

## مطالعه تنوع ژنتیکی برخی ژنوتیپ‌های پسته خراسان با نشانگرهای مولکولی

### Investigation of genetic diversity among *pistachio vera* in the Khorasan by using molecular marker

سمیه طایفه علی‌اکبرخانی<sup>۱\*</sup>، علیرضا طلایی<sup>۲</sup>، محمدرضا فتاحی مقدم<sup>۳</sup>

۱، ۲، ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی‌ارشد، استاد و دانشیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

Tayefeh Aliakbarkhany S<sup>\*1</sup>, Talaie AR<sup>2</sup>, Fatahi Moghadam MR<sup>3</sup>

1,2,3. MSc Student, Professor and Associate Professor, University of Tehran, Karaj, Iran

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Somaye.tayefeh@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۲۹)

#### چکیده

تشخیص دقیق و مطمئن ژنوتیپ‌های گیاهی به خصوص درختان میوه در اجرای برنامه‌های اصلاحی و حفظ ذخایر ژنتیکی اهمیت بالایی دارد. ارزیابی تنوع ژنتیکی برای شناسایی ژن‌های مختلف و برآورد فاصله بین افراد و جمعیت‌ها، همچنین تعیین میزان هتروزیس بسیار ضروری است. با وجود اینکه ایران دارای غنی‌ترین ذخایر ژنتیکی پسته در جهان می‌باشد با این حال مطالعات اندکی بر روی پسته در مناطق پسته‌خیز ایران انجام شده است. در این تحقیق با استفاده از نشانگرهای RAPD، تنوع ژنتیکی ۳۸ ژنوتیپ در منطقه فیض آباد خراسان مورد بررسی قرار گرفت. پانزده آغازگر مورد استفاده در مجموع ۱۱۵ مکان DNA چند شکل تولید نمودند. بیشترین تعداد مکانهای DNA تولیدی ۱۲ عدد و به وسیله آغازگر BC18 به‌دست آمد. متوسط درصد چندشکلی در بین تمام آغازگرهای مورد استفاده ۹۲/۸۳ درصد بود. قدرت تفکیک آغازگرها از ۱/۳۶ تا ۷/۸۹ متغیر و میانگین آن ۴/۹۷ بود. نتایج حاصل از ماتریس تشابه بیشترین شباهت (۷۰ درصد) را بین ژنوتیپ‌های بادامی سفید ۳ و ژنوتیپ ۷ نشان داد. کمترین شباهت (۱۸ درصد) در بین ژنوتیپ ماده گرمه‌سیاه و ژنوتیپ ماده سفید صابونی ۱ بود. تجزیه کلاستر بر اساس ضریب تشابه دایس و روش UPGMA در حد تشابه ۰/۴۱ ژنوتیپ‌های مورد بررسی را در هشت گروه قرار داد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده می‌توان دریافت که تنوع بالایی بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی وجود دارد و نشانگر RAPD برای مطالعه تنوع ژنتیکی پسته کارایی مطلوبی نشان داد.

#### واژه‌های کلیدی

پسته،  
قدرت تفکیک،  
ضریب تشابه دایس،  
تغییر پذیری ژنتیکی،  
RAPD

## مقدمه

جنس پسته *pistacia* از خانواده *Anacardiaceae* و شامل ۱۱ گونه است که فقط *P. vera* L. دارای میوه‌های خندان و از لحاظ تجاری دارای اهمیت می‌باشند (Kafkas et al. 2006). اعتقاد بر این است که قدیمی‌ترین گونه موجود در این جنس، گونه *vera* می‌باشد و گونه‌های دیگر احتمالا از آن مشتق شده‌اند (Zohry 1952). پسته گیاهی دوپایه است گرده افشانی آن توسط باد انجام می‌شود. گل‌آذین یک خوشه مرکب، گل‌های نر و ماده هر دو به صورت جانبی روی شاخه‌های یکساله تشکیل می‌شوند. پسته دارای دیکوگامی می‌باشد و معمولا گل‌های نر زودتر از گل‌های ماده می‌رسند (Werner et al. 2001).

کشور ایران منشأ پسته اهلی بوده به طوریکه بیشترین تنوع ژنتیکی در ارتباط با ارقام پسته در ایران وجود دارد. آمار متناقضی در مورد تعداد ارقام پسته موجود در ایران وجود دارد. طبق آمار منتشر شده توسط موسسه تحقیقات پسته، تعداد ارقام موجود در ایران بیش از ۷۰ رقم می‌باشد. اگر چه بعضی از محققین عقیده دارند که برخی ارقام از لحاظ ژنتیکی یکسان می‌باشند و تعداد ارقام موجود در ایران کمتر از میزان اعلام شده است. دستیابی به منابع ژنتیکی پسته، تعیین و شناسایی صفات، خصوصیات رویشی و زایشی ارقام و فنوتیپ‌های این گیاه، اولین گام در زمینه اصلاح پسته است (Barazani et al. 2003).

مهمترین عامل رسیدن به افزایش عملکرد در واحد سطح این محصول ایجاد ارقام مقاوم به بیماریها، آفات، سرما، خشکی و شوری، تغییر کیفیت محصول، شناسایی ارقام و پایه‌های پسته و حفظ ذخایر ژنتیکی این گیاه می‌باشد. بنابراین انجام تحقیقات در زمینه جمع‌آوری ذخایر توارثی پسته و شناسایی آنها از نظر مورفولوژیکی و ژنتیکی ضروری است. انتخاب ارقام جدید پسته با عملکرد کمی و کیفی بیشتر و سازگار با شرایط مختلف اقلیمی جهت استفاده از آنها در مناطق مختلف پسته‌کاری از اهداف اصلی بخش به‌نژادی است (Tajabadi Pur 2010). Kafkas et al. (2006) با استفاده از نشانگرهای RAPD، ISSR، AFLP در بررسی ۶۹ رقم و ژنوتیپ پسته مورد کشت در آمریکا، ترکیه، سوریه، یونان، ایتالیا، ایران، تونس و فلسطین اشغالی

گزارش کردند که ارقام و ژنوتیپ‌های ایرانی از ژنوتیپ‌های مربوط به سایر کشورها متمایز می‌باشد و گزارش شد که منشأ پسته از ناحیه خزر در ایران می‌باشد که از طریق جنوب شرقی ترکیه وارد سوریه و نواحی مدیترانه، اروپا و شمال آفریقا شده است. (Kamal Abadi 2003) به بررسی تنوع و انگشت‌نگاری ژنتیکی نمونه‌های کلکسیون پسته ایران پرداخت. استفاده از تکنیک RAPD برای شناسایی و طبقه‌بندی ارقام پسته کاملاً مفید و مؤثر بود و این روش در حداقل زمان و با کمترین هزینه تمایز خوبی را در بین ارقام پسته آشکار نمود. بر اساس نشانگر مولکولی RAPD و صفات مورفولوژیک همه ۶۴ رقم پسته مورد بررسی دارای ژنوتیپ مستقل و متمایز از همدیگر بوده و تکراری نمی‌باشد. گزارشات پراکنده‌ای در ارتباط با بررسی ارقام پسته موجود در ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی وجود دارد ولی هیچ کدام از آنها جامع نبوده و تمام ارقام را در بر نمی‌گیرد. بنابراین این تحقیق به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۳۸ ژنوتیپ پسته شامل ارقام و ژنوتیپ‌های موجود در فیض آباد خراسان همچنین نمونه‌هایی از کلکسیون موسسه تحقیقات پسته کشور در این منطقه به عنوان شاهد انجام گرفت که ۲۳ ژنوتیپ ماده و ۱۵ ژنوتیپ نر بودند. هدف از این پژوهش شناخت مولکولی پسته-های این منطقه و استفاده از آنها در برنامه‌های اصلاحی می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

## مواد گیاهی و استخراج DNA

نمونه‌برداری در فصل بهار از برگ‌های جوان ارقام و ژنوتیپ‌های موجود در فیض آباد خراسان انجام شد. همچنین نمونه‌هایی از کلکسیون موسسه تحقیقات پسته کشور در فیض آباد جمع‌آوری شدند. در نهایت ۳۸ ژنوتیپ از جنس *p. vera* انتخاب شد. استخراج DNA از نمونه‌های برگ‌ی و با استفاده از روش (Murray and Thompson 1980) پتاسیم در مرحله شستشو صورت گرفت. تعیین کمیت و کیفیت DNA با استفاده از روش الکتروفورز DNA روی ژل آگاروز با غلظت ۰/۸ درصد و نیز روش اسپکتروفتومتری در طول موج

جدول ۱- ژنوتیپ‌ها و ارقام پسته مورد استفاده

| ردیف | ژنوتیپ‌های ماده | ردیف | ژنوتیپ‌های ماده | ردیف | ژنوتیپ‌های نر |
|------|-----------------|------|-----------------|------|---------------|
| ۱    | بادامی سفید ۱   | ۱۶   | ژنوتیپ ۱۶       | ۱    | ژنوتیپ ۱      |
| ۲    | بادامی سفید ۲   | ۱۷   | ژنوتیپ ۱۷       | ۲    | ژنوتیپ ۲      |
| ۳    | بادامی سفید ۳   | ۱۸   | ژنوتیپ ۱۸       | ۳    | ژنوتیپ ۳      |
| ۴    | سفید صابونی ۱   | ۱۹   | ژنوتیپ ۱۹       | ۴    | ژنوتیپ ۴      |
| ۵    | سفید صابونی ۲   | ۲۰   | ژنوتیپ ۲۰       | ۵    | ژنوتیپ ۵      |
| ۶    | بادامی قرمز     | ۲۱   | ژنوتیپ ۲۱       | ۶    | ژنوتیپ ۶      |
| ۷    | قرمز زودرس درشت | ۲۲   | ژنوتیپ ۲۲       | ۷    | ژنوتیپ ۷      |
| ۸    | گرمه ریز ۱      | ۲۳   | ژنوتیپ ۲۳       | ۸    | ژنوتیپ ۸      |
| ۹    | گرمه ریز ۲      | ۲۴   | ژنوتیپ ۲۴       | ۹    | ژنوتیپ ۹      |
| ۱۰   | گرمه سیاه       | ۲۵   | ژنوتیپ ۲۵       | ۱۰   | ژنوتیپ ۱۰     |
| ۱۱   | گرمه زودرس      |      |                 | ۱۱   | ژنوتیپ ۱۱     |
| ۱۲   | اکبری           |      |                 | ۱۲   | ژنوتیپ ۱۲     |
| ۱۳   | اوحدی           |      |                 | ۱۳   | ژنوتیپ ۱۳     |
| ۱۴   | ممتاز           |      |                 | ۱۴   | ژنوتیپ ۱۴     |
| ۱۵   | کله قوچی        |      |                 | ۱۵   | ژنوتیپ ۱۵     |

درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه برای تکثیر قطعات و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه برای تکثیر نهایی در ۱۵ چرخه در دستگاه PCR<sup>۲</sup> انجام شد.

#### الکتروفورز محصول PCR

پس از انجام واکنش PCR به محتویات هر تیوب مقدار ۵ میکرولیتر بافر بارگذاری اضافه و مخلوط حاصل در چاهک‌های ژل آگاروز ۱/۲ درصد در بافر TBA<sup>۳</sup> ریخته شد. برای تخمین طول قطعات تکثیر شده از نشانگر اندازه SM0313 (شرکت فرمنتاس) استفاده شد. الکتروفورز نمونه‌ها به مدت ۱۳۰ دقیقه با جریان ۷۵ ولت صورت گرفت. پس از این مرحله ژل به مدت ۲۰ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید ۰/۵ میکروگرم در لیتر رنگ آمیزی شد و پس از شستشو در آب مقطر به مدت ۱۵ دقیقه قطعات تکثیر یافته DNA تحت نور UV<sup>۴</sup> توسط دستگاه ژل داک مشاهده شده و عکس برداری از ژل صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر<sup>۱</sup> صورت گرفت.

#### آغازگرهای مورد استفاده و تنظیم شرایط PCR

در این تحقیق از ۴۰ آغازگر ده نوکلئوتیدی سری TibMolBiol استفاده شد. کیت PCR از شرکت سیناژن (ایران) تهیه شد که شامل نوکلئوتیدهای بازی، بافر پی.سی.آر، تک دی ان ای پلیمراز و کلرید منیزیم (MgCl<sub>2</sub>) بود. واکنش زنجیره ای پلی‌مراز با حجم ۱۵ میکرولیتر شامل دو میکرولیتر از DNA تهیه شده با غلظت ده نانوگرم در میکرولیتر، ۱/۵ میکرولیتر از آغازگر با غلظت ۱۰، ۷/۵ میکرولیتر کیت PCR با غلظت ۲X و ۴ میکرولیتر آب مقطر دو بار استریل بود.

چرخه‌های حرارتی شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای واسرشت سازی اولیه به مدت سه دقیقه، ۹۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، دمای اتصال ۳۹/۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه برای تکثیر قطعات و دوباره ۹۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای واسرشت سازی، دمای اتصال ۳۷/۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۷۲

<sup>۲</sup> I-Cycler

<sup>۳</sup> Tris Boric Acid EDTA

<sup>۴</sup> UV

<sup>۱</sup> Perkin-Elmer-M EZ-201

(2004) طی مطالعه‌ای روی گونه‌های پسته در مدیترانه با استفاده از نشانگر RAPD، میزان متوسط درصد چندشکلی را ۹۳ درصد گزارش کردند. در تحقیقی که توسط Shiran et al. (2007) روی ارقام بادام با استفاده از نشانگر RAPD انجام گرفت، متوسط درصد چندشکلی ۹۱/۱ درصد گزارش شد. میانگین قدرت تفکیک (Rp) آغازگرها ۴/۹۷ نشان بود. در بین آغازگرهای مورد استفاده بیشترین مقدار قدرت تفکیک مربوط به آغازگر BC12 به میزان ۷/۸۹ بود (جدول ۲). نتایج حاصل از ماتریس تشابه نشان داد که فاصله ژنتیکی میان ارقام و ژنوتیپ‌های مورد بررسی از ۰/۳۱ تا ۰/۷۰ متغیر است. در مطالعه مشابهی روی ارقام پسته، این فاصله بین ۰/۴۰ تا ۰/۸۶ گزارش شده است (Hajizade et al. 2009). این ضریب در مطالعه دیگری بین ۰/۵۶ تا ۰/۷۹ گزارش شده است (Taghizade et al. 2010). محدوده فاصله ژنتیکی نشان دهنده تنوع بالای موجود در سطح ژنوم ارقام مورد مطالعه می‌باشد. بیشترین شباهت ژنتیکی (۷۰ درصد) بین بادامی سفید ۳ و ژنوتیپ ۷ بود که با توجه به اینکه این ژنوتیپ‌ها از یک منطقه جمع آوری شده است، احتمال اینکه این دو ژنوتیپ از یک والدین به وجود آمده باشند، وجود دارد. شباهت (۶۹ درصد) بین ژنوتیپ‌های نر ۱۳ و ۱۴ وجود داشت که ممکن است آغازگرهای مورد استفاده، به خوبی نتوانستند این ژنوتیپ‌ها را از هم تفکیک نمایند و یا اینکه احتمالاً این دو ژنوتیپ، یک ژنوتیپ هستند. کمترین شباهت (۱۸ درصد) در بین ژنوتیپ ماده گرمه سیاه و ژنوتیپ ماده سفید صابونی ۱ بود که با توجه به صفات مورفولوژی بررسی شده (اندازه برگ متفاوت، زمان گلدهی متغیر و اندازه متفاوت در تاج پوش و ارتفاع درخت)، این نتیجه مورد انتظار است. در محاسبه ضریب کوفتیتیکی که نشان دهنده همبستگی بین ماتریس تشابه و دندروگرام است، مقدار  $(I=0/072)$  به دست آمد که دلیل پایین بودن این ضریب می‌تواند وجود داده‌های گمشده در این مطالعه باشد.

میانگین شباهت ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های ماده مورد مطالعه ۰/۴۶ و در ژنوتیپ‌های نر مورد نظر ۰/۵۶ بود. از این نتیجه می‌توان دریافت که تنوع ژنتیکی در بین ژنوتیپ‌های ماده نسبت به ژنوتیپ‌های نر بیشتر است که تنوع کمتر بین ژنوتیپ‌های نر

پس از انجام آزمایش RAPD برای بررسی چندشکلی بین ژنوتیپ‌ها، وجود یا عدم وجود یک باند DNA خاص با اعداد یک و صفر مشخص شد. بعد از تشکیل ماتریس صفر و یک در نرم افزار Excel، داده‌ها به نرم افزار NTSYS-pc Ver 2.02 منتقل شد. ماتریس تشابه ژنوتیپ‌ها با استفاده ضریب تشابه دایس محاسبه و تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA<sup>۱</sup> انجام گرفت. برای هر آغازگر در این آزمایش قدرت تفکیک<sup>۲</sup> محاسبه شد. این ضریب بیانگر میزان کارایی هر نشانگر برای جداسازی و تفکیک نمونه‌های مورد مطالعه می‌باشد (Prevost and Wilkinson 1999). این شاخص براساس فرمول زیر محاسبه می‌شود (Gilbert et al. 1999):

$$Rp = \sum I_b$$

$$I_b = 1 - (2 \times 10.5 - \pi)$$

( $I_b$ ) میزان آگاهی بخش بودن هر باند DNA یک آغازگر می‌باشد. این مقدار طبق فرمول بالا برای هر کدام از نوارهای DNA تولید شده می‌تواند بین یک تا صفر متغیر می‌باشد (P). نسبتی از ژنوتیپ‌ها که دارای نوار DNA مورد نظر می‌باشند.

ضریب همبستگی کوفتیتیکی با استفاده از ماتریس تشابه و ماتریس کوفتیتیکی که از نرم‌افزار NTSYS-pc Ver 2.02 حاصل شده بود، محاسبه شد. از این نرم افزار برای ترسیم پراکنش نمونه‌ها در دو بعد و سه بعد اول تجزیه به مختصات اصلی (Principal Coordinate Analysis, PCoA) نیز استفاده شد (Caruso et al. 1986).

### نتایج و بحث

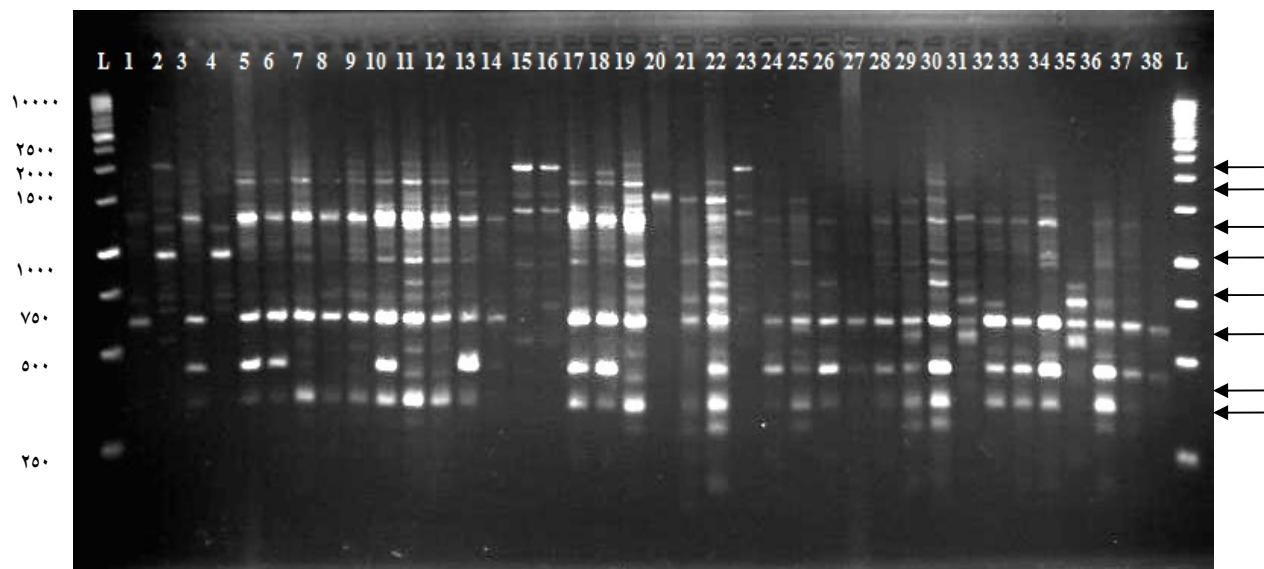
از ۴۰ آغازگر مورد استفاده، ۱۵ آغازگر، ۱۲۳ مکان تولید کردند که ۱۱۵ مکان در بین ارقام و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه چند شکل بودند. دامنه اندازه‌ی مکان‌های تکثیر شده در محدوده ۲۰۰-۳۰۰۰ متغیر بود. بیشترین تعداد مکان توسط آغازگر BC18 و بیشترین درصد چند شکلی مربوط به آغازگرهای BE11، BD11، BCO8، BC12، OPE11، OPB17، OPC09 و OPK10 و OPN13 با میزان ۱۰۰ درصد بود. متوسط درصد چندشکلی در بین تمام آغازگرهای مورد استفاده ۹۲/۸۳ درصد بود. Barazani et al.

<sup>1</sup> Unweighted Paired Group Method Using Aritmatic Average

<sup>2</sup> Resolving power

جدول ۲- توالی، تعداد کل قطعات تکثیر شده، تعداد قطعات چند شکل، درصد چندشکلی و قدرت تفکیک (RP) آغازگر های RAPD مورد استفاده

| ردیف | آغازگر   | توالی ۵'→۳' | تعداد کل قطعات تکثیر شده | تعداد قطعات چند شکل | درصد چند شکلی | قدرت تفکیک (Rp) |
|------|----------|-------------|--------------------------|---------------------|---------------|-----------------|
| ۱    | BE11     | GTCCTGCTGT  | ۷                        | ۷                   | ۱۰۰           | ۴/۵۷            |
| ۲    | BD11     | CAACCGAGTC  | ۹                        | ۹                   | ۱۰۰           | ۶/۳۶            |
| ۳    | BC07     | TGTGCCTGAC  | ۷                        | ۶                   | ۸۵/۷۱         | ۴/۱۰            |
| ۴    | BC08     | GGTCTTCCCT  | ۵                        | ۵                   | ۱۰۰           | ۲/۹۴            |
| ۵    | BC12     | CCTCCACCAG  | ۱۰                       | ۱۰                  | ۱۰۰           | ۷/۸۹            |
| ۶    | BC13     | CCTGGCACAG  | ۱۱                       | ۱۰                  | ۹۰/۹          | ۶/۹۴            |
| ۷    | BC17     | CCGTTAGTCC  | ۶                        | ۳                   | ۵۰            | ۱/۳۶            |
| ۸    | BC18     | GTGAAGGAGG  | ۱۲                       | ۱۱                  | ۹۱/۶۶         | ۷/۳۶            |
| ۹    | OPC07    | GTCCCGACGA  | ۶                        | ۵                   | ۸۳/۳۳         | ۳/۲۱            |
| ۱۰   | OPC09    | CTCACCGTCC  | ۵                        | ۵                   | ۱۰۰           | ۳/۹۴            |
| ۱۱   | OPB17    | AGGGAACGAG  | ۹                        | ۹                   | ۱۰۰           | ۵/۵۲            |
| ۱۲   | OPE11    | GAGTCTCAGG  | ۷                        | ۷                   | ۱۰۰           | ۴/۴۷            |
| ۱۳   | OPK10    | GTGCAACGTG  | ۸                        | ۸                   | ۱۰۰           | ۴/۳۱            |
| ۱۴   | OPN13    | AGCGTCACTC  | ۱۰                       | ۱۰                  | ۱۰۰           | ۶/۸۴            |
| ۱۵   | OPG11    | TGCCCCGTCGT | ۱۱                       | ۱۰                  | ۹۰/۹          | ۴/۷۳            |
| ۱۶   | مقدار کل | -           | ۱۲۳                      | ۱۱۵                 | -             | ۷۴/۵۴           |
| ۱۷   | میانگین  | -           | ۸/۲                      | ۷/۶۶                | ۹۲/۸۳         | ۴/۹۷            |



شکل ۱- الگوی نوار DNA حاصل از تکثیر آغازگر OPG11 (شماره ژنوتیپ‌ها بر اساس جدول ۱، L) نشانگر اندازه SMO313). اندازه قطعات بر اساس جفت باز می‌باشد

و هشت) که این می‌تواند ناشی از اشتباه در نامگذاری آنها باشد. همچنین احتمال دارد که والدین آنها مشترک باشد. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود، ارقام ممتاز، اوحدی و کله قوچی در گروه هشتم قرار گرفتند که این نتیجه با مطالعات انجام شده توسط Mirzaee et al. (2006) و Hajirezaee et al. (1387) مطابقت داشت. که در آن تحقیقات نیز ارقام اوحدی، ممتاز و کله قوچی در فاصله ژنتیکی کمتری از یکدیگر جدا شدند. همچنین هم گروه شدن ژنوتیپ‌های مورد بررسی با این ارقام می‌تواند دلیل خوبی بر منشا پیدایش پسته در خراسان باشد.

از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر روی داده‌های حاصل از RAPD یک پلات دو بعدی و یک پلات سه بعدی حاصل شد. سه مؤلفه اصلی که بیشترین سهم را در ایجاد تنوع موجود داشته‌اند به ترتیب ۱۱/۱۲، ۸/۴۹ و ۷/۱۷ درصد از میزان کل تنوع را توجیه می‌نمایند. از آنجا که اطلاعات به دست آمده از پلات‌های سه بعدی و دو بعدی با نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای تطابق نسبی دارند، این مسئله می‌تواند برای انتخاب آغازگر در تحقیقات بعدی به ما کمک کند. با توجه به نتایج تجزیه کلاستر ژنوتیپ‌های ۴ و سفید صابونی ۱ در گروه‌های جدا و از بقیه ژنوتیپ‌ها جدا شدند، در پلات‌های دو و سه بعدی نیز این نتایج تایید شد (شکل ۳ و ۴).

از نتایج به دست آمده می‌توان دریافت که با توجه به اینکه ژنوتیپ‌های مورد بررسی از یک منطقه جمع‌آوری شده بودند، تنوع بالایی را نشان دادند که حائز اهمیت می‌باشد و می‌توان از اطلاعات حاصل شده در انتخاب پایه و پیوندک‌های مناسب و اصلاح باغات موجود بهره گرفت. ضمن اینکه با توجه به شرایط آب و هوایی متنوع کشور، توجه به قرابت ژنوتیپ‌ها می‌تواند ما را در انتخاب ژنوتیپ مناسب برای احداث باغ جدید در یک منطقه جغرافیایی خاص راهنمایی نماید.

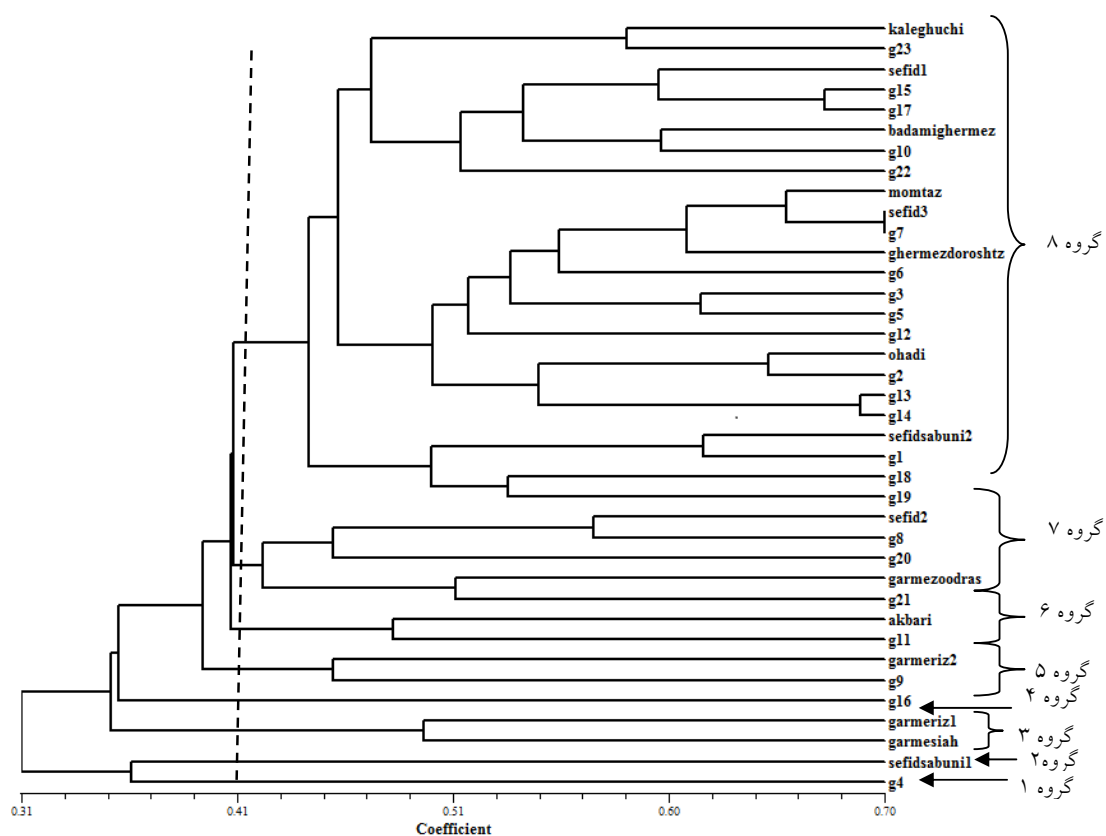
همچنین استفاده از نشانگرهای مولکولی به منظور شناسایی ارقام و فنوتیپ‌های جدید و نیز هیبریدها و پایه‌ها می‌تواند کمک زیادی در شناسایی و معرفی ارقام و هیبریدهای برتر و مقاوم ایفا کند، بنابراین اجرای کامل و دقیق اینگونه پژوهش‌ها کمک زیادی به برنامه‌های اصلاحی و شناسنامه‌دار کردن و ثبت ارقام و پایه‌های پسته در مجامع علمی جهان خواهد نمود.

احتمالا به تعداد کمتر ژنوتیپ‌های نر مورد بررسی مربوط می‌شود. اندازه جمعیت با تنوع افراد جمعیت رابطه مستقیم دارد یعنی هرچه جمعیت کمتر باشد، میزان تنوع کمتر است. همچنین با توجه به این که پسته گیاهی دوپایه و هتروزیگوت است، کاشت بذر آن و عدم پیوند (باغات بذری) باعث تفرق صفات و ایجاد ژنوتیپ‌های مختلفی می‌شد و بنابراین عمل پیوند از ایجاد تنوع جلوگیری می‌کند (Alexander 1984).

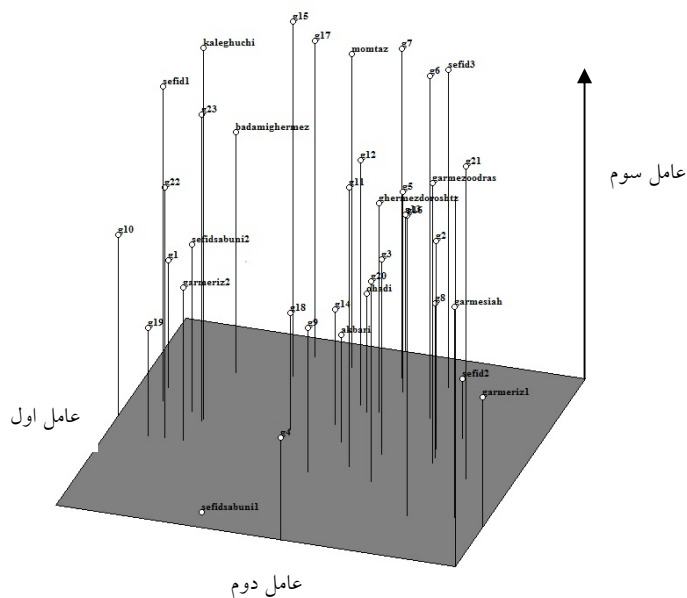
تجزیه کلاستر، در حد تشابه ۰/۳۱ ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را در دو گروه بزرگ و در فاصله ۰/۴۱ به هشت گروه تقسیم کرد (شکل ۲). ژنوتیپ نر ۴ در گروه یک قرار گرفت که احتمالا علت آن انتقال ژنوتیپ‌های نر مناسب از مناطق دیگر به این ناحیه می‌باشد که باعث جدایی این ژنوتیپ از دیگر ژنوتیپ‌ها و ارقام پسته گشته است (Ahmad et al. 2005).

گروه دوم ژنوتیپ ماده سفید صابونی ۱ را در برگرفت. گروه سوم شامل ژنوتیپ‌های ماده گرمه ریز ۱ و گرمه سیاه بود که با توجه به صفات مورفولوژی مشابه (زودرس بودن، خندانی بالا و تعداد گل فراوان) احتمالا این دو ژنوتیپ، یک ژنوتیپ باشند و یا اینکه ممکن است ژنوتیپ گرمه سیاه از بوجود آمدن یک یا چند جهش از ژنوتیپ گرمه ریز حاصل شده باشد (Dongmel et al. 2003). ژنوتیپ ماده ۱۶ به تنهایی در گروه چهار قرار گرفت. گروه پنجم در برگیرنده ژنوتیپ ماده گرمه ریز ۲ و ژنوتیپ نر ۹ بود. همانطور که ذکر شد در گروه‌های یک تا پنج فقط یک یا دو ژنوتیپ در هر گروه قرار دارد که نشان دهنده تفاوت‌های آنها با دیگر ژنوتیپ‌ها است. از سوی دیگر می‌توان پیچیدگی خاص و قابل توجه روابط ژنتیکی بین ارقام و ژنوتیپ‌های پسته را ناشی از دگر گشتن بودن پسته و عدم وجود یک سیستم دقیق شناسایی، نامگذاری و معرفی ارقام دانست (Kafkas et al. 2006). در گروه ششم ژنوتیپ نر ۱۱ و اکبری قرار گرفت که احتمال دارا بودن والدین مشترک آنها دور از انتظار نیست البته باید یکسری مطالعات دیگر انجام گیرد تا بتوان به نتیجه واقعی و درست دست یافت. بقیه ژنوتیپ‌های مورد بررسی در دو گروه هفت و هشت قرار گرفتند.

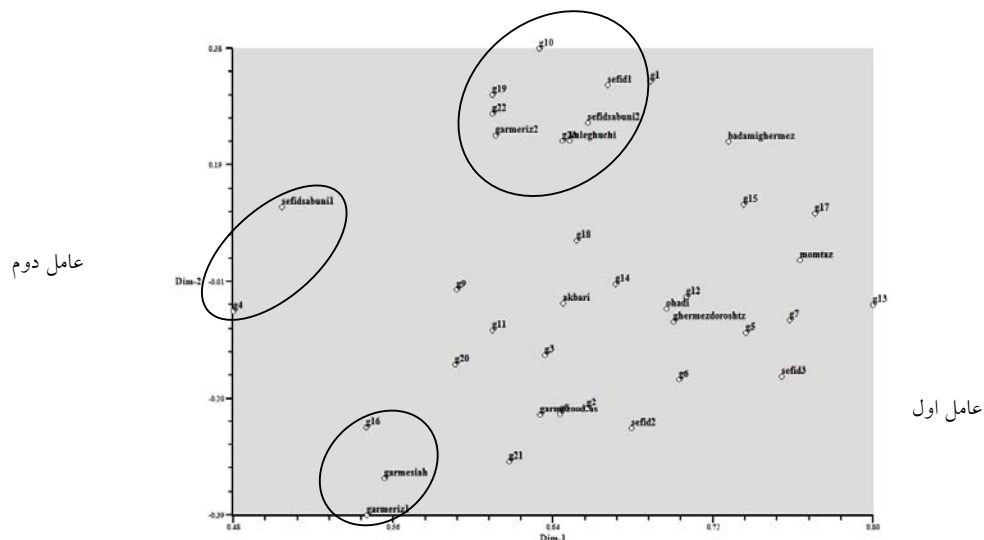
در حالاتی که این ارقام و ژنوتیپ‌ها در حد تشابه بالایی با هم در یک دسته قرار گرفتند (ژنوتیپ‌ها و ارقام موجود در گروه هفت



شکل ۲- دندروگرام مربوط به گروه‌بندی ۳۸ ژنوتیپ نر و ماده پسته با استفاده از داده‌های RAPD بر اساس ضریب تشابه دایس و الگوریتم UPGMA (ژنوتیپ‌های ۱ تا ۱۵ نر و بقیه ژنوتیپ‌ها ماده هستند).



شکل ۳- الگوی سه بعدی پراکنش ژنوتیپ‌های پسته مورد بررسی با استفاده از سه عامل اصلی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی داده‌های RAPD



شکل ۴- الگوی دو بعدی پراکنش ژنوتیپ‌های پسته مورد بررسی با استفاده از سه عامل اصلی حاصل از تجزیه به مختصات داده‌های RAPD

### منابع

- Ahmad R, Ferguson L, Southwick SM (2005) Molecular marker analyses of Pistachio rootstocks by Simple Sequence repeats and Sequence-Related Amplified Polymorphisms. *Journal of the American Society for Horticultural Science and Biotech*: 382-386.
- Alexander DM (1984) Pistachio hybridization. *Horticulture Australia*: 54-58.
- Brazani OZ, Atayev A, Yakabov B, Kostjukovsky V, Popov K, Goldrish AG (2003) Genetic variability in Turkmen population of *Pistacia vera* L. *Genetic Resources and Crop Evolution*: 383-389.
- Caruso T, Inglese A, Motisi, Sottile F (1996) Growth analysis and mineral content in pistachio (*Pistacia vera* L.) infructescence and its components. *Journal of Horticulture Science*: 919-924.
- Dollo L, Hormaza J, Polito V (1995) RAPD polymorphism among pistachio (*Pistacia vera*) cultivars. *Fruit varieties journal*: 147-152.
- Dongmel T, Shaping L, Diang L, Haitao H, Lou S, Han H (2003) Sex identification of pistachio by using RAPD analysis. *Journal of Fruit Science*: 124-126.
- Gilbert JE, Lewis RV, Wilkinson MJ, Galigari PDS (1999) Developing and appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections. *Theoretical and Applied Genetics*. 98: 1125-1131.
- Golan-goldhirsh A, Barazani Z, Wang D, Khakda J, Saunders V, Rowland L (2004) Genetic relationships among Mediterranean Pistacia evaluated by RAPD and AFLP markers Plant. *American Journal of Health-System Pharmacy Society*: 9-18.
- Hormaza JL, Dollo L, Polito V (1994) Identification of a RAPD marker linked to sex determination in *Pistacia vera* using segregant analysis. *Theoretical and Applied Genetics*: 9-13.
- Kafkas S, Perl-Treves R (2002) Interspecific relationship in Pistacia based on RAPD fingerprinting. *Horticultural Science*: 168-171.
- Kafkas S, Perl-Treves R (2006) Molecular characterization of *P. palaestina* as a variety of *P. terebinthus*. *Acta Horticultural Science* : 291-295.
- Mirzaei S, Bahar M, Sharifnabi B (2006) A phylogenetic study of Iranian wild pistachio species and some cultivars using RAPD markers. *Acta Horticulturae*. 726: 39-43. (in farsi).
- Murray HC, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight Plant DNA. *Nucleic Acid Research and Molecular Biology*: 8, 4321-4325.
- Prevost A, Wilkinson MJ (1999) A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*. 98: 107-112.
- Tagizade 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).
- Tajabadipur A (1997) Identification of some pistachio cultivars. M.Sc. thesis, Faculty of Agriculture, Tehran University, Tehran, Iran. (in farsi).
- Werner O, Sanchez-Gomez P, Guerra J, Martinez J (2001) Identification of pistacia saportae Burnat (Anacardiaceae) by RAPD analysis and morphological characters. *Horticultural Science*: 179-168.
- Zohary D (1995) Taxonomy of the genus Pistacia. Inc. Padulosi S, Caruso T And Barone E. (editors). Taxonomy, distribution, conservation and uses of Pistacia genetic resources. International Plant Genetic Resource Institute (IPGRI).
- Zohry M (1952) A monographical study genus Pistacia. *Palestine Journal Botanical*. (Jerusalem Series): 187-228.