

سلام الافضل

تایید اعضای هیأت داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد

اعضای هیأت داوران نسخه ی نهائی پایان نامه آقای شهرام نوروزی تحت عنوان: بررسی تنوع ژنتیکی برخی از ارقام پسته ایرانی با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD, SSR و ISSR را از نظر فرم و محتوی بررسی نموده و پذیرش آن را برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می کنند.

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه ی علمی	امضاء
۱- استاد راهنمای اول	دکتر مختار جلالی جواران	دانشیار	
۲- استاد راهنمای دوم	دکتر امین باقی زاده	استادیار	
۳- نماینده شورای تحصیلات تکمیلی	دکتر حمید دهقانی	دانشیار	
۴- اساتید ناظر: ۱- ناظر داخلی	دکتر حمید دهقانی	دانشیار	
۲- ناظر خارجی	دکتر رحیم حداد	استادیار	

## آیین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت

مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده 1- حق نشر و تکثیر پایان‌نامه/رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده 2- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجو مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان‌نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده 3- انتشار کتاب، نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده‌ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده‌ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آیین نامه های مصوب انجام شود.

ماده 4- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته‌ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی دانشگاه می باشد، باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

## آیین نامه چاپ پایان نامه (رساله) های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله) ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کند:

«کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده در رشته بیوتکنولوژی کشاورزی است که در سال ۱۳۸۷ در دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی جناب آقای دکتر مختار جلالی جواران و جناب آقای دکتر امین باقی زاده از آن دفاع شده است.»

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶: اینجانب شهرام نوروزی دانشجوی رشته بیوتکنولوژی کشاورزی مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: شهرام نوروزی

تاریخ و امضا: ۱۳۸۸/۷/۲۵



پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد  
رشته بیوتکنولوژی کشاورزی

بررسی تنوع ژنتیکی برخی از ارقام پسته ایرانی با استفاده از نشانگرهای مولکولی  
**ISSR و SSR, RAPD**

نگارنده:  
شهرام نوروزی

استادان راهنما:  
دکتر مختار جلالی جواران  
دکتر امین باقی زاده

آبان 1387

تقدیم به

دروماد  
♦

و

برادر و خواهران عزیزم

## تقدیر و تشکر

اینک که به لطف و عنایت خداوند متعال موفق به اتمام مقطع کارشناسی ارشد خود شده ام بر خود لازم میدانم تا از اساتید محترم راهنمای خود جناب آقای دکتر مختار جلالی جواران و جناب آقای دکتر امین باقی زاده که در تمامی مراحل انجام پایان نامه از هیچ گونه محبت و راهنمایی نسبت به بنده دریغ نمودند تشکر ویژه بنمایم. از زحمات کلیه اساتید گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس و نیز اساتید و مسئولین محترم پژوهشکده بیوتکنولوژی مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی کرمان که در راه انجام این پایان نامه کلیه امکانات فراهم نمودند و نهایت همکاری را داشتند نیز کمال تشکر را دارم. همچنین از کلیه دوستان و همکلاسیهای خوب و مهربانم که به من کمکهای فراوانی کردند بسیار سپاسگزارم.

## چکیده:

ایران دارای غنی ترین ذخایر ژنتیکی پسته در جهان می باشد و به این سبب تنوع و تعداد ارقام پسته ایران در جهان بی نظیر است. این درخت دارای ارقام بسیاری در کشور است بطوریکه بعضی از ارقام در مناطق مختلف با اسامی متفاوت نامیده می شوند و این در حالی است که روابط ژنتیکی بین آنها بدرستی مشخص نمی باشد. اولین گام در زمینه بهنژادی پسته دستیابی به منابع ژنتیکی آن، بررسی تنوع ژنتیکی و روابط ژنتیکی بین ارقام می باشد. مطالعاتی که تاکنون در زمینه پسته انجام شده بیشتر بر اساس صفات مورفولوژیک یا آیزوزایمی بوده است و از نشانگرهای DNA تنها نشانگر RAPD و AFLP برای بررسی روابط ژنتیکی تعدادی از ارقام پسته استفاده شده است. بنابراین در این پژوهش روابط ژنتیکی بین 31 رقم پسته با استفاده از 4 جفت آغازگر اختصاصی ریز ماهواره (SSR)، 10 آغازگر تصادفی RAPD و 3 آغازگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از 10 آغازگر انتخاب شده RAPD تعداد 84 باند قابل امتیاز دهی با میانگین 8/4 تولید شد بطوریکه 59/52% از آنها چند شکل بودند. با استفاده از نشانگر ISSR تعداد 28 باند با میانگین 9/3 تولید شد بطوریکه 46/42% از آنها چند شکل بودند. الگوهای انفرادی حاصل از تجزیه ی خوشه ای بر اساس ضریب تشابه دایس (DICE) و الگوریتم UPGMA در هر 3 سیستم نشانگر در مقایسه با همدیگر تا حدی متفاوت بودند، بنابراین ژنوتیپ های مورد مطالعه در گروه های متفاوتی بسته به نوع نشانگر به کار رفته قرار گرفتند. دندروگرام UPGMA عمومی که با استفاده از داده های ترکیبی هر سه مجموعه نشانگر ساخته شد تا حدی مشابه با دندروگرامهای بدست آمده با هر کدام از نشانگرها در حالت انفرادی بود. تجزیه به مختصات اصلی (PCA) عمومی بر اساس ماتریسهای تشابه ژنتیکی نشان داد که سه مولفه اول 28/46% از کل تنوع ژنتیکی را توجیه می کنند، بنابراین نتایج حاصل از تجزیه به مختصات اصلی، نتایج تجزیه خوشه ای را توجیه می کند. در مجموع چهار آغازگر SSR 11 آل را در میان 31 ژنوتیپ پسته با میانگین 2/75 تولید کردند و در تمام جایگاه ها 100% چند شکلی مشاهده شد. پایین بودن میانگین محتوای اطلاعات چند شکل (0/4374) نشان داد که تشابه ژنتیکی بالایی میان ژنوتیپ ها وجود دارد و بنابراین به آغازگرهای SSR چند شکل بیشتری نیاز می باشد. نتایج بدست آمده نشان داد که دو جایگاه Ptms42 و Ptms41 دارای انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ می باشند. مطالعه شاخص اطلاعات شانون و معیار PIC (محتوای چندشکلی) نیز نشان داد که جایگاه Ptms14 دارای بیشترین تنوع و جایگاه Ptms42 دارای کمترین تنوع در بین جایگاه های مورد مطالعه می باشد. نتایج بدست آمده نشان داد که هر سه سیستم نشانگر توانایی تعیین هویت و آشکارسازی تنوع را در بین ارقام پسته دارا می باشند. بر طبق شاخص نسبت چند گانه موثر (EMR) و شاخص راندمان ارزیابی (AEI)، معلوم گردید که در پژوهش فعلی نشانگر RAPD قدرتمندترین نشانگر در تمایز ژنوتیپ ها بود و به دنبال آن به ترتیب نشانگرهای ISSR و SSR قرار داشتند. نشانگرهای ISSR و SSR به دلیل تولید باندهایی با تکرار پذیری بیشتر معتبرترند و نشانگر RAPD بر ISSR ترجیح داده می شود.



## فهرست مطالب

عنوان.....	صفحه.....
فصل اول: مقدمه.....	1.....
1-1- اهمیت و اهداف .....	1.....
2-1- تاریخچه .....	2.....
3-1- نامگذاری ارقام پسته .....	3.....
4-1- سطح زیرکشت و میزان عملکرد پسته در ایران .....	4.....
5-1- میزان تولید پسته در ایران .....	7.....
6-1- رقبای ایران در تولید و صادرات پسته .....	8.....
7-1- مشخصات گیاه شناسی پسته.....	9.....
8-1- رده بندی پسته .....	10.....
9-1- گونه های جنس پسته .....	11.....
1-9-1- پسته اهلی <i>P. vera</i> .....	11.....
2-9-1- پسته <i>P. mutica</i> .....	11.....
3-9-1- کسور یا چاتلانقوش <i>P. khinjuk</i> .....	12.....
4-9-1- پسته آتلانتیکا <i>P. atlantica</i> .....	12.....
5-9-1- پسته اینتگریم <i>P. integrima</i> .....	12.....
10-1- اهداف اصلاحی.....	13.....
11-1- چشم انداز .....	13.....
12-1- ضرورت بررسی تنوع ژنتیکی در پسته.....	14.....
13-1- روش های برآورد تنوع ژنتیکی .....	15.....
14-1- برآورد تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای مبتنی بر DNA .....	16.....
فصل دوم: بررسی منابع.....	18.....
1-2- تنوع ژنتیکی و عوامل ایجاد تنوع .....	19.....
2-2- نشانگرهای مورفولوژیکی .....	22.....
3-2- نشانگرهای پروتئینی .....	22.....

23	4-2- نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA
25	5-2- واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)
26	6-2- کاربردهای واکنش زنجیره ای پلیمرز
27	7-2- نشانگرهای غیرمبتنی بر PCR
27	1-7-2- چند شکلی حاصل از هضم آنزیمی DNA
27	2-7-2- پویس ژنومی نشانه های هضم
28	3-7-2- تعداد متفاوت ردیف های تکراری و ماهوارک ها
28	8-2- نشانگرهای مبتنی بر PCR
28	1-8-2- تفاوت طول قطعات قابل تکثیر
29	2-8-2- تفاوت طول قطعات هضم شده فرآورده های واکنش زنجیره ای پلیمرز (PBR)
29	3-8-2- تفاوت فرم فضایی رشته های منفرد (SSCP)
30	4-8-2- واکنش تکثیر تک آغازگر
30	5-8-2- چند شکلی طول باند تکثیر شده (AFLP)
31	6-8-2- نشانگرهای ریز ماهواره
33	1-6-8-2- مشکلات کار با ریزماهواره
34	2-6-8-2- آلل های صفر
34	3-6-8-2- اندازه نمونه موردنیاز
35	4-6-8-2- کاربردهای ریزماهواره
35	9-2- چند شکلی قطعات تکثیر یافته DNA با آغازگرهای تصادفی (RAPD)
36	1-9-2- معایب روش RAPD
38	10-2- نشانگر بین ریزماهواره
40	11-2- مروری بر پژوهش های ژنتیکی در پسته
44	فصل سوم: مواد و روش ها
45	1-3- جمع آوری و نگه داری نمونه ها
46	2-3- استخراج DNA از نمونه ها
47	1-2-3- روش استخراج DNA
49	3-3- اندازه گیری کمیت و کیفیت DNA استخراجی
49	1-3-3- روش اسپکتروفتومتری
50	2-3-3- روش الکتروفورز DNA

50	4-3- انجام واکنش های زنجیره ای پلیمرز (PCR).....
50	5-3- مشخصات آغازگرهای بکار رفته .....
52	6-3- مراحل انجام واکنش های PCR.....
53	7-3- واکنش زنجیره ای پلیمرز برای نشانگر ISSR.....
54	1-7-3- برنامه PCR .....
54	2-7-3- ارزیابی محصولات ISSR-PCR.....
54	8-3- واکنش زنجیره ای پلیمرز برای نشانگر RAPD.....
55	1-8-3- برنامه RAPD- PCR.....
55	2-8-3- ارزیابی محصولات RAPD-PCR.....
55	9-3- واکنش زنجیره ای پلیمرز برای نشانگر SSR.....
56	1-9-3- برنامه واکنش SSR-PCR.....
56	2-9-3- الکتروفورز فرآورده های حاصل از نشانگر SSR.....
57	10-3- مواد لازم جهت تهیه ژل پلی اکریل آمید 6% غیر واسرشته ساز .....
57	1-10-3- آماده سازی بافر TBE5X .....
57	2-10-3- آماده سازی محلول آمونیوم پرسولفات 10%.....
57	3-10-3- تهیه بافر بارگذاری ساکارز 40%.....
58	11-3- آماده سازی دستگاه الکتروفورز .....
58	12-3- ریختن ژل .....
59	13-3- انجام بار گذاری نمونه ها و الکتروفورز مقدماتی .....
60	14-3- الکتروفورز نهایی .....
60	15-3- مرحله رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید .....
60	16-3- نرم افزارها و روش های مورد استفاده برای تجزیه و تحلیل داده ها.....
61	1-16-3- محاسبه هتروزیگوسیتی یا تنوع ژنی .....
62	2-16-3- شاخص اطلاعات شانون .....
62	3-16-3- معیارهای چند شکلی .....
63	4-16-3- محتوای اطلاعات چند شکل .....
63	5-16-3- تعادل هاردی – واینبرگ .....
64	6-16-3- تجزیه خوشه ای .....
65	7-16-3- تجزیه به مختصات اصلی .....
65	8-16-3- محاسبه ضریب کوفنتیک .....
66	9-16-3- شاخص راندمان ارزیابی .....

66.....	3-16-10- نسبت چندگانه موثر.....
67.....	فصل چهارم: نتایج و بحث.....
68.....	4-1- محاسبه تعادل هاردی - واینبرگ.....
69.....	4-2- محاسبه معیارهای چندشکلی.....
70.....	4-3- تعیین میزان تنوع ژنتیکی (هتروزگوسیتی).....
71.....	4-4- محاسبه شاخص شانون.....
72.....	4-5- مطالعه رابطه ژنتیکی بین ارقام پسته با استفاده از نشانگر SSR.....
74.....	4-6- تجزیه به مولفه های اصلی.....
77.....	4-7- بررسی تنوع ژنتیکی ارقام پسته بر اساس نشانگر مولکولی ISSR.....
78.....	4-7-1- نتایج حاصل از تجزیه خوشه ای ارقام پسته بر اساس نشانگر مولکولی ISSR.....
80.....	4-7-2- تجزیه به مولفه های اصلی.....
84.....	4-8- تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی ارقام پسته با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD.....
85.....	4-8-1- نتایج حاصل از تجزیه خوشه ای با استفاده از نشانگر RAPD بر روی ارقام پسته.....
87.....	4-8-2- تجزیه داده های حاصل از ژنوتیپ های پسته به مولفه های اصلی.....
90.....	4-9- تجزیه داده های حاصل از ژنوتیپ های پسته به مولفه های اصلی.....
91.....	4-10- مقایسه نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده های ژنوتیپ های پسته با استفاده از سه نشانگر RAPD، ISSR و SSR.....
95.....	4-11- بحث نهایی.....
98.....	4-12- پیشنهادات.....
99.....	منابع.....

## فهرست اشکال

عنوان.....	صفحه.....
شکل 1-1- نمودار توزیع میزان تولید پسته استان ها نسبت به کل کشور در سال 1384	۷.....
شکل 2-1- نمودار سطح بارور پسته استانها نسبت به کل کشور در سال 1384	7.....
شکل 1-4- درخت فیلوژنی حاصل از تجزیه خوشه ای داده ها با استفاده از روش UPGMA با ضریب تشابه دایس برای نشانگر SSR	73.....
شکل 2-4- پلات دو بعدی حاصل از تجزیه به مولفه های اصلی با استفاده از داده های مولکولی برای نشانگر SSR	75.....
شکل 3-4- پلات سه بعدی حاصل از تجزیه به مولفه های اصلی با استفاده از داده های مولکولی برای نشانگر SSR	76.....
شکل 4-4- الگوی بانندی حاصل از 17 رقم پسته (P1 تا P17) با استفاده از آغازگر Ptms31	76.....
شکل 5-4- الگوی بانندی حاصل از 16 رقم پسته (P1 تا P16) با استفاده از آغازگر Ptms31	77.....
شکل 6-4- درخت فیلوژنی حاصل از تجزیه خوشه ای مبتنی بر روش UPGMA با ضریب تشابه دایس نشانگر ISSR	79.....
شکل 7-4- پلات دو بعدی حاصل از تجزیه به مولفه های اصلی با استفاده از داده های مولکولی بر روی ارقام پسته	81.....
شکل 8-4- پلات سه بعدی حاصل از تجزیه به مولفه های اصلی با استفاده از داده های مولکولی بر روی ارقام پسته	82.....
شکل 9-4- الگوی بانندی حاصل از 14 رقم پسته (P1 تا P14) با استفاده از آغازگر ISSR2	82.....
شکل 10-4- الگوی بانندی حاصل از 14 رقم پسته (P1 تا P14) با استفاده از آغازگر ISS5	83.....
شکل 11-4- الگوی بانندی حاصل از 14 رقم پسته (P1 تا P14) با استفاده از آغازگر ISS3	84.....
شکل 12-4- دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر ژنوتیپ های پسته براساس الگوهای بانندی RAPD با استفاده از ضریب تشابه دایس و روش UPGMA	86.....
شکل 13-4- پلات دو بعدی حاصل از تجزیه به مولفه های اصلی با استفاده از داده های مولکولی RAPD در ارقام پسته	87.....
شکل 14-4- پلات سه بعدی حاصل از تجزیه به مولفه های اصلی با استفاده از داده های مولکولی RAPD در ارقام پسته	88.....
شکل 15-4- دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر ژنوتیپ های پسته براساس ترکیب داده های سه سیستم نشانگر SSR، ISSR و RAPD با استفاده از ضریب تشابه دایس و روش UPGMA	89.....

شکل 4-16- پلات دو بعدی حاصل از تجزیه به مولفه های اصلی از ژنوتیپ های پسته با استفاده از داده های مولکولی برای سه نشانگر RAPD، ISSR و SSR..... 90

شکل 4-17- پلات سه بعدی حاصل از تجزیه به مولفه های اصلی ژنوتیپ های پسته با استفاده از داده های مولکولی سه نشانگر RAPD، ISSR و SSR..... 91

## فهرست جداول

عنوان.....	صفحه.....
جدول 1-1- سطح زیر کشت، میزان تولید و عملکرد پسته کل کشور به تفکیک سال در سال 1384.....	5
جدول 1-2- سطح زیر کشت، میزان تولید و عملکرد محصول پسته به تفکیک استان در سال 1384.....	6
جدول 1-3- گونه ها و زیر گونه های مختلف پسته.....	10
جدول 1-2- انواع مختلف ریزماهواره.....	32
جدول 1-3- اسامی ژنوتیپ های پسته و کد مورد استفاده در این پژوهش.....	46
جدول 2-3- مشخصات محلول های استخراج DNA.....	47
جدول 3-3- مشخصات آغازگرهای بکار رفته در سه نشانگر RAPD, ISSR و SSR.....	51
جدول 3-4- غلظت و مقدار مواد و بافرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره ای پلیمرز تکنیک های SSR و ISSR, RAPD.....	53
جدول 3-5- برنامه SSR- Touchdown PCR.....	56
جدول 3-6- لیست مواد مورد نیاز برای تهیه بافر TBE5x.....	57
جدول 3-7- لیست مواد مورد نیاز برای تهیه بافر بارگذاری ساکارز 40%.....	58
جدول 3-8- لیست مواد مورد نیاز برای تهیه ژل پلی اکریل آمید 6%.....	58
جدول 1-4- وضعیت جایگاه های مورد مطالعه از نظر تعادل هاردی- واینبرگ.....	68
جدول 2-4- وضعیت پارامترهای مختلف چند شکلی در چهار جایگاه مورد مطالعه را نشان می دهد.....	70
جدول 3-4- پارامترهای تنوع ژنتیکی اندازه گیری شده برای 4 نشانگر مورد استفاده در این پژوهش.....	70
جدول 4-4- شاخص اطلاعات شانون جایگاه های ریزماهواره (I).....	71
جدول 4-5- نتایج چند شکلی آغازگرهای بکار رفته جهت بررسی تنوع ژنتیکی ارقام پسته با استفاده از نشانگر ISSR.....	75
جدول 4-6- مشخصات باندهای تولید شده در ارقام پسته با استفاده از نشانگر RAPD.....	85
جدول 4-7- مقایسه 31 ژنوتیپ پسته با استفاده از سه نشانگر SSR, ISSR و RAPD.....	92

# فصل اول

## مقدمه



## 1-1- اهمیت و اهداف

پسته معروف به طلای سبز یکی از مهمترین محصولات باغی و اقلام صادراتی کشور، از اهمیت اقتصادی و تجاری زیادی برخوردار است. اهمیت پسته نه تنها به عنوان منبع دائمی تهیه ارز، بلکه به لحاظ محدودیت مناطق پسته خیز در دنیا است که امکان رقابت با این محصول خیلی کمتر از سایر محصولات کشاورزی می باشد و پسته ایران توانسته است در میان معدود کشورهای تولید کننده از جایگاه ویژه ای برخوردار باشد (محمد خانی، 1376). علاوه بر این، پسته بدلیل خصوصیات بالقوه ای که از نظر سازگاری با شرایط نامساعد محیطی از جمله شوری آب و خاک مقاومت به خشکی و کم آبی دارد به عنوان مهمترین محصول اقتصادی برای بسیاری از مناطق کویری و خشک و در نواحی حاشیه ای قابل توصیه است (Padulosi, 1998). به همین دلیل این محصول تاثیر اساسی و سریعی در پیشرفت اقتصاد کشور در دو دهه اخیر داشته و کاشت آن در مناطق مستعد گسترش یافته است (اداره کل آمار، 1376).

ایران دارای غنی ترین ذخایر ژنتیکی پسته در جهان می باشد و به این سبب تنوع و تعداد ارقام پسته ایران در جهان بی نظیر است. اولین گام در زمینه بهنژادی هر محصول زراعی از جمله پسته دستیابی به منابع ژنتیکی آن، بررسی تنوع ژنتیکی موجود، تعیین و شناسایی صفات مطلوب و خصوصیات رویشی و زایشی ارقام است. مهمترین عامل جهت نیل به اهدافی هم چون افزایش عملکرد در واحد سطح، ایجاد ارقام مقاوم به بیماری ها، آفات، سرما، خشکی، بهبود کیفیت محصول شناسایی، ارزیابی ژرم پلاسما پسته و حفظ مراکز ژنتیکی گیاه می باشد (بی نام، 1380).

شرط لازم برای استفاده بهینه از ذخایر ژنتیکی از دیدگاه طرفداران منابع طبیعی و بهنژادگران گیاهی، منوط به درک و شناخت کامل و مفصل از وسعت و مشخصات تنوع ژنتیکی درون یک گونه می باشد زیرا پتانسیل لازم برای ایجاد اصلاحات از طریق انتخاب به وجود تنوع ژنتیکی در جمعیت های در حال اصلاح وابسته است (Hormaza et al., 1998).

پیشرفت های اخیر در ژنتیک سلولی و مولکولی، امید های تازه ای در بهنژادگران بوجود آورده و افق روشنی برای کشاورزی ترسیم نموده است. در این راستا شاید اساسی ترین و مفید ترین ابزار

برای درک شباهت ها و تفاوت های ژنتیکی گیاهان نشانگرهای DNA<sup>1</sup> می باشند که تفاوت افراد را در سطح توالی های بازی DNA مشخص می کنند. بسیاری از پیچیدگیهای انتخاب بر اساس فنوتیپ را می توان از طریق گزینش مستقیم و با استفاده از نشانگرهای DNA که با ژنهای کنترل کننده صفات مورد نظر پیوستگی دارند بر طرف کرد. نشانگرهای DNA ابزارهای ارزشمند در تجزیه و تحلیل های گوناگون از فیلوژنی تا همسانه کردن ژنها<sup>2</sup> را فراهم می کنند.

توسعه سریع نقشه های ژنتیکی اشباع شده<sup>3</sup> بر اساس نشانگرهای مبتنی بر واکنش زنجیره ای پلیمرز<sup>4</sup> و مکانیابی یا نشانمند کردن<sup>5</sup> ژنهای کنترل کننده صفات مختلف را امکان پذیر ساخته است. انتخاب به کمک نشانگرها<sup>6</sup> انتقال ژنهای مناسب برای صفات مطلوب مثل مقاومت به بیماری ها را با استفاده از تعداد کم تلاقی های برگشتی و با دقت بیشتر فراهم کرده است (Kumar, 1999). در این پژوهش به منظور مطالعه و ارزیابی میزان تنوع ژنتیکی بخشی از ژرم پلاسما پسته و تعیین فاصله ژنتیکی و خویشاوندی ژنتیکی ژنوتیپ های مورد نظر، از سه نشانگر مولکولی SSR، ISSR و RAPD به منظور بهره گیری بیشتر از جنبه ها و ویژگی های مختلف ژرمو پلاسما مورد مطالعه استفاده گردید.

## 2-1 تاریخچه

ایرانیان از دیر باز خواص خون ساز حیاتبخش و هوش افزای پسته را دریافته اند. در روایات باستانی آمده است که ضحاک ایرانیان را پارسی های پیروزمند پسته خوار نام نهاده و پارت ها مردانی وصف شده اند که از کودکی پسته را به عنوان خوراکی نیرو بخش مغذی و کم حجم همواره به همراه خود داشته اند. کلمه لاتین *Pistacia* از اسم فارسی آن یعنی *piste* یا *peste* گرفته شده است (شیبانی، 1374).

---

<sup>1</sup>DNA markers

<sup>2</sup>Gene cloning

<sup>3</sup>Saturated genetic maps

<sup>4</sup> PCR based markers

<sup>5</sup>Gene taging

<sup>6</sup> Marker assisted selection

برخی از محققین منشا احتمالی پسته را آسیای مرکزی می دانند جائی که رویشگاه های بزرگی از درختان پسته وحشی در این مناطق دیده می شود ( Zohary, 1952; Whitehouse, 1957). امروزه این ناحیه شامل کشورهای ایران ترکمنستان و افغانستان است ( Crane *et al.*, 1981). با توجه به اطلاعات تاریخی چنین به نظر می رسد که کاشت پسته در ایران باستان شروع و بتدریج به طرف غرب در بین النهرین سوریه و فلسطین توسعه پیدا کرده است. 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, 1995). برخی پژوهشگران کشت پسته را در ایران، در زمان پارت ها و درنواحی مستعد پارت (خراسان)، که نزدیکترین منطقه به زادگاه طبیعی آن است می دانند و گسترش آن را به سایر نواحی ایران، به بعد از اسلام نسبت می دهند (ابریشمی، 1373). پسته (*Pistacia vera* L.) بومی آسیای مرکزی و غربی است و اهلی شدن آن در آنجا آغاز و به منطقه مدیترانه کشیده شده است و ایران به عنوان اولین مرکز مهم تنوع ژنتیکی آن محسوب می شود (Paduldoi *et al.*, 1998). دو مرکز تنوع برای پسته (*Pistacia vera* L.) توصیف شده است، ناحیه اول از ایران تا شرق ترکیه و ناحیه دوم در شمال افغانستان و جنوب ترکمنستان می باشد (Whitehouse, 1957; Joley, 1969; Rechinger, 1969).

### 1-3 نامگذاری ارقام پسته

بر طبق منابع موجود بذر یا نهال این گیاه در دوره صفویه به استان کرمان حمل شده و تکثیر گردیده است و از آن زمان تا 50 الی 60 سال گذشته باغات کوچک بطور پراکنده در استان کرمان بخصوص در رفسنجان و زرنده احداث شده است. اولین ارقام پسته در ایران حاصل پرورش و اهلی کردن درختان پسته خودروی بوده است. تعداد این ارقام بسیار محدود بوده و شکل ظاهری این ارقام با محصول پسته خودروی شباهت داشته است. بر اثر پیوند و جابجایی این ارقام و توجه باغبانان ایرانی از نظر درشتی دانه های پسته تا حدودی تحول ایجاد شده است شکل ارقام مختلف پسته قرن ها پایدار و ثابت بوده و تنها از نظر ریزی و درشتی محصول و نیز کیفیت رنگ مغز پسته و طعم آن تفاوت های ناچیزی با یکدیگر داشته است. تعداد ارقام کنونی پسته در رفسنجان در دهه های اخیر

رو بفزونی گذاشته است. که بیانگر تلاش باغداران این ناحیه برای دستیابی به ارقام بهتر با محصولی انبوهتر و کیفیت مرغوبتر می باشد. محصول پسته ایران از نظر شکل ظاهری و کیفیت دارای تنوعی چشمگیر و مشتمل بر ده ها رقم است. از حدود نیم قرن پیش تعداد ارقام فزونی یافته است این تعدد و تنوع بر اثر تلاش باغبانان ایرانی بخصوص در استان کرمان و بویژه در منطقه رفسنجان ایجاد شده است. با انتقال ارقام بومی دیگر مناطق پسته خیز به کرمان و رفسنجان و با پیوند ارقام موجود و ارقام انتقالی بر روی یکدیگر ارقام پسته بسیار بدیع و متنوعی بدست آمده است (شیبانی، 1374).

#### 4-1 سطح زیر کشت و میزان عملکرد پسته در ایران

سطح زیر کشت پسته کشور در سال 1384 حدود 440 هزار هکتار و در حوزه عمل 23 سازمان جهاد کشاورزی کشت شده که 76/79 درصد آن درختان بارور و 23/21 درصد بقیه نهال بوده است. استان کرمان با 76/51 درصد سطح بارور پسته کشور مقام اول را دارا است و دو استان یزد و خراسان رضوی به ترتیب 8/02 و 5/25 درصد مقام های دوم و سوم سطح را به خود اختصاص داده اند. سه استان مزبور جمعاً 89/78 درصد سطح بارور پسته کشور و سایر استان های پسته کار 10/22 درصد سهم در سطح بارور این محصول را داشته اند. عملکرد پسته آبی 680 کیلوگرم و پسته دیم 336 کیلوگرم در هکتار در کشور می باشد. بیشترین عملکرد پسته آبی با 3089 کیلوگرم متعلق به استان سیستان و بلوچستان و کمترین آن با 250 کیلوگرم در هکتار به استان اردبیل تعلق دارد. پسته بارور دیم فقط در استان های خراسان جنوبی، خراسان رضوی، شمالی و نیز زنجان کشت شده است (آمارنامه کشاورزی، 1384).