نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۵، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۰ ، ص.۴۶۰-۴۵۳
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 25, No. 4, Winter 2012, P. 453-460
ISSN: 2008 - 4730

مطالعه تنوع ژنتیکی پسته ایرانی با استفاده از چند نشانگر بین ریزماهواره‌ای ISSR

آیدا تقی زاد[۱]- جعفر احمدی[۲*]- رحیم حداد [۳]- مهدی ضرابی[۴]

تاریخ دریافت:۹۰/۳/۲۳
تاریخ پذیرش:۹۰/۹/۱

چکیده

پسته (*Pistacia vera* L.) یکی از مهمترین محصولات باغی ایران است که سهم زیادی از درآمدهای صادراتی غیرنفتی کشور را به خود اختصاص داده است. بهترین راهکار برای رسیدن به بالاترین میزان عملکرد، احداث باغهای هموژن و اصیل ژنتیکی است که در این خصوص بررسی دقیق تنوع ژنتیکی امکان احداث باغهای یکنواخت با ژنوتیپ‌های برتر را میسر می‌سازد. در این مطالعه تنوع ژنتیکی ۱۹ توده پسته ایرانی با استفاده از ۲۰ آغازگر ISSR مورد ارزیابی قرار گرفت که از این تعداد ۱۰ آغازگر باندهای تکرار پذیر مناسب تولید کردند. در این بررسی در مجموع ۱۱۴ قطعه DNA (مکان ژنی) تکثیر و امتیاز بندی شدند که از آنها ۷۳ قطعه (۶۴ درصد) چند شکلی نشان دادند. میانگین محتوای چند شکلی اطلاعات (PIC) برای آغازگرهای استفاده شده از حداقل ۸۵ درصد تا حداکثر ۹۱ درصد متغیر بود. برای ارزیابی شباهت‌ها و اختلافات ژنومی بین ارقام از ضریب تشابه جاکارد استفاده شد. کمترین فاصله بین ارقام کله قوچی و احمد آقایی با میزان تشابه ۰/۸۳ و بیشترین فاصله ژنتیکی بین ارقام کله قوچی، حسین خانی و ابراهیم آبادی با میزان تشابه ۰/۵۴ مشاهده شد. با توجه به ضریب همبستگی کوفنتیک بین ماتریسهای تشابه و ماتریس خروجی دندروگرام، کلاستر بندی حاصل از روش UPGMA مناسب ترین گروه بندی را حاصل نمود که بر این اساس و با استفاده از نمودار درختی حاصل ارقام در سه گروه اصلی ۲، ۴ و ۱۳ رقمی گروه بندی شدند. در این تحقیق نشانگر ISSR برای مطالعات بررسی تنوع ژنتیکی و تهیه شناسنامه مولکولی کامل برای تمام توده‌های پسته ایرانی مناسب تشخیص داده شد.

واژه های کلیدی: پسته، ISSR، تنوع ژنتیکی، نشانگر

مقدمه

پسته (*Pistacia vera* L.) یکی از مهمترین محصولات باغی ایران است که سهم زیادی از درآمدهای صادراتی غیرنفتی کشور را به خود اختصاص داده است. این گیاه دو پایه، برگ ریز و دارای مرحله نونهالی طولانی بوده و بومی کوههای کم ارتفاع و تپه های خشک بیابان های مرتفع افغانستان، ایران و ترکیه است. تحمل به شوری و خشکی و توانایی رشد در خاک های ضعیف از خصوصیات مهم این گیاه است (۲۱). کشت و پرورش پسته از عرض ۲۷ درجه شمالی تا عرض ۴۲ درجه شمالی انجام می شود و اغلب درختان پسته در ارتفاع ۲۰۰۰-۹۰۰ متری از سطح دریا قرار گرفته اند. تولید کنندگان اصلی پسته در دنیا ایران، آمریکا، ترکیه و سوریه هستند (۵). بهره برداری تجاری از پسته در سال ۱۹۳۰ از ایران آغاز شده است که هنوز هم به عنوان بزرگترین تولید کننده مطرح است. استان کرمان با مجموع بیش از ۲۷۰ هزار هکتار باغ های بارور و غیر بارور، ۷۷ درصد محصول کل کشور را تولید و به عنوان مهمترین منطقه پسته کاری ایران و دنیا محسوب می‌شود (۲۰).

درخت پسته اهلی (*Pistacia vera*) متعلق به تیره سماق (Anacardiaceae)، دیپلوئید (2n=2x=30) است. جنس pistacia دارای ۱۱ گونه است که همه آنها شیره تربانتین یا سقز ترشح می‌کنند (۲۱ و ۲۴)، مهمترین گونه های جنس Pistacia عبارتند از: *P. Vera* یا پسته معمولی، *P. khinjuk* یا چاتلانقوش یا کسور، *P. mutica* یا بنه، *P. atlantica*، *P. terebinthus* و *P. integerrima*. پسته اهلی که به درخت طلای سبز هم مشهور است، تنها گونه خوراکی و مهم از لحاظ تجاری می‌باشد. مهمترین ارقام پسته تجاری در ایران شامل ارقام اوحدی، کله قوچی، اکبری، احمد آقائی، بادامی زرند، رضایی و پوست پیازی می باشند (۷). دلیل اصلی کاهش عملکرد در واحد سطح، عدم یکنواختی درختان پسته و نامشخص بودن اصالت ژنتیکی ارقام کشت شده می‌باشد. بنابراین بهترین راهکار برای

۱،۲،۳و۴- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیاران گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه بین المللی امام خمینی(ره)، قزوین
(*- نویسنده مسئول: Email: njahmadi910@yahoo.com)

رسیدن به بالاترین میزان عملکرد و محصول یکنواخت، احداث باغهای هموژن و اصیل ژنتیکی است که در این خصوص بررسی دقیق تنوع ژنتیکی و تهیه شناسنامه ژنتیکی ارقام، امکان احداث باغهای هموژن با ژنوتیپ های یکنواخت و برتر را میسر می‌سازد. تا چندین سال قبل برای مقایسه ژنوتیپ‌ها و ارقام با یکدیگر از نشانگرهای مورفولوژیکی مانند شکل میوه و برگ، اطلاعات شجره ای و نشانگر های پروتئینی استفاده می‌شد، اما از اواسط سال ۱۹۸۰ شناسایی ژنومی و انتخاب با کمک تکنولوژی نشانگرهای مبتنی بر PCR گسترش یافت که از میان آنها RAPD[1] بیشترین استفاده را در مورد پسته داشته است (۲۲). در دیگر مطالعات انجام گرفته برای تشخیص ارتباط ژنتیکی میان ارقام و گونه های Pistacia از نشانگرهای AFLP[2]، SSR[3]، ISSR[4] وRFLP[5] استفاده شده است (۱، ۲، ۳، ۴، ۶، ۸، ۹، ۱۱، ۱۳، ۱۶، ۱۷ و ۱۸). نشانگر ISSR مانند RAPD یک نشانگر غالب است، اما نسبت به آن تکثیر پذیری و تنوع پذیری بالائی داشته، سریع بوده و روشی آسان است. با توجه به این مشخصات استفاده از نشانگر ISSR در مقایسه با نشانگرهای دیگر، در مطالعات ژنتیکی بین افراد بسیار نزدیک و طبقه بندی کولتیوارها برتری دارد (۱۰، ۱۹ و ۲۳).

در مطالعات اولیه هورموزا و همکاران (۱۱) از نشانگر RAPD برای بررسی روابط فیلوژنتیکی بین ۲۹ رقم پسته (*Pistacia Vera* L.) استفاده کردند، که آزمایشات آنها نشان دهنده اهمیت استفاده از نشانگرهای مولکولی در توصیف و نگهداری کلکسیون های ژرم پلاسمی برای گونه های تکثیر یافته بصورت کلونی بود. قفقاز و همکاران (۱۴) از ۳۱۲ آغازگر RAPD استفاده کردند و نتایج آنها نشان داد که ارتباط کمی بین نشانگرRAPD با جنسیت در پسته وحشی وجود دارد. قفقاز و همکاران (۱۳) در مطالعه‌ای دیگر از نشانگر RAPD برای تعیین مشخصات ظاهری و مولکولی گونه‌های *P. atlantica*، *P. khinjuk* و *P. terebintus* استفاده کردند که بر اساس نتایج بدست آمده، گونه‌ها از هم متمایز بوده و *P. terebintus* متنوع ترین گونه بود. کاتسیوتیس و همکاران (۱۶) از دو نشانگر RAPD و AFLP برای مطالعه ارتباط فیلوژنتیکی گونه‌های بومی پسته موجود در یونان استفاده کردند که فنوگرام‌های بدست آمده با هر دو روش مشابه هم بودند اما تفاوت های جزیی در دندروگرام‌های حاصله مشاهده شد. گولان و همکاران (۹) از نشانگرهای RAPD وAFLP برای بررسی ارتباط ژنتیکی گونه های پسته مدیترانه‌ای استفاده کردند که طبق نتایج آنها همبستگی بالایی بین ماتریس‌های شباهت حاصل از دو نشانگر مشاهده گردید. فارس و همکاران (۸) در طی مطالعه‌ای به بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های پسته با نشانگرهای مورفولوژیکی و بیوشیمیایی و نشانگر ISSR پرداختند که در این بررسی نشانگر ISSR نقش موثری درتعیین چند شکلی مولکولی و بررسی ارتباط ژنتیکی درمطالعات ژرم پلاسم پسته نشان داد. احمدی افضدی و همکاران (۳) از نشانگرAFLP برای بررسی تنوع ژنتیکی ارقام و گونه‌های پسته استفاده کردند و نتایج آنها نشان داد که این نشانگر ابزاری قدرتمند و معتبر در بررسی تنوع ژنتیکی پسته می‌باشد. عرب نژاد و همکاران (۴) کارایی آغازگرهای ریزماهواره‌ای جداسازی شده از گونه وحشی خنجوک (*P. khinjuk*) را روی ژنوتیپ‌های تجاری پسته بررسی کردند و نتایج آنها نشان داد که نشانگرهای ریزماهواره‌ای با پراکندگی مناسب در طول ژنوم از کارائی مناسبی بر روی ژنوتیپ‌های پسته اهلی برخوردار هستند لذا می توان از این نشانگرها برای انگشت نگاری ژنتیکی ارقام تجاری پسته استفاده کرد. نوروزی و همکاران (۱۸) برای اولین بار از نشانگر ISSR برای بررسی تنوع ژنتیکی تعدادی از ارقام پسته ایرانی استفاده کردند که نتایج آنها بیانگر تنوع ژنتیکی ناچیز بین ارقام مورد آزمایش و راندمان بالای این نشانگر در تعیین تنوع بین ارقام پسته ایرانی بود.

علیرغم اطلاعات مفید بدست آمده از این نشانگرها در تعیین روابط خویشاوندی، تنوع ژنتیکی و انگشت نگاری ژنوتیپ های این گیاه، هر کدام از این روش‌ها محدودیت های خاص مربوط به خود را دارند. بنابراین با توجه به کاربرد آسان، سرعت و سادگی نشانگر ISSR و تحقیقات بسیار اندک در خصوص انگشت نگاری پسته ایرانی و پسته در دنیا، در این مطالعه از نشانگر ISSR برای انگشت نگاری و شناسایی چند شکلی ژنتیکی بین ارقام پسته ایرانی (*Pistacia Vera* L.) استفاده گردید.

مواد و روش ها

نمونه های گیاهی

در این مطالعه از ۱۹ رقم پسته ایرانی استفاده شد، که این نمونه‌ها از مرکز تحقیقات کشاورزی استان قزوین و مرکز تحقیقات پسته رفسنجان تهیه شده بودند (جدول ۱).

استخراج DNA

DNA ژنومی نمونه برگ‌های تثبیت شده در ازت مایع با استفاده از روش CTAB (۱۲) با اندکی تغییرات استخراج شد. ترکیب بافر استخراج شامل (۱۰۰میلی مولار Tris-Hcl (pH=8)، ۰/۲۵ مولار کلرید سدیم (NaCl)، ۲۰ میلی مولار EDTA (pH=8)، ۲٪ هگزا دستیل تری متیل آمونیم بروماید (CTAB)، ۱٪ پلی ونیل پرولیدین (PVP) و ۰/۲٪ بتامرکاپتواتانول) بود. کیفیت و کمیت DNA های

1- Random Amplified Polymorphic DNA
2-Amplified Fragment Length Polymorphism
3- Simple Sequence Repeats
4-Inter Simple Sequence Repeat
5-Restriction Fragment Length Polymorphism

استخراج شده با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز با ژل آگارز ۰/۸٪ تعیین گردید.

آغازگرها

در این تحقیق از ۲۰ آغازگر ISSR (metabion) استفاده شد که از این تعداد ۱۰ آغازگر تکثیر مناسب قطعات داشتند و برای انجام آزمایشات مفید واقع شدند. ۱۰ آغازگر دیگر باندی تولید نکردند و یا باندهای ضعیف و نامشخص تولید کردند که برای ادامه آزمایش حذف گردیدند. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۳ ارائه شده است.

واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR)

تکثیر قطعات DNA با واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر (شامل ۱۲/۵ میکرولیتر PCR master (سیناژن)، ۱۰ میکرولیتر dH_2O، یک میکرولیتر DNA (۴۰ ng) و ۱/۵ میکرولیتر آغازگر (۱۰۰ پیکومول)) به همراه یک قطره روغن مینرال برای جلوگیری از تبخیر انجام گرفت. واکنش‌های PCR با دستگاه ترموسایکلر تکنه مدل گرادیان تی سی ۵۱۲ (ساخت آلمان) با برنامه PCR شامل مراحل، واسرشته سازی[1] اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، در ادامه ۳۵ چرخه بصورت واسرشته سازی به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، اتصال[2] آغازگر به مدت یک دقیقه در دمای مناسب اتصال برای هر آغازگر (جدول ۳) و مرحله توسعه[3] رشته جدید به مدت ۱/۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و در نهایت توسعه نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد انجام گرفت. سپس محصولات تکثیر یافته واکنش زنجیره‌ای پلی مراز با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ ٪ الکتروفورز شد. ژل‌ها پس از رنگ آمیزی با محلول اتیدیوم بروماید و عکس برداری مورد ارزیابی قرا گرفتند. تکرارپذیری باندها بوسیله تکرار عملیات PCR والکتروفورز مجدد آنها ارزیابی گردید و فقط از باندهای تکرارپذیر برای نمره‌دهی و آنالیز آماری استفاده شد. باندهای تکثیر یافته بصورت یک (حضور باند) و صفر (عدم حضور باند) نمره‌دهی شدند. تجزیه و تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم افزار NTSYS صورت گرفت. تجزیه خوشه‌ای و گروه-بندی ژنوتیپ‌ها نیز بر اساس ضریب تشابه جاکارد و با استفاده از روش UPGMA انجام شد. در این مطالعه شاخص نشانگری (MI)[4](۱۱) و میانگین محتوای اطلاعات چند شکل (PIC)[5] (۱۹) نیز برای آغازگرها محاسبه گردید.

نتایج و بحث

از مجموع ۲۰ آغازگر استفاده شده در این مطالعه، ۱۰ آغازگر تکثیر باندی مناسب داشته و برای واکنش‌های زنجیره‌ای پلی مراز DNAژنومی تمام ژنوتیپ‌ها مناسب شناخته شدند. الگوی باندی ژل-های الکتروفورزی مربوط به آغازگرهای K24a و K26 در شکل های ۱ و ۲ نشان داده شده است. در این بررسی ۱۱۴ قطعه (مکان ژنی) DNA امتیازبندی شدند که از این بین ۷۳ قطعه DNA (۶۴ درصد) چند شکلی نشان دادند و میزان این چند شکلی از حداکثر۹۱ درصد برای آغازگر k10 تا حداقل۳۷ درصد برای آغازگر k16 متغیر بود. طول قطعات تکثیری مشاهده شده در این مطالعه در محدوده بین ۲۵۰ جفت باز تا ۲ کیلو باز قرار داشت. در مقایسه با نتایج این آزمایش، قفقاز و همکاران (۱۵) با استفاده از ۲۰ آغازگر ISSR در مجموع ۱۵۶ قطعه DNA بدست آوردند که ۷۳ (۴۶/۲ درصد) قطعه چندشکل بودند. نوروزی و همکاران (۱۱) نیز در مطالعه‌ای بر روی ۳۱ ژنوتیپ پسته، در مجموع ۲۸ قطعه DNA مشاهده کردند که ۱۳ قطعه از آن‌ها (۴۶/۴۲ درصد) چند شکل بودند. در مطالعه انجام گرفته توسط نوروزی (۱۸) محصولات تکثیری مناسب از آغازگرهای با واحدهای تکراری GAA، GA و CA تولید شد و آغازگرهای دارای واحدهای تکراری CT، GT و CAA توانایی تفکیک اندکی داشته و سطح چند شکلی پایین‌تری را در مقایسه با سایر آغازگرها نشان دادند. در صورتی که در مطالعات ما آغازگر K10 با واحد تکراری AC و آغازگر K15 با واحد تکراری GT چند شکلی بالاتری را نشان داد. فارس و همکاران (۸) نیز در مطالعات انجام گرفته بر روی ارقام پسته تونس، درصد بالایی از قطعات چند شکل (۲۶ نوار) را مشاهده کردند. در این مطالعه تنها آغازگری که چند شکلی بالایی نشان داد حاوی واحد تکراری GT بود. نتایج نشان داد که در ژنوم ارقام پسته مورد مطالعه آن‌ها ریزماهواره‌های با توالی مکمل آغازگر به مقدار بسیار محدودی وجود داشت.

برای ارزیابی شباهت‌ها و اختلافات ژنومی بین ارقام از ضرایب تشابه جاکارد، دایس و تطابق ساده استفاده شد. با توجه به اینکه ضریب همبستگی کوفنتیک دندروگرام بدست آمده از ماتریس تشابه جاکارد (r=۰/۷۹) بزرگتر از ضریب همبستگی کوفنتیک دندروگرام بدست آمده از دو روش دیگر بود، لذا بر اساس ماتریس تشابه جاکارد، کلاستر بندی انجام گرفت و در بررسی دندروگرام خروجی، کلاستر بندی حاصل از روش UPGMA (شکل ۳) مناسب‌ترین گروه‌بندی را حاصل نمود. بر اساس خط برش از ضریب تشابه حدود ۶۸ درصد در نمودار درختی حاصل (شکل ۳)، ارقام در سه گروه اصلی۲، ۴ و ۱۳ رقمی گروه‌بندی شدند. در گروه اول به ترتیب ارقام قزوینی و سفید پسته نوق، در گروه دوم ابراهیم آبادی، امیری، محسنی، خنجری دامغان و در آخرین گروه ارقام احمد آقایی، غلامرضایی، حسین خانی،

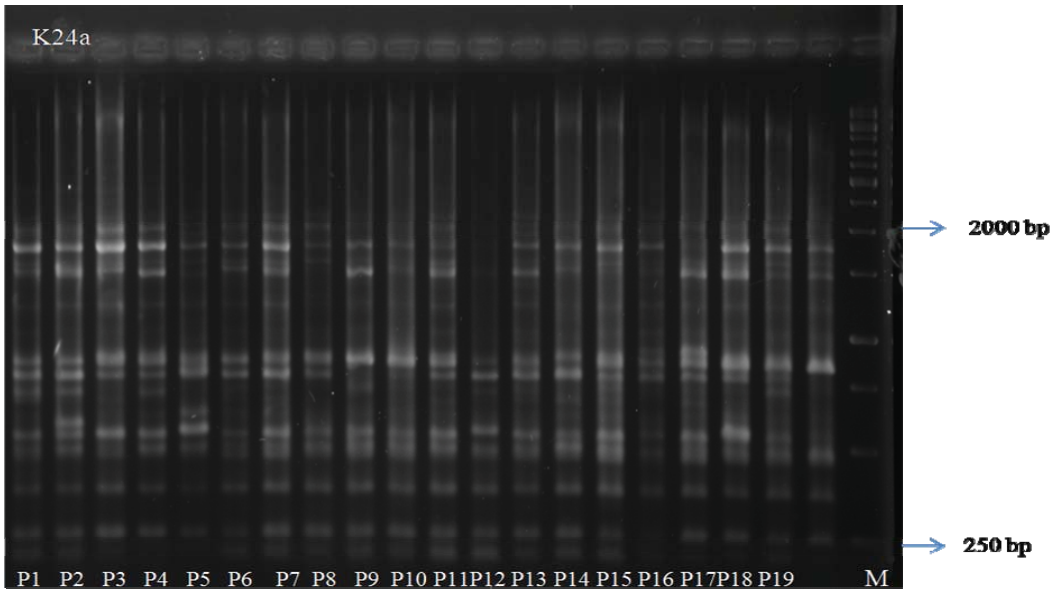
1 -Denaturation
2-Annealing
3- Extension
4- Marker Index
5- Polymorphism Information Content

سیف الدین، رضایی زودرس، کله قوچی، اوحدی، جواد آقایی، فندقی ریز، ممتاز، شنی، اکبری، لاور ۲ قرار گرفتند. در صورتی که بنا بر نتایج نوروزی و همکاران (۱۸) ۳۱ رقم مورد آزمایش در ۱۱ گروه اصلی گروه‌بندی شده بودند که در برخی موارد مانند طبقه‌بندی جواد آقایی، راور ۲ و سیف الدین در یک گروه تشابهاتی بین نتایج حاصل از این دو مطالعه مشاهده شد.

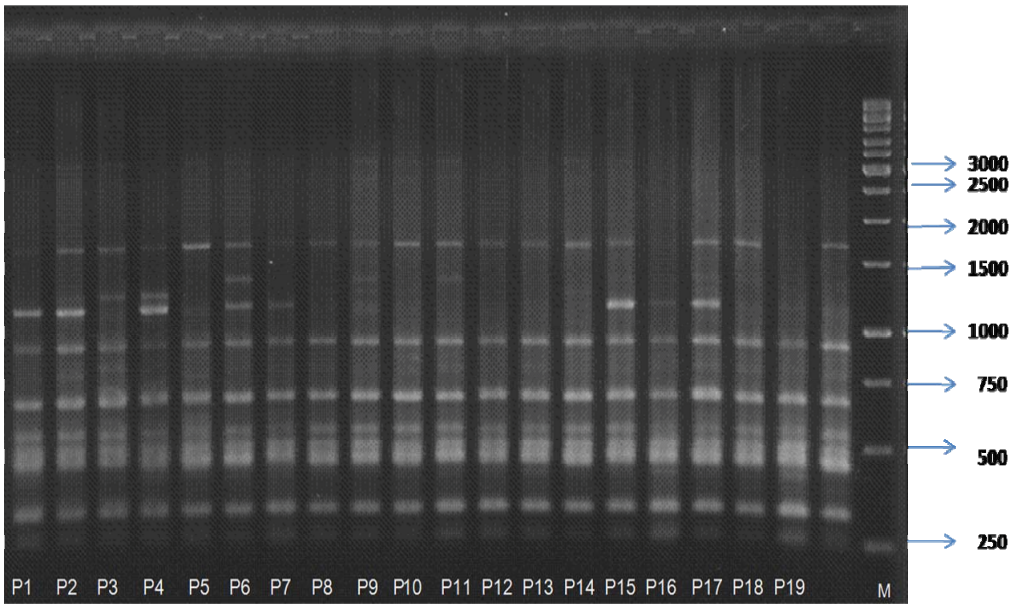
با بررسی فاصله ژنتیکی ۱۹ رقم مورد مطالعه از طریق ضریب تشابه جاکارد (جدول ۲)، کمترین فاصله ژنتیکی بین ارقام کله قوچی و احمد آقایی با میزان تشابه ۰/۸۳ و بیشترین فاصله ژنتیکی بین ارقام کله قوچی، حسین خانی و ابراهیم آبادی با میزان تشابه ۰/۵۴ مشاهده شد. میزان تشابه بین ژنوتیپ های مورد بررسی از ۰/۵۴ الی ۰/۸۳ متغیر بود که این فاصله می‌تواند بیانگر تنوع ژنوتیپ‌های مورد استفاده به علت طبیعت دو پایه، دگر گرده‌افشان و هتروزیگوسیتی بالا در گیاه پسته باشد. نوروزی و همکاران (۱۸) نیز در مطالعه خود میزان شباهت بدست آمده بر اساس ضریب تشابه دایس را بین ۰/۸۴ تا ۱ اعلام کردند که مؤید تنوع ژنتیکی بالا بین ارقام پسته ایرانی بود.

جدول ۱- مشخصات و کد اختیاری ارقام استفاده شده برای انگشت نگاری DNA با استفاده از نشانگرهای ISSR

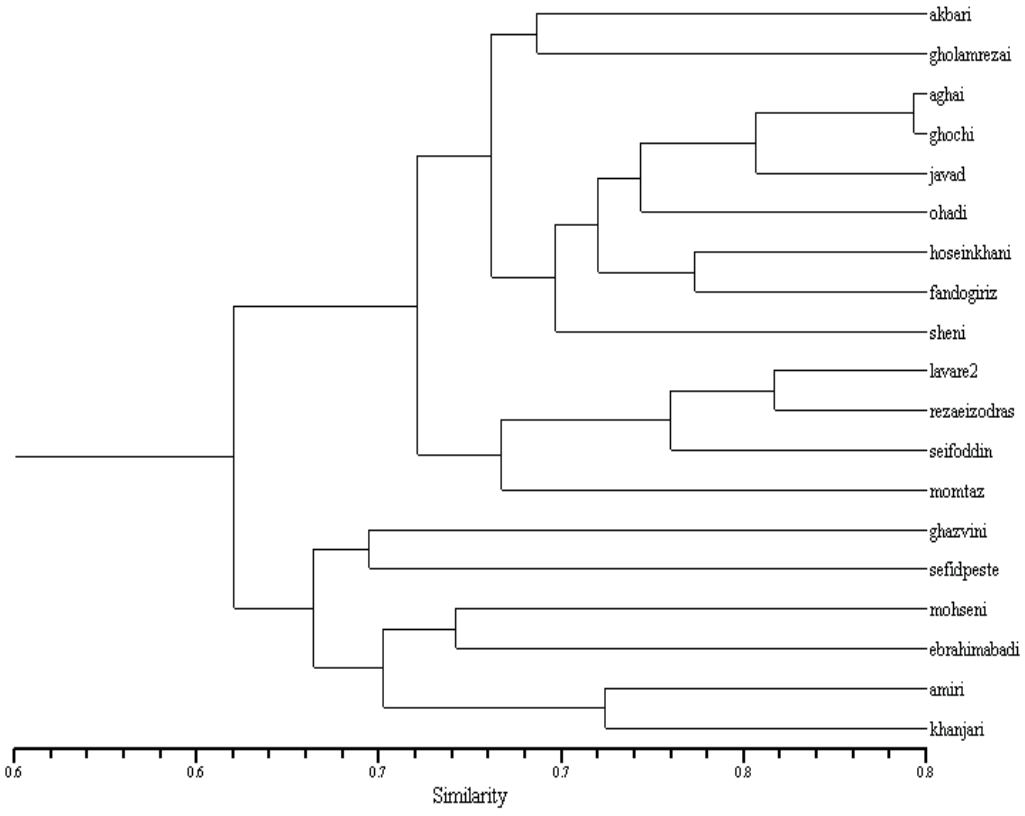
کد	نام رقم	کد	نام رقم
P11	غلامرضایی	P1	اکبری
P12	خنجری دامغان	P2	احمد آقایی
P13	سفید پسته نوق	P3	کله قوچی
P14	لاور ۲	P4	اوحدی
P15	فندقی ریز	P5	قزوینی
P16	ابراهیم آبادی	P6	محسنی
P17	سیف الدین	P7	جواد آقایی
P18	رضایی زودرس	P8	امیری
P19	ممتاز	P9	شنی
		P10	حسین خانی



شکل ۱- الگوی باندی حاصل از الکتروفورز DNA های تکثیر شده ۱۹ رقم پسته ایرانی توسط آغازگر k24a در ژل آگارز ۱/۵ ٪



شکل ۲- الگوی باندی حاصل از الکتروفورز DNA های تکثیر شده ۱۹ رقم پسته ایرانی توسط آغازگر k26 در ژل آگارز ۱/۵ ٪



شکل ۳- نمودار درختی ۱۹ رقم پسته ایرانی با استفاده از ماتریس تشابه جاکارد بر اساس گروه‌بندی با روش UPGMA

PIC توانایی جداسازی و تفکیک نشانگر بر اساس تعداد و آلل-های جایگاه نشانگر و فراوانی آن‌ها در مجموعه نمونه برداری است که هر چه میزان آن بالاتر باشد نمایانگر قدرت تمایز بیشتر نشانگر می‌باشد.

جدول ۲- ماتریس تشابه جاکارد برای آغازگرهای ISSR مورد مطالعه در بررسی ۱۹ رقم پسته ایرانی

	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19
P1	۱																		
P2	۰/۷	۱																	
P3	۰/۷۴	۰/۸۴	۱																
P4	۰/۷۶	۰/۷۶	۰/۷۹	۱															
P5	۰/۶۷	۰/۶۲	۰/۶۰	۰/۶۰	۱														
P6	۰/۷۲	۰/۶۴	۰/۶۵	۰/۷۱	۰/۷۰	۱													
P7	۰/۷۴	۰/۸۰	۰/۷۹	۰/۷۴	۰/۵۹	۰/۶۷	۱												
P8	۰/۶۸	۰/۶۷	۰/۶۸	۰/۶۵	۰/۶۶	۰/۷۱	۰/۶۸	۱											
P9	۰/۶۹	۰/۷۵	۰/۷۶	۰/۷۴	۰/۶۰	۰/۶۷	۰/۷۱	۰/۷۲	۱										
P10	۰/۷۲	۰/۷۵	۰/۸۳	۰/۷۶	۰/۶۵	۰/۶۵	۰/۷۴	۰/۶۵	۰/۷۴	۱									
P11	۰/۷۴	۰/۶۷	۰/۷۲	۰/۷۲	۰/۶۵	۰/۷۲	۰/۷۴	۰/۶۶	۰/۷۲	۰/۷۴	۱								
P12	۰/۷۲	۰/۶۷	۰/۶۷	۰/۶۴	۰/۶۸	۰/۷۰	۰/۷۰	۰/۷۵	۰/۶۹	۰/۶۶	۰/۷۰	۱							
P13	۰/۷۳	۰/۶۲	۰/۷۰	۰/۶۷	۰/۶۹	۰/۷۱	۰/۶۸	۰/۶۳	۰/۶۰	۰/۶۳	۰/۶۹	۰/۷۱	۱						
P14	۰/۶۸	۰/۷۵	۰/۷۷	۰/۶۹	۰/۶۴	۰/۶۶	۰/۷۲	۰/۶۳	۰/۶۹	۰/۷۲	۰/۷۰	۰/۶۸	۰/۶۷	۱					
P15	۰/۷۱	۰/۷۰	۰/۷۴	۰/۷۵	۰/۶۳	۰/۶۶	۰/۷۶	۰/۶۹	۰/۷۵	۰/۷۸	۰/۷۶	۰/۷۰	۰/۶۷	۰/۷۴	۱				
P16	۰/۶۶	۰/۵۷	۰/۵۵	۰/۶۰	۰/۶۷	۰/۷۲	۰/۶۱	۰/۶۹	۰/۶۳	۰/۵۵	۰/۶۴	۰/۶۸	۰/۶۵	۰/۵۵	۰/۵۸	۱			
P17	۰/۶۸	۰/۶۷	۰/۶۷	۰/۶۴	۰/۶۴	۰/۶۶	۰/۶۸	۰/۶۶	۰/۷۰	۰/۶۳	۰/۷۵	۰/۷۱	۰/۶۹	۰/۷۸	۰/۷۴	۰/۵۸	۱		
P18	۰/۶۶	۰/۷۸	۰/۷۱	۰/۷۰	۰/۷۱	۰/۶۸	۰/۷۱	۰/۶۹	۰/۶۸	۰/۷۳	۰/۷۱	۰/۶۸	۰/۶۵	۰/۸۰	۰/۷۲	۰/۶۲	۰/۷۶	۱	
P19	۰/۷۰	۰/۷۴	۰/۷۲	۰/۷۱	۰/۶۷	۰/۷۲	۰/۷۰	۰/۷۰	۰/۷۰	۰/۶۹	۰/۷۰	۰/۷۲	۰/۶۴	۰/۷۲	۰/۷۰	۰/۶۶	۰/۷۱	۰/۷۵	۱

میانگین محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) برای آغازگرهای استفاده شده بالا بوده و از حداقل ۸۵ درصد برای آغازگر K16 تا حداکثر ۹۳ درصد برای آغازگر K25 متغیر بود (جدول ۳)، که در مقایسه با نتایج قفقاز و همکاران (۱۵) با رنج PIC بین ۰/۵ تا ۰/۷۶ آغازگرهای مورد آزمایش در این مطالعه از PIC بالاتری برخوردار بودند.

که این مطلب بیانگر اینست که این آغازگرها نسبت به آغازگرهای دیگر قدرت تشخیص بهتری در تعیین فاصله ژنتیکی ارقام دارند و به خاطر کارایی بالای این آغازگرها، برای استفاده در انگشت نگاری تمام ارقام و ژنوتیپ های پسته توصیه می‌شوند.

شاخص نشانگری (MI) یک معیار برای تعیین کارایی نشانگر در تخمین چند شکلی می‌باشد. در این مطالعه شاخص نشانگری (MI)

آغازگرها بین ۲ تا ۶/۲ متغیر بود و آغازگرهای K10, 830, K11, K25 , K13و K24a شاخص نشانگری بالاتری نسبت به بقیه آغازگرها نشان دادند. از آنجا که آغازگرهای K10 ,K11 K13 و K24a علاوه بر بالا بودن MI از PIC بالاتری نیز برخوردار هستند، چهار آغازگر مذکور می‌توانند آغازگرهای بسیار مفیدی برای انجام آزمایشات انگشت نگاری پسته در سطح وسیع انتخاب شوند. در این پژوهش به طور کلی مقدار MI بالا بود که علت این امر تعداد بالای تعداد قطعات تکثیر شده به ازای هر آغازگر در کل جمعیت و چند شکل بودن آنها می‌باشد. بنابراین نتایج نشانگر ISSR کارایی بالایی در تخمین چند شکلی دارد.

نتیجه گیری

نتایج بدست آمده از این پژوهش نشان داد که استفاده از نشانگرهای ISSR برای طبقه‌بندی و بررسی تنوع ژنتیکی ارقام پسته ایرانی مناسب می‌باشند. با توجه اینکه که چهار آغازگر K10 ,K11, K13و K24a دارای بالاترین مقادیر MI و PIC بودند به عنوان آغازگرهای مفید و کارآمد برای انگشت نگاری تمام ژنوتیپ‌های پسته معرفی و انتخاب گردیدند. همچنین با استفاده از میزان تشابه بین ارقام و با روش کلاستربندی، ۱۹ رقم مورد مطالعه در سه گروه با اختلافات درون گروهی حداقل و بین گروهی حداکثر قرار گرفتند.

جدول۳ – نام و مشخصات آغازگرهای ISSR ، تعداد قطعات تکثیر شده، تعداد قطعات چند شکل، درصد چند شکلی، محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) و شاخص نشانکری (MI) برای آغازگرهای ISSR استفاده شده در انگشت نگاری ارقام پسته ایرانی

کد آغازگر	توالی آغازگر(′3-′5)	دمای اتصال (سانتی گراد)	تعداد قطعات تکثیر شده	تعداد قطعات چند شکل	درصد چند شکلی	محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC)	شاخص نشانکری (MI)
k10	$(AC)_8YG$	۵۴	۱۲	۱۱	۰/۹۱	۰/۹۰	۶/۵۵
840	$(CA)_6AG$	۵۹	۱۲	۸	۰/۶۶	۰/۹۰	۵/۲۷
k16	$(AG)_8YT$	۵۴	۸	۳	۰/۳۷	۰/۸۵	۲/۰۳
k11	$(GT)_8YC$	۵۷	۱۲	۹	۰/۷۵	۰/۹۰	۵/۴۰
k15	$(CA)_8RC$	۵۳	۹	۷	۰/۷۷	۰/۸۷	۳/۸۸
k13	$(AG)_8G$	۵۴	۱۱	۷	۰/۶۳	۰/۹۰	۴/۸۸
k26	$(AG)_8T$	۵۳	۱۲	۷	۰/۵۸	۰/۹۰	۴/۵۸
k25	$(GA)_8A$	۵۳	۱۵	۸	۰/۵۳	۰/۹۳	۶/۲۰
k24b	$(CA)_8T$	۵۱	۱۱	۶	۰/۵۴	۰/۸۹	۴/۰۰
k24a	$(GA)_8TT$	۵۳	۱۲	۷	۰/۵۸	۰/۹۰	۵/۰۰

منابع

1- Ahmad R., Ferguson L., and Southwick S.M. 2003. Identification of pistachio (*Pistacia vera* L.) nuts with microsatellite markers. Hort. Science, 128:898-903.

2- Ahmad R., Ferguson L., and Southwick S.M. 2005. Molecular marker analyses of pistachio rootstocks by Simple Sequence Repeats and Sequence-Related Amplified Polymorphism. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 80:382-386.

3- Ahmadi Afzadi M., Sayed Tabatabaei B.E., Mohammadi S.A., and Tajabadipur A. 2007. Comparison of genetic diversity in species and cultivars of pistachio (*Pistacia sp.* L.) based on Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) markers. Iranian Journal of Biotechnology, 5:147-152.

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

5- Caruso T., Iannini C., Monastra F., Zakynthinos G., Rouskas D., Barone E., Marra F.P., Sottile F., Batlle I., Vargas F., Romero M., Padulosi S., Greco C.I., Cabina M.R., Martelli G., Ak B.E., and Laghezali M. 1998. Genetic and phenotypic diversity in pistachio (*Pistacia vera* L.) germplasm collected in Mediterranean countries. Acta Horticulture. 470:168-178.

6- Dollo L., Hormaza J.I., and Polito V.S. 1995. RAPD polymorphisms among pistachio (*Pistacia vera* L.) cultivars. Fruit Varieties J. 49:47-152.

7- Esmail-Pour A. 2001. Distribution, use and conservation of pistachio in Iran. In: Padulosi, S., Hadj-Hassan, A. (Eds) Project on underutilized mediterranean species. Pistacia: towards a comprehensive documentation of distribution and use of its genetic diversity in central &west Asia, North Africa and mediterranean Europe. IPGRI, Rome, Italy.
8- Fares K., Guasmi F., Touil L., Triki T., and Ferchini A. 2009. Genetic diversity of Pistachio tree using inter-simple sequence repeat markers (ISSR) supported by morphological and chemical markers. Biotechnology, 8:24-34.
9- Golan-Goldhirsh A., Barazani O., Wang Z.S., Khadka D.K., Saunders J.A., Kustiukovsky V., and Rowland L.J. 2004. Genetic relationships among Mediterranean *Pistacia* species evaluated by RAPD and AFLP markers. Plant Systematics Evolution, 246:9-18.
10- 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.
11- Hormaza 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. Economical Botany, 52:78-87.
12- Hormaza J.I., Dollo L., and Polito V.S. 1994. Determination of relatedness and geographical movement of *Pistacia vera* (pistachio; Anacardiaceae) germplasm by RAPD analysis. Economical Botany, 48:349-358.
13- Kafkas S., and Perl Treves R. 2001. Morphological and molecular phylogeny of Pistacia species in turkey. *Theorical* Applied Genetics, 102:908-915.
14- Kafkas S., Cetiner S., and Perl Trevis R. 2001. RAPD markers linked to sex in the genus Pistacia. Journal of Horticultural Science and Biotecnology. 76;251-255.
15- Kafkas S., Ozkan H., Acar I., Atli H.S., Koyuncu S.A.K., Acar B.E., Atli I., and Koyuncu H.S. 2006. Detecting DNA polymorphism and genetic diversity in a wide pistachio germplasm: comparison of AFLP, ISSR, and RAPD markers. Journal of the American Society for Horticultural Science, 131(4): 62-74.
16- Katsiotis A., Hagidimitriou M., Drossou A., Pontikis C., and Loukas M. 2003. Genetic relationships among species and cultivars of Pistacia using RAPDs and AFLPs. Euphytica. 132: 279-286.
17- Mirzaei S., Bahar M., and Sharifnabi B. 2006. A phylogenetic study of Iranian wild pistachio species and some cultivars using RAPD markers. Acta Horticulture. 726:39-43.
18- Norozi S.H., Baghizadeh M., and Jalali Javaran M. 2009. The genetic diversity of Iranian pistachio (*Pistacia vera* L.) cultivars revealed by ISSR markers. Biological Diversity and Conservation, 2:50-56.
19- Powell W., Morgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J., Tingey S., and Rafalski A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding, 2:225-238.
20- Sedaghat R., and Suryaprakash S. 2006. Constraints in production and marketing of pistachio in Iran and concerned policies. Journal of Applied Horticulture. 8, 82-84.
21- Whitehouse W.E. 1957. The pistachio nut. A new crop for the Western United States. Economical Botany, 11:281-321.
22- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Levak K.J., Rafalski J.A., and Tingey S.V. 1990. DNA polymorphism amplification by arbitrary primers is useful as genetics markers. Nucleic Acids Research, 18:6531-6535.
23- Ziekiewicz E., Rafalski A., and Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchore PCR amplification. Genomics, 20:176-183.
24- Zohary D. 1995. The genus Pistacia L. PP: 1-11. In: S. Padulosi, T. Caruso, E. Barone (Eds.), Taxonomy, Distribution, Conservation and Uses of Pistacia Genetic Resources. IPGRI, Italy.