بررسی تنوع ژنتیکی تعدادی از ژنوتیپ‌های نر و مادهٔ پسته (*Pistacia vera* L.) با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD

محبوبه حاجی‌زاده حسین‌آبادی[۱]، حمیدرضا کریمی[۲*]، حسین دشتی[۳]، محمدحسین شمشیری[۴] و علی تاج‌آبادی‌پور[۵]

(E-mail: h_karimi1019@yahoo.com)

(تاریخ وصول: ۹۱/۱۱/۳۰ – تاریخ پذیرش: ۹۲/۰۴/۰۵)

چکیده

به منظور مطالعهٔ تنوع ژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های نر پسته، تعداد ۱۶ ژنوتیپ نر و ۸ ژنوتیپ مادهٔ پسته از مؤسسهٔ تحقیقات پستهٔ ایران (IPRI) انتخاب شدند. ۱۲ آغازگر مورد استفاده، در مجموع ۶۵ قطعه DNA را تکثیر کردند که از بین آن‌ها ۴۸ قطعه چندشکل و ۱۷ قطعه یک‌شکل بودند. تجزیهٔ خوشه‌ای براساس ماتریس تشابه و ضریب تشابه جاکارد و به روش UPGMA، ژنوتیپ‌های پستهٔ مورد مطالعه را در فاصلهٔ تشابه ۰/۴۹ در پنج گروه اصلی قرار داد. بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های نر پسته با استفاده از نشانگر RAPD وضعیت ژنتیکی آن‌ها را مشخص کرد، به‌طوری که ارقام ماده به‌خوبی از ژنوتیپ‌های نر تفکیک شدند و به‌نظر می‌رسد ژنوتیپ نر MO12 به‌دلیل تشابه ژنتیکی کمتر با ارقام مادهٔ مورد مطالعه می‌تواند گرده‌دهندهٔ مناسبی برای این ارقام باشد که لازم است در این زمینه از طریق گرده‌افشانی کنترل‌شده پژوهش‌هایی انجام شود. نتایج این پژوهش نشان داد که ژنوتیپ‌های نر پستهٔ مورد بررسی تنوع ژنتیکی بالاتری از ژنوتیپ‌های ماده دارند که دلیل آن پیوند نزدن ژنوتیپ‌های نر موجود در باغ‌های پسته است که باعث ایجاد تنوع وسیع‌تری در ژنوتیپ‌های نر در مقایسه با ارقام ماده شده است.

واژگان کلیدی: آغازگر RAPD، پسته (*Pistacia vera* L.)، تجزیهٔ خوشه‌ای

۱. فارغ‌التحصیل گروه باغبانی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان، رفسنجان- ایران

۲. دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان، رفسنجان– ایران (نویسندهٔ مسئول مکاتبات*)

۳. دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان، رفسنجان- ایران

۴. استادیار، گروه باغبانی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان، رفسنجان- ایران

۵. مربی بخش تحقیقات به‌نژادی و بیوتکنولوژی مؤسسهٔ تحقیقات پستهٔ کشور، رفسنجان- ایران

مقدمه

پسته[1] یکی از مهم‌ترین محصولات باغی و سومین کالای صادراتی ایران است و اهمیت اقتصادی ویژه‌ای دارد (۱). جنس پسته متعلق به خانوادهٔ پسته‌سانان[2]، راستهٔ Sapindales است (۲۱ و ۲۵). این جنس دارای بیش از ۱۳ گونه است که به‌صورت درخت یا درختچه‌های خزان‌کننده یا همیشه‌سبز و دوپایه‌اند. در بین گونه‌های جنس پسته فقط گونهٔ vera دارای خشک‌میوهٔ خندان است و ارزش تجاری دارد (۲۵).

بررسی منابع ژنتیکی گیاهان با استفاده از نشانگرهای مولکولی در سال‌های اخیر افزایش چشم‌گیری داشته است (۱۸). از اواسط دههٔ ۱۹۸۰ انتخاب و تعیین هویت ژنوم با کمک نشانگرهای مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به‌سرعت پیشرفت کرد. نشانگر RAPD[3] یکی از متداول‌ترین آن‌هاست که در مطالعهٔ تنوع ژنتیکی پسته کاربرد دارد (۱۵). این تکنیک بر مبنای تکثیر قطعات تصادفی DNA انجام می‌شود و نیازی به اطلاع از توالی DNA الگو نیست (۱۹). چندشکلی در RAPD به دو علت ایجاد می‌شود: ۱- تفاوت‌های موجود در توالی‌های DNA در مکان‌های اتصال آغازگر که مانع اتصال آغازگر به جایگاه اتصال می‌شود که بیشتر از جهش‌های نقطه‌ای ناشی است؛ ۲- تفاوت در اندازهٔ قطعهٔ تکثیرشدنی بین دو نقطهٔ اتصال آغازگر که از عواملی مثل حذف، اضافه و وارونگی ناشی می‌شود. این دو نوع چندشکلی به‌دلیل نامشخص‌بودن جایگاه ژنی باندها در ژنوم و نیز وجود سایر باندها از یکدیگر تفکیک‌پذیر نیستند (۱۰).از مزایای این روش آسانی کار، ارزان بودن آن در مقایسه با سایر روش‌ها، نیازنداشتن به آگاهی قبلی از توالی ژنوم و درصد چندشکلی بالای آن است (۲۴). با توجه به تمام مزایای ذکرشده، معایب این نشانگر عبارت است از تکرارناپذیری و هم‌بارز نبودن. البته بخش زیادی از باندهای RAPD درصورتی‌که آزمایش با دقت لازم تکرار شود، تکرارپذیری بالایی دارند و همچنین نتایج مطمئنی به‌دست می‌آید (۱۳).

محققان، با استفاده از نشانگر RAPD، هویت ژنتیکی ژنوتیپ نر پستهٔ جدیدی با عنوان سیاه‌برگ را بررسی و گزارش کردند که ویژگی‌های ژنتیکی سیاه‌برگ ارتباط خیلی نزدیکی به رقم تجاری اوحدی دارد. نتایج این مطالعه نشان داد که از تکنیک RAPD می‌توان برای مطالعهٔ تنوع ژنتیکی ارقام پسته استفاده کرد (۱۴). در پژوهشی تنوع ژنتیکی ۳۰ رقم مادهٔ پستهٔ اهلی و یک ژنوتیپ نر با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR، RAPD و SSR بررسی و نشان داده شد که نشانگرهای RAPD، سپس ISSR و SSR بیشترین قابلیت تفکیک‌پذیری ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را دارند (۸). در پژوهش دیگری هویت هشت ژنوتیپ نر و ۱۰ رقم مادهٔ پستهٔ اهلی با استفاده از نشانگر آیزوزایم تعیین و گزارش شد که مقدار چندشکلی بیشتر در ژنوتیپ‌های نر پسته در مقایسه با ماده به‌دلیل گزینش شدید ارقام ماده از سوی کشاورزان و تکثیر رویشی است (۹). در پژوهشی روابط ژنتیکی ۳۰ رقم مادهٔ پستهٔ 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 ISSR این تنوع را به‌وضوح نشان داد (۲۰).

بیشتر پژوهش‌های صورت‌گرفته در کشور در زمینهٔ تنوع ژنتیکی گونه‌های پسته یا ارقام مادهٔ پسته با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی‌اند (۳، ۴، ۵، ۷، ۱۶، ۱۷ ، ۲۰) و هیچ‌گونه گزارش منسجمی دربارهٔ شناسایی ژنوتیپ‌های نر پسته دیده نمی‌شود؛ به‌طوری‌که تاکنون در کشور ایران رقم نر پسته معرفی نشده است و این پژوهش زمینه‌ای مناسب را برای دستیابی به این هدف فراهم می‌کند. از طرف دیگر در پژوهش‌های متعدد (۱۱، ۱۲ ، ۲۲) نقش ژنوتیپ نر و نوع دانهٔ گرده در عملکرد، کمیت و کیفیت خشک‌میوهٔ پسته به اثبات رسیده است. بنابراین، انتخاب ژنوتیپ‌های نر مناسب در حکم گرده‌دهنده برای ارقام تجاری اهمیت دارد و لازمهٔ آن شناسایی ژنوتیپ‌های نر از لحاظ مورفولوژی و مولکولی است. بنابراین پژوهش حاضر به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی تعدادی از ژنوتیپ‌های نر پسته با استفاده از نشانگر RAPD به اجرا درآمد.

مواد و روش‌ها

تعداد ۱۶ درخت نر پسته از کلکسیون بذری به‌همراه ۸ درخت مادهٔ پسته از کلکسیون ارقام ماده از ایستگاه شمارهٔ ۲ مؤسسهٔ تحقیقات پستهٔ ایران واقع در رفسنجان در سال ۱۳۸۸ به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی انتخاب شدند. درختان نر مورد ارزیابی ۲۸ ساله، بذری و بدون پیوند بودند و در بافت خاک شنی و فاصلهٔ کاشت ۷×۴ متر پرورش یافته بودند. ارقام مادهٔ مورد استفاده شامل اوحدی، کله‌قوچی، ایتالیایی، فندقی، ابراهیمی، جندقی، رضایی زودرس و قزوینی بود (جدول ۱).

DNA ژنومی از بافت برگ با استفاده از روش CTAB[4] در قالب دویل و دویل[5] با کمی تغییرات استخراج شد (۱۶) . برای این منظور ۰/۵ گرم بافت تازهٔ برگ در هاون چینی با استفاده از ازت مایع خرد شد و با ۶ میلی‌لیتر بافر استخراج (۱۰۰ mM Tris-HCl، ۱/۴ M NaCl، ۲۰ mM EDTA، ۲ درصد CTAB، ۲ درصد PVP، ۰/۱ Na2S2O5

1. Pistacia vera L.
2. Anacardiaceae
3. Random Amplified polymorphic DNA
4. Cetyl trimethyl ammonium bromide
5. Doyle and Doyle

جدول ۱. ارقام و ژنوتیپ‌های پستهٔ نر و مادهٔ مورد مطالعه

ردیف	کد اختیاری	ژنوتیپ	جنسیت	ردیف	کد اختیاری	ژنوتیپ	جنسیت
۱	MK1	کله‌قوچی	نر	۱۳	MQ25	قزوینی	نر
۲	MH4	هراتی	نر	۱٤	MHZ26	حسن‌زاده	نر
۳	MJ5	جندقی	نر	۱۵	ME27	ابراهیمی	نر
٤	MEA8	ابراهیم‌آبادی	نر	۱٦	MI30	ایتالیایی	نر
۵	MSR9	سیریزی	نر	۱۷	FF	فندقی	ماده
٦	MV11	واحدی	نر	۱۸	FRZ	رضایی زودرس	ماده
۷	MO12	اوحدی	نر	۱۹	FK	کله‌قوچی	ماده
۸	MJA13	جوادآقایی	نر	۲۰	FQ	قزوینی	ماده
۹	MR14	رضایی	نر	۲۱	FO	اوحدی	ماده
۱۰	MS21	سیف‌الدینی	نر	۲۲	FJ	جندقی	ماده
۱۱	MGh23	غفوری	نر	۲۳	FE	ابراهیمی	ماده
۱۲	MF24	فندقی	نر	۲٤	FI	ایتالیایی	ماده

درصد، β-mercaptoethanol ۰/۲ درصد) و مخلوط شد و به فالکون انتقال یافت. نمونه‌ها در حمام آب گرم در دمای ۶۰ درجهٔ سانتی گراد به مدت ۱ ساعت قرار داده شدند و سپس ۳ میلی‌لیتر کلروفرم /ایزوآمیل الکل (۱:۲۴) به هر نمونه اضافه و با سرعت ۵۱۰۰ دور به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. روشناور هر فالکون جمع‌آوری و به فالکون جدید انتقال یافت و دوباره ۳ میلی‌لیتر کلروفرم/ایزوآمیل الکل اضافه شد و با سرعت ۵۱۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. دوباره روشناور جمع‌آوری و به فالکون جدید انتقال داده شد و ۰/۶ میلی‌لیتر ایزوپروپانل سرد به‌ازای هر یک میلی‌لیتر محلول اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۱۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز مایع رویی به‌آرامی خالی شد و دو میلی‌لیتر الکل ۷۵ درصد جهت شست‌وشوی DNA اضافه و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۱۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و الکل رویی خالی شد و اجازه داده شد تا DNA خشک شود. ۷۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل به هر فالکون اضافه شد و محلول DNA به میکروتیوب منتقل و در دمای ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد. کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده به دو روش طیف‌سنجی (اسپکتروفتومتری) و الکتروفورز ژل آگاروز ۰/۸ درصد مشخص شد و غلظت یکسانی از DNA نمونه‌ها (۲۰ نانوگرم در میکرولیتر) آماده شد. در این آزمایش از ۱۲ آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی سری‌های TIB MOLBIOL و OPERON استفاده شد که پیش‌تر روی پسته گزارش شده است (۱۶).

جدول ۲. آغازگرهای مورد استفاده برای بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های پستهٔ مورد مطالعه

ردیف	آغازگر	توالی آغازگر ´۵ ـ ´۳
۱	OPAD-02	CTGAACGCTG
۲	OPAE-10	CTGAAGCGCA
۳	OPB-10	CTGCTGGGAC
٤	OPG-02	GGCACTGAGG
۵	OPZ-10	CCGACAAACC
٦	TIBMBB-12	GTGTGCCCCA
۷	TIBMBC-04	CCACGTGCCA
۸	TIBMBC-13	TCGGTGAGTC
۹	TIBMBE-05	GGAACGCTAC
۱۰	TIBMBE-08	GGGAAGCGTC
۱۱	TIBMBE-17	GGGAAAAGCC
۱۲	TIBMBE-19	AGGCCAACAG

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل بافر PCR با غلظت X1، ۱/۷۵ mM MgCl2، ۰/۲ mM dNTPs، از هر آغازگر ۰/۲ µM، یک واحد از آنزیم *Taq* DNA Polymerase و ۳۰ نانوگرم از DNA الگو انجام شد. چرخه‌های حرارتی شامل دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه برای شروع بازشدن DNA ژنومی، تعداد ۳۵ چرخه شامل مراحل به‌صورت تک‌رشته‌ای‌شدن DNA در دمای ۹۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگر در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، بسط آغازگر در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و درنهایت یک چرخه در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه برای تکمیل بسط با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل Bio-Rad انجام شد. محصولات تکثیر به‌وسیلهٔ دستگاه الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵ درصد و ولتاژ ثابت ۱۰۰ به مدت ۳ ساعت تفکیک شدند. سپس ژل در محلول اتیدیوم بروماید با غلظت یک میلی‌لیتر در یک لیتر آب‌مقطر به مدت ۳۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شد. بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، ژل با آب‌مقطر شست‌وشو و به دستگاه ژل داک، جهت مشاهدهٔ باندهای تکثیرشده زیر نور فرابنفش، منتقل شد و از ژل عکس‌برداری شد. براساس الگوهای باندی RAPD به‌دست‌آمده، حضور و حضورنداشتن باند به‌صورت یک و صفر امتیازدهی شد. بعد از تشکیل ماتریس یک و صفر (۶۵×۲۴)، ماتریس تشابه ژنوتیپ‌ها با استفاده از ضریب تشابه جاکارد[1] و دندروگرام براساس ماتریس تشابه و به روش UPGMA به‌دست آمد. تجزیهٔ داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار NTSYS نسخهٔ ۲،۰۲ انجام گرفت.

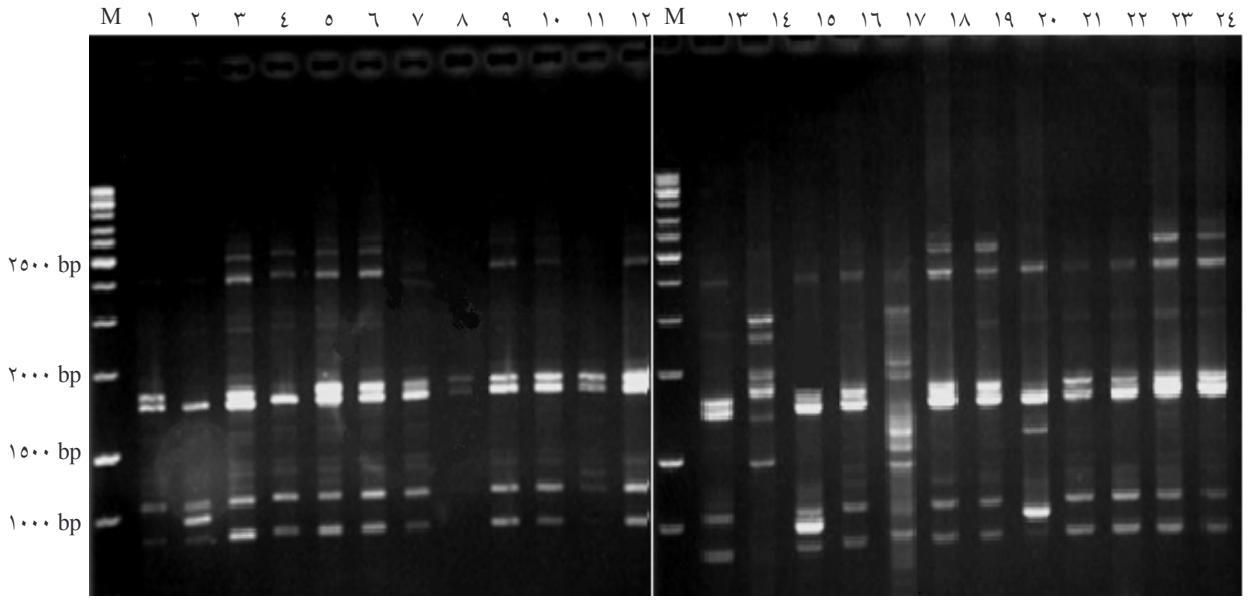
نتایج

از ۱۲ آغازگر مذکور، در مجموع ۶۵ قطعه DNA تکثیر شد که از بین آن‌ها تعداد ۴۸ قطعه چندشکل و ۱۷ قطعه یک‌شکل بودند. متوسط نوارهای الکتروفورتیک تولیدشده برای هر آغازگر ۵/۴۱ باند و متوسط چندشکلی ایجادشده برای هر آغازگر ۴ باند بود (جدول ۳). در پژوهشی محققان ضمن مطالعهٔ تنوع ژنتیکی برخی از گونه‌ها و ارقام پسته با استفاده از آغازگرهای مذکور گزارش کردند که از ۱۳۰ باند تولیدشده ۱۱۸ باند، با متوسط ۹/۸۳ باند به‌ازای هر آغازگر، چندشکل بودند (۱۶). چندشکلی بیشتر ایجادشده به‌ازای هر آغازگر در آن پژوهش به‌سبب ژنوتیپ‌های به‌کاررفته است. در پژوهش آن‌ها ژنوتیپ‌ها به گونه‌های ورا، خنجوک، آتلانتیکا و موتیکا متعلق بودند، درصورتی‌که در پژوهش حاضر ژنوتیپ‌ها فقط به گونهٔ ورا متعلق بودند. بیشترین درصد چندشکلی به آغازگر TIBMBE-08 (۱۰۰ درصد) و کمترین درصد چندشکلی به آغازگر OPB-10 (۴۰ درصد) مربوط بود. در شکل ۱، الگوهای باندی حاصل از تکثیر DNA با استفاده از آغازگر OPAE-10 نشان داده شده است.

جدول ۳. تعداد قطعات و درصد چندشکلی حاصل از آغازگرهای مورد استفاده

ردیف	آغازگر	تعداد کل قطعات تکثیرشده (a)	تعداد قطعات چندشکل (b)	درصد چندشکلی (b/a)
۱	OPAD-02	٤	۳	۷۵
۲	OPAE-10	٦	۵	۸۳/۳۳
۳	OPB-10	۵	۲	٤۰
٤	OPG-02	۸	۵	٦۲/۵
۵	OPZ-10	٦	۵	۸۳/۳۳
٦	TIBMBB-12	۵	٤	۸۰
۷	TIBMBC-04	٦	۵	۸۳/۳۳
۸	TIBMBC-13	۳	۲	٦٦/٦٦
۹	TIBMBE-05	٦	۳	۵۰
۱۰	TIBMBE-08	٦	٦	۱۰۰
۱۱	TIBMBE-17	٦	۵	۸۳/۳۳
۱۲	TIBMBE-19	٤	۳	۷۵
کل	-	٦۵	٤۸	–
میانگین	-	۵/٤۱	٤	۷۳/۵٤

1. Jaccard



شکل ۱. الگوی باندی حاصل از DNA ژنوتیپ‌های پستهٔ مورد مطالعه با استفاده از آغازگر OPAE-1
M: نشانگر وزن مولکولی kb1، ژنوتیپ‌ها به‌ترتیب شماره عبارت‌اند از: ۱- MK_1 -۲ MH_4 -۳ MJ_5 -٤ MEA_8 -٥ MSR_9 -٦ MV_{11} -۷ MO_{12} -۸ MJA_{13} -۹ MR_{14} -۱۰ MS_{21} -۱۱ MGh_{23} -۱۲ MF_{24} -۱۳ MQ_{25} -۱٤ MHZ_{26} -۱٥ ME_{27} -۱٦ MI_{30} -۱۷ FF -۱۸ FRZ -۱۹ FK -۲۰ FQ -۲۱ FO -۲۲ FJ -۲۳ FE -۲٤ FI

ماتریس تشابه در پژوهش فوق محاسبه شد که بیان‌کنندهٔ میزان تشابه دوبه‌دوی بین ژنوتیپ‌هاست. هرچه دو ژنوتیپ از نظر نشانگرهای مختلف الگوی مشابه‌تری با همدیگر داشته باشند، تشابه ژنتیکی آن‌ها بیشتر خواهد بود. براساس نتایج حاصل از ماتریس تشابه، بیشترین تشابه ژنتیکی (۷۵ درصد) بین ژنوتیپ‌های MO_{12} و MJA_{13}؛ MGh_{23} با MF_{24} و MS_{21}؛ MJ_5 و MV_{11} و کمترین شباهت ژنتیکی (۲۸ درصد) بین ژنوتیپ‌های ME_{27} و MV_{11}؛ FO با MJA_{13} و MGh_{23} وجود داشت. همان‌طورکه مشاهده می‌شود، کمترین میزان تشابه ژنتیکی بین ارقام ماده با ژنوتیپ نر MO_{12} است (جدول‌های ۴ و ۵).

دندروگرام براساس ماتریس تشابه و به روش UPGMA به‌دست آمد. در پژوهش حاضر ضریب همبستگی کوفنتیک حاصل از دندروگرام و ماتریس تشابه ۰/۸۴ محاسبه شد که نشان‌دهندهٔ برازش مناسب بین ماتریس تشابه و دندروگرام است. به‌طورکلی، ضریب همبستگی کوفنتیک بزرگ‌تر یا مساوی ۰/۹ نشان‌دهندهٔ برازش خیلی خوب، بین ۰/۹ تا ۰/۸ نشان‌دهندهٔ برازش خوب، بین ۰/۸ تا ۰/۷ نشان‌دهندهٔ برازش ضعیف و کمتر از ۰/۷ نشان‌دهندهٔ برازش خیلی ضعیف است (۲۳). دندروگرام حاصله در فاصلهٔ تشابه ۰/۴۹ ژنوتیپ‌ها را در پنج گروه به شرح زیر تقسیم شد.

گروه اول به دو زیرگروه تقسیم شد. زیرگروه اول شامل ژنوتیپ‌های نر MK_1-MF_{24}-MHZ_{26}-MS_{21}-MGh_{23}-MJ_5-MV_{11} و MR_{14} است. در این گروه بیشترین تشابه بین ژنوتیپ‌های نر MGh_{23} و MS_{21}؛ MGh_{23} و MF_{24}؛ MV_{11} و MJ_5 و کمترین تشابه بین ژنوتیپ‌های MR_{14} و MK_1-MF_{24}-MHZ_{26} و MGh_{23} مشاهده شد. در این پژوهش ژنوتیپ‌های نر MK_1-MF_{24} و MS_{21} با والد مادری کله‌قوچی، فندقی و سیف‌الدینی در یک گروه قرار گرفته‌اند. در پژوهش‌های دیگری با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR نیز ارقام کله‌قوچی، فندقی و سیف‌الدینی به‌دلیل تشابه ژنتیکی در یک گروه قرار گرفتند (۴ و۵). دوازده آغازگر مورد استفاده در این پژوهش نتوانستند ژنوتیپ‌های نر MGh_{23} و MS_{21} را از یکدیگر کنند و این دو ژنوتیپ در یک جایگاه قرار گرفتند و درصورتی‌که با تعداد آغازگرهای بیشتر همین نتیجه تکرار شود، باید گفت که دو ژنوتیپ مذکور یک ژنوتیپ واحدند. زیرگروه دوم شامل ژنوتیپ‌های نر MH_4-MQ_{25}-MI_{30} و رقم مادهٔ کله‌قوچی است که بیشترین تشابه (۰/۶۱) بین ژنوتیپ‌های MH_4 و MQ_{25} و کمترین تشابه (۰/۵۱) بین رقم مادهٔ کله‌قوچی با ژنوتیپ‌های MI_{30} و MH_4 مشاهده شد. در پژوهشی با استفاده از نشانگرهای ایزوآنزیم و SSR رقم کله‌قوچی در یک گروه مجزا از رقم فندقی قرار گرفت (۲ و ۵). در پژوهش حاضر،

جدول ٤. ضرایب تشابه حاصل از داده‌های نشانگرهای RAPD بین ٢٤ ژنوتیپ نر و مادهٔ پستهٔ مورد مطالعه

ژنوتیپ	MK1	MH4	MJ5	MEA8	MSR9	MV11	MO12	MJA13	MR14	MS21	MGh23	MF24	MQ25	MHZ26	ME27	MI30	FK	FE	FO	FI	FF	FQ	FJ	FR
MK1	۱																							
MH4	۰/٤٥	۱																						
MJ5	۰/٦٢	۰/٤٨	۱																					
MEA8	۰/٥١	۰/٤١	۰/٥٩	۱																				
MSR9	۰/٤٨	۰/٤٨	۰/٥٥	۰/٥٥	۱																			
MV11	۰/٦٠	۰/٤٧	۰/٧٥	۰/٥٢	۰/٥٨	۱																		
MO12	۰/٤٧	۰/٣٧	۰/٣٧	۰/٣٢	۰/٤٠	۰/٤٠	۱																	
MJA13	۰/٥٦	۰/٣٩	۰/٤٣	۰/٤٥	۰/٥٣	۰/٤٢	۰/٧٥	۱																
MR14	۰/٥١	۰/٤٦	۰/٥٨	۰/٣٨	۰/٥٠	۰/٦١	۰/٣٨	۰/٤٠	۱															
MS21	۰/٦٠	۰/٥٤	۰/٥٦	۰/٤٢	۰/٤٨	۰/٥٩	۰/٤٢	۰/٥٠	۰/٥٦	۱														
MGh23	۰/٦٦	۰/٥٠	۰/٥٧	۰/٣٧	۰/٤٠	۰/٥٥	۰/٤٨	۰/٥٦	۰/٥١	۰/٧٥	۱													
MF24	۰/٧١	۰/٥٤	۰/٦١	۰/٤٦	۰/٤٠	۰/٦٣	۰/٤٢	۰/٤٤	۰/٥١	۰/٦٣	۰/٧٥	۱												
MQ25	۰/٥١	۰/٦١	۰/٥٤	۰/٥٣	۰/٤٥	۰/٥٢	۰/٣٠	۰/٤١	۰/٤٤	۰/٤٧	۰/٥١	۰/٥٥	۱											
MHZ26	۰/٦٨	۰/٥٥	۰/٥٧	۰/٤٦	۰/٤٣	۰/٥٥	۰/٤١	۰/٤٤	۰/٥١	۰/٥٤	۰/٦٠	۰/٦٥	۰/٥١	۱										
ME27	۰/٣٦	۰/٤٨	۰/٢٩	۰/٤٣	۰/٣٥	۰/٢٨	۰/٤٤	۰/٤٧	۰/٢٤	۰/٣٣	۰/٣٢	۰/٣٧	۰/٤٤	۰/٤١	۱									
MI30	۰/٤٤	۰/٥٥	۰/٤٤	۰/٤٦	۰/٥٣	۰/٤٧	۰/٣٦	۰/٥٠	۰/٤١	۰/٤٥	۰/٤٥	۰/٥٠	۰/٥٦	۰/٣٥	۰/٤١	۱								
FK	۰/٤٦	۰/٥١	۰/٤٥	۰/٣٧	۰/٤٥	۰/٤٤	۰/٣٧	۰/٤٥	۰/٤٨	۰/٦٢	۰/٥٧	۰/٤٦	۰/٥٣	۰/٤١	۰/٣٧	۰/٥١	۱							
FE	۰/٤٥	۰/٤١	۰/٥٢	۰/٦٢	۰/٤٤	۰/٥١	۰/٣٢	۰/٣٩	۰/٤٢	۰/٣٤	۰/٤١	۰/٤٥	۰/٥٦	۰/٤٥	۰/٣٧	۰/٤٥	۰/٣٧	۱						
FO	۰/٣٥	۰/٥٠	۰/٤٤	۰/٤١	۰/٥٣	۰/٥١	۰/٣٦	۰/٢٨	۰/٤١	۰/٣٧	۰/٢٨	۰/٣٧	۰/٣٤	۰/٤٤	۰/٤١	۰/٤٠	۰/٣٦	۰/٤٠	۱					
FI	۰/٤٦	۰/٤٦	۰/٤٥	۰/٤٣	۰/٥٠	۰/٥٢	۰/٣٣	۰/٤٠	۰/٣٩	۰/٤٢	۰/٣٨	۰/٣٨	۰/٤٨	۰/٤١	۰/٣٨	۰/٤٦	۰/٣٨	۰/٥١	۰/٥٧	۱				
FF	۰/٥٥	۰/٥٠	۰/٥٧	۰/٥١	۰/٥٨	۰/٤٣	۰/٣٧	۰/٥٠	۰/٤٦	۰/٥٠	۰/٥٤	۰/٤٥	۰/٦١	۰/٥٠	۰/٣٧	۰/٥٠	۰/٥٧	۰/٥٤	۰/٣٦	۰/٤٦	۱			
FQ	۰/٥٣	۰/٤٣	۰/٥١	۰/٤٤	۰/٤٢	۰/٤٥	۰/٣٤	۰/٤٢	۰/٤٥	۰/٤٠	۰/٤٣	۰/٥٣	۰/٥٠	۰/٥٣	۰/٤٥	۰/٣٨	۰/٤٠	۰/٤٨	۰/٣٠	۰/٣٢	۰/٥٨	۱		
FJ	۰/٥٠	۰/٤٤	۰/٤٣	۰/٤٥	۰/٤٨	۰/٤٦	۰/٣٣	۰/٣٦	۰/٤٠	۰/٣١	۰/٣٤	۰/٤٠	۰/٤٦	۰/٤٤	۰/٣٣	۰/٣٨	۰/٤٠	۰/٣٩	۰/٤٤	۰/٤٦	۰/٤٤	۰/٤٨	۱	
FRZ	۰/٦٠	۰/٣٧	۰/٥٧	۰/٥٧	۰/٤٤	۰/٥١	۰/٣٢	۰/٣٩	۰/٥١	۰/٤٥	۰/٤٥	۰/٥٠	۰/٤٧	۰/٤٥	۰/٣٢	۰/٤٠	۰/٤١	۰/٥٤	۰/٤٥	۰/٥١	۰/٥٤	۰/٥٣	۰/٥٦	۱

جدول ۵. حداقل و حداکثر تشابه بین ژنوتیپ‌های نر و مادهٔ پستهٔ مورد مطالعه براساس ماتریس تشابه

رقم	تشابه با ژنوتیپ‌های نر	
	حداکثر (٪)	حداقل (٪)
کله‌قوچی (FK)	MS_{21} (٪۶۲)	MEA_8،MO_{12}،ME_{27} (٪۳۷)
ابراهیمی (FE)	MQ_{25} (٪۵۶)	MO_{12}(٪۳۲)
اوحدی (FO)	MSR_9 (٪۵۳)	MJA_{13} ،MGh_{23} (٪۲۸)
ایتالیایی(FI)	MV_{11} (٪۵۲)	MO_{12} (٪۳۳)
فندقی (FO)	MSR_9 (٪۵۸)	MO_{12} ،ME_{27} (٪۳۷)
قزوینی (FQ)	MK_1،MF_{24}،MHZ_{26} (٪۵۳)	MO_{12} (٪۳۴)
جندقی (FJ)	MK_1 (۵۰)	MS_{21} (٪۳۱)
رضایی‌زودرس (FRZ)	MK_1 (٪۶۰)	MO_{12}، ME_{27} (٪۳۲)

ژنوتیپ‌های نر MK_1،MF_{24}،MJ_5 و MQ_{25} با والدهای مادری خود یعنی ارقام کله‌قوچی، فندقی، جندقی و قزوینی در گروه‌های نزدیک به هم قرار گرفته‌اند.

گروه دوم شامل ژنوتیپ نر MEA_8 و ارقام ابراهیمی، فندقی، قزوینی، جندقی و رضایی زودرس بود که بیشترین تشابه (۰/۶۲) بین ژنوتیپ MEA_8 و رقم ابراهیمی و کمترین تشابه (۰/۳۹) بین ارقام ابراهیمی و جندقی مشاهده شد. نتایج فوق با نتایج پژوهش دیگری با استفاده از نشانگر AFLP مبنی بر قرارگرفتن ارقام قزوینی، جندقی، ابراهیمی و ابراهیم‌آبادی در یک گروه مطابقت دارد (۶). همچنین در پژوهش دیگری با استفاده از نشانگر ISSR ارقام قزوینی و ابراهیم‌آبادی در یک گروه واقع شدند (۴).

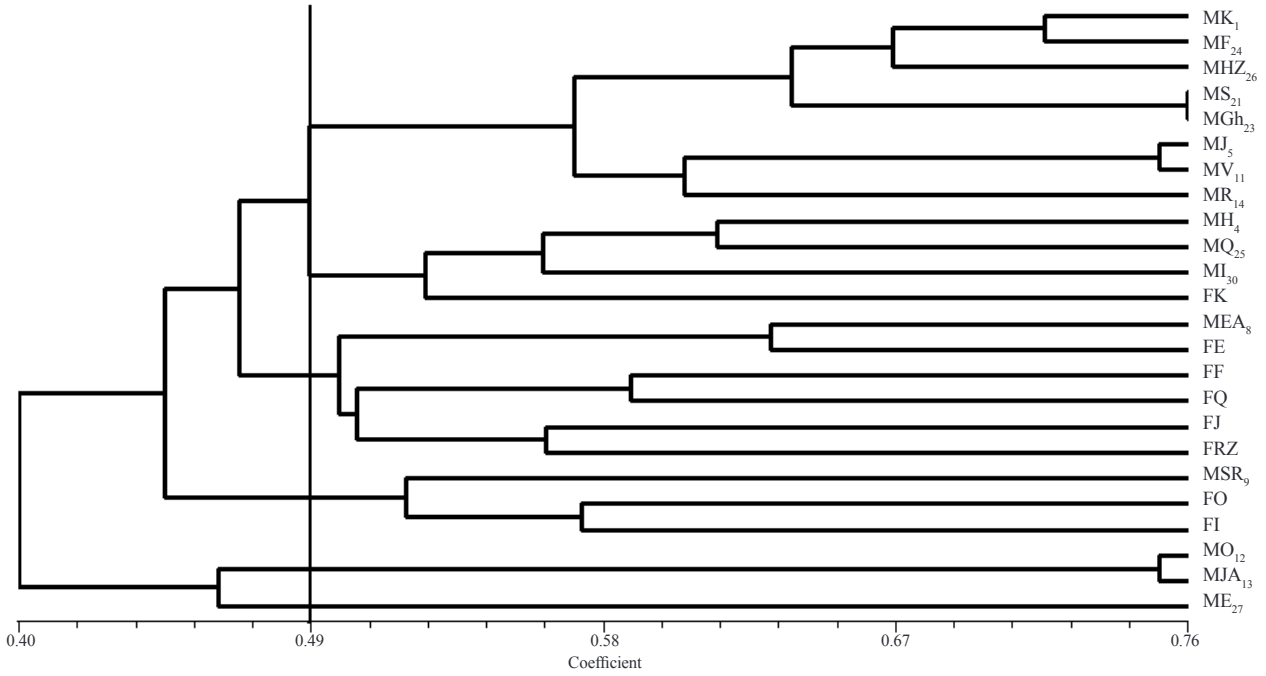
گروه سوم شامل ژنوتیپ نر MSR_9 و ارقام مادهٔ اوحدی و ایتالیایی بود. در این گروه بیشترین تشابه (۰/۵۷) بین ارقام اوحدی و ایتالیایی و کمترین تشابه بین ژنوتیپ نر MSR_9 و رقم مادهٔ ایتالیایی مشاهده شد. نتایج مذکور با نتایج پژوهش دیگری مبنی‌بر قرارگرفتن ارقام اوحدی، ایتالیایی و سیریزی به‌مثابهٔ والد مادری ژنوتیپ MSR_9 در یک گروه مطابقت دارد (۶). همچنین در مطالعهٔ دیگری با استفاده از نشانگرهای ایزوآنزیم، ارقام اوحدی و ایتالیایی نیز در یک گروه واقع شدند (۲).

گروه چهارم دربرگیرندهٔ ژنوتیپ‌های نر MO_{12} و MJA_{13} است. نتایج مذکور با نتایج حاصل از پژوهشی با استفاده از نشانگرهای SSR و ISSR مبنی‌بر تشابه ارقام اوحدی و جوادآقایی در یک گروه مطابقت دارد (۴ و ۵). در مطالعهٔ حاضر، ژنوتیپ نر MO_{12} با والد مادری خود یعنی رقم اوحدی در دو گروه مجزا از هم قرار گرفتند که دلیل آن ژن‌های نوترکیب است.

گروه پنجم این گروه شامل ژنوتیپ نر ME_{27} بود. در گزارشی با استفاده از نشانگرهای ISSR ،SSR و RAPD رقم ابراهیمی از سایر ارقام پسته مجزا شده و در یک گروه جدا واقع می‌شود (۸).

بحث

در این پژوهش بالاترین درصد چندشکلی ایجادشده به آغازگرهای TIBMBE-08 (۱۰۰ درصد) و TIBMBC-04، TIBMBE-17، OPZ-10 و OPAE-10 (هرکدام ۸۳/۳۳ درصد) است که نشان‌دهندهٔ کارآیی این آغازگرها در تفکیک ژنوتیپ‌های پسته است و سایر محققان می‌توانند برای بررسی تنوع ژنتیکی پسته از این آغازگرها استفاده کنند. در این پژوهش، بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های نر پسته با استفاده از نشانگر RAPD وضعیت ژنتیکی آن‌ها را مشخص کرد، به‌طوری‌که، با توجه به نتایج حاصل از دندروگرام، ارقام ماده به‌خوبی از ژنوتیپ‌های نر تفکیک شدند. ارقام ماده همگی در خوشه‌های نزدیک به هم قرار گرفتند، ولی ژنوتیپ‌های نر در دو انتهای دندروگرام قرار گرفتند و از یکدیگر تفکیک شدند. این مطلب با توجه به تفاوت‌هایی که جنس نر و مادهٔ پسته با یکدیگر دارند، کاملا توجیه‌پذیر است. در مطالعات، عنوان شده که ویژگی‌های برگ و خشک‌میوه از عوامل اصلی تفکیک‌کنندهٔ ارقام مادهٔ پسته و ویژگی‌های برگ از عوامل اصلی تفکیک‌کنندهٔ ژنوتیپ‌های نر پسته است (۹ و ۱۷). برخلاف اینکه تشابه ژنتیکی چشمگیری بین ارقام مادهٔ پستهٔ ایران وجود دارد (۵ و ۷)، در این پژوهش مشخص شد که ژنوتیپ‌های نر پسته از تنوع ژنتیکی بالاتری برخوردارند. دلیل آن پیوند نزدن ژنوتیپ‌های نر موجود در باغ‌های پسته است که باعث ایجاد تنوع وسیع‌تری در ژنوتیپ‌های نر در مقایسه با ارقام ماده شده است. از طرف دیگر، ارقام ماده به‌واسطهٔ گزینش تک‌درخت



شکل۲. دندروگرام حاصل از داده‌های نشانگرهای RAPD مربوط به ۲۴ ژنوتیپ نر و مادهٔ پسته به روش UPGMA
ژنوتیپ‌ها به‌ترتیب شامل MK_1، MF_{24}، MHZ_{26}، MS_{21}، MGh_{23}، MJ_5، MV_{11}، MR_{14}، MH_4، MQ_{25}، MI_{30}، FK، MEA_8، FE، FF، FQ، FJ، FRZ، MSR_9، FO، FI، MO_{12}، MJA_{13}، ME_{27}

و تکثیر رویشی نگهداری شده‌اند که این خود باعث باریک‌شدن دامنهٔ ژنتیکی ارقام ماده شـده اسـت. در پژوهشی با اسـتفاده از نشانگرهای ایزوزایم گزارش شده است که تنوع ژنتیکی بیشتر ژنوتیپ‌های نر پسته از ماده به‌دلیل گزینش شدید ژنوتیپ مادهٔ برتر و تکثیر به روش رویشی از سـوی کشـاورزان است (۹). پسـته گیاهی دوپایه است که کمیت و کیفیت خشک‌میوهٔ آن تحت تأثیر نوع دانهٔ گرده است. در این پژوهش والد برخی از ژنوتیپ‌های نر یکسـان است، ولی در گروه‌های متفاوت قرار گرفته‌اند که این موضوع بیانگر تأثیر والد پدری و هتروزیگوسیتی بالای موجود در پسته به‌دلیل دوپایه‌بودن و طبیعت دگرگشن گیاه پسته اسـت و در کارهـای اصلاحی ایجاد تنوع نقش مهمـی دارد؛ بنابراین، تلاقی دورترین ژنوتیپ‌ها با هـم می‌تواند تنوع ژنتیکی را افزایش دهد و شـانس انتخاب ژنوتیپ‌های برتر را بالا ببرد. دسترسی به تنوع ژنتیکی کافی برای برنامه‌های اصلاحی حیاتی است، تا بتوان به تولید واریته‌های جدید و بهبود تولید محصول کمک کرد. کمترین شباهت ژنتیکی (۲۸ درصد) بین ژنوتیپ نر MGh_{23} و رقم اوحدی وجود داشت. درمجموع، قرارگرفتن سـه ژنوتیپ نر MO_{12}، MJA_{13} و ME_{27} در کلاسترهای جدا از سایر ژنوتیپ‌ها، نشان‌دهندهٔ فاصلهٔ ژنتیکی بیشتر این ژنوتیپ‌ها از ارقام ماده در مقایسـه با سایر ژنوتیپ‌های نر است. همچنین براساس ماتریس تشـابه، ژنوتیپ‌های نر MO_{12}، MEA_8 و ME_{27} کمترین تشابه را با رقم کله‌قوچی، ژنوتیپ MO_{12} کمترین تشـابه را با رقم ابراهیمی، ایتالیایی و قزوینی، ژنوتیپ‌های MJA_{13} و MGh_{23} کمترین تشابه را با رقم اوحدی، ژنوتیـپ MS_{21} کمترین میزان تشـابه را با رقم جندقـی و ژنوتیپ‌های MO_{12} و ME_{27} کمترین میزان تشـابه را با رقم رضایی زودرس داشتند، که می‌توان از این ژنوتیپ‌ها به‌منزلهٔ گرده‌دهندهٔ مناسب برای ارقام مادهٔ مورد استفاده در این پژوهش و یا جهت ایجاد ارقام جدید استفاده کرد. بر این اساس توصیه می‌شود گرده‌افشانی ارقام مادهٔ مورد استفاده در این پژوهش به‌وسیلهٔ ژنوتیپ‌های نر مذکور به‌صورت دستی انجام شود و با نتایج حاصل از این آزمایش مقایسـه شود. براساس نتایج پژوهش فوق پیش‌بینی می‌شود که ژنوتیپ نر MO_{12} به‌دلیل تشابه ژنتیکی کمتر با ارقام مادهٔ مورد مطالعه می‌تواند گرده‌دهندهٔ مناسبی برای این ارقام باشد و لازم است در این زمینه از طریق گرده‌افشانی کنترل‌شده پژوهش‌هایی صورت گیرد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که نشانگرهای RAPD که مسـتقیماً تفاوت را در سطح ژنوم گیاه نشـان می‌دهند، ابزار قدرتمندی برای تعیین خویشاوندی و تشخیص تنوع ژنتیکی در سطح درون‌گونه‌ای ژنوتیپ‌های پسته‌اند و می‌توانند در ارزیابی ذخایر توارثی ژنوتیپ‌های نر پسته و مدیریت آن به‌کار روند.

منابع

۱. اسماعیل‌پور ع (۱۳۸۴) «خصوصیات و ویژگی‌های برخی از ارقام پسته ایران و ارقام نر پسته» گزارش پژوهشی مؤسسه تحقیقات پسته کشور، ۲۵ صفحه.

۲. اعلمی ع.، تائب م. لطفی ع. و صادقیان مطهر ی (۱۳۸۲) «مطالعهٔ چندشکلی ایزوآنزیمهای استراز، پراکسیداز و مالات دهیدروژناز در ارقام و گونه های پستهٔ ایرانی» علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، ۷ (۱): ۱۱۴-۱۰۷.

۳. تاج‌آبادی پور ع (۱۳۷۶) «شناسایی برخی از ارقام پسته» پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه تهران.

۴. تقی‌زاد آ.، احمدی ج. حداد ر. و ضرابی م (۱۳۹۰) "مطالعه تنوع ژنتیکی پستهٔ ایرانی با استفاده از چند نشانگر بین ریزماهواره‌ای ISSR" علوم باغبانی، ۲۵ (۴): ۴۶۰-۴۵۳.

۵. میرزایی س (۱۳۸۱) "تنوع ژنتیکی ارقام پستهٔ ایرانی براساس نشانگرهای RAPD،" پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد دانشگاه صنعتی اصفهان.

6. Ahmadi afzadi M, Tabatabaei SB, Mohammadi SA and Taj Abadipour A (2007) "Comparison of genetic diversity in species and cultivars of Pistachio (*Pistacia* sp) based on Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) markers," *Iranian Journal of Biotechnology*, 3: 147152-.
7. Arabnezhad H, Bahar M and Taj Abadi Pour A (2008) "Assessment of genetic diversity among Iranian pistachios using microsatellites isolated from *Pistacia khinjuk*," *Science* and *Technology of Agriculture* and *Natural Resource*, 45: 218228-.
8. 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 Biotecnology*, 9: 76327640-.
9. 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: 134138-.
10. Caetano-Anolles G and Peter M G (1997) DNA markers Protocols. Applications and overviews. Weily-Liss, Inc. New York, 364.
11. Crane JC and Iwakiri BT (1982) "Pistachio nut development influenced by pollen source," California pistachio industry annual report.
12. Dehghani Shuraki Y and Sedgley M (1994) "Effect of pistil age and pollen parents on pollen tube growth and fruit production of pistachio," *American Society for Horticulture Science*, 69: 10191027-.
13. 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-.
14. Javanshah A, Tajabadipour A and Mirzaei S (2007) "Identification of a New Phenotype (Siah Barg) of pistachio (*Pistacia vera* L.) with shiny-blackish green leaves using RAPD assay," *Agricultural, Biological, and Environmental Statistics*, 9310-307 :2-.
15. Kafkas S and Perl-Treves R (2002) "Interspecific relationships in *Pistacia* based on RAPD fingerprinting," *American Society for Horticultural Science*, 37: 168171-.
16. Karimi HR, Zamani Z, Ebadi A and Fatahi Moghadam MR (2009) "Genetic relationships of some Pistacia species using RAPD and AFLP markers," *Horticulture Environment* and *Biotechnology*, 50: 519524-.
17. Karimi HR, Zamani Z, Ebadi A and Fatahi MR (2009) "Morphological diversity of *Pistacia* species in Iran," *Genetic Resources* and *Crop Evolution*, 56: 561571-.
18. Laurentin, H (2009) "Data analysis for molecular characterization of plant genetic resources," *Genetic Resources* and *Crop Evolution*, 56: 277292-.
19. 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): 257263-.
20. 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: 5056-.
21. Pell SK (2004) "Molecular systematics of the cashew family (Anacardiaceae)," Department of Biological Sciences, Louisiana State University, Baton Rouge, LA, USA. Ph.D Dissertation.

22. Riazi GH and Rahemi M (1995) "The effects of various pollen sources on growth and development of *Pistacia vera* L. nuts," *Acta Horticulturae*, 419: 6772-.
23. Rohlf FJ (1992) *NTSYS-pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System)*, Version 1.70. Exeter, Setauket, NY.
24. Williams JGK Hanafey MK Rafalski JA and Tingey SV (1993) "Genetic analysis using random amplified polymorphoic DNA markers," *Meth. Enzyme*, 218: 704-740.
25. Zohary M (1952) "A monographic study of the genus *Pistacia*," *Palestine Jornal of botany Jerusalem*, 5: 187-228.