

ارزیابی روابط ژنتیکی برخی از ارقام و ژنوتیپ‌های بادام (*Prunus dulcis* L.) با استفاده از نشانگر SSR

موسی رسولی^۱، محمدرضا فتاحی مقدم^{۲*}، ذبیح‌اله زمانی^۳، علی ایمانی^۴ و علی عبادی^۵
۱. دانشجوی سابق دکتری پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران و استادیار گروه مهندسی فضای سبز
دانشکده کشاورزی دانشگاه ملایر
۲، ۳ و ۵. دانشیار و استادان پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۴. دانشیار، مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج
تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۲/۲۰ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۱/۸/۱۵

چکیده

استفاده از نشانگرهای مولکولی به‌ویژه ریزماهورها به دلیل دقت بالای آنها در مطالعه ژنوم درختان میوه از اهمیت زیادی برخوردار است. در این پژوهش برای ارزیابی روابط ژنتیکی ۶۸ رقم و ژنوتیپ بادام داخلی و خارجی از ۲۲ مکان ریزماهور استفاده شد. DNA ژنومی از بافت‌های برگ گیوان استخراج و واکنش‌های PCR با استفاده از ۲۲ مکان انتخاب‌شده (از بین ۱۰۰ عدد مکان) ریزماهور روی آن انجام شد. از مکان‌های بررسی‌شده در مجموع ۱۶۷ آلل چندشکل که بین ۴ تا ۱۱ آلل در هر مکان SSRs و با متوسط ۷/۶۰ آلل بودند، مشاهده شد. از بین مکان‌های استفاده‌شده، مکان‌های *pchgms6* و *UDP97401* با داشتن تعداد آلل زیاد، آلل مؤثر بالا، قدرت تفکیک‌کنندگی، میزان اطلاعات چندشکلی، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و شاخص اطلاعاتی شانون بالا، نسبت به سایر مکان‌های بررسی‌شده کارایی بهتر و مزیت بیشتری داشتند. براساس ماتریس تشابه، بیشترین تشابه (۰/۷۴) بین ژنوتیپ‌های '۵-۱۷' و '۱-۲۱' و کمترین تشابه بین ژنوتیپ '۲-۷' با 'مشهد ۳' و 'پرلیس' و همچنین ژنوتیپ '۴-۸' با 'دیررس ساوجبلاغ' و 'آذر' (۰/۱۴) مشاهده شد. برای رسم نمودار خوشه‌ای از روش UPGMA و ضرایب تشابه دایس بین ارقام و ژنوتیپ‌ها استفاده شد. براساس این روش ارقام و ژنوتیپ‌های بررسی‌شده در فاصله تشابه ۰/۴۰ به ۸ گروه اصلی تقسیم شدند که متناسب با منشاء جغرافیایی و برخی خصوصیات مورفولوژیکی آنها بود.

واژه‌های کلیدی: بادام، تنوع ژنتیکی، توالی‌های ساده تکرارشونده (ریزماهورها)، ماتریس تشابه.

مقدمه

هلو، بادام و ۱۰ گونه دیگر از زیرجنس *Amygdalus* را با استفاده از نشانگر SSR بررسی کردند. یک گونه از زیرجنس *Cerasus* (در جنس *Prunus*) نیز به‌منزله گروه بیرونی در مطالعه به کار برده شد. تعداد آلل‌های آشکارشده در ارقام هلو و بادام از ۱ تا ۳ متغیر بود. درحالی‌که سایر گونه‌ها ۱ تا ۱۰ آلل آشکار کردند. پس از تجزیه کلاستر، ژنوتیپ‌های مطالعه‌شده در ۴ گروه جای گرفتند به‌طوری‌که در گروه اول، ارقام هلو به همراه گونه‌های وحشی آن، گروه دوم شامل ارقام اهلی بادام، گروه سوم گونه‌های وحشی بادام و گروه چهارم یکی از

ارقام بادام بومی و واردشده به ایران بیشتر از نظر خصوصیات مورفولوژیکی و زراعی مطالعه شده‌اند. با این حال این مطالعات قادر به شناسایی روابط ژنتیکی و تعیین خصوصیات و ارتباط آنها، نبودند. برای مثال برخی ارقام خارجی که وارد ایران شده‌اند به دلیل اشتباه انجام‌شده در نامگذاری و گم‌شدن برچسب آنها به‌صورت شماره‌های مختلف شاهرودی معرفی شده و هنوز ناشناخته باقی مانده‌اند (Shiran et al., 2007).
Martinez-Gomez. et al (2003) تعدادی از ارقام

روش‌های مولکولی می‌تواند مناسب و مفید باشد. هدف این پژوهش تعیین خصوصیات ژنتیکی، تنوع و رابطه بین ارقام ایرانی و برخی ارقام مهم خارجی بادام با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

۶۸ رقم و ژنوتیپ متفاوت و متنوع از ارقام و ژنوتیپ‌های ایرانی و خارجی بادام که در کلکسیون تحقیقاتی کمال‌آباد کرج وابسته به مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر جمع‌آوری شده‌اند در این پژوهش بررسی شدند (جدول ۱).

استخراج DNA کل ژنومی

از برگ‌های جوان باز شده در اوایل بهار DNA ژنومی با استفاده از روش Murray & Thompson (1980) استخراج و به وسیله ژل الکتروفورز و اسپکتروفوتومتر ارزیابی کمی و کیفی شد. نمونه‌های DNA در ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شدند.

انجام آزمایش SSR

در این پژوهش ۲۲ نشانگر ریزماهوره از بین ۱۲۰ نشانگر مربوط به گونه‌های مختلف جنس پرونوس شامل بادام، هلو، گیلاس و زردآلو که چندشکلی بالایی داشتند، انتخاب شدند (جدول ۲). هر ۲۲ نشانگر ریزماهوره هسته‌ای استفاده شده واحدهای تکراری دو نوکلئوتیدی داشتند. مشخصات مربوط به تمام مکان‌های ریزماهوره در جدول ۲ ذکر شده است. اجزای واکنش PCR با حجم ۲۵ میکرولیتر به شرح جدول ۳ براساس روش Sánchez- Pérez. *et al.* (2005) بهینه شدند. پس از انجام آزمایش‌های مقدماتی، شرایط PCR شامل غلظت‌های استفاده شده (خصوصاً آنزیم تک‌پلیمرز و DNA) و نیز چرخه‌های حرارتی (شامل تعداد، دما و نیز مدت هر یک از چرخه‌ها) بهینه‌سازی شد (جدول ۴). به منظور تفکیک فرآورده‌های تکثیر شده به وسیله آغازگرهای ریزماهوره به محتویات واکنش هر لوله مقدار ۳ میکرولیتر بافر بارگذاری اضافه و مخلوط حاصل به کمک سیستم الکتروفورز افقی در چاهک‌های ژل آگاروز

گونه‌های وحشی متعلق به جنس *Cerasus* را شامل شد. نتایج، تنوع ژنتیکی زیادی را در ژرم‌پلاسما بررسی شده آشکار کرد و به علاوه ارزش نشانگرهای SSR معرفی شده در یک گونه جنس *Prunus* را برای شناسایی گونه‌های دیگر آن جنس نشان داد. Xie. *et al.* (2006) برای بررسی تنوع ژنتیکی ۲۳ رقم بادام از چین و ۱۵ رقم بادام از کشورهای آمریکا، فرانسه، ایتالیا و اسپانیا، دو هیبرید هلو- بادام و سه رقم هلو، تعداد ۱۶ مارکر SSR شامل ۸ مارکر EST-SSR و ۸ مارکر SSR ژنومی هلو را استفاده کردند. سه مارکر EST-SSR و ۷ مارکر SSR ژنومی چندشکلی بالایی نشان دادند. ارقام بررسی شده در ۳ گروه قرار گرفتند به طوری که تمام ارقام بادام چینی در گروه اول و تمام ارقام آمریکایی و اروپایی در گروه دوم جای گرفتند و گروه سوم شامل ارقام هلو و هیبریدهای هلوبادام بود. این بررسی مشخص کرد که ارقام بادام چینی تاریخچه تکاملی مستقل از بادام‌های اروپایی- آمریکایی دارند. Shiran. *et al.* (2007) با استفاده از ۱۸ جفت آغازگر ریزماهوره‌ای (مربوط به هلو)، تنوع ژنتیکی ۳۶ رقم بادام اهلی به همراه سه گونه وحشی آن را مطالعه کردند و در مجموع ۱۲۶ آلل را آشکار کردند. گروه‌بندی براساس ضریب تشابه جاکارد و به روش UPGMA^۱ پس از جدایی دو گونه وحشی *A. scopia* و *A. orientalis*، ارقام و ژنوتیپ‌های باقی‌مانده را در فاصله ژنتیکی ۰/۷۱ به دو گروه اصلی تفکیک کرد. با توجه به دندروگرام و ماتریس تشابه، به خوبی آشکار شد که میزان تشابه ژنتیکی بین ارقام و ژنوتیپ‌ها و گونه‌های بادام مطالعه شده، پایین و تنوع بین آنها نسبتاً زیاد بود. نتایج حاصل از این پژوهش گروه‌بندی ارقام و ژنوتیپ‌های بررسی شده را براساس منشأ جغرافیایی یا دودمان نشان داد. همچنین مشخص شد که نشانگرهای SSR ژنومی استخراج شده از هلو قابلیت بالایی برای مطالعات انگشت‌نگاری DNA، مطالعات شجره‌ای و ارتباط ژنتیکی در بادام و سایر گونه‌های آن دارند. از آنجا که ارقام ایرانی بادام تا کنون کمتر شناخته و یا بررسی شده‌اند، لذا مطالعه، شناسایی و تعیین روابط ژنتیکی بین ارقام ایرانی با استفاده از

1. Unweighted Paired Group Method Using Arithmetic Average

استفاده شد. به این منظور تعداد آلل‌های مشاهده شده در هر مکان ریزماهواره (N_a)، تعداد آلل‌های مؤثر در هر مکان ریزماهواره (N_e)، فراوانی آلل غالب (F_{ma}) و آلل‌های نادر (N_r)، به‌منزله شاخص‌هایی از تغییرات نوسانات ژنتیکی موجود در کل جمعیت محاسبه شدند (Kimura & Crow, 1964). به‌منظور تعیین میزان تنوع ژنتیکی، شاخص‌های هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_o)، شاخص شانون (I)، محاسبه شد (Shannon & Weaver, 1949; Nei, 1973). به‌منظور تعیین میزان شاخص خودگشتی (Fit) از شاخص آماری رایت^۳ استفاده شد (Wright, 1978). شاخص تثبیت (F_{in}) براساس رابطه $F_{in} = (H_e - H_o)/H_e$ و با استفاده از میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_o) و مورد انتظار (H_e) محاسبه شد (Nei, 1987).

نتایج و بحث

قطعات تکثیرشده و شاخص‌های تغییرات آلی

برای بررسی میزان چندشکلی DNA، تنوع و روابط ژنتیکی در بین ۶۸ رقم و ژنوتیپ مختلف بادام (جدول ۱)، آلل‌های ۲۲ مکان ریزماهواره استفاده شده (جدول ۲) در محاسبات منظور شدند. مکان‌های مذکور در مجموع ۱۶۷ آلل با میانگین ۷/۶ آلل برای هر مکان ریزماهواره ایجاد کردند. مکان UDP97401 بیشترین تعداد آلل (۱۱ آلل) و مکان UDP98406 کمترین تعداد آلل (۴ آلل) را ایجاد کرد. Mosavi و همکاران (2010) با استفاده از ۱۵ نشانگر ریزماهواره روابط ژنتیکی ۵۳ رقم بادام را بررسی و تعداد ۴ تا ۱۳ آلل با میانگین ۸/۷۳ را گزارش کردند. همچنین Sánchez- Pérez. *et al.* (2005) با استفاده از ۱۷ نشانگر ریزماهواره هلو، روابط ژنتیکی ۲۵ رقم زردآلو را بررسی و تعداد ۱ تا ۹ آلل با میانگین ۴/۱ گزارش کردند. Zeinalabedini. *et al.* (2007) گزارش کردند که با استفاده از ۷ آلل آگارز متافور تعداد ۱۳۵ آلل در ۷۰ رقم بادام مطالعه شده به کمک نشانگر ریزماهواره تکثیر شد که تعداد آلل تولیدشده به‌وسیله این نشانگرها از ۵ تا ۱۵ آلل با میانگین تعداد ۹ آلل در هر مکان متغیر بود. آنها گزارش کردند که کمترین تعداد آلل در ارقام بادام

متافور ۳ درصد حاوی اتیدیوم بروماید (۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) در بافر 1X TBE ریخته شد. الکتروفورز نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت با جریان ۱۰۰ ولت انجام شد. پس از این مرحله قطعات تکثیر یافته DNA زیر نور UV توسط دستگاه ژل‌داک (SYNGENE) مشاهده و عکس‌برداری از ژل انجام شد. برای تخمین طول قطعات تکثیر شده از نشانگر اندازه SM0313 Fermentas که قطعات ۱۰۰ bp داشت، استفاده شد.

روش‌های آماری تجزیه و تحلیل داده‌ها

برای بررسی چندشکلی بین ارقام و ژنوتیپ‌ها، امتیازدهی باندها به صورت صفر (وجودنداشتن باند) و یک (وجود باند) انجام شد. ارقام و ژنوتیپ‌های دارای یک باند، هموزایگوت و ارقام و ژنوتیپ‌های دارای دو باند، هتروزیگوت در نظر گرفته شدند. اندازه‌گیری فاصله و شباهت ژنتیکی براساس داده‌های صفر و یک با ضرایب تشابه جاگرد، دایس و تطابق ساده انجام شد. برای تعیین روابط خویشاوندی بین افراد و گروه‌ها و گروه‌بندی ارقام و ژنوتیپ‌ها با استفاده از آنالیز خوشه‌ای به روش میانگین ریاضی گروه‌های جفتی وزن نشده (UPGMA) با نرم‌افزار NTsys2.02 انجام شد.

همچنین به‌منظور بررسی کارآمدی نشانگرهای ریزماهواره استفاده شده، معیارهای مختلف مثل قدرت تفکیک‌کنندگی (PD)^۱، میزان اطلاعات چندشکلی (PIC)^۲ با استفاده از رابطه‌های ۱ و ۲ و همچنین میزان تنوع و تمایز ژنتیکی با توجه به روابط مربوط محاسبه شد.

$$\text{PD} = 1 - \sum P_i^2, P_i = \text{فراوانی آلل} \quad (\text{رابطه ۱})$$

و

$$P_j = 1 - P_i, \text{PIC} = 1 - \sum P_i^2 - \sum \sum 2P_i^2 P_j^2 \quad (\text{رابطه ۲})$$

از آلل‌های ایجاد شده در مکان‌های ریزماهواره روی ارقام و ژنوتیپ‌های مطالعه شده، برای محاسبه پارامترهای ژنتیکی جمعیت شامل شاخص‌های تغییرات، تنوع، تمایز ژنتیکی، فاصله ژنتیکی و جریان ژنی با استفاده از نرم‌افزار POP GENE نسخه ۱/۳۱ (Yeh *et al.*, 1997)

1. Power of Discrimination

2. Polymorphic Information Content

3. Wrights F-Statistics

در نشانگر UDP96008 (۵ آلل) و بیشترین آن در نشانگر BPPCP010 (۱۵ آلل) مشاهده شد.

جدول ۱. اسامی ارقام و ژنوتیپ‌های بادام بررسی شده

شماره	نام رقم	شماره	نام رقم	شماره	نام رقم	شماره	نام رقم
۱	۱۰-۱۱	۲۱	۱۴-۲۴	۴۱	یزد ۶۰	۶۱	پسره قزوین
۲	۵-۱۷	۲۲	پرایس	۴۲	یزد ۱۰۳	۶۲	آذر
۳	۱-۲۱	۲۳	۸-۴	۴۳	زرقان ۲۶	۶۳	شکوفه
۴	ژینکو	۲۴	۹-۲۳	۴۴	پاکوتاه طالقان شماره ۲	۶۴	کرمان ۱۶
۵	۵-۶	۲۵	۲-۲۹	۴۵	مشهد ۳	۶۵	کرمان ۲۰
۶	زرقان ۱۰	۲۶	نیلوس الترا	۴۶	زرقان ۳	۶۶	کرمان ۵
۷	D-124	۲۷	D-99	۴۷	زرقان ۳۶	۶۷	تونو
۸	۴-۶	۲۸	۲-۷	۴۸	مشهد ۷	۶۸	شاهرود ۱۲
۹	۳-۱۷	۲۹	۱۶-۳	۴۹	مشهد ۴		
۱۰	زرقان ۸	۳۰	پرلیس	۵۰	زرقان ۷		
۱۱	روبی	۳۱	میرینج تهران	۵۱	ارومیه ۵۴		
۱۲	۳-۱۲	۳۲	پاکوتاه طالقان	۵۲	یزد ۱۳		
۱۳	میژن	۳۳	مشهد ۹	۵۳	دیررس ساوجبلاغ		
۱۴	۹-۷	۳۴	۱۳-۲۴	۵۴	برگ درشت همدان		
۱۵	بوتی	۳۵	مشهد ۱۰	۵۵	شال قزوین		
۱۶	نان پاریل	۳۶	مشهد ۶	۵۶	پاکوتاه رزن		
۱۷	۱۶-۲۵	۳۷	ارومیه ۶۸	۵۷	بهار همدان		
۱۸	۱۲-۲۶	۳۸	ارومیه ۹۸	۵۸	سهند		
۱۹	۲-۲۷	۳۹	یزد ۴۴۴	۵۹	برگ سیاه قزوین		
۲۰	۹-۲	۴۰	یزد ۳۱۸	۶۰	هیبرید هلو و بادام		

جدول ۲. اسامی و مشخصات آغازگرهای ریزماهوره منتخب استفاده شده در ارزیابی ارقام و ژنوتیپ‌های بادام

شماره	نشانگر (مکان)	توالی آغازگر	موتیف	دمای اتصال	منبع
۱	BPPCT 001	F: AAT TCC CAA AGG ATG TGT ATG R: CAG GTG AAT GAG CCA AAG C	(GA)27	۵۷	Dirlewanger <i>et al.</i> , 2002
۲	BPPCT 007	F: TCATTGCTCGTCATCAGC R: CAGATTTCTGAAGTTAGCGGTA	(AG)22 (CG)2 (AG)4	۵۷	Dirlewanger <i>et al.</i> , 2002
۳	BPPCT 010	F: AAAGCACAGCCATAATGC R: GTACTGTTACTGCTGGGAATGC	(AG)4 GG(AG)10	۵۷	Dirlewanger <i>et al.</i> , 2002
۴	EPDCU4658	F: GGGCGTGAAGGTGTTACTGT R: GGTGACACAGAAGAGAGCAGAA	(GA)?	۵۷	http://www.bioinfo.wsu.edu/gdr/
۵	EPPCU0863	F: CGGAAAAGCAAAAACCACTCA R: ATCGAAATCGTTCGCCACAA	(GA)14	۵۷	Howad <i>et al.</i> , 2005
۶	MA040a	F: AGAAATGGAGTGACGTAAC R: ACGTGATGAGAAGTAGGGAG	(GA)17	۵۷	Yamamoto <i>et al.</i> , 2002
۷	MA027a	F: GGGCAGTGAAGAATCTATGA R: GATAGCATAAAACCCGIGAAA	(GA)28	۵۷	Yamamoto <i>et al.</i> , 2002
۸	Pchgms6	F: CATTGTTCAATGGGAGGAATT R: AGAACATTCTAAAGGAGCA	(CT)34	۵۷	Wang <i>et al.</i> , 2002
۹	UDP96001	F: AGTTTGATTTTCTGATGCATCC R: TGCCATAAGGACCGGTATGT	(CA)17	۵۷	Cipriani <i>et al.</i> , 1999
۱۰	UDP96003	F: TTGCTCAAAAAGTGTCTGTGC R: ACACGTAGTGCAACACTGGC	(CT)11(CA)28	۵۷	Cipriani <i>et al.</i> , 1999
۱۱	UDP96005	F: GTAACGCTCGCTACCACAAA R: CCTGCATATCACCCACAG	(AC)16	۵۷	Cipriani <i>et al.</i> , 1999
۱۲	UDP97401	F: TAAGAGGATCATTTTTGCCTTG R: CCCTGGAGGACTGAGGGT	(AG)17	۵۷	Cipriani <i>et al.</i> , 1999
۱۳	UDP97403	F: CTGGTTACAACCTGCAAGC R: CGTCGACCAACTGAGACTCA	(AG)22	۵۷	Cipriani <i>et al.</i> , 1999
۱۴	UDP98405	F: ACGTGATGAACCTGACACCA R: GAGTCTTTGCTCTGCCATCC	(AG)9	۵۷	Cipriani <i>et al.</i> , 1999
۱۵	UDP98406	F: TCGGAAACTGGTAGTATGAACAGA R: ATGGTCTGATGCACAGTCA	(AG)15	۵۷	Cipriani <i>et al.</i> , 1999
۱۶	UDP98408	F: ACAGGCTTGTGAGCATGTG R: CCTCTGTTGGGAAAATTTGA	(AG)29	۵۷	Cipriani <i>et al.</i> , 1999
۱۷	UDP98409	F: GCTGATGGGTTTTATGGTTTTTC R: CGGACTTATCCTCTATCAACA	(AG)19	۵۷	Cipriani <i>et al.</i> , 1999
۱۸	UDP98410	F: AATTTACCTATCAGCCTCAAA R: TTTATCCAGTTTACAGACCG	(AG)23	۵۰	Testolin <i>et al.</i> , 2000
۱۹	UDP98412	F: AGGAAAAGTTTCTGTGCAC R: GCTGAAGACGACGATGATGA	(AG)28	۵۰	Testolin <i>et al.</i> , 2000
۲۰	UDP98414	F: AAAAGGCACGACGTTGAAGA R: TTCAGATTGGGAATTTGCAG	(AG)29	۵۷	Testolin <i>et al.</i> , 2000
۲۱	UDP98021	F: AAGCAGCAATGGGCAGAATC R: GAATATGAGACGGTCCAGAAGC	(GA)22	۵۷	Testolin <i>et al.</i> , 2000
۲۲	UDP98024	F: CCTTGATGCATAATCAAACAGC	(GT)19TC(TG)7	۵۷	Testolin <i>et al.</i> , 2000

RGGACACTGGCATGTGAAG

جدول ۳. مواد لازم و مقدار هر یک از آنها برای تهیه مخلوط واکنش PCR به حجم ۲۵ میکرولیتر

مقدار برای هر واکنش ۲۵ میکرولیتری	غلظت نهایی	غلظت پایه	مواد
۲/۵	۱۰x	۱x	بافر واکنش
۱/۲۵	۱۰mM	۰/۵mM	مخلوط نوکلئوتیدها
۱	۵۰mM	۲mM	کلرید منیزیم
۰/۵	۵mM	۰/۱mM	آغازگر رو به جلو
۰/۵	۵mM	۰/۱mM	آغازگر معکوس
۰/۱	۵u/μl	۰/۲u/μl	آنزیم تک‌پلیمرز
۳	۲۵ng/μl	۳ng/μl	نمونه DNA الگو
۱۶/۱۵	-	-	آب
۲۵	-	-	جمع

جدول ۴. زمان و دمای مراحل انجام واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای ریزماهوره در این آزمایش

مرحله	مرحله انجام شده	تعداد چرخه (تکرار)	زمان (دقیقه)	دما °C
۱	شروع با زدن DNA	۱	۵	۹۴
۲	تک‌شتمای شدن DNA، اتصال آغازگر	۳۵	۱	۹۴
۳	بسط آغازگر	-	۲	۵۰-۵۷*
۴	بسط نهایی	۱	۱۰	۷۲
۴	نگهداری	۱	نامحدود	۷۲
			نامحدود	۴

*بسته به نوع آغازگر متفاوت است.

مکان مؤثر در هر مکان ژنی (N_e) را داشتند. از طرفی مکان‌های UDP97403 و UDP98410 با $3/80$ و $4/10$ تعداد آلل مؤثر در هر مکان ژنی (N_e) نسبت به سایر مکان‌ها در سطح پایینی قرار داشتند. میانگین تعداد آلل مؤثر در هر مکان ژنی (N_e) برای تمام مکان‌های ریزماهوره به کاررفته در این پژوهش $5/63$ بود. *Mosavi et al.* (2010) بیشترین و کمترین تعداد آلل مؤثر در هر مکان ژنی (N_e) را با $11/37$ و $2/6$ به ترتیب در مکان‌های BPPCT010 و UDP97403 برای 53 رقم بادام گزارش کردند که با نتایج به دست آمده از این پژوهش مطابقت داشت. *Zeinalabedini et al.* (2007) تعداد آلل مؤثر در ارقام بادام را در دامنه $1/918$ برای مکان CPPCT022 و $10/594$ را برای مکان BPPCT010 گزارش کردند. آلل‌های نادر به آلل‌هایی گفته می‌شود که فراوانی بسیار کم داشته باشند (کمتر از ۵ درصد) و به عبارت دیگر مختص به یک یا چند رقم باشد. حضور تعداد زیاد آلل نادر می‌تواند نشان‌دهنده نسبت بالای جهش در مکان‌های ژنی ریزماهوره، تنوع بالای ژنتیکی در نمونه‌های بررسی شده و استفاده از نشانگرهایی با واحدهای تکراری دو نوکلئوتیدی باشد. نتایج به دست آمده نشان داد که تعداد آلل‌های نادر (N_r) در مکان‌های بررسی شده بین ۱ تا ۴ عدد بود. بیشترین تعداد آلل نادر مربوط به مکان UDP97401 با ۴ آلل نادر به دست آمد. میانگین آلل‌های نادر برای تمام مکان‌های

تعداد آلل مشاهده شده در برخی ارقام بادام در دامنه ۳ تا ۱۰ آلل در هر مکان ژنی با میانگین $6/64$ (Shiran *et al.*, 2007) و تعداد ۱ تا ۳ آلل در هر مکان ژنی برای ارقام هلو و نیز ۵ تا ۸ آلل در هر مکان ژنی در بادام (Martinez-Gomez *et al.*, 2003) گزارش شده است. *Baranek et al.* (2006) تعداد ۱۰۶ آلل (متوسط $5/05$ آلل در هر مکان ژنی) در برخی ژنوتیپ‌های جنس پرونوس گزارش کردند. اندازه نمونه، میزان تنوع در نمونه‌ها، روش آشکارسازی و ارزیابی اندازه قطعات از جمله عوامل اختلاف در تعداد آلل‌ها در آزمایش‌های مختلف است. نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که دامنه اندازه آلل بین ۶۷-۲۹۷ جفت باز در بین کل مکان‌های ریزماهوره متغیر بود. دامنه بزرگ‌تر اندازه باندها با استفاده از مکان‌های ریزماهوره هلو روی گونه بادام توسط پژوهشگران مختلف گزارش شده است (Shiran *et al.*, Martinez-Gomez *et al.*, 2003). *Mosavi et al.*, *Zeinalabedini et al.*, 2007, 2007). براساس نتایج به دست آمده تعداد آلل مؤثر در هر مکان ژنی (N_e)، کمتر از تعداد آلل مشاهده شده (N_e) بود. حداکثر تعداد آلل مؤثر در هر مکان ژنی (N_e)، مربوط به مکان pchgms6 با $9/019$ و حداقل تعداد آلل مؤثر مربوط به مکان UDP98406 با $3/74$ بود. همچنین مکان‌های UDP97401، BPPCT007 و BPPCT010 به ترتیب با $8/41$ ، $8/25$ و $8/14$ مقادیر بیشتری از تعداد

تفکیک‌کنندگی ۰/۸۸۹ مربوط به مکان pchgms6 و کمترین میزان آن ۰/۷۳۳ مربوط به مکان UDP98406 بود (جدول ۶). همچنین میانگین قدرت تفکیک‌کنندگی برای تمام مکان‌های ریزماهواره استفاده‌شده در این پژوهش ۰/۸۱۱ بود که نشان‌دهنده انتخاب صحیح آنها و قدرت بالای این مکان‌ها در تفکیک ارقام و ژنوتیپ‌ها از یکدیگر بود. میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) یکی از معیارهای ارزیابی قدرت تمایز نشانگر بوده است و قدرت تفکیک یک نشانگر را براساس تعداد آلل‌ها و فراوانی نسبی آلل نشان می‌دهد. براساس نتایج به‌دست‌آمده میزان PIC برای تمام مکان‌های استفاده‌شده از ۰/۴۸۰ (مکان UDP98406) تا ۰/۷۱۸ (مکان pchgms6) و با میانگین ۰/۶۰۰ متغیر بود (جدول ۶). هتروزیگوسیتی (متفاوت‌بودن آلل‌های یک مکان ژنی) از جمله فاکتورهای مهم در برنامه‌های اصلاحی درختان میوه است که مؤثر بر میزان تنوع ژنتیکی، امکان تلاقی و فرایند انتخاب بوده است و ارتباط نزدیکی با هتروزیس و پس‌روی خویش‌آمیزی دارد. براساس نتایج به‌دست‌آمده بیشترین میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) در بین مکان‌های بررسی‌شده برای تمام ارقام و ژنوتیپ‌ها برابر با ۰/۸۹۶ مربوط به مکان pchgms6 و کمترین میزان آن برابر با ۰/۷۳۸ مربوط به مکان UDP98406 بود. میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) برای مکان‌های ریزماهواره بررسی‌شده ۰/۸۱۷ بود.

هتروزیگوستی مشاهده‌شده (Ho) برای تمام مکان‌های ریزماهواره بررسی‌شده بیشتر از میزان هتروزیگوستی مورد انتظار (He) بود که نشان‌دهنده تنوع بالا در بین ارقام و ژنوتیپ‌های بررسی‌شده بود (جدول ۶). همچنین بالابودن میزان هتروزیگوسیتی مشاهده‌شده (Ho) نسبت به هتروزیگوستی مورد انتظار (He) می‌تواند به‌دلیل عدم وقوع پدیده اینبردینگ، خودناسازگار بودن ارقام و ژنوتیپ‌های بررسی‌شده، گرده‌افشانی آزاد، وجودنداشتن ارقام هموزایگوت و خودسازگار و وجودنداشتن آلل‌های خنثی باشد. نتایج به‌دست‌آمده از بررسی شاخص‌های تنوع ژنتیکی با نتایج Sánchez- Pérez. *et al.* (2002)، Dirlewanger. *et al.* (2004)، Mosavi. *et al.* (2007) و *al.* (2010) مطابقت داشت.

ریزماهواره استفاده‌شده ۱/۷۲ بود (جدول ۵). نتایج به‌دست‌آمده با نتایج Zeinalabedini. *et al.* (2007) که تعداد آلل‌های نادر را در ارقام بررسی‌شده بادام بین ۱ تا ۴ گزارش کرد، مطابقت داشت. همچنین Mosavi. *et al.* (2010) تعداد آلل‌های نادر را در ارقام بادام بررسی‌شده بین ۱ تا ۳ با میانگین ۲/۷۳ برای هر مکان ریزماهواره به کار برده‌شده، گزارش کرد. آلل غالب به آلل‌هایی گفته می‌شود که در بین تمام آلل‌های مشاهده‌شده برای یک مکان ریزماهواره بیشترین فراوانی را دارا باشد. براساس نتایج به‌دست‌آمده، فراوانی آلل غالب بین ۰/۱۵۵ برای مکان pchgms6 تا ۰/۳۷۳ برای مکان UDP98406 بود (جدول ۵). همچنین میانگین فراوانی آلل غالب برای هر مکان ریزماهواره ۰/۲۵۶ بود (جدول ۵). بیشترین فراوانی آللی (۱۱ آلل) مربوط به مکان UDP97401 و کمترین فراوانی آللی (۶ آلل) مربوط به مکان UDP98406 و سه مکان دیگر مشاهده شد (جدول ۵). تعداد و فراوانی آللی، فراوانی آلل غالب و فراوانی آلل نادر برای تمام مکان‌های بررسی‌شده در جدول ۶ ذکر شده است. Mosavi. *et al.* (2010) فراوانی آلل غالب در مکان‌های مطالعه‌شده را از ۰/۱۱ تا ۰/۴۵۳ به‌ترتیب برای مکان‌های BPPCT010 و UDP97403 گزارش کردند. همچنین Zeinalabedini. *et al.* (2007) فراوانی آلل غالب در مکان‌های بررسی‌شده را از ۰/۱۵۷ تا ۰/۷ به‌ترتیب برای BPPCP026 و CPPCP026 در ارقام بادام گزارش کردند. مقایسه تعداد آلل و فراوانی آلل غالب در مکان‌های ژنی مختلف نشان داد که عموماً حداکثر فراوانی آلل غالب مربوط به نشانگرهایی بود که تعداد آلل کمتری داشتند.

شاخص‌های تنوع ژنتیکی

قدرت تفکیک‌کنندگی (PD)، میزان اطلاعات چندشکلی (PIC)، هتروزیگوستی مشاهده‌شده (Ho) و هتروزیگوستی مورد انتظار (He) از جمله شاخص‌های تنوع ژنتیکی محاسبه‌شده در این پژوهش بودند. (جدول ۶). قدرت تفکیک‌کنندگی (PD) احتمال شناسایی ارقام و ژنوتیپ‌ها را توسط یک نشانگر نشان می‌دهد و رابطه مستقیم با میزان چندشکلی مکان ریزماهواره دارد. براساس نتایج به‌دست‌آمده بیشترین میزان قدرت

مکان‌های بررسی شده متغیر بودند (جدول ۶). بیشترین شاخص شانون به میزان ۲/۲۵۰ مربوط به مکان pchgms6 و کمترین میزان آن به مقدار ۱/۴۷۶ مربوط به مکان UDP98406 بود. میانگین شاخص شانون در مکان‌های مطالعه شده ۱/۷۹۸ به دست آمد. شاخص ضریب خودگشایی کل (Fit) و همچنین شاخص تشبیت ژنی (Fin) (جدول ۶) برای تمام مکان‌های بررسی شده کمتر از صفر بود که متأثر از خودناسازگاری و میزان بالای هتروزیگوسیتی مشاهده شده بین ارقام و ژنوتیپ‌های بررسی شده است.

در مجموع مکان‌های pchgms6 و UDP97401 با داشتن تعداد آلل زیاد، تعداد آلل مؤثر، قدرت تفکیک‌کنندگی، میزان اطلاعات چندشکلی، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و شاخص اطلاعاتی شانون بالا، نسبت به سایر مکان‌های بررسی شده کارایی بهتر و مزیت بیشتری داشتند. نتایج به دست آمده درباره مکان‌های ذکر شده برای اولین بار برای ارقام بادام به دست آمده است که می‌تواند به دلیل تنوع بالا بین ارقام بررسی شده باشد.

Zeinalabedini. *et al.* (2007) بیشترین میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار را در مکان BPPCP010 (۰/۹۰۵)، کمترین مقدار را در مکان CPPCT022 (۰/۴۷۸) و میانگین آن را در هر مکان ۰/۷۹۱ گزارش کردند. همچنین Mosavi. *et al.* (2010) بیشترین هتروزیگوسیتی مورد انتظار در ۵۵ رقم و ژنوتیپ بادام بررسی شده را در مکان BPPCT010 (۰/۹۲۱)، کمترین مقدار را در مکان UDP97403 (۰/۶۳۱) و میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار را برای تمام ارقام و ژنوتیپ در مکان‌های بررسی شده ۰/۸۱۵ گزارش کردند.

شاخص‌های تمایز ژنتیکی

شاخص شانون (I) به منزله معیاری برای اندازه‌گیری میزان آلل‌های چندشکل در یک مکان است. همچنین شاخص شانون برای محاسبه اطلاعات نشانگر به کار می‌رود و بیان‌کننده میزان مشارکت آللی در تفکیک ژنوتیپ‌های مطالعه شده است. مقادیر بالای این شاخص بیانگر قدرت مکان نشانگر در تفکیک درست نمونه‌هاست. نتایج به دست آمده نشان داد که دامنه تغییرات شاخص اطلاعات شانون از ۱/۴۷۶ تا ۲/۲۵۰ در

جدول ۵. دامنه اندازه و تعداد آلل مشاهده شده، مؤثر، نادر و فراوانی آلل غالب در مکان‌های ریزماهوره بررسی شده در برخی ارقام و

ژنوتیپ‌های بادام

ردیف	مکان (نشانگر)	دامنه اندازه آلل (جفت باز)	تعداد آلل مشاهده شده (Na)	تعداد آلل مؤثر (Ne)	تعداد آلل نادر (Nr)	فراوانی آلل غالب
۱	BPPCP 010	۱۰۱-۱۰۶	۶	۴/۷۲۳	۱	۰/۲۷۹
۲	BPPCT 007	۱۳۰-۱۷۲	۱۰	۸/۲۵۷	۱	۰/۱۸۴
۳	BPPCT 010	۱۳۳-۱۷۱	۱۰	۸/۱۴۱	۲	۰/۱۴۷
۴	EPDCU4658	۱۵۹-۲۸۹	۸	۵/۴۶۴	۳	۰/۲۳۹
۵	EPPCU0863	۱۴۰-۱۶۰	۷	۵/۵۸۳	۱	۰/۲۴۶
۶	MA040a	۱۴۷-۲۱۷	۸	۵/۷۷۴	۱	۰/۲۳۹
۷	MA027a	۱۱۱-۲۹۷	۸	۶/۰۴۴	۲	۰/۲۰۸
۸	pchgms6	۱۶۹-۲۱۰	۱۰	۹/۰۱۹	۱	۰/۱۵۲
۹	UDP96001	۱۰۲-۱۳۲	۷	۵/۲۷۵	۱	۰/۲۷۶
۱۰	UDP96003	۱۲۰-۱۹۴	۶	۴/۴۸۱	۱	۰/۲۶۵
۱۱	UDP96008	۱۴۰-۱۵۷	۷	۵/۳۹۹	۱	۰/۲۷۲
۱۲	UDP97401	۱۴۳-۱۹۰	۱۱	۸/۴۱۴	۴	۰/۱۷۲
۱۳	UDP97403	۹۷-۱۴۵	۶	۳/۸۰۱	۱	۰/۳۵۴
۱۴	UDP98405	۱۰۰-۱۱۸	۷	۵/۱۰۷	۲	۰/۲۶۵
۱۵	UDP98406	۷۹-۱۰۸	۶	۳/۷۴۲	۱	۰/۳۷۳
۱۶	UDP98408	۱۰۸-۱۳۴	۶	۵/۰۷۸	۱	۰/۲۵۴
۱۷	UDP98409	۱۵۲-۱۷۱	۶	۴/۵۷۱	۲	۰/۲۷۹
۱۸	UDP98410	۱۳۱-۱۷۷	۸	۴/۰۷۶	۳	۰/۳۵۲
۱۹	UDP98412	۱۲۵-۱۸۰	۷	۴/۴۸۰	۳	۰/۳۰۶
۲۰	UDP98414	۱۲۴-۱۶۰	۷	۴/۵۱۳	۲	۰/۳۰۹
۲۱	UDP98021	۱۵۱-۱۶۱	۸	۵/۴۹۸	۳	۰/۲۵۷
۲۲	UDP98024	۶۷-۹۰	۸	۶/۳۴۵	۱	۰/۲۰۱
	میانگین	۱۲۴-۱۷۰	۷/۵۹	۵/۶۳	۱/۷۲	۰/۲۵۶

جدول ۶. شاخص‌های تنوع و تمایز ژنتیکی در مکان‌های ریزماهوره بررسی شده در برخی ارقام و ژنوتیپ‌های بادام

ردیف	مکان	Ho	He	I	Fit	PD	PIC	Fis
۱	BPPCP 010	۱/۰۰۰	۰/۷۹۴	۱/۶۴۰	-۰/۲۶۹	۰/۷۸۸	۰/۵۴۰	-۰/۲۶۹
۲	BPPCT 007	۱/۰۰۰	۰/۸۸۵	۲/۱۸۲	-۰/۱۳۹	۰/۸۷۹	۰/۷۰۰	-۰/۱۳۸
۳	BPPCT 010	۱/۰۰۰	۰/۸۸۴	۲/۱۵۶	-۰/۱۴۰	۰/۸۷۷	۰/۷۰۰	-۰/۱۴۰
۴	EPDCU4658	۱/۰۰۰	۰/۸۲۳	۱/۷۹۹	-۰/۲۲۴	۰/۸۱۷	۰/۵۸۳	-۰/۲۲۴
۵	EPPCU0863	۱/۰۰۰	۰/۸۲۷	۱/۸۰۵	-۰/۲۱۸	۰/۸۲۱	۰/۶۰۰	-۰/۲۱۸
۶	MA040a	۱/۰۰۰	۰/۸۳۳	۱/۸۶۷	-۰/۱۹۱	۰/۸۲۷	۰/۶۱۳	-۰/۱۹۱
۷	MA027a	۰/۹۸۵	۰/۸۴۱	۱/۸۹۰	-۰/۱۹۸	۰/۸۳۵	۰/۷۰۰	-۰/۱۹۸
۸	Pchgms6	۱/۰۰۰	۰/۸۹۶	۲/۲۵۰	-۰/۱۲۵	۰/۸۸۹	۰/۷۱۸	-۰/۱۲۵
۹	UDP96001	۱/۰۰۰	۰/۸۱۶	۱/۷۷۸	-۰/۲۳۴	۰/۸۱۰	۰/۶۰۰	-۰/۲۳۴
۱۰	UDP96003	۱/۰۰۰	۰/۷۸۳	۱/۵۸۸	-۰/۲۶۸	۰/۷۷۷	۰/۵۲۱	-۰/۲۶۸
۱۱	UDP96008	۰/۹۸۴	۰/۸۲۱	۱/۷۸۲	-۰/۲۷۷	۰/۸۱۵	۰/۵۸۳	-۰/۲۲۷
۱۲	UDP97401	۱/۰۰۰	۰/۸۸۸	۲/۲۲۲	-۰/۱۳۵	۰/۸۸۱	۰/۷۰۳	-۰/۱۳۵
۱۳	UDP97403	۱/۰۰۰	۰/۷۴۳	۱/۵۰۷	-۰/۳۵۷	۰/۷۳۷	۰/۴۸۷	-۰/۳۵۷
۱۴	UDP98405	۱/۰۰۰	۰/۸۱۰	۱/۷۳۴	-۰/۲۴۳	۰/۸۰۴	۰/۵۶۴	-۰/۲۴۳
۱۵	UDP98406	۱/۰۰۰	۰/۷۳۸	۱/۴۷۶	-۰/۳۶۵	۰/۷۳۳	۰/۴۸۰	-۰/۳۶۵
۱۶	UDP98408	۱/۰۰۰	۰/۸۰۹	۱/۶۹۲	-۰/۲۴۵	۰/۸۰۳	۰/۵۶۰	-۰/۲۴۵
۱۷	UDP98409	۱/۰۰۰	۰/۷۸۷	۱/۵۸۱	-۰/۲۸۰	۰/۷۸۱	۰/۵۲۴	-۰/۲۸۰
۱۸	UDP98410	۱/۰۰۰	۰/۷۶۱	۱/۵۷۳	-۰/۳۲۵	۰/۷۵۵	۰/۵۰۲	-۰/۳۲۵
۱۹	UDP98412	۱/۰۰۰	۰/۷۸۳	۱/۶۲۸	-۰/۲۸۷	۰/۷۷۷	۰/۵۲۶	-۰/۲۸۷
۲۰	UDP98414	۱/۰۰۰	۰/۷۸۴	۱/۶۵۵	-۰/۲۸۵	۰/۷۷۸	۰/۵۳۲	-۰/۲۸۵
۲۱	UDP98021	۱/۰۰۰	۰/۸۲۴	۱/۸۲۵	-۰/۲۲۲	۰/۸۱۸	۰/۶۰۰	-۰/۲۲۲
۲۲	UDP98024	۱/۰۰۰	۰/۸۴۹	۱/۹۳۲	-۰/۱۸۷	۰/۸۴۲	۰/۶۲۷	-۰/۱۸۷
	میانگین	۰/۹۹۸	۰/۸۱۷	۱/۷۹۸	-۰/۲۳۱	۰/۸۱۱	۰/۶۰۰	-۰/۲۳۵

Ho: هتروزایگوسیتی مشاهده شده؛ Fit: شاخص خودگشنی PD: قدرت تفکیک کنندگی.
He: هتروزایگوسیتی مورد انتظار PIC: میزان اطلاعات چندشکلی؛ I: شاخص اطلاعاتی شانون.

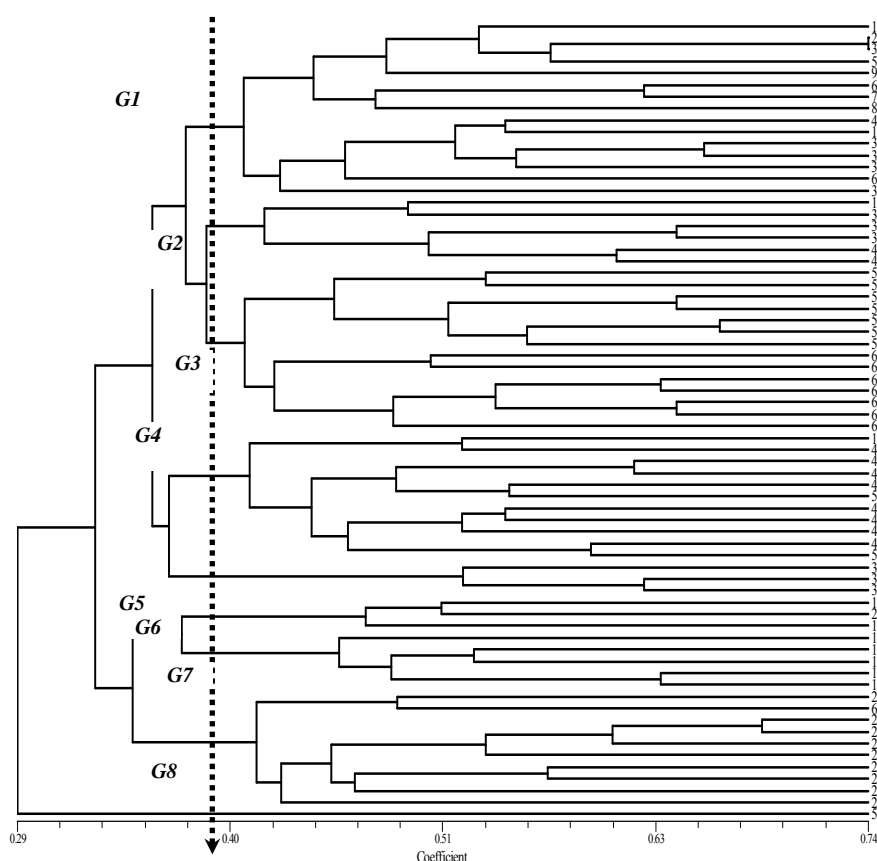
ماتریس تشابه

یکسان و ژنوتیپ خودسازگاری مشابه (S_1S_j) داشتند، میزان تشابه ۰/۵۰ را نشان دادند. همچنین میزان تشابه رقم 'شکوفه' با رقم 'نان پاریل' ۰/۳۵ بود. طبق گزارش‌های قبلی که رقم 'شکوفه' احتمالاً از تلاقی ارقام آی × نان پاریل به وجود آمده است با این حال نتایج به دست آمده این موضوع را تأیید نمی‌کند. وجود شباهت‌های ژنتیکی بین برخی ژنوتیپ‌ها و ارقام به دلیل یکسان بودن منشأ جغرافیایی و تکثیر بذری این ارقام است. همچنین دلیل تشابه بالای برخی ژنوتیپ‌ها مثل '۱۴-۲۴' (۰/۶۸) و '۲-۲۹' (۰/۶۶) با رقم 'نی پلاس اولترا' بیانگر این نکته است که احتمالاً در برنامه دورگ‌گیری یکی از والدین این ژنوتیپ‌ها رقم 'نی پلاس اولترا' بوده و یا اینکه از یک کلون مشابه هستند. تشابه نسبتاً زیاد بین ژنوتیپ‌های '۵-۱۷' و '۱-۲۱' نیز شاید به دلیل این است که احتمالاً یک ژنوتیپ یکسان بوده و یا یک کلون باشند. وجود تشابه ژنتیکی بالا بین

نتایج حاصل از ماتریس تشابه دایس نشان داد که کمترین تشابه (۰/۱۳۶) بین ژنوتیپ '۲-۷' با 'مشهد ۳' و 'پرلیس' و همچنین ژنوتیپ '۴-۸' با 'دیررس ساوجبلاغ' و 'آذر' وجود داشت. بیشترین تشابه (۰/۷۴) بین ژنوتیپ‌های '۵-۱۷' و '۱-۲۱' بود. همچنین رقم 'نی پلاس اولترا' با ژنوتیپ '۱۴-۲۴' (۰/۶۸) و '۲-۲۹' (۰/۶۶)، 'میرپنج تهران' با 'پاکوتاه شماره ۱ طالقان' (۰/۶۵)، 'نان پاریل' با '۱۶-۲۵' (۰/۶۳) نیز تشابه بالایی داشتند. متوسط تشابه بین ارقام و ژنوتیپ‌ها نیز ۰/۴۲ بود. ژنوتیپ 'نی پلاس اولترا' حداقل تشابه را با سایر ارقام نشان داد و ضرایب تشابه بین این ژنوتیپ و سایر ارقام و ژنوتیپ‌ها کمتر از ۴۰ درصد (۰/۳۱) بود. این موضوع بیانگر دوربودن این رقم با اکثر ارقام و ژنوتیپ‌های داخلی و بومی بود. براساس نتایج ماتریس تشابه، دو رقم 'تونو' و 'ژینکو' که منشأ جغرافیایی

مورفولوژیکی (ارائه نشده‌اند) و مولکولی حاصل از نشانگرهای ریزماهواره برای ۶۸ رقم و ژنوتیپ بادام بررسی شده در این پژوهش انجام شد. نتایج نشان داد که همبستگی بین ماتریس تشابه داده‌های مورفولوژیکی و مولکولی معنادار نبود و میزان آن $r=0/10$ به دست آمد.

ارقام یلدا و 'نی پلاس اولترا'، 'فرانسیس' با 'شاهرود ۱۲' و 'سهند' با 'زرقان ۸' توسط Mosavi. *et al.* (2010) گزارش شده است. همچنین وجود مشابهت ژنتیکی بالا بین برخی ارقام بادام مثل 'سفید' با 'منقا'، 'شاهرود ۱۸' با 'نان پاریل' و 'شاهرود ۱۶' با 'تاردی نان پاریل' توسط Shiran. *et al.* (2007) گزارش شده است. همچنین مقایسه ماتریس‌های تشابه داده‌های



شکل ۱. گروه‌بندی ۶۸ نمونه بادام با استفاده از ضرایب تشابه دایس و روش UPGMA (نام ارقام و ژنوتسها در جدول ۱ آمده است).

تجزیه کلاستر

۶، 'ژینکو'، 'زرقان ۸'، 'میرپنج تهران'، 'پاکوتاه شماره ۱ طالقان'، 'مشهد ۹'، 'نو ۲' و 'پرلیس ۳' بود. ژنوتیپ‌های '۵-۱۷' و '۱-۲۱' در یک شاخه و در فاصله ۰/۷۴ و کاملاً در کنار یکدیگر قرار گرفتند. این وضعیت بین ۶۸ رقم و ژنوتیپ بررسی شده فقط برای این دو ژنوتیپ در تجزیه کلاستر به وجود آمد. دو رقم

کلاستر حاصل از ماتریس تشابه دایس که با روش UPGMA حاصل شد، در فاصله ۰/۴۰ ارقام و ژنوتیپ‌ها را در ۸ گروه، تفکیک کرد (شکل ۱). کلاستر حاصله نشان داد که تنوع قابل توجهی بین ارقام و ژنوتیپ‌ها وجود دارد. همچنین کلاسترهای اصلی زیرگروه‌های فرعی داشتند. **گروه اول:** شامل ارقام و ژنوتیپ‌های '۱-۱۱'، '۵-۱۷'، '۱-۲۱'، '۵-۶'، '۳-۱۷'، '۴-

1. Genco
2. Tuono
3. Peerless

مهم جدا شدن دو ژنوتیپ 'یزد ۱۰۳' و 'یزد ۱۳' از سایر ژنوتیپ‌های استان یزد بود. همچنین در این کلاستر ژنوتیپ 'پاکوتاه شماره ۲ طالقان' قرار گرفت که کاملاً از نظر منشاء جغرافیایی با سایر ژنوتیپ‌های این گروه متفاوت بود. **گروه پنجم:** این گروه تعداد کمی از ژنوتیپ‌ها را شامل شد و از طرفی نسبتاً نزدیک به ژنوتیپ‌های گروه چهارم بودند. ژنوتیپ‌های این گروه شامل '۱۳-۳۴'، 'مشهد ۱۰' و 'مشهد ۶' بود. **گروه ششم:** شامل ارقام و ژنوتیپ‌های 'روبی ۱'، '۳-۱۶' و 'میشن ۲' بود. به نظر می‌رسد والدین ژنوتیپ '۳-۱۶' احتمالاً یکی از دو رقم 'روبی' یا 'میشن' است. هرچند قضاوت در این مورد نیاز به بررسی بیشتر دارد. **گروه هفتم:** شامل ارقام و ژنوتیپ‌های '۷-۹'، 'بوتی ۲'، '۱۲-۲۶'، 'نان پاریل ۴'، '۱۶-۲۵' بود. ژنوتیپ‌های این گروه نیز احتمالاً منشاء گرفته از ارقام امریکایی 'بوتی' و 'نان پاریل' باشند. **گروه هشتم:** شامل ارقام و ژنوتیپ‌های '۲-۹'، '۱۴-۲۴'، 'شاهرود ۱۲'، 'نی پلاس اولترا ۵'، '۲-۲۹'، '۹-۳۲'، 'پرایس ۶'، '۴-۸'، 'D-۹۹'، '۲-۷' و 'ارومیه ۵۴' بود. با توجه به نتایج به دست آمده از تجزیه کلاستر گروه‌بندهای مختلفی از ارقام و ژنوتیپ‌های داخلی، ارقام امریکایی و اروپایی و ترکیبی از هر سه گروه نشان‌دهنده این مطلب است که رابطه نزدیک بین ارقام و ژنوتیپ‌ها وجود دارد. از طرفی با توجه به اینکه منشاء ارقام کشت شده و تجاری بادام گونه *P. dulcis* است می‌تواند این ارتباط نزدیک توجیه شود. به‌طور کلی، تجزیه کلاستر منشاء اکثر ژنوتیپ‌های حاصل از برنامه‌های اصلاحی را که در این پژوهش بررسی شدند را نشان داد. دلیل این امر نزدیک بودن این ژنوتیپ‌ها به ارقام خاص در تجزیه کلاستر بود. Shiran. et al. (2007) با استفاده از ۱۸ جفت آغازگر ریزماهورهای (مربوط به هلو)، تنوع ژنتیکی ۳۶ رقم بادام اهلی به همراه سه گونه وحشی آن را مطالعه کردند و گروه‌بندی

اروپایی 'تونو' و 'ژینکو' نیز با توجه به منشاء جغرافیایی و ژنتیکی آنها در کلاستر مشابه قرار گرفتند که مشابه نتایج Martinez-Gomez و همکاران (2003) بود. نکته قابل توجه قرار گرفتن رقم 'پرلیس' در این کلاستر است که جدا از سایر ارقام امریکایی قرار گرفت. این احتمال وجود دارد که در نامگذاری رقم مذکور اشتباه شده است. همچنین جدا شدن دو ژنوتیپ طالقان از یکدیگر با وجود مشابه بودن منشاء جغرافیایی این دو ژنوتیپ از جمله نتایج قابل توجه بود. ژنوتیپ 'مشهد ۹' نیز جدا از سایر ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده از منطقه خراسان قرار گرفت. همچنین قرارگیری ژنوتیپ‌های '۱۰-۱۱'، '۵-۱۷'، '۱-۲۱'، '۵-۶'، '۳-۱۷'، '۴-۶' و 'زرقان ۸' در این زیرشاخه احتمالاً به دلیل منشأ گرفتن آنها از یک کلون است. **گروه دوم:** در این گروه بیشتر ژنوتیپ‌های استان یزد همراه با دو ژنوتیپ از آذربایجان غربی قرار گرفتند. این ژنوتیپ‌ها شامل '۳-۱۲'، 'ارومیه ۶۸'، 'ارومیه ۹۸'، 'یزد ۴۴۴'، 'یزد ۳۱۸' و 'یزد ۶۰' بودند. نتایج به دست آمده منطبق با منشاء جغرافیایی و تشابه ژنتیکی این ژنوتیپ‌ها بود. هر چند در این کلاستر نیز ژنوتیپ '۳-۱۲' جدا از سایر ژنوتیپ‌های ایستگاه تحقیقاتی کمال‌آباد قرار گرفت. **گروه سوم:** این کلاستر نسبت به سایر کلاسترها تعداد بیشتری از ارقام و ژنوتیپ‌ها را شامل شد. ژنوتیپ‌های استان‌های همدان، قزوین و آذربایجان شرقی همراه با برخی دیگر از ژنوتیپ‌ها از کرمان در این کلاستر قرار گرفتند. ارقام و ژنوتیپ‌های این گروه شامل 'دیررس ساوجبلاغ'، 'برگ‌درشت همدان'، 'شال قزوین'، 'پاکوتاه رزن'، 'بهار همدان'، 'برگ‌سیاه قزوین'، 'سهند'، 'هیبرید هلو و بادام'، 'آذر'، 'پسره قزوین'، 'کرمان ۱۶'، 'کرمان ۲۰'، 'کرمان ۵' و 'شکوفه' بود. نکته قابل توجه قرار گرفتن ژنوتیپ 'هیبرید هلو و بادام' در این گروه بود. هرچند این ژنوتیپ در زیرکلاستر جداگانه نسبت به سایر ژنوتیپ‌های این کلاستر قرار گرفت. **گروه چهارم:** در این گروه بیشتر ژنوتیپ‌های استان‌های فارس و خراسان به همراه برخی ژنوتیپ دیگر قرار گرفتند. این ارقام و ژنوتیپ‌ها شامل: '۲-۲۷'، 'مشهد ۴'، 'یزد ۱۰۳'، 'زرقان ۲۶'، 'مشهد ۳'، 'یزد ۱۳'، 'پاکوتاه شماره ۲ طالقان'، 'زرقان ۳'، 'مشهد ۷' و 'زرقان ۷' بود. نکته

1. Ruby
2. Mission
3. Butte
4. Non Pareil
5. Ne Plus Ultra
6. Price

تجزیه کلاستر ارقام بررسی شده را به خوبی از یکدیگر تفکیک کرد و با نتایج تجزیه به مختصات اصلی همپوشانی داشتند و هر دو تنوع بالایی را بین ارقام بادام نشان دادند که همسو با نتایج به دست آمده در این پژوهش بود.

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش با بررسی تنوع و ارتباط ژنتیکی ۶۸ رقم و ژنوتیپ بادام با استفاده از ۲۲ آغازگر نشانگر ریزماهواره (SSR) در مجموع ۱۶۷ آلل چندشکل، بین ۴ تا ۱۱ آلل و با میانگین آللی ۷/۶۰ برای هر مکان، به دست آمد. مکان‌های pchgms6 و UDP97401 از نظر تعداد آلل و برخی شاخص‌های تنوع و تمایز ژنتیکی کارایی بهتر و مزیت بیشتری نسبت به سایر مکان‌های بررسی شده داشتند. براساس ماتریس تشابه، بیشترین تشابه (۰/۷۴) بین ژنوتیپ‌های '۵-۱۷' و '۱-۲۱' و کمترین تشابه (۰/۱۴) بین ژنوتیپ‌های '۲-۷' و 'مشهد ۳' مشاهده شد. تجزیه خوشه‌ای براساس روش UPGMA و ضرایب تشابه دایس ارقام و ژنوتیپ‌های بررسی شده را در فاصله تشابه ۰/۴۰ به ۸ گروه اصلی تقسیم کرد. براساس نتایج تجزیه خوشه‌ای ارقام و ژنوتیپ‌ها به خوبی از یکدیگر تفکیک شدند. نتایج به دست آمده نشان دهنده این موضوع است که برخی ژنوتیپ‌های بررسی شده منشأ یکسان دارند و ممکن است از یک کلون باشند. از طرفی تشابه کم ارقام و ژنوتیپ‌های داخلی با ارقام خارجی منطقی به نظر می‌رسد اما تشابه کم بین برخی ژنوتیپ‌های داخلی علاوه بر منشأ جغرافیایی سایر دلایل ژنتیکی نیز می‌تواند داشته باشد.

براساس ضریب تشابه جاکارد و به روش UPGMA پس از جدایی دو گونه وحشی *A. orientalis* و *A. scoparia*، ارقام و ژنوتیپ‌های باقی مانده را در فاصله ژنتیکی ۰/۷۱ به دو گروه اصلی تفکیک کرد. در دندروگرام به دست آمده یک گروه اصلی مشاهده شد که شامل تمام ارقام *P. dulcis* و *P. communis* بود در حالی که *P. orientalis* در فاصله کمتر از ۰/۴۲ در کلاستر جداگانه قرار گرفتند. این نتایج با یافته‌های به دست آمده از این پژوهش مطابقت داشت. نتایج Shiran. et al. (2007) نشان داد که در گروه ارقام *P. dulcis* یک کلاستر فرعی از ارقام ایرانی، امریکایی و اروپایی و یا مخلوطی از ارقام خارجی به دست آمد که نشان دهنده رابطه نزدیک این ارقام با یکدیگر است. این نتایج در پژوهش حاضر نیز با توجه به گروه‌های مختلف به دست آمده از تجزیه کلاستر مشاهده شد. تنوع ژنتیکی ارقام بادام منشأ گرفته از گونه *P. dulcis* بالا بوده و ممکن است تمام ارقام بررسی شده از همدیگر متمایز شوند (Martinez-2003 Gomez et al.,). بین ارقام خارجی و ایرانی براساس منشأ جغرافیایی و روابط خویشاوندی ژنوتیپی یک نوع وابستگی وجود داشت. این مورد یک نشان خوب از درستی نتایج به دست آمده بود که اهمیت ویژه آن برای بررسی ارقام ایرانی و ارقام ناشناخته و تنوع ژنتیکی، روابط والدینی و منشأ ناشناخته این ارقام است. Mosavi. et al. (2010) تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی بین ۵۳ رقم بادام ایرانی و خارجی را با استفاده از ۱۵ مکان ریزماهواره هلو ارزیابی کردند. براساس نتایج آنها تجزیه کلاستر در فاصله ۰/۲۷ کلیه ارقام را به هفت گروه اصلی تقسیم کرد که هر گروه نیز چندین زیرگروه داشت. همچنین نتایج آنها نشان داد که

REFERENCES

1. Badenes, M.L. & Parfitt, D.E. (1995). Phylogentic relationships of cultivated *Prunus* species from an analysis of chloroplast DNA variation. *Theoretical and Applied Genetics*, 90, 1035–1041.
2. Baranek, M., Raddova, J. & Pidra, M. (2006). Comparative analysis of genetic diversity in *prunus* L. as revealed by RAPD and SSR markers. *HortScience*, 108, 253-2598.
3. Cipriani, G., Lot, G., Huang, W.G., Marrazzo, M.T., Peterlunger, E. & Testolin, R. (1999). AC/GT and AG/CT microsatellites repeats in peach (*Prunus persica* L. Batsch): isolation, characterization and cross-species amplification in *Prunus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 100, 713–722.
4. Dirlwanger, E., Crosson, A., Tavaud, P., Aranzana, M.J., Poizat, C., Zanetto, A., Arús, P., & Laigret, L. (2002). Development of microsatellite markers in peach and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry. *Theoretical and Applied Genetics*, 105, 127–138.
5. FAO. (2007). FAOSTAT database results. <http://faostat.Fao.org/faostat.servlet>.

6. Howad, W., Yamamoto, T. & Dirlwanger, E. (2005). Mapping with a few plants: Using selective mapping for microsatellite saturation of the Prunus reference map. *Genetics*, 171, 1305-1309.
7. Kester, D. E., & Gradziel, T. M. (1996). Almonds, in: Janick J., Moore J. N. (Eds.), *Fruit Breeding*. Vol. 3. Nuts, John Wiley and Sons, New York, pp: 1-97.
8. Kester, D.E., Gradziel, T.M. & Grasselly, C. (1991). Almonds (*Prunus*). In: Moore, J.N., Ballington, H.J. (Eds.). Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops. *International Society for Horticultural Science*, the Netherlands, pp: 701-758.
9. Kimura, M. & Crow, J.F. (1964). The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 42, 725-738.
10. Martinez-Gomez, P., Arulsekhar, S., Potter, D. & Gradziel, T.M. (2003). An extended interspecific gene pool available to peach and almond breeding as characterized using simple sequence repeat (SSR) markers. *Euphytica*, 131, 313-322.
11. Martinez-Gomez, P., Sanchez-Perez, R., Dicenta, F., Howad, W., Arus, Pand and Gradziel, T.M. (Eds.).(2007). Fruits and nuts. Vol.4.Almond. Kole, C. *Genome mapping and molecular breeding in plants*. pp:229-242.
12. Mosavi, A., Fatahi, R., Zamani, Z. & Imani, A. (2010). Evaluation of genetic diversity and identification of self-incompatibility alleles in some almond genotypes and cultivars. *Ph.D. thesis*, Department of Horticultural Sciences, Collage of Agriculture & Natural Resources. University of Tehran, 292p.
13. Murray, M. & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8, 4321- 4325.
14. Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided population. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 70, 3321-3323.
15. Nei, M. (1978). Estimation of average hetrozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, 583-590.
16. Nei, M.(1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, USA.
17. Sanchez-Perez, R., Dicenta, F., Gradziel, T. M., Arus, P. & Martinez-Gomez, P. (2004). Application of molecular markers in almond breeding programmes. *Nucis-Newsletter*, 12, 9-12.
18. Sanchez-Perez, R., Ruiz, D., Dicenta, F., Egea, J. & Marinez-Gomez, P. (2005). Application of simple sequence repeat (SSR) markers in apricot breeding: molecular characterization, protection, and genetic relationships. *Scientia Horticulturae*, 103, 305-315.
19. Shannon, C.E. & Weaver, W. (1949). *The Mathematical Theory of Communication*. University of Illinois Press, Urbana, Illinois, USA.
20. Shiran, B., Amirbakhhtiar N., Kiani, S., Mohammadi, Sh., Sayed Tabatabaei, E. & Moradi, T. (2007). Molecular charactrization and genetic relationship among almond cultivars assessed by RAPD and SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 111, 280-292.
21. Testolin, R., Marrazzo, T., Cipriani, G., Quarta, R., Verde, I., Dettori, M.T., Pancaldi, M. & Sansavini, S. (2000). Microsatellite DNA in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and its use in fingerprint- ing and testing the genetic origin of cultivars. *Genome*, 43, 512-520.
22. Wang, Y., Georgi, L.L., Zhebentyayeva, N., Reig hard, G.L., Scorza, R. & Abbott, A.G. (2002). Highthrough put targeted SSR marker development in peach. *Genome*, 45, 319-328.
23. Wright, S. (1978). *Variability within and Among Natural Populations*. Vol.4. The Univ. of Chicago Press, Chicago, USA.
24. Wunsch, A. & Hormaza, J.I. (2002). Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. *Euphytica*, 125, 56-67.
25. Xie, H., Sui, Y., Chang, F.Q., Xu, Y. & Ma, R.C. (2006). SSR allelic variation in almond. *Theoretical and Applied Genetics*, 112, 366-372.
26. Xu, Y., Ma, R.C., Xie, H. & Cao, M.Q. (2004). Development of SSR markers for the phylogenetic analysis of almond trees from China and the Mediterranean region. *Genome*, 47, 1091-1104.
27. Yamamoto, T., Mochida, K., Imai, T., Shi, Y. Z., Ogiwara, I. & Hayashi, T. (2002). Microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] derived from an enriched genomic and cDNA libraries. *Molecular Ecology Notes*, 2, 298-301.
28. Yeh, F.C., Yang, R.C. & Boyle, T. (1997). POPGENE. CIFOR and University of Alberta, Canada, Version 1.31
29. Zeinalabedini, M., Majourhat, K., Khayam-Nekoui, M. Grigorian, V., Torchi, M. Dicenta, F. & Martinez-Gomez, P. (2007). Molecular characterization of almond cultivars and related wild species using nuclear and chloroplast DNA markers. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 5(3&4), 242-247.