصد تجمعی	درصد مقادیر ویژه	مقادیر ویژه	محورها
۱۷/۱۱	۱۷/۱۱	۰/۰۴۶۳	۱
۲۷/۲۸	۱۰/۱۷	۰/۰۲۷۶	۲
۳۶/۳۵	۹/۰۷	۰/۰۲۴۶	۳
۴۳/۴۸	۷/۱۳	۰/۰۱۹۳	۴
۴۹/۱۲	۵/۶۴	۰/۰۱۵۳	۵

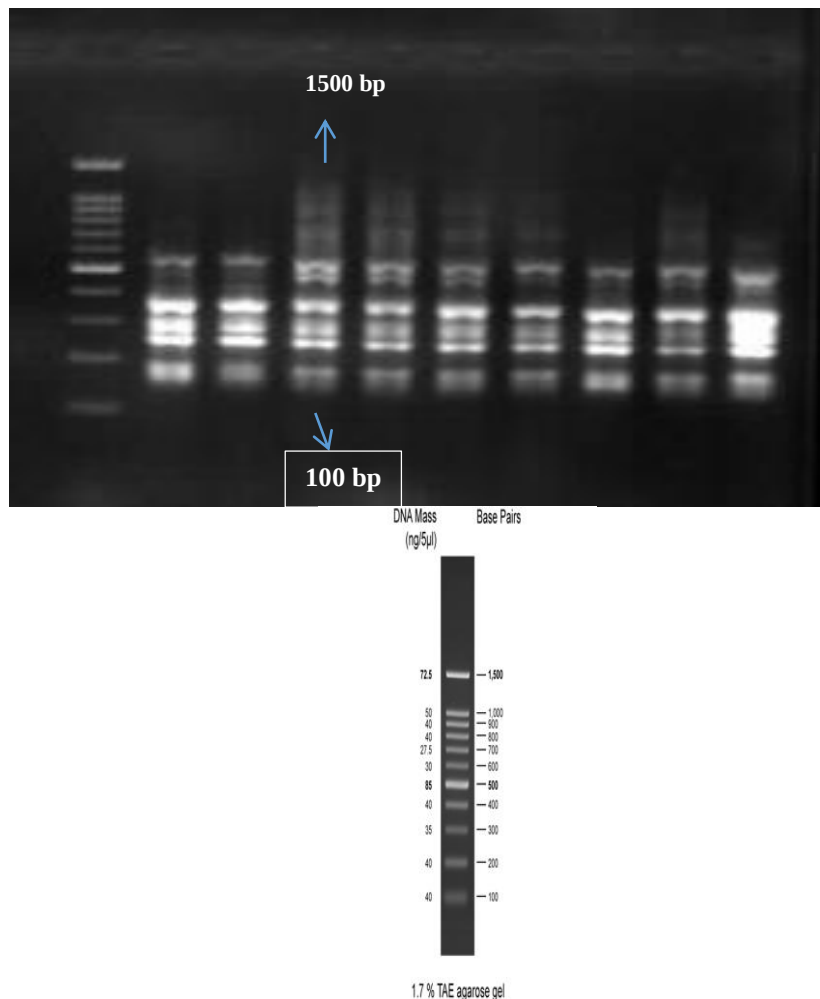


شکل ۴-۹- تجزیه دویعدی ۴۵ ژنوتیپ پسته بر اساس ماتریس عدم تشابه به دست آمده از ۱۰ نشانگر RAPD

۴-۳-۲- بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با استفاده از نشانگرهای ISSR

در این مطالعه ۱۰ نشانگر ISSR جهت تکثیر DNA ی ۴۵ ژنوتیپ مورد مطالعه (۲۰ ژنوتیپ بذری ماده و ۲۰ ژنوتیپ بذری نر و ۵ ژنوتیپ محلی) مورد استفاده قرار گرفت. در شکل (۴-۱۱) نمونه‌ای از تصویر ژل حاوی قطعات DNA تکثیر شده با استفاده از نشانگر UBC886 نشان داده شده است. در این ارزیابی ۱۰ نشانگر در مجموع ۲۲۷ باند تولید کردند که از این تعداد قطعه DNA تکثیر شده تمام باندها در یک یا چند ژنوتیپ چندشکلی نشان دادند (جدول ۴-۱۱). میانگین اندازه قطعات تکثیر شده از ۱۰۰ جفت‌باز در نشانگر UBC888 تا ۱۸۰۰ جفت‌باز در نشانگر UBC886 متغیر بود و میانگین تعداد باندهای تکثیر شده برای هر نشانگر ۲۲/۷ باند بود. نشانگرهای UBC886 و UBC888

با ۲۷ باند بیشترین تعداد باند و نشانگر S14 با ۱۶ باند کمترین تعداد باند را نشان دادند و میانگین درصد چندشکلی حاصل از تکثیر کل نشانگرها ۱۰۰ درصد بود (جدول ۴-۱۱).



شکل ۴-۱۰- قطعات DNA تکثیر یافته توسط نشانگر UBC886 بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد. از چپ به راست به ترتیب: لدر و

ژنوتیپ‌های MG15, MG14, MG13, MG12, MG11, MG10, MG9, MG8

با توجه به ضریب R_p محاسبه شده در این مطالعه میانگین قدرت تفکیک ژنی ۱۱/۵۲۵ بود. قدرت تفکیک نشانگرهای UBC888 و UBC886 به ترتیب برابر با ۱۴/۷۱ و ۱۴/۵۳ بالاتر از سایر نشانگرها بود و کمترین قدرت تفکیک ژنی مربوط به نشانگر UBC850 با میزان ۴/۵۳ گزارش شد. در مطالعه اشرف مهربانی و همکاران، ۱۳۹۳ در بررسی تنوع ژنتیکی ۵۹ ژنوتیپ بنه با استفاده از ۱۶ نشانگر ISSR در مجموع ۱۵۸ آلل تکثیر شد و ۱۰۰ درصد آلل‌ها چندشکل بودند و تعداد آن‌ها از ۳ تا ۱۷ و با میانگین آلل ۹/۸۷ متغیر بود. اندازه آن‌ها بین ۱۰۰ تا ۲۸۰۰ جفت باز متغیر بود. آغازگر

UBC840 با ۱۷ آلل بیشترین تعداد و UBC 866 با ۳ آلل کمترین تعداد آلل را به خود اختصاص داد و دو نشانگر UBC840 و UBC826 با شاخص نشانگری مطلوب، بیشترین کارایی بالا و قدرت تشخیص مناسب در تعیین فاصله ژنتیکی معرفی شدند.

جدول ۴-۱۱: نتایج حاصل از نشانگرهای ISSR مورد استفاده در بررسی تنوع ژنوتیپها

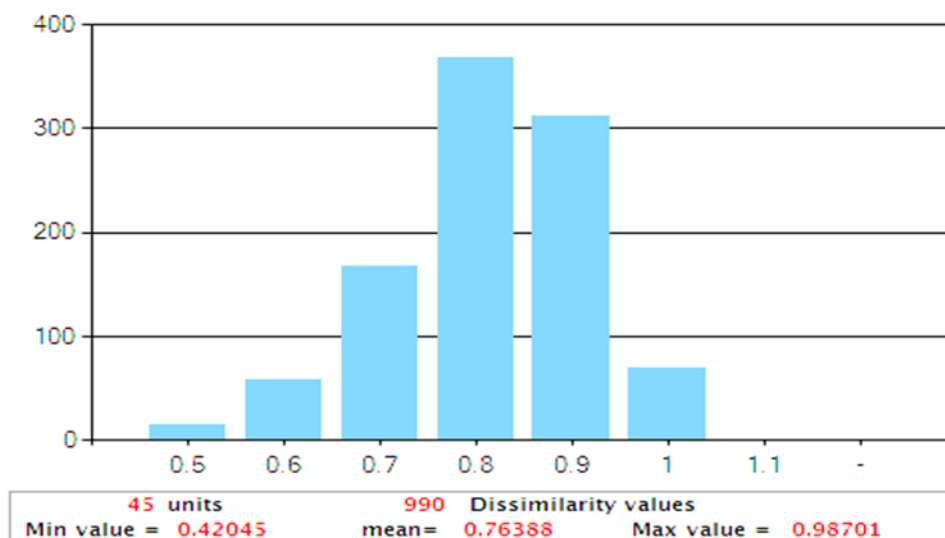
ردیف	نشانگر	کل باندها	باندهای چندشکل	درصد چندشکلی %	Rb
۱	S14	۱۶	۱۶	۱۰۰	۹/۳۷
۲	UBC850	۱۹	۱۹	۱۰۰	۴/۵۳
۳	UBC886	۲۷	۲۷	۱۰۰	۱۴/۵۳
۴	UBC890	۱۹	۱۹	۱۰۰	۱۰/۷۱
۵	UBC826	۲۳	۲۳	۱۰۰	۱۳/۸۶
۶	UBC840	۲۴	۲۴	۱۰۰	۱۲/۰۸
۷	UBC853	۲۵	۲۵	۱۰۰	۱۴/۳۱
۸	UBC888	۲۷	۲۷	۱۰۰	۱۴/۷۱
۹	UBC884	۲۳	۲۳	۱۰۰	۹/۰۲
۱۰	UBC887	۲۴	۲۴	۱۰۰	۱۲/۱۳
کل		۲۲۷	۲۲۷		
میانگین		۲۲/۷	۲۲/۷	۱۰۰	۱۱/۵۲۵

در نتایج تحقیق (Akdemir *et al.*, 2016) در تعیین پایداری ژنتیکی گیاهچه‌های رشد یافته *in vitro* برای تولید گیاهچه‌های سالم و بی خطر در مقیاس بزرگ درختان بالغ و ارزیابی تنوع ژنتیکی آن، پسته‌های بالغی که برای مدت طولانی و با رشد مجدد از جوانه‌های آپیکالی و برگ‌های مشتق شده از آن‌ها در محیط آزمایشگاه پراکنده شدند، با استفاده از هفت نشانگر ISSR که ۶۲ باند با میانگین ۸/۹ باند برای هر نشانگر تولید نمودند و تعداد کل باندهای چندشکل ۴۱ (۶۴/۷ درصد) برای نشانگر مورد مطالعه بود و نشانگر ISSR11 بیشترین تعداد باند و بیشترین چند شکلی را به ترتیب با ۱۳ و ۹ عدد باند تولید نمود. اندازه باندها بین ۱۸۰ تا ۱۵۰۰ جفت باز متغیر بود.

در ارزیابی تقی‌زاد و همکاران (۱۳۹۰) در تنوع ژنتیکی ۱۹ توده پسته ایرانی، از ۲۰ نشانگر ISSR مورد مطالعه ۱۰ نشانگر باند تکرار پذیر داشتند و در مجموع ۱۱۴ قطعه DNA مکان ژنی تکثیر و امتیاز بندی شدند که در مجموع ۷۳ باند ۶۴ درصد چندشکل بودند. میانگین محتوای چندشکلی اطلاعات برای نشانگرهای استفاده شده از حداقل ۸۵ درصد تا حداکثر ۹۱ درصد متغیر بود. طول قطعات تکثیری مشاهده شده در این مطالعه در محدوده بین ۲۵۰ جفت باز تا ۲ کیلو باز قرار داشت.

۴-۳-۲-۱- رابطه ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های پسته حاصل از داده‌های ISSR

ضریب عدم تشابه جاکارد (شکل ۴-۱۲) در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی با میانگین ۰/۷۶ و در محدوده بین ۰/۴۲ تا ۰/۹۸ قرار داشت. ژنوتیپ‌های FG18 با FG19، MG5 با MG17، MG6 با MG19 دارای بیشترین ضریب عدم تشابه ژنتیکی (۰/۹۸) بودند یا به عبارتی دارای بیشترین اختلاف ژنتیکی بودند. در بین ژنوتیپ‌ها، FG6 با FG13 دارای کمترین ضریب عدم تشابه دایس (۰/۴۲) بودند که به معنی این است که این دو رقم بیشترین شباهت ژنتیکی را در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه دارند. در مطالعه (Taghizade *et al.*, 2010) تنوع ژنتیکی ۱۹ توده پسته ایرانی، با استفاده از ۲۰ نشانگر ISSR بررسی شده که تعداد ۱۰ نشانگر باندهای تکرارپذیر ایجاد کردند. برای ارزیابی شباهت و اختلاف ژنومی بین ارقام از ضریب عدم تشابه جاکارد استفاده شد. کمترین فاصله بین رقم‌های کله‌قوچی و احمدآقایی با میزان تشابه ۰/۸۳ و بیشترین فاصله در بین رقم‌های کله‌قوچی، حسین‌خانی و ابراهیم‌آبادی با میزان تشابه ۰/۵۴ مشاهده شد. در مطالعه (Akdemir *et al.*, 2016) بر روی گیاهچه‌های پسته با استفاده از نشانگر ISSR مقادیر تشابه بین ۰/۵۵۶ و ۰/۹۸ با میانگین ۰/۸۲ متغیر بود.



شکل ۱۱-۴- میزان فراوانی ضرایب عدم تشابه در ماتریس عدم تشابه بین ژنوتیپ‌های پسته با استفاده از نشانگرهای ISSR

۴-۳-۲- گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس نتایج نشانگرهای ISSR

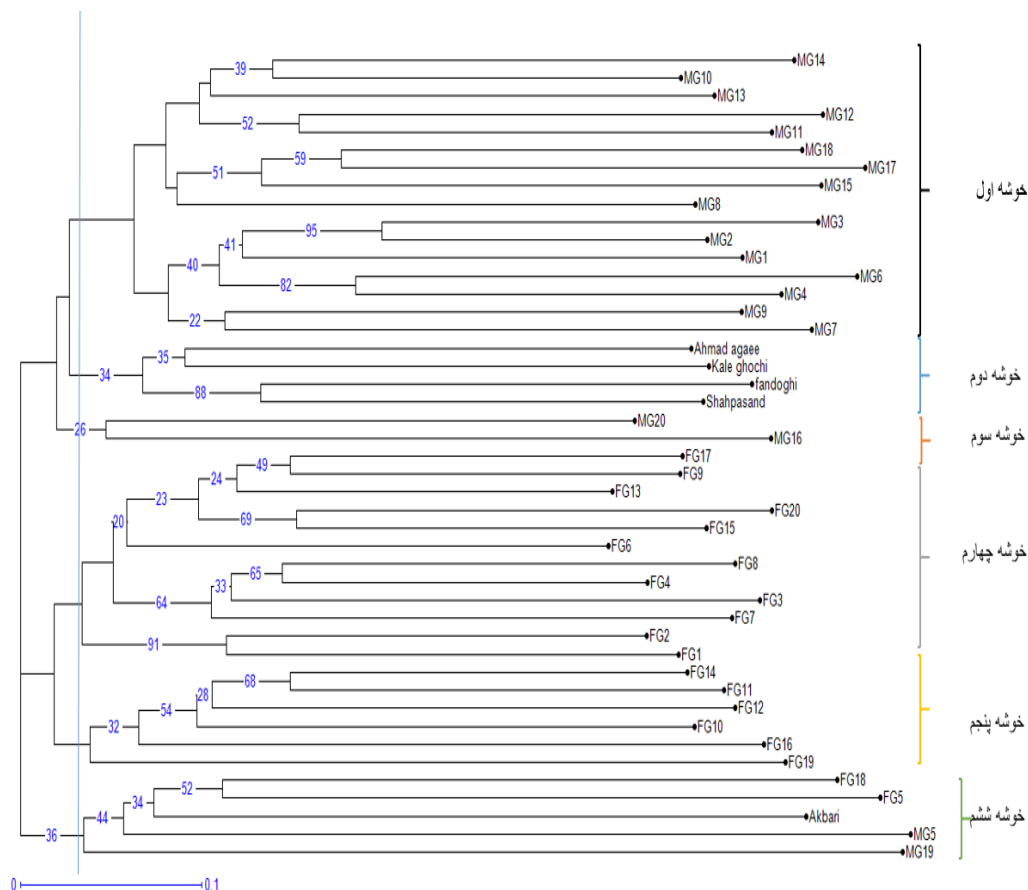
به منظور گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از داده‌های صفر و یک ابتدا با ضریب جاکارد و ماتریس عدم تشابه ژنتیکی برای ژنوتیپ‌ها محاسبه شد.

بر اساس نتایج گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در تجزیه گروه‌ای ژنوتیپ‌ها به ۶ گروه مشخص گروه‌بندی شدند و هر کدام شامل چند زیر گروه کوچکتر شد. نمودار حاصل با الگوریتم UPGMA ترسیم شد (شکل ۴-۱۳). گروه ۱ به دو زیرگروه با ژنوتیپ‌های MG14، MG10، MG13، MG12، MG11، MG18، MG17، MG15 و MG8 در زیر گروه اول و MG3، MG2، MG1، MG6، MG4، MG9، MG7 در زیر گروه دوم قرار داشتند. در گروه ۲ ژنوتیپ‌های تجاری احمدآقایی، کله‌قوچی در زیر گروه اول و شاه‌پسند و فندق‌ی در زیر گروه دوم قرار گرفتند. ژنوتیپ‌های MG20، MG16 در گروه ۳ و ژنوتیپ‌های FG17، FG9، FG13، FG20، FG6، FG8، FG4، FG3 و FG7 در زیر گروه اول و FG1، FG2 در زیر گروه دوم در گروه ۴ و ژنوتیپ‌های FG14، FG11، FG12، FG10 و FG16 در زیر گروه اول و FG19 در زیر گروه دوم از گروه ۵ و در گروه ۶ ژنوتیپ‌های MG5، اکبری و FG5 و FG18 در زیر گروه اول و MG19 در زیر گروه دوم گروه‌بندی شدند. در این پژوهش در نگاه کلی این‌طور برداشت می‌شود که ژنوتیپ‌های ماده و نر جدا از هم و در کنار هم و ژنوتیپ‌های تجاری

نزدیک به هم در گروه‌های مجزا قرار گرفتند که بیانگر وجود تنوع ژنتیکی زیاد در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه است و البته ژنوتیپ‌های MG5 و MG19 و رقم اکبری با فاصله‌ای دور از سایر ژنوتیپ‌های نر و در سمت پایین نمودار در گروه ششم جای گرفته که باز این خود نشان از فاصله ژنتیکی ژنوتیپ اکبری با سایر ژنوتیپ‌های تجاری بررسی شده است. همچنین این موضوع برای دو ژنوتیپ MG5 و MG19 که با فاصله‌ای زیاد از سایر ژنوتیپ‌های نر واقع شده‌است، صدق می‌کند.

تنوع ژنتیکی ۱۹ توده پسته ایرانی، از ۲۰ نشانگر ISSR مورد مطالعه ۱۰ نشانگر باندهای تکرارپذیر ایجاد کردند و در کلاستر بندی ۱۹ رقم مورد مطالعه حاصل از روش UPGMA مناسب‌ترین گروه‌بندی حاصل شد و با استفاده از نمودار درختی حاصل، ارقام در سه گروه عمده با اختلافات درون گروهی حداقل و بین گروهی حداکثر قرار گرفتند و نتیجه نشان داد که نشانگر ISSR برای مطالعات بررسی تنوع ژنتیکی و تهیه شناسنامه مولکولی کامل برای تمام توده‌های ایرانی مناسب تشخیص داده شد. در مطالعه اشرف مهرابی و همکاران، (۱۳۹۳) تجزیه گروه‌ای نتوانست ژنوتیپ‌ها را به طور کامل از هم جدا کند و عدم ارتباط بین تنوع مولکولی و تنوع جغرافیایی در بین ژنوتیپ‌های بنه مشاهده شد.

در تحقیق انجام شده توسط حاجی‌زاده حسین آبادی و همکاران، ۱۳۹۲ برای بررسی تنوع ژنتیکی ۱۹ ژنوتیپ نر و هشت ژنوتیپ ماده از ۱۲ آغازگر ISSR استفاده شد که در کلاستر بندی حاصل از روش UPGMA ارقام ماده همگی در گروه‌های نزدیک به هم ولی ژنوتیپ‌های نر در دو انتهای دندروگرام قرار گرفتند و از یکدیگر تفکیک شدند و ژنوتیپ‌های نر پسته از تنوع بالایی برخوردار بودند که این به دلیل پیوند نزدن ژنوتیپ‌های نر موجود در باغ است.

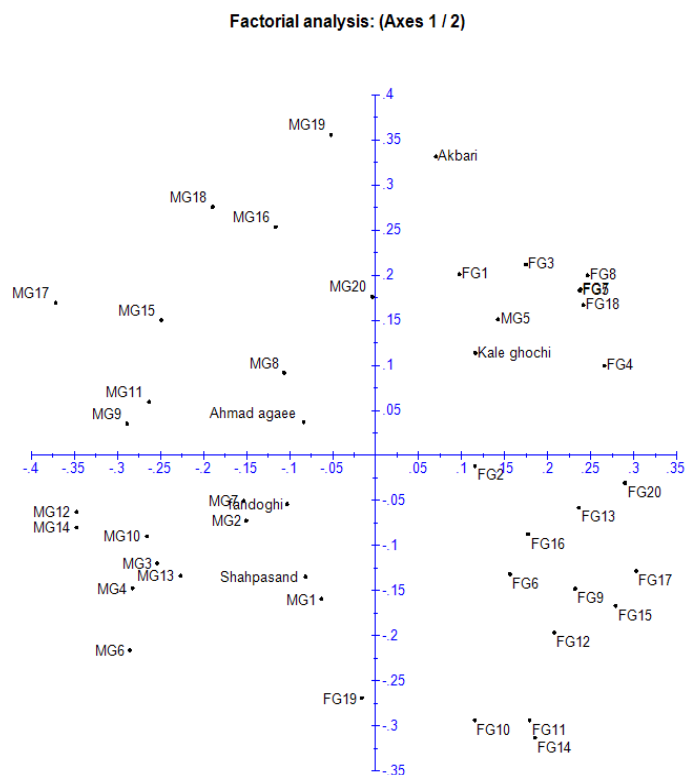


شکل ۴-۱۲: نمودار حاصل از تجزیه گروه ای با الگوریتم UPGMA با استفاده از ماتریس عدم تشابه داده های مولکولی ۱۰

پرایمر ISSR

آزمون تجزیه دو بعدی روش دیگری برای گروه بندی ژنوتیپها بود که تصویر بهتری را از پراکنش ژنوتیپها فراهم کرد (شکل ۴-۱۴). لازم به ذکر است تجزیه به مولفه های اصلی می تواند باعث پردازش داده های حاصل از آنالیز آلل های حاصل از تکثیر PCR در چند محور و در نتیجه باعث افزایش وزن داده های آن در این محورها شود. در صورت نداشتن اطلاعات شجره ای مناسب، تفسیر نتایج حاصل از تجزیه خوشه ای ممکن است قابل تفسیر و توجیه با روابط ژنتیکی و شجره ای واقعی ژنوتیپها نباشد (شاملو و همکاران، ۱۳۹۳). در چنین مواردی اکثر محققان استفاده از تجزیه به مؤلفه های اصلی را به عنوان یک روش مکمل برای تجزیه گروه توصیه می کنند. با توجه به نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه های اصلی (جدول ۴-۱۲) سه مؤلفه اول در مجموع توانستند ۳۳/۷۹ درصد از تغییرات کل را توجیه می کنند. در نمودار تجزیه دوبعدی نیز پراکندگی ژنوتیپها متفاوت تر از

گروه‌بندی توسط تجزیه گروه‌ای و نمودار درختی صورت گرفت. ژنوتیپ‌های تجاری کله‌قوچی و اکبری در ناحیه اول محور و در بین ژنوتیپ‌های ماده قرار گرفت اما ژنوتیپ احمدآقایی با چند ژنوتیپ نر و در ناحیه ۴ محور و ژنوتیپ‌های فندق و شاه‌پسند هم در قسمت پایین محور و در بین ژنوتیپ‌های نر و در ناحیه سه قرار داشتند. به طور کلی اگر دقت کنیم در نمودار تجزیه دوبعدی حاصل (شکل ۴-۱۴)، ژنوتیپ‌های ماده در سمت راست و ژنوتیپ‌های نر در سمت چپ نمودار قرار دارند که این خود بیانگر تنوع بین ژنتیکی بین این گروه از ژنوتیپ‌ها است که به دلیل تجمع این گروه از ژنوتیپ‌ها به‌طور مجزا و در نقاط خاصی، در دو جهت مخالف نمودار است. در بین ژنوتیپ‌های نر به دلیل پراکندگی زیادی که دارند هم نشان از تنوع بالا بین این ژنوتیپ‌ها است.



شکل ۴-۱۳- تجزیه دوبعدی ۴۵ نمونه ژنوتیپ‌های پسته بر اساس ماتریس عدم تشابه به دست آمده از ۱۰ نشانگر ISSR

جدول ۴-۱۲: مقادیر ویژه محاسبه شده برای PCOA^۱ بر اساس ماتریس عدم تشابه

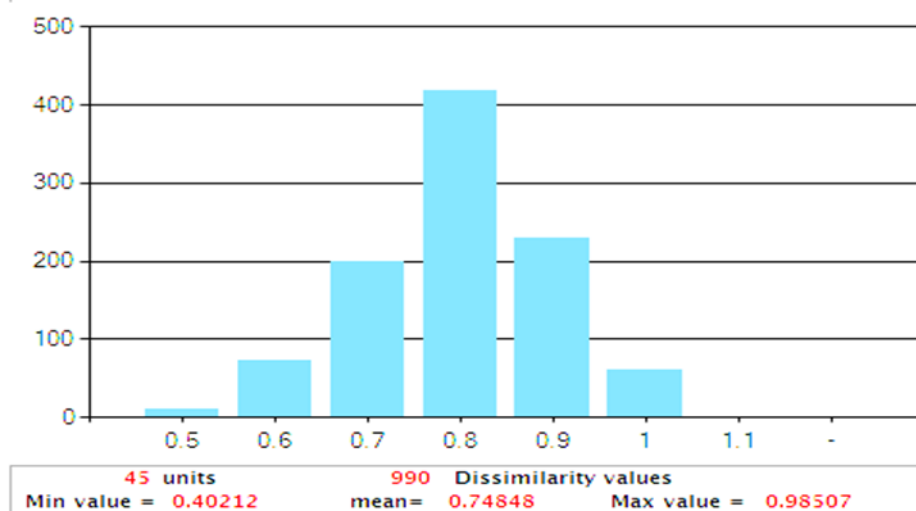
محورها	مقادیر ویژه	درصد مقادیر ویژه	درصد تجمعی
۱	۰/۰۴۴۸	۱۵/۴	۱۵/۴
۲	۰/۰۳۰۹	۱۰/۶۲	۲۶/۱۲
۳	۰/۰۲۲۳	۷/۶۷	۳۳/۷۹
۴	۰/۰۱۸۰	۶/۲۱	۴۰/۰۰
۵	۰/۰۱۵۶	۵/۳۷	۴۵/۳۷

۴-۳-۳- رابطه ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های پسته با استفاده از مجموع نشانگرهای RAPD

و ISSR

ضریب عدم تشابه در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با استفاده از مجموع داده‌های ملکولی هر

دو نوع نشانگر با حد واسط (۰/۷۴) و در محدوده بین ۰/۴ تا ۰/۹۸ قرار گرفت (شکل ۴-۱۵).



شکل ۴-۱۴- میزان فراوانی ضرایب عدم تشابه در ماتریس عدم تشابه بین ژنوتیپ‌های پسته با استفاده از مجموع نشانگرهای

RAPD .ISSR

بیشترین ضریب عدم تشابه (۰/۹۸) بین ژنوتیپ‌های MG5 با MG16 و MG5 با MG17 و کمترین

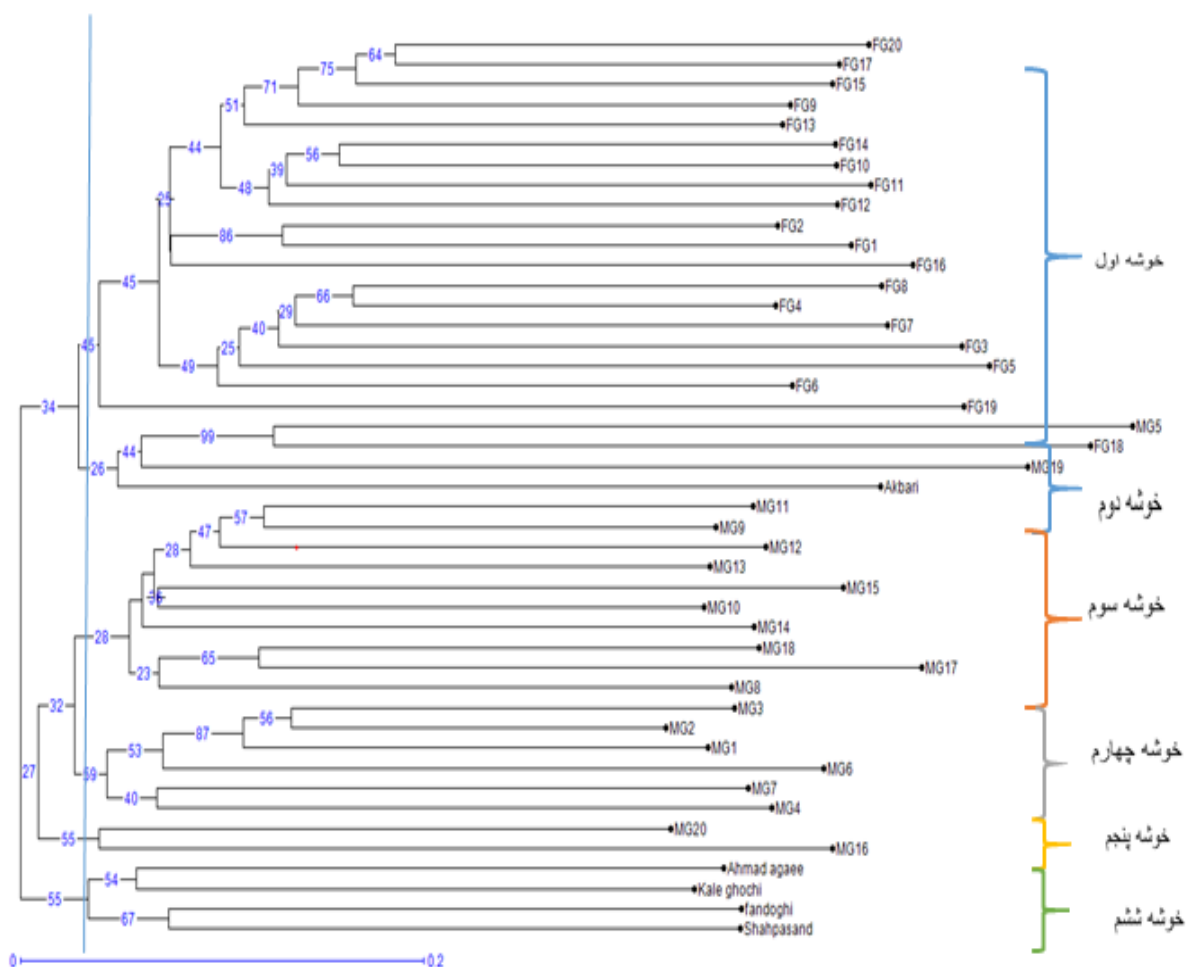
ضریب عدم تشابه و کمترین ضریب عدم تشابه (۰/۴) بین ژنوتیپ‌های MG1 با MG2 و MG2 با

MG3 مشاهده شد و این به این معنی است که بیشترین ضریب عدم تشابه در واقع بیانگر بیشترین

تنوع ژنتیکی و کمترین ضریب عدم تشابه نشان از شباهت بیشتر بین این ژنوتیپ‌ها است.

۴-۳-۴- گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس نشانگرهای RAPD و ISSR به طور ترکیبی

بر اساس نتایج گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها به شش گروه مشخص با زیرگروه‌های کوچکتر گروه‌بندی شدند و نمودار حاصل با الگوریتم UPGMA برای ۴۵ ژنوتیپ با استفاده از نتایج ترکیبی نشانگرهای ISSR و RAPD ترسیم شد. (شکل ۴-۱۶) ژنوتیپ‌های FG20, FG9, FG17, FG15, FG12, FG14, FG13, FG10, FG11, FG7, FG2, FG16, FG1, FG6, FG5, FG8, FG4 و FG در زیرگروه اول و رقم FG19 به‌طور جداگانه در زیرگروه دوم از گروه اول و ژنوتیپ‌های MG19, FG18 و MG5 در زیرگروه دوم و ژنوتیپ اکبری در گروه دوم و ژنوتیپ‌های MG13, MG9, MG11, MG15, MG10, MG12 و MG14 در زیرگروه اول و MG8, MG17 و MG18 در زیرگروه دوم از گروه سوم گروه‌بندی شدند و ژنوتیپ‌های MG6, MG2, MG1 و MG3 در زیرگروه اول و دو ژنوتیپ MG4, MG7 در زیرگروه دوم از گروه چهارم و ژنوتیپ‌های MG20 و MG16 در گروه پنجم که به‌طور جداگانه در زیرگروه کوچکتری هستند و چهار رقم تجاری شاهپسند، فندق‌ی در یک زیرگروه و دو رقم کله‌قوچی و احمدآقایی در زیرگروه دوم گروه ششم گروه‌بندی شدند. در این گروه‌بندی رقم اکبری با فاصله دور از چهار رقم تجاری دیگر و این بار هم در زیرگروه مجزایی در بین ژنوتیپ‌های نر و نزدیک به ژنوتیپ‌های MG5 و MG19 و FG5 قرار گرفته که می‌تواند نشان از تنوع بین این رقم تجاری خاص با سایر ارقام تجاری باشد. چهار رقم دیگر تجاری در پایین دندروگرام و با فاصله از ژنوتیپ‌های ماده قرار گرفته که نشان دهنده تنوع بیشتر بین آن‌هاست که موارد ذکر شده با کمی تفاوت در رسم نمودار با نتایج حاصل از نشانگر ISSR مطابقت دارد.



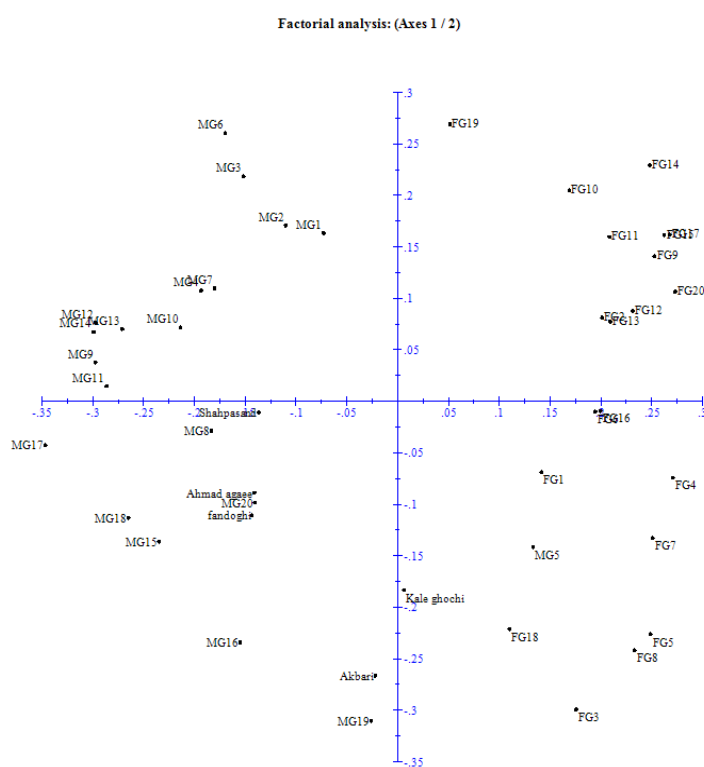
شکل ۴-۱۵- نمودار UPGMA بر اساس ضریب عدم تشابه محاسبه شده از داده های ۱۰ نشانگر ISSR و ۱۰ نشانگر RAPD به

طور ترکیبی

با توجه به جدول (۴-۱۳) و داده های حاصل از تجزیه به مؤلفه های اصلی از سه مؤلفه اول و میزان درصد تجمعی، به میزان ۳۰/۹۸ درصد از کل تنوع موجود در بین ژنوتیپ ها را در بر گرفت و تجزیه دو بعدی حاصل (شکل ۴-۱۷) نسبت به دو حالت قبل پراکنش بسیار مناسبی نداشت. اما به طور کلی باز هم قابل توجیه است، چرا که ژنوتیپ های نر و ماده دور از هم و رقم های تجاری در بین ژنوتیپ های نر جای گرفتند.

جدول ۴-۱۳: مقادیر ویژه به دست آمده برای PCOA بر اساس ماتریس عدم تشابه

محورها	مقادیر ویژه	درصد مقادیر ویژه	درصد تجمعی
۱	۰/۰۴۳۴	۱۵/۵۸	۱۵/۵۸
۲	۰/۰۲۵۱	۹	۲۴/۵۸
۳	۰/۰۱۷۸	۶/۴	۳۰/۹۸
۴	۰/۰۱۴۶	۵/۲۵	۳۶/۲۳
۵	۰/۰۱۴۰	۵/۰۳	۴۱/۲۶



شکل ۴-۱۶- تجزیه دوبعدی ۴۵ نمونه ژنوتیپ پسته بر اساس عدم تشابه دایس به دست آمده از ۱۰ نشانگر ISSR و ۱۰ نشانگر

RAPD به طور ترکیبی

فصل پنجم

نتیجه‌گیری و پیشنهادات

۵- نتیجه‌گیری و پیشنهادات

۵-۱- نتیجه‌گیری کلی

نتایج نشان می‌دهد که از میان صفات مورد مطالعه برخی با داشتن میزان واریانس و انحراف معیار بالا از قبیل خصوصیات وزنی میوه در ۱۰۰ دانه، تعداد میوه در ۱۰۰ گرم، طول مغز، طول و عرض خوشه میوه و همچنین میزان خندانی و پوکی میوه در تنوع و تفکیک پذیری ژنوتیپ‌های ماده از یکدیگر تأثیر بسیاری داشتند. برای کل ژنوتیپ‌ها صفاتی مانند طول و عرض برگ و برگچه‌ها، طول شاخه سال جاری، آغاز گلدهی و تاریخ برداشت در قسمت فنولوژیکی میوه در میزان تنوع و تفکیک‌پذیری ژنوتیپ‌ها بیشترین تأثیر را داشتند. در میان ژنوتیپ‌های ماده می‌توان ژنوتیپ‌هایی از قبیل FG3، FG6، FG17، FG18 و FG20 را از لحاظ خصوصیات وزنی و تعداد میوه در ۱۰۰ گرم میوه و ژنوتیپ‌های FG16، FG13، FG18، FG12 و FG8 با کمترین درصد پوکی و ژنوتیپ‌های FG2 و FG13 در میزان خندانی نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها برتری نشان دادند. در صفت طول مغز و هسته ژنوتیپ‌های FG3، FG6، FG17، FG19 و FG20 بیشترین طول را نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها به خود اختصاص دادند که می‌توان گفت از یک سری لحاظ نزدیک و یا حتی بهتر از ارقام تجاری می‌باشند. در این مطالعه میزان خندانی بین ۵۸ تا ۹۳ درصد و میزان پوکی بین ۱ تا ۲۳ درصد مشاهده شد که با توجه به سال‌آوری پسته این دوصفت بر یکدیگر تأثیرگذارند. در رابطه با میزان پوکی و خندانی میوه باید اشاره کرد که تحت تأثیر عواملی از قبیل شرایط آب و هوایی هر منطقه و تنوع آن، روش و میزان تغذیه و کوددهی، میزان آبیاری و خاک، عدم گرده افشانی مناسب و میزان گرده در باغ ممکن است متغیر باشند. در رابطه با خصوصیات فنولوژیکی دو شاخص زمان گلدهی و تاریخ برداشت در این پژوهش نتایج نشان داد که از نظر آغاز گلدهی در ژنوتیپ‌های نر رقم MG3 زودگل‌ترین بود که با رقم‌های شاه‌پسند و احمدآقایی و فندق‌ی بیشترین هم‌پوشانی را داشت. رقم MG9 دیرگل‌ترین شناخته شد که با رقم‌های فندق‌ی و اکبری بیشترین هم‌پوشانی را داشت و رقم

MG20 با بیشترین طول دوره گلدهی معرفی شدند. از نظر زمان رسیدن ژنوتیپ FG14 زودرس ترین و رقم اکبری و FG17 دیررس ترین و FG13 به عنوان رقم میان رس شناخته شد. در تجزیه خوشه‌ای به روش Ward و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی ژنوتیپ‌های تجاری به صورت پراکنده و در میان ژنوتیپ‌های نر و ماده قرار گرفتند و فاصله بین ژنوتیپ‌ها در دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای مشخص کرد که به لحاظ خصوصیات مورفولوژیکی و فنولوژیکی بین ژنوتیپ‌ها تنوع زیادی حاکم است. با توجه به حائز اهمیت بودن صفات ذکرشده فوق در بازاریپسندی و مورد توجه بودن در استاندارد جهانی تجارت پسته می‌توان از ژنوتیپ‌های برتر در برنامه‌های اصلاحی بهره برد.

ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در قسمت تجزیه مولکولی و داده‌های حاصل از نشانگرها بویژه نشانگرهای ISSR دارای تنوع ژنتیکی بیشتری هستند. در کل نشانگرهای ISSR نسبت به RAPD باند تکثیری و درصد چندشکلی بیشتری نشان دادند و اندازه باندها در هر دو نوع نشانگر از ۱۰۰ تا ۱۸۰۰ جفت‌باز مشخص شد. از میان نشانگرهای ISSR، UBC888 و UBC886 بیشترین تعداد باند و میزان تفکیک‌پذیری بالا و بهتری را نشان دادند. در میان نشانگرهای RAPD، دو نشانگر BD12 و OPN11 بیشترین تعداد باند و درصد چندشکلی و همچنین میزان تفکیک‌پذیری بیشتری نسبت به سایر نشانگرها داشتند. ضرایب ماتریس عدم تشابه در نشانگرهای RAPD بین ۰/۳۲ تا ۱ و در نشانگرهای ISSR بین ۰/۴۲ تا ۰/۹۸ متغیر بود و در استفاده ترکیبی از دو نشانگر این ضرایب بین ۰/۴ تا ۰/۹۸ متغیر بود. نتایج نشان داد بیشترین شباهت بین ژنوتیپ‌های MG1، MG2 و MG3 است و بیشترین اختلاف ژنتیکی توسط نشانگر RAPD بین ژنوتیپ‌های FG18 با FG1، FG3، FG12، FG13، FG15، و MG17 و در بین ژنوتیپ‌های MG5 با MG16، MG17 با MG19 مشاهده شد. بیشترین فاصله ژنتیکی توسط نشانگر ISSR بین ژنوتیپ‌های MG5 با MG16 و MG17 و در نتایج به دست آمده از ضرایب عدم تشابه توسط نشانگر ترکیبی ISSR و RAPD بیشترین اختلاف ژنتیکی بین MG5 با MG17 و MG6 با MG19 و FG18 با FG19 مشخص شد. در تجزیه کلاستر ۴۵ ژنوتیپ مورد مطالعه اغلب ژنوتیپ‌های نر و ماده در گروه‌های جدا از هم و ژنوتیپ‌های تجاری هم در کنار هم و در بین

ژنوتیپ‌های نر مشاهده شدند که این مطلب نشان دهنده تنوع بین گروهی زیاد در بین این سه گروه از ژنوتیپ‌ها بود که نسبت به تنوع درون گروهی بیشتر بارز است. البته فاصله ژنتیکی رقم اکبری جدا از سایر ژنوتیپ‌های تجاری احمدآقایی، شاه‌پسند، فندق و کله‌قوچی که به صورت دو به دو با هم و در بین ژنوتیپ‌های نر بودند، نشان داده شد که این مطلب به عبارتی نشان از تفاوت ژنتیکی رقم اکبری نسبت به سایر ارقام تجاری می‌باشد. بین ژنوتیپ‌های MG19 و MG5 با ژنوتیپ‌های ماده فاصله نزدیک‌تری مشاهده شد. در نمودار دوبعدی حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی هم تا حد نسبتاً زیادی همین نتایج را نشان داد. البته در تجزیه مولکولی با استفاده از نشانگر ISSR و نشانگر ترکیبی ISSR و RAPD بیشتر این نتایج به هم نزدیک بود.

تطابق نسبی نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای و تجزیه دوبعدی می‌تواند برای انتخاب نشانگر در تحقیقات بعدی کمک نماید و از نشانگرهای مولکولی هر کدام نتایج بهتری داشت در مطالعات بعدی استفاده گردد. در داده‌های حاصل از نشانگرهای مولکولی و مورفولوژیکی در این پژوهش نشان می‌دهد که ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از تنوع نسبتاً بالایی برخوردار هستند. نتایج به دست آمده از دندروگرام رسم شده حاصل از داده‌های فنوتیپی و ژنوتیپی با هم متفاوت هستند اما به طور کلی اکثر ژنوتیپ‌های ماده و نر در گروه‌های متفاوت و مجزا قرار گرفتند. از اطلاعات به دست آمده از این پژوهش می‌توان در انتخاب ژنوتیپ‌های برتر و در نهایت انتخاب پایه و پیوندک‌های مناسب و اصلاح باغات در سطح کشور بهره برد و با وجود تنوع شرایط آب و هوایی در کشور و توجه به قرابت خویشاوندی در انتخاب ژنوتیپ‌های مناسب برای احداث باغ‌های جدید کاتالوگ خوبی از نمونه‌های نزدیک به هم شکل گیرد.

۵-۲- پیشنهادات

۱- جمع‌آوری ژنوتیپ‌های برتر و مفید و در نهایت ایجاد کلکسیون بذری و استفاده از اطلاعات در

برنامه ریزی حفاظت ژرم پلاسما پسته

۲- استفاده از ژنوتیپ‌های برتر در برنامه‌های اصلاحی

۳- انتخاب و کشت ژنوتیپ‌های برتر در سایر مناطق و بررسی عملکرد و اندازه گیری صفات کیفی و

کمی میوه

۴- استفاده از سایر نشانگرها مانند AFLP، SSR برای ارزیابی تنوع ژنتیکی این محصول باغی

۵- بررسی سایر صفات مهم مانند شکل و اندازه گل‌آذین‌های ژنوتیپ‌های ماده و نر، زمان باز شدن

جوانه گل‌ها، رنگ هسته میوه، رنگ جوانه گل‌ها، اندازه‌گیری وزن جوانه‌ها، رنگ هال یا همان

پوست رویی میوه، آسان جداشدن پوست از مغز در زمان برداشت و مقاومت به سرمازدگی یا

درصد سرمازدگی میوه و اندازه‌گیری عناصر معدنی میوه و میزان اسیدهای چرب و پروتئین میوه

پیوست‌ها

محلول‌های مورد نیاز

جدول پیوست ۱: مواد و غلظت مورد استفاده جهت تهیه بافر استخراج

مواد	غلظت (مولار)	در ۱۰۰ میلی‌لیتر	نیاز به اتوکلاو
Tris-HCl, pH=8	۱ M	۱۰ ml	بله
EDTA, pH=8	۰/۵ M	۴ ml	بله
NaCl	۵ M	۲۸ ml	بله
PVP-40	-	۲ درصد	خیر
CTAB	-	۲ درصد	خیر
Mercaptoethanol	-	۰/۲ درصد	خیر

در نهایت حجم بافر را توسط آب مقطر استریل به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده و pH آن به ۸ رسانده می‌شود. pH کل توسط HCl در pH=8 تنظیم شد.

۳-۱-۱- محلول کلرید سدیم ۵ مولار (NaCl, 5 M)

۲۹/۲۲ گرم NaCl در حدود ۷۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردید و حجم محلول به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و اتوکلاو گردید.

۳-۱-۲- محلول اتیلن دی آمین تترا استیک اسید ۰/۵ مولار (EDTA, 0.5 M, pH=8)

۱۸/۶۱۲ گرم EDTA در ۷۵ میلی‌لیتر آب مقطر دو بار تقطیر مخلوط شد و pH محلول، توسط یک همزن مغناطیسی و با استفاده از NaOH انجام شد و در نهایت حجم محلول به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد، محلول پس از اتوکلاو شدن در یخچال نگهداری گردید.

۳-۱-۳- محلول استات سدیم ۳/۲ مولار (C₂H₃NaO₂, 3.2M, pH=5.4)

مقدار ۲۶/۲۴ گرم استات سدیم در ۷۵ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. سپس در حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر، pH محلول با استیک اسید، به ۵/۴ رسانده شد و اتوکلاو گردید.

۳-۱-۴- محلول بافر TBE^۱

بافر TBE (بافر الکتروفورز) با غلظت استوک ۲X تهیه و نگهداری شد و با غلظت ۰/۵X مصرف گردید. برای تهیه استوک ۲X، ۲۱/۶ گرم Tris Base، ۱۱ گرم اسیدبوریک، ۸ میلی لیتر EDTA ۰/۵ مولار باهم مخلوط و به حجم ۷۵۰ میلی لیتر رسانده شد. پس از تنظیم pH به میزان ۸، حجم محلول با آب مقطر به ۱۰۰۰ میلی لیتر رسید.

۳-۴- استخراج DNA از بافت برگ

استخراج DNA از بافت برگ گیاه جوان و تازه‌ی گیاه پسته *Pistacia* به روش (Doyle and Doyle, 1998) با کمی تغییرات صورت گرفت. حدود ۰/۳ گرم از نمونه برگ (بدون ساقه) درون هاون چینی استریل شده با استفاده از ازت مایع کاملاً پودر شد و سریع به تیوپ با حجم ۲ میلی لیتر انتقال داده شد، سپس ۱۰۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (جدول پیوست ۱) از قبل در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد گرم شده، ۳ میکرولیتر بتامرکاپتواتانول به آن افزوده شده و هر ویال ۳۰ ثانیه با استفاده از ورتکس مخلوط شد. بعد از آن تیوپ‌ها به مدت ۶۰ دقیقه درون بن‌ماری با دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند و هر ۱۰ دقیقه یک‌بار به آرامی سروته شدند. پس از آن نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند و سپس مایع شناور رویی به تیوپ جدید منتقل شد. محلول کلروفرم^۲: ایزوآمیل الکل^۳ (۲۴:۱) به صورت هم حجم با مایع رویی به نمونه‌ها اضافه شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد.

فاز بالایی را با احتیاط و بدون مخلوط شدن با فاز وسط که حاوی پروتئین است، برداشته و به یک تیوپ جدید منتقل شد (اگر محلول شفاف نباشد می‌توان با تکرار دو یا سه مرتبه دیگر این مرحله، به

^۱ - Tris Borate Ethylene (TBE)

^۲ - Chloroform

^۳ Isoamyl alcohol

شفاف شدن آن کمک کرد). در مرحله بعد ۲/۳ حجم ایزوپروپانول سرد^۱ (-۲۰- درجه سانتی‌گراد)، ۰/۱ حجمی استات سدیم (۳/۲ M، pH=۸) و ۱/۲ حجم کلرید سدیم ۴M، به مایع رویی برداشته شده، افزوده شد و تیوپ به آرامی با دست سروته گردید تا مواد اضافه شده خوب مخلوط گردد. سپس به مدت یک ساعت در دمای -۲۰- درجه سانتی‌گراد قرارداده شد و بعد از این مرحله به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد تا اینکه رسوبی از DNA تشکیل شد و ته‌نشین گردید. سپس فاز رویی حذف و رسوب حاصل با اتانول سرد ۹۶ درصد و دو بار با اتانول ۷۰ درصد شستشو داده شد که این مرحله بستگی به میزان شفاف بودن یا آلودگی رسوب DNA دارد.

در مرحله‌ی پایانی رسوب DNA در شرایط استریل به‌طور کامل خشک گردید و سپس ۲۰ تا ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل^۲ و دیونیزه به رسوب تشکیل‌شده افزوده شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرارداده شد. سپس DNA حل‌شده برای نگهداری طولانی‌مدت در فریزر -۲۰- درجه سانتی‌گراد قرارداده شد.

1 -Cold Isopropanol

2 -Dionized Water

منابع

احمدی ک، قلی‌زاده ج، عبادزاده ح، حاتمی ه، حسین‌پور ر، عبدشاه ه، رضایی م م و استبرق م، (۱۳۹۵) "آمارنامه باغی وزارت جهاد کشاورزی" تهران، وزارت کشاورزی جهاد، ج ۳، ش ک

۴۹۹۶۹۷۹

اسفندیاری ب، داوری‌نژاد غ ح، شهریاری ف و کیانی م، (۱۳۸۹) "تعیین جنسیت گونه‌ها و ارقام پسته با استفاده از نشانگرهای SCAR, RAPD، پایان‌نامه کارشناسی ارشد باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد.

اسماعیل‌پور ع، (۱۳۸۴) " خصوصیات و ویژگی‌های برخی از ارقام پسته ایران و ارقام نر پسته " گزارش پژوهشی مؤسسه تحقیقات پسته کشور، ۸۸ صفحه.

اشرف‌مهرابی ع، محمدی س، غلامی پ و اطمینان ع ر، (۱۳۹۳) " بررسی تنوع ساختار ژنتیکی جمعیت‌هایی از بنه (*P.mutica*, *P.atlantica*) با استفاده از نواحی بین ریزماهواره‌ای ژنومی " پایان نامه کارشناسی ارشد اصلاح نباتات ، دانشگاه ایلام.

ارجمند قهستانی ر، توسلیان ا و محمدی‌نژاد ق، (۱۳۹۴)"ارزیابی تنوع ژنتیکی ۲۵ ژنوتیپ پسته ایرانی با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR" مقاله پژوهشی ، مجله بیوتکنولوژی کشاورزی علمی- پژوهشی ISC، دوره ۷: ش ۳، ۱-۱۸

بابائیان جلودار ن، کاکاوند م، قهرمانی ف و خادریان ر، (۱۳۸۷) "در ترجمه مارکرهای مولکولی در ژنتیک گیاهی و بیوتکنولوژی" انتشارات دانشگاه مازندران، ص ۳۰۱.

پناهی ب، اسماعیل‌پور ع و فربود ف،(۱۳۸۲) اصول آماده‌سازی زمین کاشت، داشت و برداشت پسته، معاونت امور باغبانی، تهران، ۵۸ صفحه.

پورمقدم ش، کریمی ح ر، محمدی میریک ع ا و شمشیری م ح، (۱۳۹۳)، "بررسی تنوع ساختار

ظاهری درون توده‌ای پسته و همبستگی بین بذرها با دانه‌های حاصل از آن‌ها در رقم پسته

بادامی ریز زرنند" علوم باغبانی ایران، دوره ۴۷، شماره ۱، ص ۱۱۹-۱۲۷

تاج‌آبادی پور ع، (۱۳۷۶) "شناسایی برخی از ارقام پسته" پایان‌نامه کارشناسی ارشد باغبانی، دانشکده

کشاورزی دانشگاه تهران.

تقی زاد آ، احمدی ج. حداد ر و ضرابی م (۱۳۹۰) "مطالعه تنوع ژنتیکی پسته ایرانی با استفاده از

چند نشانگر بین ریزماهور های "ISSR علوم باغبانی، ۴۵۳-۴۶۰ : ۴ (۲۵)

حاجی رضایی م. جوادی غ. باقی زاده ا. صادقی زاده م. ۱۳۸۸ ارزیابی تنوع ژنتیکی تعدادی از ارقام

پسته استان کرمان بر اساس نشانگر مولکولی RAPD. مجله زیست شناسی ایران ش ۲

حاجی زاده حسین آبادی م. کریمی ح. ر. دشتی ح. شمشیری م ح. تاج آبادی پور ع. ۱۳۹۲ بررسی تنوع

ژنتیکی تعدادی از ژنوتیپ های نروماده پسته با استفاده از نشانگر RAPD ، به نژادی گیاهان

زراعی و باغی، ش ۱، ۳۲-۲۶

حکم آبادی ح، حسینی فرد س ج، مرادی قهدریجانی م و امامی س ی، (۱۳۹۰)، "تشخیص عوامل

خسارت زای محیطی و غیر محیطی وارده به محصول پسته، انتشارات آموزش و ترویج کشاورزی،

۳۶۰ صفحه

شاملو ف، (۱۳۹۳) "بررسی تنوع ژنتیکی گردو منطقه شهرستان آزادشهر با استفاده از نشانگر

مولکولی ریزماهوره" پایان نامه کارشناسی ارشد، باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی

شاهرود

صادقی سرشت ا، کریمی ح ر، محمدی میریک ع و اسماعیل زاده م، (۱۳۹۳) "تنوع و روابط بین صفات

رویشی در دانه‌های حاصل از هیبرید طبیعی بنه باغی به عنوان یک پایه در پسته" فناوری

تولیدات گیاهی، جلد پانزدهم، شماره ۱، ص ۱۴۰-۱۲۷

رستمی کیا ی، فتاحی م و ایمانی ع ا، (۱۳۸۸) " بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های بنه با استفاده از صفات مورفولوژیکی برگ و میوه " تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران، جلد ۱۷، شماره ۲: ۲۹۴-۲۸۴.

طایفه علی اکبرخانی س، طلایی ع، فتاحی مقدم م، (۱۳۹۱) " مطالعه تنوع ژنتیکی برخی ژنوتیپ‌های پسته خراسان با نشانگرهای مولکولی، پایان‌نامه کارشناسی ارشد باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

عوض آبادیان ع. افشاری ح. حکم‌آبادی ح. (۱۳۹۳) بررسی صفات کمی و کیفی ژنوتیپ‌های مختلف انتخابی کلکسیون تلقیح کنندگان پسته در ژنوتیپ‌های مختلف ماده انتخاب بذری در ایستگاه تحقیقات پسته دامغان، پایان نامه کارشناسی ارشد علوم باغبانی

فتاحی مقدم م ر، محمدزاده م، زمانی ذ و خدیوی خوب ع (۱۳۹۳) "مطالعه ارتباط بین نشانگرهای مولکولی و صفات مهم میوه در فندق با استفاده از آنالیز رگرسیون چندمتغیره" مجله سلول و بافت، ج ۵: ش ۳، ۲۸۹-۲۹۹

قره‌یاضی ب، (۱۳۷۵)، "کاربرد نشانگرهای DNA در اصلاح نباتات"، مجموعه مقالات چهارمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران، ص ۱۳۴-۱۴۰.

مقبلی م، رشیدی م ر، افشاری ح و شوشتری م ب، (۱۳۹۱) "بررسی تنوع ژنتیکی در بین ارقام اصلی پسته دامغان با استفاده از نشانگر RAPD" همایش ملی محیط زیست و تولیدات گیاهی سمنان، دانشگاه آزاد اسلامی سمنان

میرزایی، س، بهار، م، شریف نبی، ب، (۱۳۸۳)، تنوع ژنتیکی ارقام پسته ایرانی بر اساس نشانگرهای RAPD، سومین همایش بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران.

نائینی م ر، ابراهیمی م، شریف‌زادگان ح، حاجی‌رضا م ر و میرزاپور م ه، (۱۳۹۶) "آشنایی با عملیات کاشت و داشت باغات پسته"، جلد اول، انتشارات نسیم حیات، تهران، ۱۲۸ صفحه

نقوی م، قره‌یاضی ب و حسینی سالکده ق، (۱۳۸۶) "نشانگرهای مولکولی" انتشارات دانشکده تهران،

ص ۳۴۳

نوروزی ش. جلالی‌جواران م. باقی‌زاده ا. ۱۳۸۷ بررسی تنوع ژنتیکی برخی از ارقام پسته ایرانی با

استفاده از نشانگر مولکولی RAPD, SSR, ISSR پایان نامه کارشناسی ارشد. بیوتکنولوژی کشاورزی

دانشگاه تربیت مدرس تهران.

Akdemir. H, Suzerer .V, Tilkat3 .E, Onay.A, Ozden Çiftçi .Y (2016), Detection of Variation in Long-Term Micropropagated Mature Pistachio via DNA-Based Molecular Markers, Appl Biochem Biotechnol (2016) 180:1301–1312

Ahmadi Afzadi, M., Seyed Tabatabaei, B.E., Mohammadi, S.A., and Tajabadipur, A., (2007). Comparison of genetic diversity in species and cultivars of pistachio (*Pistacia vera* L.) based on amplified fragment length polymorphism marker. Iranian Journal of biotechnology, 5: 147-152.

Allen, J. M., Obae, S. G., Brand, M. H., Silander, J. A., Jones, K. L., Nunziata, S. O., (2012). Development and characterization of microsatellite markers for *Berberis thunbergii* (Berberidaceae). American Journal of Botany, 99, e220–e222.

Anonymous (1997) Antepfistigi cesit katalogu. TC Tarim ve Koy Isleri Bakanligi Mesleki Yayinlar Genel:361 Seri:20 Ankara Barone E, Di Marco L, Marra FP, Sidari M (1996) Isozymes and canonical discriminant analysis to identify pistachio (*P. vera* L.) germplasm. HortScience 31:134–138

Arab-nejad H., Bahar M., and Tajabadipour A. (2008). Use of *Pistacia khinjuk* Stocks microsatellite markers in analyses of genetic diversity in Iranian pistachio cultivars. Iranian Agricultural Science. 45:207-217.

Baghizadeh A, Noroozi Sh and 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 Biotechnology*, 9: 76327640-.

Baghizadeh A & Haghi R (2012) "Studying Genetic Diversity of Pistachio Cultivars in Kerman Province Based on Morphological Traits Using Fourier series and Cluster Analysis" Global Journals Inc. (USA) Online ISSN: 2249-4626 & Print ISSN: 0975-5896.

- Barone E, Di Marco L, Marra FD and Sidari M (1996) "Isozyme and Canonical Discriminant Analysis to identify pistachio (*Pistacia vera* L.) germplasm," American Society for Horticultural Science, 31: 1341-38.
- Blair, M. W., Panaud, O. and McCouch, S. R. (1999) "Inter-simple sequence repeat (ISSR) Amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L)". Theoretical and Applied Genetics. 98, pp 780-792.
- Browicz, K. (1988). Chorology of trees and shrubs in south-west Asia and adjacent regions. Polish Scientific Publication, Warsaw, Poland.
- Botstein, D. White, R.L. Skolnick M. and Davis R.W. (1980) "Construction of a genetic linkage map in map using restriction fragment length polymorphisms" Am. J. Hum. Genet., 32, pp 314-331.
- Chatti k, Choulak S, Guenni K, Salhi-Hannachi A, (2017) Genetic diversity analysis using morphological parameters in Tunisian Pistachio (*Pistacia vera* L.) Journal of Research in Biological Sciences, 02 (2017) 29-34
- Chaudhary, .M. Rahul, V.P., Singh, V., and Chauhan, M. P. (2016). "correlation and path coefficient analysis for yield and yield related traits in linseed (*Linum usitatissimum* L.)". Thebioscan, 11, 2, pp 939-942.
- Chauhan, P. and Kumar, P. (2015). "Molecular markers: application in plant improvement programme" International Journal of Applied And Pure Science and Agriculture , 1,7 , pp 74-90.
- Dellaporta. S. L., J. Wood and J. .B Hicks. (1983); A plant DNA minipreparation: Version II. Plant Mol. Bio. Rep. 1(14):19-21.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. (1990); Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. Vol.12: 11-15.
- Doyle JJ, Doyle JL. (1990); Isolation of plant DNA from fresh tissue. Quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull. 19:11-5.
- Ehsanpour, A. A., Tavasoli, M. and Arab, L. (2008) Sex determination of *Pistacia vera* L. using ISSR markers. Malaysian Applied Biology 37(2): 25-28.
- FAOSTAT (2011). <http://faostat.fao.org>.
- Farzad Amirebrahimi, F. Mahmoodnia Meimand, M. Karimi, H.R. Malekzadeh, Kh. Tajabadipour, A. (2017), Genetic Diversity assessment of Male and Female Pistachio Genotypes Based on ISSR Markers. J Plant Mol Breed 5(1): 31 - 39

- FAO, (2014). FAO STAT Data Base. FAO, <http://apps.fao.org/>
- Faostat, (2016). FAO web page. (<http://www.fao.org/faostat>). Accessed 17 May (2016).
- FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations Database; (2015). Available: [http:// faostat.fao.org/](http://faostat.fao.org/).
- Fares K., Guasmi F., Touil L., Triki T., and Ferchini A. (2009). Genetic diversity of Pistachio tree using intersimple
- Fazeli, F. and Cheghamirza, K. (2011). Investigation of genetic diversity in iranian landrace chickpea bulks using ISSR marker. *Modern Genetic*, 6 (2), 97-104. (In Farsi)
- Garcia, MG, Ontivero M, Diaz Ricci JC and Castagnaro A (2002) "Morphological traits and high resolution RAPD markers for the identification of the main strawberry varieties cultivated in Argentina," *Plant Breeding*, 121: 7680-.
- Grodzicker, T., Williams, J., Sharp, P. and Sambrook, J. (1975). "Physical mapping of temperature sensitive *mutants of adenovirus*". Cold Spring Harbor Symposia on
- Gupta M., Chyi Y.S.I., Romero Severson J., and Owen J.L. (1994). Amplification of DNA markers from evolutionary diverse genomes using single primers of simple sequence repeats. *Theoretical Applied Genetics*, 89:998–1006.
- Hajirezayi M, Baghizadeh A, Javadi GH, and Sadeghizadeh M. (2009). Genetic diversity assessment of a few numbers of pistachio cultivars in Kerman province based on RAPD markers. *Iranian Journal of Biotechnolgy* 22(3), 462-469.
- Hansen, M., Hallena, C. and Sall, T. (1998) Error rates and polymorphism frequencies for three RAPD protocols. *Plant Molecular Biology Reports*, 16,139-146.
- Hormaza, J. I., Dollo, L., and Polito, V. S. (1994b). Determination of relatedness and geographical movements of *Pistacia vera* L. (Pistachio, Anacardiaceae) germplasm by RAPD analysis. *Economic Botany* 48: 349–358.
- Hormoza, J. I, Pinney,K, and Polito,V.S, (1998), Genetic diversity of Pistachio (*pistacia vera*, Anacardiaceae) germplasm based on randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers, *Economic Botany* 52 (1): 78-87.
- Hosseinzadeh, H. Abolghasem, S. Tabassi, S. Moghadam, N. Rashedinia, M. Mehri, H.S. Iranian (2012). *J. Pharm. Res.* 11 (3) 879–887.
- Iranjo P, NabatiAhmadi D, Sorkheh K, Rajabi Memeari H, Ercisli S, (2015) "Genetic diversity and phylogenetic relationships between and within wild *Pistacia* species

- populations and implications for its conservation” Northeast Forestry University and Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Ibrahim Basha A, Padulosi S, Chabane K, Hadj-Hasan A, Dulloo E, Pagnotta AM, Porceddu E (2007). Genetic diversity of Syrian pistachio (*Pistacia vera* L.) varieties evaluated by AFLP markers. Genet. Res. Crop Evol. 54: 1807-1816.
- Iruela, M., Rubio, J., Cubero, J. I., Gil, J. and Millan, T. (2002). "Phylogenetic analysis in the genus *Cicer* and cultivated chickpea using RAPD and ISSR markers". Theoretical and Applied Genetics, 104,4 , pp 643-651.
- IPGRI. (1997). Descriptors for Pistachio (*Pistacia vera* L.). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy. ISBN 92-9043-332-9
- Jaccard, P. (1912). The distribution of the flora in the alpine zone. New Phytologist 11, 2, pp 37-50.
- Kafkas, S, Perl-treves, R, (2001), Morphological and molecular phylogeny of pistacia species in turkey, Theor Appl Genet 102: 908-915.
- Kafkas, S, Perl-treves, R, (2002), Inerspecific relationships in pistacia based on RAPD fingerprinting, HortScience 37: 168-171.
- Kafkas S, Perl-Treves R (2006) Molecular characterization of *P. palaestina* as a variety of *P. terebinthus*. Acta Horticultural Science: 291-295.
- Karimi HR, Zamani Z, Ebadi A, Fatahi MR (2009c) Genetic relationship of some Pistacia species using RAPD and AFLP markers. Hort Environ Biotechnol 50:519–524
- Karimi HR, HajizadehHossinAbadi M, MalekiKohbanani A (2012) Genetic diversity of Pistacia khinjuk Stocks. using RAPD markers and leaf morphological characters. Plant Syst Evol 298:963–968
- Katsiotis A, Hagidimitriou M, Drossou A, Pontikis C, Loukas M (2003) Genetic relationships among species and cultivars of Pistacia using RAPDs and AFLPs. Euphytica 132:279–286
- Kebour D, Boutekrabt A and Mefti M (2012) “Using ISSR markers to study genetic polymorphism of pistachio (*Pistacia vera* L.) in Algeria” E3 Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research Vol. 3(3), pp. 47-53

- Maciel FL, TS Gerald and Echeverrigaray S (2001) "Random amplified polymorphic DNA markers variability among cultivars and landraces of common beans of South-Brazil," *Euphytica*, 120 (2): 257-263.
- Maghsoudi.H, Khoshtaghaza.M.H, Minaei.S, Dizaji.H.Z, Agric.J. (2012). *Sci. Technol.* 14 299–310.
- Mahmoodabadi.S.K, Panahi .B, Agharahimi.J, Salajegheh.F, Biol.J, (2012) *Environ. Sci.* 6 (16) 81–86.
- Martinez, E., and Herreco, M. (1994). Male performance in pistachio (*Pistacia vera* L.). *Journal of Horticultural Science* 69 (4): 1117-1122.
- Martins, M., Sarmiento, D., & Oleveira, M. M. (2004). Genetic stability of micropropagated almond plantlets as assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell Reports*, 23, 492–496.
- Meyer, W., Mitchell, T. G., Freedman, E. Z. and Vilgalys, R. (1993). "Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of (*Cryptococcus neoformans*)."
Journal of Clinical Microbiology, 31, 9, pp 2274-2280.
- Mirzaei, S., Bahar M., and Sharifnabi, B. (2003). A phylogenetic study of Iranian wild pistachio species and some cultivars using RAPD markers. *Acta Hort.* 726: 39-43. (In Persian).
- Mondini, L., Noorani, A. A. and Pagnotta, M. (2009). "Assessing Plant Genetic Diversity by Molecular Tools." *Diversity*, 1, pp19-35.
- Noroozi Sh, Baghizadeh A and Javaran M J (2009) "The genetic diversity of Iranian pistachio (*Pistacia vera* L.) cultivars revealed by ISSR markers," *Biological Diversity and Conservation*, 2: 50-56.
- Parfitt, Dan E, Badenes Maria, L, (1997), Phylogeny of the genus pistacia as determined from analysis of the chloroplast genome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol 94: 7987-7992
- Pezhman mehr M, Baghizadeh A (2008). Genetic diversity assessment of some of Iranian black cumin ecotypes by RAPD and AFLP markers. In: *proc. 2nd. nat. symp. of cellular and molecular biology*. Kerman. Iran. pp. 86-87.

- Potter, R.H. and Jones, M.G.K. (1991). "Molecular analysis of genetic stability. In: Dodds JH (Eds) In vitro methods for conservation of plant genetic resources". Chapman and Hall. London pp 71-91.
- Reddy, M. P., Sarla, N., and Siddiq, E. A. (2002). "Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding". Euphytica, 128, 1, pp 9-17. Tagizadeh, A.,
- Roldán-Ruiz, I., Calsyn, E., Gilliland, T.J., Coll, R., van Eijk, M.J.T. and De Loose, M. (2000). Estimating genetic conformity between related ryegrass (*Lolium* sp.) varieties, 2. AFLP characterization. Molecular Breeding, 6, 593-602.
- Rovira M, Batlle I, Romero M, Vargas FJ (1995) Isoenzymic identification of Pistacia species. Acta Hort 419:265–271
- Roy, A., Frascaria, N., MacKay, J. and Bousquet, J. (1992). "Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*". Theoretical and Applied Genetics, 85, 2-3, pp 173-180.
- Semagn, K., Bjørnstad, Å, and Ndjondjop, M. N. (2006). "An overview of molecular marker methods for plants". African journal of biotechnology, 5, 25.
- sequence repeat markers (ISSR) supported by morphological and chemical markers. Biotechnology, 8:24-34.
- Shafiei-Astani, B., Ong, A. H. K., Valdiani, A., Tan, S. G., Yien, C. Y. S., Ahmady, F. and Kuar, T. (2015). "Molecular genetic variation and structure of Southeast Asian crocodile (*Tomistoma schlegelii*): Comparative potentials of SSRs versus ISSRs." Gene, 571, 1, pp 107-116.
- Shen, J., Ding, X., Liu, D., Ding, G., He, J., Li, X., and Chu, B. (2006). "Intersimple sequence repeats (ISSR) molecular fingerprinting markers for authenticating populations of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo". Biological and Pharmaceutical Bulletin, 29, 3, pp 420-422.
- Smith, J. S. C. and Smith, O. S. (1992). "Fingerprinting crop varieties". Advances in agronomy, 47, pp 85-140.
- Sokal, R. R. and Michener, C. D. (1958). A statistical method for evaluating systematic relationships. Univ. Kans. Sci. Bull. 38, pp 1409-1438.
- Tagizadeh 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. (in farsi).

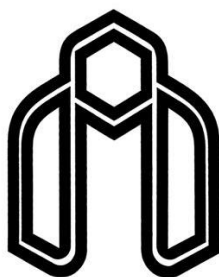
- Tanksley, S. D., and Orton, T. J. (1983). "Isozymic variation and plant breeders, *Isozymes in plant genetics and breeding*", Elsevier science, Amsterdam, the Netherlands, part A, 381-400
- TayefehAliakbarkhany S, Talaie AR, Fatahi Moghadam MR (2015) Investigation of genetic diversity among *Pistacia Vera* In the Khorasan by using molecular. *Mod Genet* 8:169–176
- Tsumara Y, Ohba K, Strauss SH (1996). Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theor. Appl. Genet.* 92: 40-45.
- Vargas, F.J. and M.A. Romero, 1998. Vigour in pistachio progenies. *Acta Horticulturae*, 470: 162-167.
- Wang, X., Yang, R., Feng, S., Hou, X., Zhang, Y., Li, Y. and Ren, Y. (2012). "Genetic variation in *Rheum palmatum* and *Rheum tanguticum* (Polygonaceae), two medicinally and endemic species in China using ISSR markers". *Plos one*, 7, 12, e51667.
- Whitehouse W.E. (1957). The pistachio nut. A new crop for the Western United States. *Economical Botany*, 11:281-321.
- Williams JGK Hanafey MK Rafalski JA and Tingey SV (1993) "Genetic analysis using random amplified polymorphoic DNA markers," *Meth. Enzyme*, 218: 704-740.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., and Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531–6535.
- Wolfe, A. D. and Liston, A. (1998). "Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology". In *Molecular systematics of plants II* ,(pp. 43-86, Springer US.
- Young, N. D., Menancio-Hautea, D., Fatokun, C. A. and Danesh, D. (1992). "RFLP technology, crop improvement, and international agriculture". *Biotechnology: Enhancing research on tropical crops in Africa*, pp 221-230.
- Yu, K.F., Deynze, A.V. and Pauls, K.P., (1993). "Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. In: Glick BR, Thompson JE (eds) *Methods in plant molecular biology and biotechnology*". CRC Press, Boca Raton- Ann Arbor-London-Tokyo, 360 pp.

- Zietkiewicz, E., Rafalski, A. and Labuda, D. (1994). "Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification". *Genomics*, 20, 2, pp 176-183.
- Zohry M (1952) A monographical study genus *Pistacia*. *Palestine Journal Botanical*. (Jerusalem Series): 187-228.
- Zohary D (1996) Taxonomy of the genus *Pistacia*. In: Padulosi S, Caruso T And Barone E. (editors). *Taxonomy, distribution, conservation and uses of Pistacia genetic resources*. International Plant Genetic Resource Institute (IPGRI).

Abstract

In this research genetic diversity of 45 genotypes of pistachios including 20 male genotypes and 20 selected genotypes with five commercial postnodes from seed collection in Damghan Post Research Station were evaluated using morphological phenological and also two markers of ISSR and RAPD. The 10 ISSR molecular markers produced a total of 227 bands all of which represented 100% polymorphism the mean number of bands of polymorphism was 22.7 bands for each marker. The highest resolution of the gene was UBC888 with 14.71 Rp. 10 of the RAPD 213 bands were generated of which 205 were multiform. the average number of polymorphic bands for each marker was 20.5 bands and 95.9% polypeptides. The BD12 indicator had the highest RP of 13.64. the coefficient of correlation between them was calculated to determine the relationships between the attributes. The results showed that genotypes were studied in some traits such as 100 seed weight and fruit length, osteoporosis, waterlogging, flowering date, flowering length, fruit harvesting and Also dimensional traits of leaf and length of branch of this year showed variability with variance and high coefficient of variation. FG18 genotype was the highest dry pistachio (128.8g) and FG3 (51g) and male genotype (MG20). The longest flowering period (11 days) was introduced to superior genotypes. Correlation coefficient between traits was significant and significant between many morphological data especially quantitative characteristics. The cluster analysis by Ward method and the analysis of the main components from the first three components in a total of 52.45%, based on morphological data could explain the variation between two groups of female genotypes and commercial cultivars and show a good separation of female genotypes. The genotypic grouping using cluster analysis using UPGMA method was able to isolate all three groups of male and female genotypes and commercial cultivars in six groups so that commercial cultivars other than Akbari and Kheluchuchi cultivars were more observed among male genotypes group.

Keywords: Pistachio, Morphological Data, UPGMA, Genetic Diversity, ISSR Markers and RAPD,



Shahrood University of Technology
Faculty of Agriculture
MSc Thesis in Horticulture

**Genetic Diversity Evaluation of Selected Pistachio Genotypes
in Damghan Post Station with RAPD and ISSR Markers**

BY: Samira Neishabouri

Supervisor:

Dr.Mehdi Rezaei

Advisors:

Dr. Parviz Heidari

Dr. Hussein hokmabadi

June 2018