مقاله پژوهشی

نشریه علمی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران | شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijrfpbgr.2021.353621.1377
جلد ۳۰، شماره ۱، صفحه ۵۵-۳۹ (۱۴۰۱) | شناسه دیجیتال (DOR): 20.1001.1.17350891.1401.30.1.3.7

ارزیابی ژنتیکی گونه‌های وحشی و تجاری پسته براساس خصوصیات ریخت‌شناختی و نشانگرهای مولکولی RAPD-PCR

فرحناز نریمانی[۱]، جواد عرفانی‌مقدم[۲*] و علی اشرف مهرابی[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام.
۲*- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام. پست‌الکترونیک:j.erfani@ilam.ac.ir
۳- دانشیار، بخش تحقیقات زیست فناوری منابع طبیعی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۴/۲۳

چکیده

در این پژوهش، ۴۴ ژنوتیپ و رقم از سه گونه متعلق به جنس *Pistacia* شامل *P. atlantica* (۱۵نمونه)، *P. khinjuk* (۲۳ نمونه) و *P. vera* (۶ رقم) که از بخش‌های مختلف استان ایلام و سمنان جمع‌آوری شده بودند بر اساس صفات برگ و میوه ارزیابی شدند. نتایج ارزیابی صفات ریختی نشان داد تنوع (ضریب تغییرات فنوتیپی) بالایی در صفات مرتبط با میوه در مقایسه با صفات برگ بین گونه ها وجود داشت. نتایج تجزیه به عامل‌ها نشان داد، ۳ عامل اصلی ۹۴/۰۴٪ واریانس کل بین نمونه‌ها را توجیه نمودند. در تجزیه به عامل ها، وزن میوه، قطر و طول میوه، وزن مغز و وزن پوسته سخت جزء صفات مهم و تاثیرگذاری بودند که در عامل اول قرار گرفتند و نزدیک به ۵۲٪ واریانس کل را توجیه نمودند. نتایج به دست آمده از تجزیه خوشه‌ای، نمونه‌های مورد بررسی را به سه گروه اصلی تقسیم کرد به طوری که نمونه‌های متعلق به هر گونه در گروه‌های مجزا تفکیک شدند. همچنین، در بخش دوم این آزمایش، تنوع ژنتیکی بین نمونه ها با ۱۲ آغازگر RAPD بررسی شد. در مجموع ۷۱ آلل شناسایی شدند و اندازه آلل‌ها در محدوده ۲۸۰ تا ۲۵۰۰ جفت باز متغیر بود. تعداد آلل مشاهده شده برای هر مکان از ۴ آلل (OPA-16 و OPA-18) تا ۹ آلل (Custom-primer) با میانگین ۵/۹۱ آلل برای هر مکان بود. شاخص محتوی چندشکلی (PIC) برای مکان OPB-14 بیشترین (۰/۴۸۳) و برای مکان OPA-13 کمترین مقدار (۰/۰۸۹) و میانگین آن ۰/۳۵ در بین همه مکان‌های RAPD بود. دامنه تشابه ژنتیکی ژاکارد میان نمونه‌ها از ۰/۲۷ تا ۰/۸۴ ثبت شد. نتایج حاصل از این پژوهش، در طبقه بندی، حفاظت و شناسایی منابع ژنتیکی پسته کمک می‌کند و می‌تواند در برنامه‌های به نژادی این محصول موثر باشد.

واژه‌های کلیدی: آلل، تجزیه خوشه‌ای، تنوع ژنتیکی، تنوع ریختی، چند شکلی

مقدمه

گونه‌های مختلف پسته به‌عنوان یکی از مهمترین محصولات باغی و جنگلی از اهمیت اقتصادی و تجاری زیادی برخوردار است. تشخیص دقیق و مطمئن ژنوتیپ‌های گیاهی به‌ویژه ژرم‌پلاسم‌های وحشی پسته در اجرای برنامه-های اصلاحی و حفظ ذخایر ژنتیکی اهمیت بالایی دارد. به‌طوری‌که ارزیابی تنوع ژنتیکی برای شناسایی ژن‌های مختلف و برآورد فاصله بین افراد و جمعیت‌ها، همچنین

تعیین میزان هتروزیس بسیار ضروریست. با وجود اینکه ایران دارای غنی‌ترین ذخایر ژنتیکی پسته در جهان می‌باشد، مطالعات اندکی بر روی پسته‌های وحشی در مناطق پسته خیز ایران انجام شده است (Tayefeh Ali Akbarkhany *et al*., 2013).

گونه‌های پسته وحشی ازجمله نمونه‌های با ارزشی هستند که در بسیاری از نقاط کشور ایران سطح قابل توجهی را به خود اختصاص داده است. این گونه‌ها به لحاظ اقتصادی از نظر تولید صمغ (سقز) و استفاده از آن در تولید انواع مواد دارویی و بهداشتی، تولید میوه در تغذیه، شاخ و برگ آن در تولید علوفه دام و چه به لحاظ نقش آن در حفاظت خاک و جلوگیری از فرسایش، تلطیف آب و هوای منطقه، تأمین آبهای زیرزمینی، مأمن و ماوای حیات‌وحش و همین طور مقاومت بسیار بالای آن در تحمل خشکی و سایر شرایط نامناسب اقلیمی از ارزش و اهمیت خاصی در کشور برخوردار است. بنابراین شناسایی و بررسی دقیق این گونه‌ها و مشخصات رویشگاهی و تعیین دقیق سطح پراکنش آن در مناطق مختلف کشور برای اجرای برنامه‌های توسعه از ضرورتی خاص برخوردار است (Zahedipour *et al*., 2005). در مناطق کوهستانی ایران، به‌ویژه دامنه‌های زاگرس، درخت بنه به فراوانی یافت می‌شود، به‌طوری‌که حدود ۲/۵ میلیون هکتار از جنگل‌های ایران، جنگل‌های بنه هستند. ایلام دارای ۵۰۰ هزار هکتار جنگل است که ۲۰۰ هزار هکتار آن را درختان بنه تشکیل می‌دهند و از مناطق مهم پراکنش بنه در ایران می‌باشد (Soleiman-Beigi & Arzehgar, 2013).

پسته وحشی گونه اقتصادی مهمی برای روستاییان ساکن جنگل‌های زاگرس است (Pourreza *et al*., 2008). میوه و صمغ درخت بنه (سقز) دارای کاربردهای خوراکی، صنعتی و دارویی فراوانی هستند. کاربردهای دارویی و مصارف خوراکی میوه و صمغ بنه از دیرباز تاکنون نه تنها در ایران بلکه در میان بومیان تمام مناطق بنه‌خیز ازجمله بخش‌هایی از الجزایر، ترکیه و عراق نیز گزارش شده است (Benhassaini *et al*., 2007). وجود اسیدهای آمینه ضروری و غیرضروری فراوان در روغن بنه فاکتور بسیار مهم و مؤثری است که ارزش‌های تغذیه‌ای این روغن را بسیار بهبود می‌بخشد. نقش اسیدهای آمینه در سلامتی انسان بارز و روشن می‌باشد. روغن بنه سرشار از مواد معدنی ازجمله آهن، روی، منیزیم، مس، سلنیم، منگنز، پتاسیم، فسفر، کلسیم و سدیم است (Soleiman-Beigi & Arzehgar, 2013).

شرایط بسیار متنوع اکولوژیکی در مناطق کشت پسته در ایران، انتخاب ژنوتیپ‌های سازگار و پرمحصول توسط باغداران و توسعه کشت آنها در منطقه، تلاقی ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مختلف پسته یک ناحیه و حتی تلاقی ژنتیکی ارقام اهلی با پسته‌های وحشی، منجر به ایجاد تنوع ژنتیکی قابل توجهی در ژنوتیپ‌های پسته در مناطق مختلف شده است که شناسایی آنها را دچار مشکل می‌کند (Esmail-Pour, 2003). گونه‌های مختلف پسته به دلیل دو پایه بودن و هتروزیگوسی بالا، تنوع ژنتیکی نسبتاً بالایی دارند (Tayefeh Ali Akbarkhany *et al*., 2013). در مورد گونه *P. atlantica*، تنوع ریختی وسیعی توسط Belhadj و همکاران (۲۰۰۷) گزارش شده است. پدیده تفاوت درون‌گونه‌ای، از نظر ویژگی‌های ریخت‌شناختی، بین جمعیت‌های گیاهی که در شرایط رویشگاهی متفاوت رشد می‌کنند، اغلب مشاهده می‌شود (Goulart *et al*., 2006). برای ارزیابی تنوع ژنتیکی، از صفات برگ و میوه برای تکمیل صفات ریخت‌شناسی استفاده می‌شود. البته استفاده از ویژگی‌های ظاهری گیاهان در تاکسونومی به حدود یک قرن پیش برمی‌گردد.

تنوع ژنتیکی ۳۰ ژنوتیپ پسته شامل ۲۴ رقم محلی پسته *P. vera*، واریته اصلاح شده سرخس *CV. Sarakhs*، گونه‌های وحشی پسته شامل خنجوک *P. vera khinjuk*، بنه *P. atlantica*، بنه باغی *P. atlantica subsp. mutica*، اینتگریما *P. integerrima* و پالستینا *P. palestina*با سه نشانگر ایزوزایمی (استراز، پراکسیداز و مالات دهیدروژناز) بررسی شد (Alami *et al*., 2003). براساس پژوهش این محققان، تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها را

به هشت گروه اصلی و ۲۰ گروه فرعی تقسیم کرد، به طوری‌که پنج گروه اول، به ارقام پسته اختصاص یافت و سه گروه پایانی سایر گونه‌ها را شامل شد. همچنین نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که خنجوک بیشترین قرابت را با ارقام رایج پسته دارد. در پژوهشی دیگر، مطالعه فیلوژنی ۴ گونه پسته (خنجوک *P. khinjuk*، لنتیسکوس *P. lentiscus*، تربینتوس *P. terebinthus* و پسته *P. vera*) بوسیله نشانگر RAPD بررسی شد. در این گزارش ۲۳ آغازگر مورد استفاده، ۲۴۸ باند تولید کرد که ۱۳۹ عدد آن در سطح درون گونه‌ای چند شکلی نشان داد. تجزیه خوشه‌ای داده‌ها نشان داد که خنجوک نزدیک‌ترین گونه به ورا می‌باشد (Al-Saghir & Porter, 2006).

از نشانگر RAPD برای ارزیابی تنوع ژنتیکی گونه‌های *P. atlantica*، *P. khinjuk* و *P. terebintus* استفاده شد و بر اساس نتایج به‌دست آمده، گونه‌ها از هم متمایز بوده و *P. terebintus* دارای بیشترین تنوع بود. در این تحقیق، ۲۰ آغازگر مورد استفاده توانست ۲۲۸ باند چندشکل در سطح درون گونه‌ای ایجاد کند (Kafkas & Perl-Treves, 2002). در پژوهشی، از دو نشانگر RAPD و AFLP برای مطالعه ارتباط فیلوژنتیکی گونه‌های بومی پسته موجود در یونان استفاده شد و دندروگرام به‌دست آمده با هر دو روش مشابه هم بودند، اما تفاوت‌های جزئی در گروه‌های حاصل مشاهده شد (Katsiotis *et al.*, 2003). تنوع ژنتیکی برخی توده‌های پسته با نشانگرهای مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و نشانگر ISSR بررسی شد، در این ارزیابی، نشانگر ISSR نقش مؤثری در تعیین چند-شکلی مولکولی و بررسی ارتباط ژنتیکی در مطالعات ژرم-پلاسم پسته نشان داد (Fares *et al.*, 2009).

جنس *Pistacia* در غرب ایران دارای گونه‌های متعددی است و در واقع یکی از پوشش‌های گیاهی مهم در این مناطق به شمار می‌آید و شناسایی ژنوتیپ‌های مطلوب و ارزیابی خویشاوندی بین آنها و مقایسه با ارقام تجاری پسته می‌تواند در اصلاح این محصول برای دستیابی به نتاج یا ژنوتیپ‌هایی که به لحاظ صفات کمی و کیفی، میوه مرغوب-تری داشته باشند مؤثر باشد. در این راستا، این پژوهش برای ارزیابی اولیه از منابع موجود این جنس در غرب کشور و بررسی وجود تنوع ژنتیکی بین آنها براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و نشانگر مولکولی RAPD انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، ۴۴ ژنوتیپ و رقم از نمونه‌های پسته وحشی و اهلی که از مناطق مختلف استان ایلام و سمنان جمع‌آوری شدند با استفاده از خصوصیات مورفولوژیکی مربوط به برگ، میوه و نشانگر مولکولی RAPD بررسی شدند (جدول ۱). نمونه برگی نمونه‌های مورد بررسی در اردیبهشت‌ماه سال ۹۷ برای استخراج DNA جمع‌آوری شد. همچنین نمونه‌های برگ بالغ و میوه در اواخر فصل و در زمان رسیدگی کامل جمع‌آوری گردید. این پژوهش در گروه باغبانی دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام انجام شد. برخی از صفات ریختی مربوط به طول و عرض برگ، طول رگبرگ اصلی، تعداد برگچه، وزن میوه، طول و قطر میوه، وزن مغز و وزن پوسته سخت اندازه‌گیری شد. وزن میوه و مغز توسط ترازوی دیجیتالی با دقت یک‌صدم گرم محاسبه گردید و مشخصات مربوط به هر ژنوتیپ از قبیل طول و عرض برگ، طول رگبرگ اصلی، طول و قطر میوه با استفاده از خط‌کش و کولیس دیجیتالی برای هر نمونه ارزیابی شدند. تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Excel و SPSS انجام شد. ضرایب شاخص تنوع فنوتیپی بر اساس نسبت انحراف معیار صفت بر میانگین آن صفت محاسبه شد. تجزیه داده‌ها برای تعیین همبستگی صفات با استفاده از نرم‌افزار SPSS و تجزیه به عامل‌های اصلی با استفاده از تکنیک چرخش عامل‌ها (Factor Rotation) و به‌روش وریماکس (Varimax) انجام شد. همچنین تجزیه خوشه‌ای با روش Ward و محاسبه فواصل بعد از نرمال کردن داده‌ها با نرم-افزار SPSS انجام گردید.

در آزمایش دوم استخراج DNA ژنومی با روش CTAB تغییریافته در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه باغبانی دانشگاه ایلام انجام گردید (Doyle and Doyle, 1990) و برای بررسی روابط ژنتیکی نمونه‌های پسته از ۱۷ آغازگر

RAPD استفاده شد که با بررسی اولیه این آغازگرها بر سه نمونه متفاوت، تعداد ۱۲ آغازگر توانایی تولید آلل‌های چندشکل را نشان دادند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در حجم ۱۵ میکرولیتر، شامل ۳ میکرولیتر DNA ژنومی (۱۰ نانوگرم در میکرولیتر)، ۲ میکرولیتر آغازگر (۱۰ پیکومول در میکرولیتر)، ۷ میکرولیتر PCR Master (2X) Mix تهیه شده از شرکت سیناژن (۳ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۱/۶ میلی‌مولار $DNTP_s$ و آنزیم Taq 0.2 Units/µl) و ۳ میکرولیتر آب استریل با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad) انجام شد.

جدول ۱- ژنوتیپ‌های مورد بررسی و منطقه جمع‌آوری آنها

Table 1. Investigated genotypes and their collection site

نمونه Sample	گونه Genotype	محل جمع‌آوری Collection site	نمونه Sample	گونه Genotype	محل جمع‌آوری Collection site
1	*P. khinjuk*	Nakhjir	23	*P. atlantica*	Nakhjir
2	*P. atlantica*	Nakhjir	24	*P. atlantica*	Nakhjir
3	*P. khinjuk*	Meime	25	*P. khinjuk*	Meime
4	*P. atlantica*	Nakhjir	26	*P. khinjuk*	Meime
5 (Akbari)	*P. vera*	Damghan	27 (Phandoghi)	*P. vera*	Damghan
6	*P. khinjuk*	Meime	28	*P. khinjuk*	Meime
7	*P. atlantica*	Nakhjir	29 (Badami)	*P. vera*	Damghan
8	*P. khinjuk*	Meime	30	*P. khinjuk*	Meime
9	*P. khinjuk*	Nakhjir	31	*P. khinjuk*	Meime
10	*P. atlantica*	Nakhjir	32	*P. atlantica*	Nakhjir
11	*P. atlantica*	Nakhjir	33	*P. khinjuk*	Meime
12	*P. atlantica*	Nakhjir	34	*P. atlantica*	Nakhjir
13	*P. khinjuk*	Nakhjir	35	*P. khinjuk*	Meime
14	*P. atlantica*	Nakhjir	36	*P. khinjuk*	Meime
15	*P. atlantica*	Nakhjir	37	*P. khinjuk*	Meime
16	*P. Khinjuk*	Nakhjir	38	*P. khinjuk*	Meime
17	*P. atlantica*	Nakhjir	39 (Ohadi)	*P. vera*	Damghan
18	*P. khinjuk*	Meime	40	*P. khinjuk*	Meime
19	*P. khinjuk*	Meime	41	*P. khinjuk*	Meime
20	*P. atlantica*	Nakhjir	42	*P. khinjuk*	Meime
21	*P. atlantica*	Nakhjir	43 (Ahmadaghaei)	*P. vera*	Damghan
22	*P. khinjuk*	Meime	44 (Abbasali)	*P. vera*	Damghan

*: ایلام (نخجیر، عرض جغرافیایی: "۲۴ '۷۰ °۳۳، طول جغرافیایی: "۳۴ '۲۰ °۴۶، ارتفاع: ۱۳۶۷ متر)

*: Ilam (Nakhjir, Latitude (N): 33°70'24", Longitude (E): 46°20'34", Altitude (m.a.s.l.): 1367 m

* ایلام (میمه، * عرض جغرافیایی: "۵۶ '۱۲ °۳۳، طول جغرافیایی: "۵۴ '۶۳ °۴۶، ارتفاع: ۱۲۳۹ متر)

*: Ilam (Meime, Latitude (N): 33°12'56", Longitude (E): 46°63'54", Altitude (m.a.s.l.): 1239 m

**: سمنان (دامغان: عرض جغرافیایی: "۳۸ '۱۶ °۳۶، طول جغرافیایی: "۷۱ '۳۸ °۵۴، ارتفاع: ۱۱۲۷ متر)

*: Semnan (Damghan, Latitude (N): 36°16'28", Longitude (E): 54°38'71", Altitude (m.a.s.l.): 1127 m

واکنش زنجیره پلیمراز با استفاده از برنامه شیب دمایی شامل یک چرخه دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه برای واسرشت‌سازی اولیه DNA الگو، ۴۰ چرخه دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، یک دقیقه دمای اتصال ۳۸ درجه سانتی‌گراد و دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه بود و در نهایت یک چرخه به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای تکثیر نهایی انجام شد. بعد از انجام واکنش به محصول PCR، ۵ میکرولیتر بافر بارگذاری اضافه و در نهایت ۱۲ میکرولیتر محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد به مدت ۱۲۰ دقیقه با ولتاژ ۹۰ ولت الکتروفورز گردید. رنگ‌آمیزی ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید انجام و باند حاصل به صورت صفر و یک کدگذاری شد و داده‌ها با استفاده از برنامه NTSYS-pc و Gen ALEx 6.41 تجزیه گردید.

جدول ۲- آماره‌های توصیفی صفات ریختی مورد بررسی در گونه‌های مختلف پسته

Table 2. Descriptive statistics for morphological traits among different species of pistachio

صفات Characters	*P. atlantica*		*P. khinjuk*		*P. vera*	
	میانگین±SD Means ±SD	ضریب تغییرات فنوتیپی (٪) PCV%	میانگین ±SD Means ±SD	ضریب تغییرات فنوتیپی (٪) PCV%	میانگین±SD Means ±SD	ضریب تغییرات فنوتیپی (٪) PCV%
طول رگبرگ اصلی (سانتی‌متر) Length of the main vein (cm)	6.6±1.12	16.99	7.71±1.34	17.48	10.14±0.45	4.45
تعداد برگچه Number of leaflets	4.72±0.49	10.43	4.46±0.88	19.79	4.86±0.53	10.98
طول برگ (سانتی‌متر) Leaf length (cm)	5.48±0.76	14.01	6.5±0.99	15.30	11.59±2.03	17.55
عرض برگ (سانتی‌متر) Leaf width (cm)	3.25±0.52	16.16	4.38±0.86	19.78	8.22±0.47	5.79
وزن میوه (گرم) Fruit weight (gr)	0.33±0.04	12.54	0.12±0.01	11.63	1.06±0.18	16.96
قطر میوه (میلی‌متر) Fruit diameter (mm)	5.14±0.57	11.10	2.40±0.57	23.68	9.29±1.04	11.19
طول میوه (میلی‌متر) Fruit length (mm)	4.06±0.69	17.17	2.23±0.85	38.36	15.26±5.37	35.21
وزن مغز (گرم) Kernel weight (gr)	0.15±0.01	12.54	0.046±0.005	12.85	0.70±0.11	16.96
وزن پوسته (گرم) Shell weight (gr)	0.17±0.02	12.54	0.08±0.009	12.35	0.36±0.06	16.96

نتایج

ارزیابی نمونه‌ها بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی

آماره‌های توصیفی برای صفات فنوتیپی ارزیابی شده، محاسبه شد (جدول ۲). در بین صفات اندازه‌گیری شده، بیشترین درصد تنوع فنوتیپی (ضریب تغییرات)، مربوط به صفات میوه بود و بیانگر این است که اختلاف زیادی بین ژنوتیپ‌ها و ارقام برای شاخص‌های مرتبط با میوه وجود دارد. طول میوه در بین نمونه‌های متعلق به سه گونه دارای تنوع بالایی بود، به شکلی که برای این شاخص نمونه‌های متعلق به گونه *vera* دارای ضریب تنوع ۳۵/۲۱٪ بودند و در دو گونه

atlantica و *khinjuk* به‌ترتیب ۱۷/۱۷ و ۳۸/۳۶٪ به دست آمد. نتایج نشان داد که شاخص تنوع فنوتیپی برای صفات مرتبط با برگ در مجموع برای سه گونه متفاوت در مقایسه با میوه پائین‌تر بود که این موضوع نشان می‌دهد بین نمونه‌های متعلق به هر گونه از نظر ابعاد برگ تنوع زیادی وجود ندارد (جدول ۲). بیشترین میانگین وزن میوه (۱/۳۱ گرم) در رقم پسته اکبری مشاهده شد اما در بین ژنوتیپ‌های وحشی پسته، نمونه شماره ۲۰ از گونه *P. atlantica* دارای بیشترین وزن میوه (۰/۳۹ گرم) بود. نتایج نشان داد که میانگین وزن یک میوه در سه گونه مورد بررسی *P. vera*، *P. atlantica* و *P. khinjuk* به‌ترتیب ۱/۰۶، ۰/۳۳ و ۰/۱۲ می‌باشد. همچنین نتایج مربوط به وزن مغز نشان داد میانگین وزن مغز در گونه *P. vera* (۰/۷۰)، گونه *P. atlantica* (۰/۱۵) و گونه *P. khinjuk* (۰/۰۴) است.

ضرایب همبستگی بین صفات اندازه‌گیری شده در جدول ۳ ارائه شده است. بیشترین و کمترین ضریب همبستگی به‌ترتیب بین وزن یک میوه و وزن مغز (r=۰/۹۹) و صفات تعداد برگچه و عرض برگ (r=۰/۰۱) مشاهده شد. وزن میوه و مغز همبستگی مثبت و معنی‌داری با طول و عرض برگ داشت ولی رابطه منفی بین ابعاد برگ با طول و قطر میوه وجود داشت (جدول ۳). نتایج این تحقیق نشان داد که بیشترین ابعاد برگ مربوط به گونه *P. vera* است.

جدول ۳- همبستگی ساده بین صفات ریختی مورد مطالعه در نمونه‌های پسته

Table 3. The Simple correlation between morphological traits in pistachio samples

صفات Characters	طول رگبرگ Length of the main vein	تعداد برگچه Number of leaflets	طول برگ Leaf length	عرض برگ Leaf width	وزن میوه Fruit weight	قطر میوه Fruit diameter	طول میوه Fruit length	وزن مغز Kernel weight
طول رگبرگ اصلی Length of the main vein	0.28							
تعداد برگچه Number of leaflets	0.69**	0.18						
طول برگ Leaf length	0.74**	0.01	0.87**					
عرض برگ Leaf width	0.47**	0.19	0.76**	0.69**				
وزن میوه Fruit weight	−0.57**	0.07	−0.59**	−0.70**	−0.21			
قطر میوه Fruit diameter	−0.20	0.16	−0.42**	−0.47**	−0.15	0.65**		
طول میوه Fruit length	0.51**	0.19	0.79**	0.74**	0.99**	−0.28	−0.20	
وزن مغز Kernel weight	0.36*	0.19	0.66**	0.58**	0.98**	−0.03	−0.03	0.96**

**، *: به‌ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵٪

**, * significantly at 1 and 5% of probability level, respectively

در تجزیه عاملی، سه عامل با مقادیر ویژه بیشتر از یک در مجموع ۹۴/۰۴ درصد واریانس کل را توجیه کردند (جدول ۴). بیشترین ضرایب عاملی در عامل اول مربوط به صفات میوه است و در مجموع ۵۲ درصد واریانس کل را به خود اختصاص دادند و این عامل را می‌توان عامل میوه نامید که ارتباط مستقیمی با ویژگی‌های دانه دارد. در عامل دوم صفات مرتبط با برگ ضرایب عاملی بیشتری به خود اختصاص دادند و به‌همین دلیل می‌توان این عامل را اندازه برگ نامگذاری کرد و در مجموع عامل دوم ۳۰/۱۷ درصد واریانس کل را توجیه کرد. در عامل سوم صفت تعداد برگچه با ضریب مثبت قرار گرفت که ۱۱/۸۷

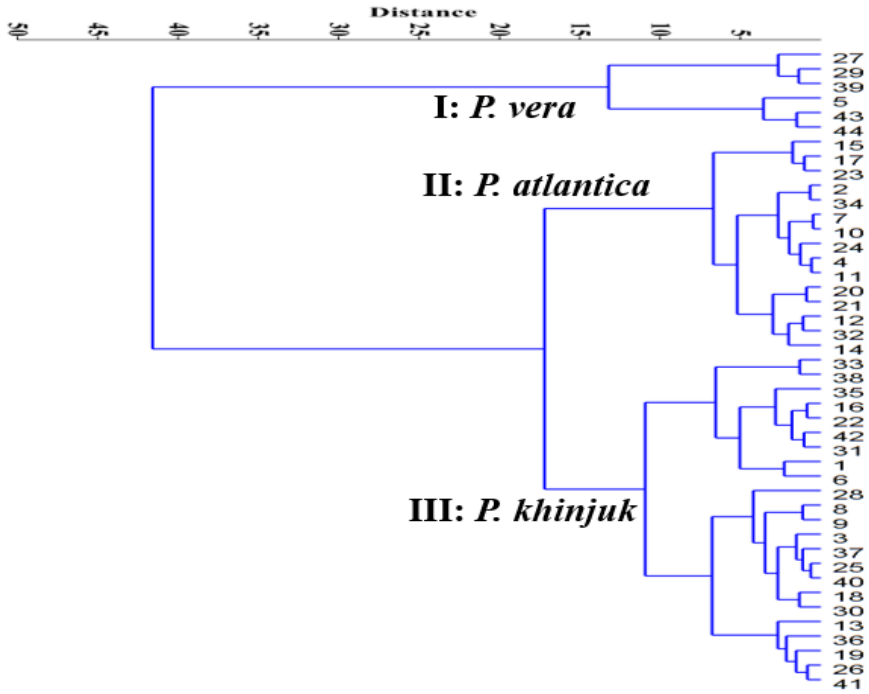
درصد واریانس کل را به خود اختصاص داد و می‌توان آن را عامل تعداد برگ نام نهاد.

نتایج تجزیه خوشه‌ای بین نمونه‌های پسته بر اساس صفات مورفولوژی در شکل ۱ نشان داده شده است. با توجه به نتایج به‌دست آمده ژنوتیپ‌ها در فاصله ۱۲ به سه گروه اصلی تقسیم-بندی شدند. گروه اول شامل ارقام متعلق به گونه *vera* بودند که همه آنها شامل ارقام تجاری هستند. نمونه‌های موجود در گروه دوم متعلق به بنه (گونه *atlantica*) که بیشتر آنها از منطقه نخجیر جمع‌آوری شده بودند و در گروه سوم نمونه‌های متعلق به گونه *khinjuk* قرار گرفتند. نتایج نشان داد که دو گونه پسته وحشی شامل گونه‌های *atlantica* و *khinjuk* در یک خوشه بزرگتر و از ارقام تجاری پسته تفکیک شدند. در این بررسی، تجزیه پلات با استفاده از دو فاکتور اصلی اول و دوم که به‌ترتیب ۵۶/۴۶ و ۲۰/۵۱ درصد واریانس کل را توجیه کرده بودند انجام شد. در این تجزیه سه گروه اصلی را می‌توان در نظر گرفت که با گروه-بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای شباهت‌های زیادی را نشان می‌دهد. دو گونه *P. atlantica* و *P. khinjuk* بیشترین قرابت ژنتیکی را با هم دارند. با توجه به تجزیه پلات می‌توان گفت که گونه *P. atlantica* و *P. khinjuk* از نظر صفات مورفولوژیکی بیشترین تنوع را نشان می‌دهند.

جدول ۴- مقادیر ویژه، واریانس، واریانس تجمعی و ضرایب عاملی صفات در نمونه‌های پسته

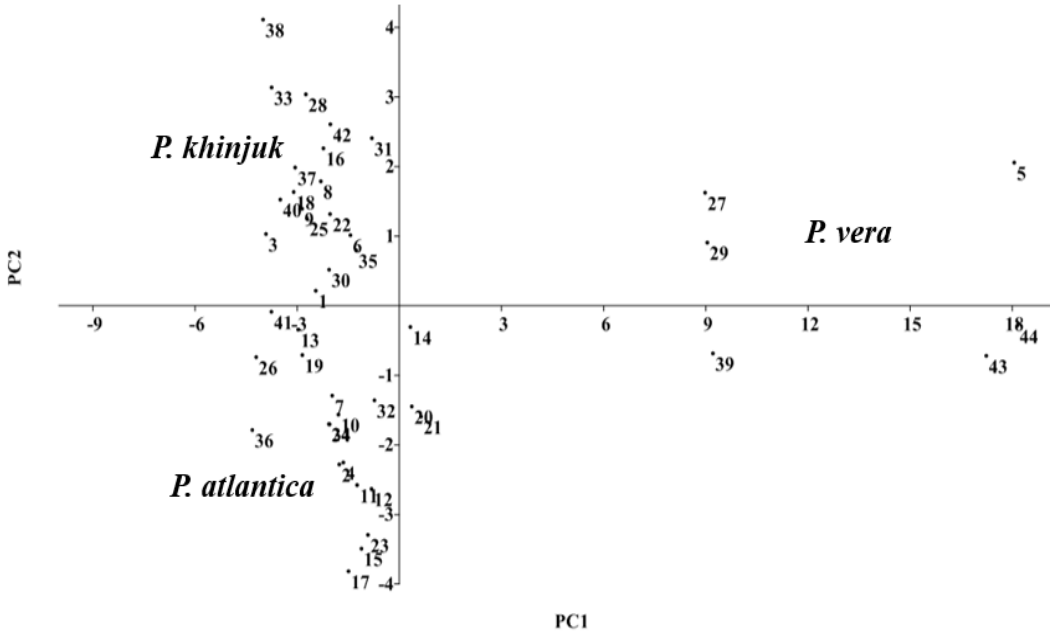
Table 4. Eigen values, variance, cumulative variance and factors coefficients in pistachio samples

صفات Characters	عامل ۱ Factor 1	عامل ۲ Factor 2	عامل ۳ Factor 3
وزن میوه Fruit weight	**0.92**	0.36	0.07
قطر میوه Fruit diameter	**0.93**	0.14	0.07
طول میوه Fruit length (mm)	**0.85**	0.43	0.06
وزن مغز Kernel weight	**0.89**	0.42	0.06
وزن پوسته Shell weight	**0.96**	0.22	0.08
طول رگبرگ اصلی Length of the main vein	0.13	**0.89**	0.23
طول برگ Leaf length	0.51	**0.78**	0.04
عرض برگ Leaf width	0.43	**0.84**	−0.12
تعداد برگچه Number of leaflets	0.10	0.08	**0.98**
مقادیر ویژه Eigen value	6.29	1.16	1.00
واریانس (٪) Variance (%)	52.00	30.17	11.87
واریانس تجمعی (٪) Cumulative variance (%)	52.00	82.17	94.04



شکل ۱- تجزیه خوشه‌ای ۴۴ نمونه پسته بر اساس ویژگی‌های ریختی

Figure 1. Cluster analysis of 44 pistachio sample using morphological characters

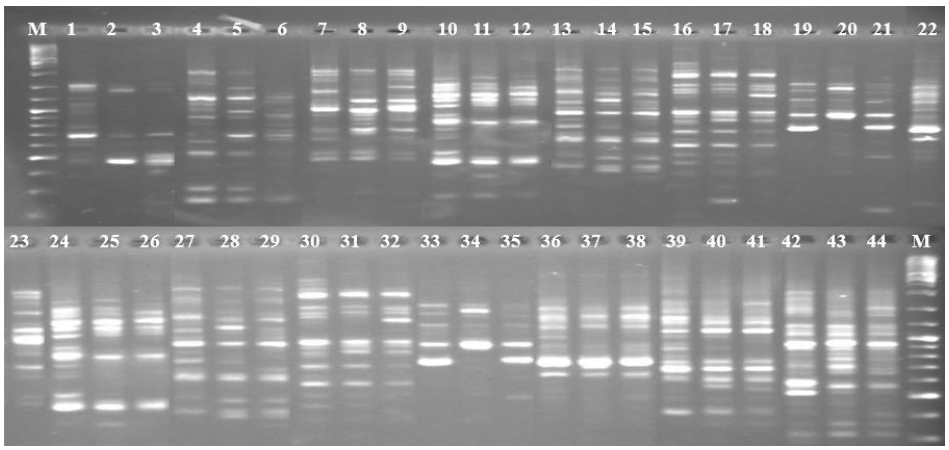


شکل ۲- نمودار بای‌پلات حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس ویژگی‌های ریختی نمونه‌های پسته

Figure 2. Bi-plate diagram of principal components analysis based on morphological properties of pistachio samples

ارزیابی ژنتیکی نمونه‌ها با استفاده از نشانگر RAPD

نتایج این بخش نشان داد که آغازگرهای مورد استفاده سطح بالایی از چندشکلی را در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه نشان می‌دهند. تمام ۱۲ آغازگر مورد استفاده باند چندشکل بر روی نمونه‌های پسته ایجاد کردند و در مجموع ۷۱ باند بر روی ژل آگارز مشخص شد. سطح قابل توجهی از تنوع میان نمونه‌های مختلف مشاهده شد و نتایج به‌دست آمده از این بخش اطلاعات کافی برای تشخیص و تفکیک نمونه‌ها را از یکدیگر فراهم کرد. نتایج مربوط به تعداد آلل‌های چندشکل نشان داد که درصد کل چندشکلی به‌دست آمده در این پژوهش ۹۷٪ می‌باشد. تعداد کل آلل برای هر آغازگر از ۴ تا ۹ قطعه و میانگین تعداد آلل مشاهده شده برای آغازگرها ۵/۹۱ ثبت شد. بیشترین تعداد آلل تولید شده متعلق به آغازگر Custom-primer (۹ قطعه) (شکل ۳) و کمترین آلل متعلق به آغازگرهای OPA-16 و OPA-18 (۴ قطعه) بود و محدوده اندازه قطعات تولید شده نیز از ۲۸۰–۲۵۰۰ جفت‌باز متغیر بود. میزان اطلاعات چندشکلی، یکی از شاخص‌های مهم برای مقایسه آغازگرهای مختلف از لحاظ قدرت آنها برای تفکیک ژنوتیپ‌ها می‌باشد. در این تحقیق همه آغازگرهای استفاده شده چندشکلی بالایی را بین نمونه‌های مورد بررسی نشان دادند و بیانگر کارایی آنها در تفکیک نمونه‌ها بودند (جدول ۵). بیشترین و کمترین مقدار محتوای اطلاعات چندشکلی مربوط به آغازگر OPB-14 (۰/۴۸۳) و OPA-13 (۰/۰۸۹) با میانگین ۰/۳۵ به‌دست آمد.



شکل ۳– الگوی تکثیر باندی در ۴۴ نمونه پسته با استفاده از آغازگر CUSTOMPRIMER

Figure 3. RAPD profile of 44 pistachio sample, produced by CUSTOMPRIMER

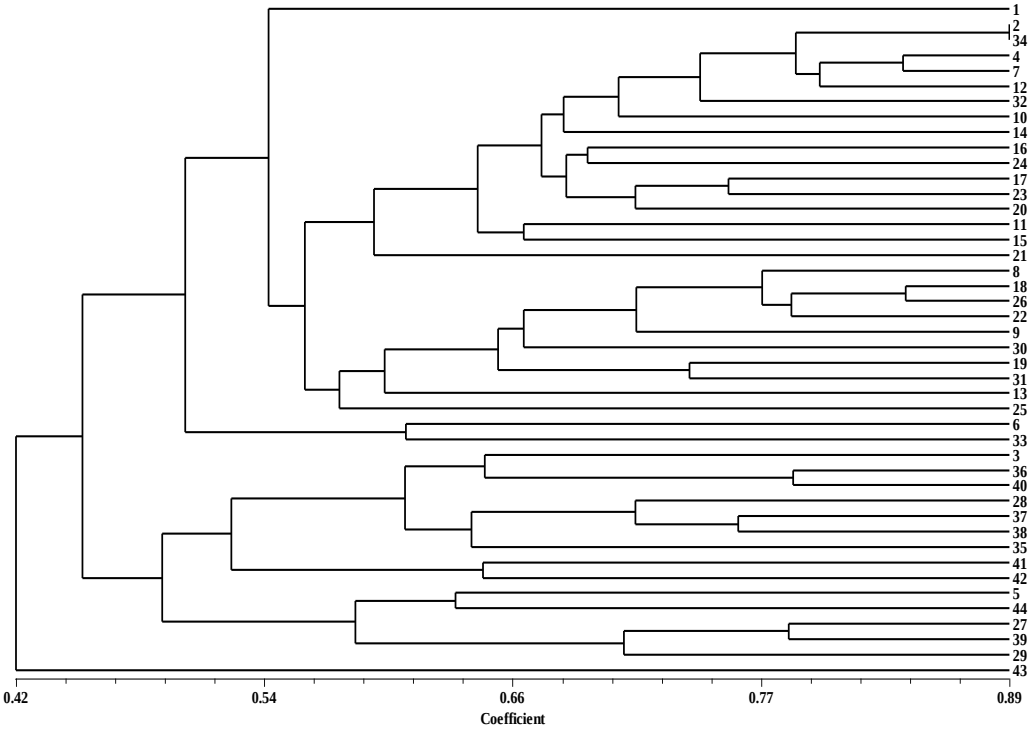
جدول ۵- شاخص‌های ژنتیکی برای آغازگرهای RAPD در ۴۴ نمونه پسته

Table 5. Genetically index for RAPD primers of 44 pistachio sample

آغازگر Primer	توالی آغازگر Primer sequence	تعداد آلل Allele number	اندازه قطعات Allele size	محتوای اطلاعات چند شکل Polymorphism information content
OPA-01	CAG GCC CTT C	5	1200 –500	0.26
OPA-02	TGC CGA GCT G	7	1100 –140	0.39
OPA-09	GGG TAA CGC C	8	800 –300	0.40
OPA-13	CAG CAC CCA C	5	1250 –520	0.08
OPA-16	AGC CAG CGA A	4	1000 –400	0.37
OPA-18	AGG TGA CCG T	4	1050 –550	0.29
OPB-06	TGC TCT GCC C	6	1450 –630	0.46
OPB-14	TCC GCT CTG G	5	1800 –510	0.48
Custom primer	CGC ACC GCA G	9	2500 –280	0.39
UBC-43	AAA ACC GGG C	6	1700 –650	0.41
UBC-292	AAA CAG CCC G	5	1500 –700	0.32
UBC-691	AAA CCA GGC G	7	1300 –330	0.43

ماتریس تشابه ژاکارد بین ژنوتیپ‌های پسته از داده-های RAPD محاسبه شد. ضریب تشابه ژاکارد میان ژنوتیپ‌های مورد بررسی در محدوده ۰/۲۷ بین ارقام بادامی و احمدآقایی از گونه *P. vera* که هر دو از شهرستان دامغان جمع‌آوری شده بودند تا ۰/۸۹ بین نمونه‌های ۲ و ۳۴ از گونه *P. atlantica* که هردو متعلق به نخجیر ایلام بودند قرار داشت. ارتباط میان ۴۴ نمونه پسته بر اساس مقدار تشابه ژنتیکی ژاکارد به‌وسیله تجزیه خوشه‌ای با روش UPGMA تعیین شد (شکل ۴). بر اساس دندروگرام به‌دست آمده از ماتریس تشابه ژاکارد، نمونه‌های مورد بررسی در فاصله ۰/۴۲ تا ۰/۸۹ با ضریب تشابه ۰/۵۰ به ۵ گروه با تنوع بالا تقسیم شدند.

نتایج نشان داد که رقم احمدقایی به تنهایی در یک خوشه قرار گرفت و بقیه ارقام متعلق به گونه *P.vera* در یک شاخه مشخص گردیدند. نتایج گروه‌بندی براساس داده-های RAPD تا حدود زیادی با خوشه‌بندی صفات ریختی مطابقت داشت، به‌طوری‌که نمونه‌های متعلق به هر گونه در خوشه‌های جداگانه تفکیک شدند. بر اساس نتایج واریانس مولکولی (AMOVA)، مقدار تنوع بین جمعیت‌ها ۳/۹۴ (۲۶٪) و تنوع درون جمعیت‌ها ۱۱/۰۹ (۷۴٪) به‌دست آمد. بااین‌حال، بیشترین تنوع ژنتیکی در داخل جمعیت ثبت شد (جدول ۶). نتایج نشان می‌دهد که بیش از ۲۵٪ قطعات تکثیر شده توان تمایز گونه‌ها را از یکدیگر دارند.



شکل ۴- تجزیه خوشه‌ای ۴۴ نمونه پسته بر اساس ضرایب تشابه ژاکارد و روش UPGMA با استفاده از نشانگر RAPD

Figure 4. UPGMA cluster based on Jaccard's similarity coefficient obtained from RAPD markers among 44 pistachio sample

جدول ۶- تجزیه واریانس مولکولی بین نمونه‌های پسته براساس نشانگر RAPD

Table 6. Molecular variance analysis among pistachio samples using RAPD marker

منابع تغییرات Source of variation	درجه آزادی df	میانگین مربعات Mean of squares	واریانس Variance	درصد Percent	P-value
بین گونه Between the species	2	62.45	3.94	26٪	0.002
داخل گونه Within the species	41	11.09	11.09	74٪	-
کل Total	43	13.48	15.04	100٪	-

شاخص تنوع ژنی (هتروژنی)، شاخص شانون و میزان چندشکلی در مکان‌های تکثیر شده، برای هر جمعیت جداگانه به‌دست آمد (جدول ۷). نتایج نشان داد که بیشترین میزان شاخص شانون و شاخص هتروژنی مربوط به جمعیت *khinjuk* و کمترین مقدار این شاخص‌ها مربوط به جمعیت *atlantica* بود. میانگین شاخص شانون برای همه جمعیت‌ها ۰/۴۱ و میانگین شاخص هتروژنی جمعیت‌ها، ۰/۲۷ به‌دست آمد. بیشترین و کمترین تعداد آلل مؤثر به‌ترتیب در جمعیت *khinjuk* و *atlantica* ثبت شد. متوسط درصد چندشکلی در مکان‌های ژنومی تکثیرشده، ۰/۳۰ درصد بود. بیشترین و کمترین درصد چندشکلی به‌ترتیب در جمعیت *khinjuk* (۰/۳۳) و جمعیت *atlantica* (۰/۲۷) ثبت شد.

نتایج حاصل از درصد مکان‌های چندشکل نشان داد که بالاترین درصد مکان‌های ژنی چندشکل در جمعیت *khinjuk* با میزان ۸۷/۳۲٪ مشاهده گردید. جمعیت *vera* نیز با میزان ۶۹/۰۱٪ کمترین میزان مکان چندشکلی را نشان داد. میانگین درصد مکان‌های در بین جمعیت‌های ارزیابی شده ۷۷٪ ثبت شد.

جدول ۷- شاخص‌های تنوع درون جمعیت‌های پسته

Table 7. Diversity parameters within the pistachio populations

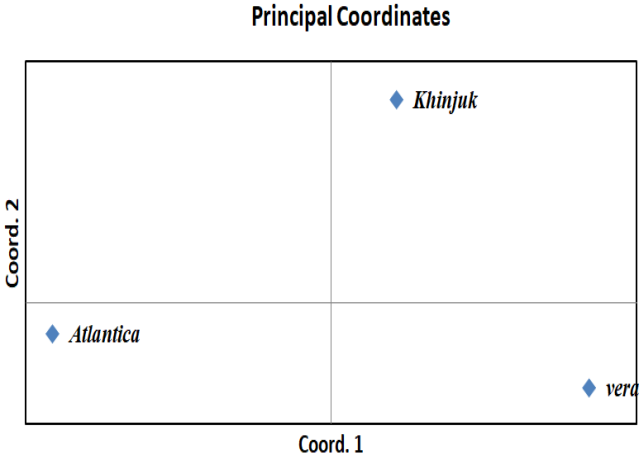
جمعیت Population	تعداد آلل Allele number	تعداد آلل مؤثر Effective allele number	شاخص شانون Shannon's index	شاخص تنوع ژنی Gene diversity index	آلل‌های چندشکل (٪) Polymorph allele (%)	چندشکلی (٪) Polymorphism (%)
vera	0.08 ±1.53	0.04±1.45	0.03 ±0.39	0.02 ±0.26	0.02 ±0.31	69.01%
atlantica	0.06 ±1.7	0.04 ±1.41	0.03 ±0.38	0.02 ±0.25	0.02 ±0.27	74.65%
khinjuk	0.05 ±1.83	0.04 ±1.56	0.02 ±0.47	0.02 ±0.32	0.02 ±0.33	87.32%
Mean	0.06 ±1.68	0.04 ±1.47	0.02 ±0.41	0.02 ±0.27	0.02 ±0.3	77.00%

در این تحقیق، ماتریس فاصله ژنتیکی بر اساس شاخص Nei محاسبه شد (جدول ۸). کمترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های *vera* و *khinjuk* (۱۲٪) و بیشترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های *vera* و *atlantica* (۲۶٪) به‌دست آمد. تجزیه به مختصات اصلی برای ۳ جمعیت مورد بررسی انجام شد. دو مؤلفه اول استخراج شده به‌ترتیب ۸۶/۸ و ۱۳/۲ درصد از واریانس موجود را توجیه کردند. بای‌پلات حاصل نشان می‌دهد که جمعیت *P. atlantica*، فاصله ژنتیکی بیشتری با دو جمعیت مورد بررسی دارد. بر اساس نتایج جدول ۸ بیشترین فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های *P. atlantica* و *P. vera* وجود داشت. همچنین جمعیت‌های *P.vera* و *P. khinjuk* قرابت ژنتیکی بیشتری باهم داشتند که این نتایج در پراکنش دوبعدی آنها در شکل ۵ نشان داده شده است.

جدول ۸- فاصله ژنتیکی ۳ جمعیت پسته با استفاده از آلل‌های تکثیر شده در ۱۲ مکان RAPD

Table 8. Genetic distance of 3 pistachio populations using alleles generated in 12 RAPD loci

Population جمعیت	*P. vera*	*P.atlantica*
P. atlantica	0.26	0
P. khinjuk	0.12	0.17



شکل ۵- تجزیه به مختصات اصلی و بای‌پلات ۳ جمعیت پسته براساس داده‌های نشانگر RAPD

Figure 5. The principal decomposition of 3 pistachio populations and Bi-plate diagram using RAPD marker data

بحث

ارزیابی منابع موجود بر اساس ریخت‌شناسی به عنوان مرحله اولیه در ارزیابی ژرم‌پلاسم در نظر گرفته می‌شود. همچنین، ادغام داده‌های ریخت‌شناسی و مولکولی می‌تواند ما را به سمتی هدایت کند که اطلاعات جامع و دقیق از منابع ژنتیکی موجود و حفاظت آنها چیده شود و یا در برنامه‌های به‌نژادی استفاده شوند (Pereira-Lorenzo *et al.*, 2012; Zarei, 2017). اطلاعات نشان داد که سطح تنوع فنوتیپی بالایی نه تنها در میان سه گونه، بلکه در میان نمونه‌های متعلق به هر گونه وجود دارد. علاوه بر این، ارقام *P. vera* تنوع نسبتاً کمتری را در بین نمونه های مورد مطالعه نشان دادند. با توجه به اینکه تمام نمونه‌های *P. vera* مورد استفاده در این مطالعه از ارقام تجاری پسته بودند، به‌طور گسترده‌ای در ایران کشت می شوند. بنابراین، تعجب‌آور نیست که آنها دارای سطح بالایی از شباهت‌های مورفولوژیکی هستند، به‌ویژه برای ویژگی‌های اقتصادی یا اولویت مصرف‌کننده انتخاب شدند. بالاتر بودن تنوع ریخت‌شناسی که در دو گونه وحشی پسته مشاهده شد ممکن است به دلیل فراهم بودن شرایط بازگرده‌افشانی بین نمونه‌ها و تولید بذر و در طول سالیان زیادی تعداد بسیاری از ژنوتیپ‌های پسته در شرایط طبیعی از طریق بذر تکثیر شده باشد.

نتایج بسیاری از گزارش‌ها نشان می‌دهد پسته به دلیل دوپایه بودن و هتروزیگوسی بالا، دارای تنوع ژنتیکی نسبتاً زیادی می‌باشد (Tayefeh Ali Akbarkhany *et al.*, 2013). در پژوهشی، Kafkas و همکاران (۲۰۰۱) تنوع مورفولوژیکی سه گونه *P. atlantica*، *P. terebintus* و *P. eurycarpa* را در ترکیه با استفاده از صفات برگ و میوه مطالعه کردند. نتایج آنان نشان داد که تنوع نسبتاً بالایی در نمونه‌های بررسی شده وجود دارد. در پژوهشی دیگر، تنوع ژنتیکی جمعیت‌های بنه با استفاده از صفات ریختی برگ و میوه مشخص شد، به استثناء طول برگ، از نظر سایر صفات مورد بررسی در بین رویشگاه‌ها اختلاف معنی‌داری وجود دارد (Rostamikia *et al.*, 2009). Kafkas و همکاران (۲۰۰۱) با ارزیابی نمونه‌های مختلف پسته نشان دادند که بین وزن میوه با طول برگچه و همچنین ابعاد برگ همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود دارد. نتایج برخی گزارش‌ها نشان می‌دهد که ابعاد برگ همبستگی مستقیمی با صفاتی مانند وزن مغز دارد. برگ‌ها مهمترین اندام برای جذب نور و فتوسنتز هستند و با افزایش سطح برگ، محصولات فتوسنتزی افزایش می‌یابد که به مصرف میوه می‌رسد (Mashmoul *et al.*, 2013). Rostamikia و همکاران (۲۰۰۹) با ارزیابی جمعیت‌های بنه نشان دادند

که بین سطح برگ و وزن برگ و همچنین بین وزن ۱۰۰ میوه و ابعاد برگ همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود دارد. در پژوهشی روی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف پسته، ۵ عامل اصلی و مستقل نزدیک به ۷۹/۳۳ درصد از کل واریانس را توجیه کردند (Arjmand Qahestani *et al*., 2015). تنوع ژنتیکی ۳۳ ژنوتیپ ماده پسته بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی مورد ارزیابی قرار گرفت و بر اساس تجزیه خوشه‌ای به چهار گروه با تنوع بالا تقسیم شدند (Arjmand Qahestani *et al*., 2015). در مطالعه Rostamikia و همکاران (۲۰۰۹) تجزیه خوشه‌ای به روش Ward با استفاده از کل صفات مورد بررسی برگ و میوه انجام شد و شش رویشگاه مورد مطالعه در دو گروه مجزا قرار گرفتند. در ارزیابی تنوع ژنتیکی ۲۵ ژنوتیپ پسته ایرانی با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR، در مجموع ۱۴۸ قطعه DNA تکثیر شد که از بین آنها تعداد ۱۲۳ قطعه (۸۳ درصد) چندشکل بودند (Arjmand Qahestani *et al*., 2015). در پژوهشی دیگر، در ارزیابی تنوع ژنتیکی پسته منطقه خراسان با نشانگر RAPD درصد چندشکلی بین نمونه‌ها ۹۲/۸۳ درصد گزارش شد (Tayefeh Ali Akbarkhany *et al*., 2013). در گزارشی، با استفاده از نشانگرهای RAPD-PCR، ۵۹ ژنوتیپ از ده رویشگاه مختلف بررسی شدند و بر اساس دندروگرام به‌دست آمده نمونه‌های مورد ارزیابی به هشت گروه با تنوع بسیار بالا تقسیم شدند (Mehrabi *et al*., 2016). قرار گرفتن نمونه‌های یک منطقه جغرافیایی در دو گروه مستقل و نمونه‌های مناطق مختلف در یک گروه بیانگر این مطلب است که عامل منطقه جغرافیایی با وجود مفید بودن در گروه‌بندی نمونه-ها نمی‌تواند به‌عنوان فاکتور کامل و مستقل در این زمینه مورد استفاده قرار گیرد.

در مطالعه Mehrabi و همکاران (۲۰۱۶) در بررسی ساختار تنوع ژنتیکی جمعیت‌های درختان بنه با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD و تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که سطح بیشتری از تنوع به درون جمعیت‌ها (۷۸ درصد) تعلق دارد، در حالی که ۲۲ درصد تنوع در بین جمعیت‌ها مشاهده شد که با این تحقیق هم‌خوانی داشت. Mehrabi و همکاران (۲۰۱۶) با بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های درختان بنه براساس داده‌های RAPD گزارش کردند که نمونه‌های جمع‌آوری شده از آبدانان دارای بیشترین میزان آلل‌های چندشکل (۵۷/۷۳٪) و شاخص شانون (۰/۲۵۱) هستند و بیشترین میزان شاخص هتروزنی (۰/۱۷۲) نیز در جمعیت بانه مشاهده شد، در حالی که کمترین میزان آلل‌های چندشکل (۱۳/۴۰٪)، شاخص هتروزنی (۷۴٪) و شاخص شانون (۸۱٪) در جمعیت خارج از زاگرس ثبت گردید. فاصله ژنتیکی بین دو جمعیت به منزله تفاوت توجیه‌پذیر بین دو موجود با استفاده از تنوع آللی است. به‌عبارت دیگر، فاصله ژنتیکی بیانگر میزان تفاوت‌های ژنی بین جمعیت یا گونه‌ها است که با استفاده از کمیت‌های عددی اندازه-گیری و گزارش می‌شود. Mehrabi و همکاران (۲۰۱۶) با ارزیابی نمونه‌های مختلف پسته وحشی، بیشترین فاصله ژنتیکی را بر اساس شاخص Nei، میان دو جمعیت جوانرود و خارج از زاگرس (۰/۱۸۰) و کمترین فاصله ژنتیکی را در جمعیت‌های ایلام و پاوه (۰/۰۰۰)، ایلام و باینگان (۰/۰۰۱) و پاوه و باینگان (۰/۰۰۲) گزارش کردند. El Zerey-Belaskri و همکاران (۲۰۱۸) در پژوهشی تنوع ژنتیکی بالایی را در میان ژنوتیپ‌های *P. atlantica* آتلانتیکا گزارش کردند و نشان دادند که ژنوتیپ‌ها از مناطق خاصی در خوشه‌های مختلف توزیع شده‌اند. هرچند جمعیت‌های مورد بررسی از مناطق مختلف با شرایط آب و هوایی متفاوت جمع‌آوری شده بودند و نتایج نشان داد که ممکن است یک جریان ژنتیکی بین جمعیت‌ها به‌ویژه برای نمونه‌هایی که در نزدیکی یکدیگر قرار دارند اتفاق افتاده باشد. در این پژوهش تنوع زیادی بر اساس نشانگرهای مورفولوژیکی و RAPD در بین جمعیت‌های مورد بررسی پسته مشاهده شد که بیانگر وجود تنوع ژنتیکی بالا برای ژرم‌پلاسم مورد مطالعه بود و می‌توان به‌عنوان مواد ژنتیکی مناسب

جهت مطالعات اصلاحی برای نمونه‌های مورد بررسی استفاده کرد. البته تنوع بالای ژنتیکی در پسته می‌تواند به‌دلیل دوپایه بودن و طبیعت دگرگشنی گیاه پسته باشد. دسترسی به تنوع ژنتیکی کافی برای برنامه‌های اصلاحی حیاتی است، تا بتوان به تولید ارقام جدید و بهبود تولید محصول کمک کرد. بنابراین، تلاقی نمونه‌های مطلوب با فاصله ژنتیکی بالا می‌تواند شانس انتخاب برای دستیابی به نتاج برتر را بالا ببرد.

سپاسگزاری

هزینه‌های این پژوهش از محل اعتبارات پژوهشی دانشگاه ایلام تأمین شده است. نویسندگان از مساعدت‌کنندگان قدردانی خود را اعلام می‌دارند.

منابع مورد استفاده

- AL-Saghir, M.G. and Porter, D.M. 2006. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) study of *Pistacia* species (Anacardiaceae). Asian Journal of Plant Sciences, 5: 1002-1006.
- Arjmand Qahestani, R., Tavassolian, I. and Mohammadi Nezhad, Q. 2015. Evaluation of genetic diversity in 25 Iranian pistachio genotypes using ISSR markers. Agricultural Biotechnology Journal, 7: 1-18.
- Belhadj, S., Derridj, A., Aigouy, T.H., Gers, C.H., Gauquelin, T.H. and Mevy, J.P.H. 2007. Comparative morphology of leaf epidermis in eight populations of Atlas Pistachio (*Pistacia atlantica* Desf., Anacardiaceae). Microscopy Research and Technique, 70: 837-846.
- Benhassaini, H., Bendahmane, M. and Benchalgo, N. 2007. The chemical composition of fruits of *Pistacia atlantica* desf. subsp. *atlantica* from Algeria. Chemistry of Natural Compounds, 43:121-124.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- El Zerey-Belaskri, A., Ribeiro, T., Alcaraz, M. L., Zerey, W. E., Castro, S., Loureiro, J., Benhassaini, H. and Hormaza, J.I. 2018. Molecular characterization of *Pistacia atlantica* Desf. subsp. *atlantica* (Anacardiaceae) in Algeria: Genome size determination, chromosome count and genetic diversity analysis using SSR markers. Scientia Horticulturae, 227: 278-287.
- Esmail-Pour, A. 2003. Distribution, Use and conservation of pistachio in Iran. PP. 16-26. In: IPGRI workshop: Towards a Comprehensive Documentation and use of Pistacia Genetic Diversity in Central and West Asia, North Africa and Europ.
- Fares, K., Guasmi, F., Touil, L., Triki, T. and Ferchichi, A. 2009. Genetic diversity of Pistachio tree using intersimple sequence repeat markers (ISSR) supported by morphological and chemical markers. Biotechnology, 8: 24-34.
- Goulart, M.F., Lemos, J.P. and Lovato, M.B. 2006. Variability in fruit and seed morphology among and within populations of *Plathymenia* in areas of the Cerrado, the Atlantic Forest, and transitional sites. Plant Biology, 8: 112-119.
- Kafkas, S. and Perl-Treves, R. 2001. Morphological and molecular phylogeny of *Pistacia* species in Turkey. Theoretical and Applied Genetics, 102: 908-915.
- Kafkas, S., Kafkas, E. and Prel-Treves, R. 2002. Morphologacal diversity and a germplasm survey of tree wild *pistacia* species in Turkey. Genetic Resource and Evolution, 49: 261-270.
- 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.
- Mashmoul, A., Hassani, A., Pirzad, A. and Azimi, J. 2013. Effect of chemical and biological phosphorus on the some morphological characters of summer savory (*Satureja hortensis*). International Journal of Plant Production, 4: 184–188.
- Mehrabi, A.A., Gholami, P., Etminan, A. and Mohammadi, S. 2016. The structure of genetic diversity of *Pistacia atlantica* subsp. *mutica* revealed by RAPD-PCR molecular markers. Journal of Forest and Wood Products, 69: 237-248.
- Pereira-Lorenzo, S., Dos Santos, A.R.F., Ramos-Cabrer, A.M., Sau, F. and Diaz-Hernandez, M.B. 2012. Morphological variation in local pears from North-Western Spain. Scientia Horticulturae, 138: 176–182.
- Pourreza, M., Shaw, J.D. and Zangeneh, H. 2008. Sustainability of wild pistachio (*Pistacia atlantica* Desf.) in Zagros forests, Iran. Forest Ecology and Managemnt, 72: 157-160.
- Rostamikia, Y., Fattahi, M. and Imani, A.A. 2009. Investigation of genetic diversity of wild pistachio using fruit and leaf morphological characteristics. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 17: 284-294.
- Soleiman-Beigi, M. and Arzehgar Z. 2013. A review study on chemical properties and food indexes of mastic oil compared with olive, sunflower and

canola oils, the Ilamian traditional uses of mastic. Scientific Journal of Ilam University of Medical Sciences, 21: 1-13.
- Tayefeh Ali Akbarkhany, S., Talaie, A.R. and Fatahi, M.R. 2013. Investigation of genetic diversity among *Pistachio vera* in the Khorasan by using morphological characters and RAPD molecular marker. Journal of Plant Production, 20: 171-192.
- Zahedipour, H.A., Fatahi, M., Mir Davoudi Akhavan, H.R., Goudarzi, G.R. and Azdou, Z. 2005. distribution of different species of pistachio in Markazi province of Iran. Iranian Journal of Forest and Poplar Research, 13: 33-78.
- Zarei, A., Erfani-Moghadam, J. and Mozaffari, M. 2017. Phylogenetic analysis among some pome fruit trees of Rosaceae family using RAPD markers. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 31: 289–298.

Genetic evaluation of some wild and commercial pistachio species based on morphological characteristics and RAPD-PCR molecular markers

F. Narimani[1], J. Erfani-Moghadam[2*], A. A. Mehrabi [3]

[1] MSc. Graduated, Dept. Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Ilam, Ilam, I.R. Iran
[2*] Corresponding author: Assoc. Prof., Dept. Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Ilam, Ilam, I.R. Iran. Email: j.erfani@ilam.ac.ir
[3] Assoc. Prof. Dept. Biotechnology, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, I.R. Iran.

Received: 15.02.2021 Accepted: 04.05.2021

Abstract

In this study, 44 accessions and cultivars of three species of *Pistacia* including *P. atlantica* (15 accessions), *P. khinjuk* (23 accessions), and *P. vera* (6 cultivars) collected from different parts of Ilam and Semnan provinces, Iran, were evaluated for leaf and fruit traits. Investigation of morphometric traits revealed that there was a high variability (CVph) in fruit traits compared to leaf traits among species. The results of the principle component analysis (PCA) revealed that the three main components explained 94.04% of the total variation among the accessions. In PCA1, the fruit weight, length, and diameter, kernel and shell weight were predominant in the first component and explained 52% of the total variation. According to the results of cluster analysis, the accessions were divided into three main groups so that, those belonging to each species were placed into separate groups. Also, in the second part of the experiment, genetic diversity among samples was investigated using 12 RAPD primers. A total of 71 alleles were identified and their sizes ranged from 280 to 2500 bp. The number of observed alleles for each locus ranged from 4 (OPA-18 and OPA-16) to 9 (Custom primer) alleles, with an average of 5.91 alleles per locus. The polymorphic index content (PIC) was the highest (0.81) for the OPB-14 locus and the lowest (0.089) for the OPA-13 locus, and was 0.35 among all RAPD loci. The Jaccard's genetic similarity coefficient ranged from 0.27 to 0.84 among the samples. The obtained results of the current study will help in the classification, preservation, and identification of *Pistachio* genetic resources and can be effective in breeding improved varieties of this crop.

Keywords: Allele, cluster analysis, genetic diversity, morphometric variation, polymorphism