Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Molecular variation and genetic relationships among Iranian and foreign pistachio cultivars using gene-targeted CAAT box-derived markers

Azadeh Imani

M.Sc. Student, Department of Genetics and Plant Breeding, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran. E-mail address: imany.azadeh@yahoo.com

Jafar Ahmadi

*Corresponding author. Professor, Department of Genetics & Plant Breeding, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran. E-mail address: ahmadi@eng.ikiu.ac.ir, njahmadi910@yahoo.com

Mohsen Heydari

Master of Horticulture Science (MSc/MA), Department of Pistachio, Ruyesh Sabz Farda Horticultural Technologies Research Center, Tehran, Iran. E-mail address: agribusiness2@gmail.com

Abstract

Objective

The objectives of this research were the study genetic diversity in Iranian and foreign pistachio cultivars using CBDP markers and the efficiency of these markers in the differentiation and grouping of cultivars.

Materials and methods

In this research, the genetic diversity of 73 cultivars (63 Iranian and 10 foreign cultivars) was evaluated using 25 CBPD primers.

Results

The results showed that the bands' polymorphism for Iranian and foreign cultivars was 77.56% and 67.80%, respectively. The PIC mean for CBPD markers was 0.76 and all CBDP primers had a high ability to separate pistachio cultivars. The MI mean for CBDP primers was 2.65 and the CAAT2 primer showed the highest MI (8.52) value. Analysis of molecular variance determined 4% inter-group diversity and 96% intra-group diversity for studied genotypes. Gst value 0.04

verified low inter-group diversity as well. Nm value 11.03 showed the gene flow between foreign and Iranian pistachio cultivars. Iranian cultivars had higher values than foreign cultivars in terms of both Nei and Shannon gene diversity indices as well. Cluster analysis using the Jaccard matrix and UPGMA method was performed and the results showed, the average similarity coefficient between cultivars was 0.68 and the pistachio cultivars were divided in three main groups, in which the main groups were subdivided into several subgroups. The principal coordinate analysis also confirmed the result of the cluster analysis.

Conclusions

In conclusion, the use of CBDP markers is suitable for studying the genetic diversity of pistachio cultivars. Also, the efficiency and differentiation power of CBDP primers was confirmed due to the high mean of PIC and MI.

Keywords: CAAT box, CBDP, Functional marker, Gene diversity, Pistachio

Paper Type: Research Paper.

Citation: Imani A, Ahmadi J, Heydari M (2022) Molecular variation and genetic relationships among Iranian and foreign pistachio cultivars using gene-targeted CAAT box-derived markers. *Agricultural Biotechnology Journal* 14 (3), 41-62.

Agricultural Biotechnology Journal 14 (3), 41-62. DOI: 10.22103/jab.2022.17432.1310

Received: May 1, 2022. Received in revised form: June 10, 2022.

Accepted: June 11, 2022. Published online: August 10, 2022

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۲۲۲۸-۶۷۰۵ شاپا الکترونیکی: ۲۲۲۸-۶۵۰۰

تنوع ملکولی و روابط ژنتیکی ارقام پسته ایرانی و خارجی با استفاده از نشانگرهای هدفمند مبتنی بر CAAT-box ژن‌ها

آزاده ایمانی

دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و بهنژادی گیاهی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره)، قزوین، ایران. رایانامه: imany.azadeh@yahoo.com

جعفر احمدی

*نویسنده مسئول: استاد، گروه ژنتیک و بهنژادی گیاهی، دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره)، قزوین، ایران. تلفن ۰۹۱۲۳۱۲۸۲۷۸، رایانامه: njahmadi910@yahoo.com, ahmadi@eng.ikiu.ac.ir

محسن حیدری

کارشناس ارشد علوم باغبانی، پژوهشگر بخش تحقیقات پسته، مرکز پژوهشی فناوری های باغبانی رویش سبز فردا، تهران، ایران. رایانامه: agribusiness2@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۱۱ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۱/۰۳/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۲۱

چکیده

هدف: بررسی میزان تنوع ژنتیکی در ارقام ایرانی و خارجی پسته‌های موجود در ایران با استفاده از نشانگرهای CBDP (CAAT box- derived polymorphism) و کارائی این نشانگرها در تفکیک و گروه‌بندی ارقام و از و اهداف این تحقیق به‌شمار می‌آید.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق تنوع ژنتیکی ۷۳ رقم (۶۳ رقم ایرانی و ۱۰ رقم خارجی) با استفاده از ۲۵ آغازگر CBPD مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: بر اساس نتایج آزمایش درصد چند شکلی باندها در ارقام ایرانی ۷۷/۵۶ درصد و در ارقام خارجی ۶۷/۸۰ درصد مشاهده شد. میانگین PIC برای نشانگرهای CBPD، ۰/۷۶ بود و تمام آغازگرهای CBDP توانایی بالایی در تفکیک ارقام پسته داشتند. میانگین MI (Marker Index) برای آغازگرهای CBDP برابر۲/۶۵ بود و آغازگر CAAT2 بیشترین (۸/۵۲) مقدار MI را نشان داد. تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که از کل تنوع، چهار در صد به تنوع بین گروهی و ۹۶ در صد به تنوع ژنتیکی درون گروهی اختصاص دارد. مقدار Gst برابر با ۰/۰۴ تنوع پایین بین گروهی و مقدار Nm برابر با ۱۱/۰۳ احتمال وقوع جریان ژنی بین

ارقام خارجی و ایرانی پسته را نشان داد. ارقام ایرانی از نظر هر دو شاخص تنوع ژنی Nei و شانون از مقادیر بالاتری نسبت به ارقام خارجی برخوردار بودند. تجزیه کلاستر با استفاده از ماتریس جاکارد و به روش UPGMA نشان داد که متوسط ضریب تشابه بین ارقام ۰/۶۸ بود و ارقام پ سته مورد مطالعه در سه گروه ا صلی از هم متمایز شدند که هر کدام از گروه‌های ا صلی به چند زیرگروه تفکیک شدند. تجزیه به مختصات اصلی نیز تقسیم بندی حاصل از تجزیه کلاستر را تائید نمود.

نتیجه‌گیری: استفاده از نشانگرهایCBDP برای بررسی تنوع ژنتیکی ارقام پسته مناسب می‌باشند و کارایی و قدرت تمایز آغازگرهای CBDP با توجه به بالا بودن میانگین PIC و MI تایید شد.

کلیدواژه‌ها: تنوع ژنی، پسته، نشانگر عملکردی، جعبه CAAT، CBDP.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: ایمانی آزاده، احمدی جعفر، حیدری محسن (۱۴۰۱) تنوع ملکولی و روابط ژنتیکی ارقام پسته ایرانی و خارجی با استفاده از نشانگرهای هدفمند مبتنی بر CAAT-box ژن‌ها. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۴(۳)، ۴۱-۶۲.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

مقدمه

جنس پسته (*Pistacia*) متعلق به تیره پسته‌سانان (*Anacardiaceae*) دارای ۳۳ گونه می‌باشد و سه گونه *P.vera* (پسته اهلی یا معمولی)، *P. atlantica* (بنه) و *P. khinjuk* (خنجوک) از مهم‌ترین گونه‌های این جنس محسوب می‌شوند که در ایران هم شناخته شده‌اند (Caruso et al. 1998). اولین ارقام پسته در ایران حاصل پرورش و اهلی کردن درختان پسته وحشی (سرخس) بوده است و تنها پسته خوراکی که به‌صورت تجاری در بازار به خرید و فروش می‌رسد گونه *P.vera* است (Behboodi 2005). اطلاع از سطح تنوع ژنتیکی اساسی‌ترین جنبه تمام علوم زیستی از قبیل زیست شناسی، اصلاح و حفظ گونه‌های زیستی به‌شمار می‌رود. امروزه روش‌های بررسی تنوع ژنتیکی بیشتر براساس استفاده از نشانگرهای ژنتیکی در مجموعه‌های مورد مطالعه است (Kafkas et al. 2002; Karimi et al. 2009).

استفاده از نشانگرهای مولکولی در سطح DNA می‌تواند در تشخیص و شناسایی رقم خاص، تعیین روابط خویشاوندی بین ارقام و ژنوتیپ‌ها و تعیین و مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات مطلوب در یک ژنوتیپ به کار رفته و موجب بهبود مدیریت و کاربرد منابع ژنتیکی موجود شود (Mahmoodi et al., 2018). میزان اطلاعات به‌دست‌آمده از این تکنیک‌های ژنتیکی، یکی از پارامترهای قابل ارزیابی برای مطالعه جمعیت‌های مختلف و درک تفاوت‌های ژنتیکی بین جمعیت‌هاست (Mohammadabadi,

2017). همچنین، مطالعه ژنوتیپ‌های مختلف با استفاده از تکنیک‌های ملکولی بسیار مهم و برای طبقه‌بندی آن‌ها مفید است (Alinaghizadeh et al. 2007; Moazeni et al., 2016a). حفاظت باید بر اساس دانش عمیقی از منابع ژنتیکی گیاهان باشد، لذا تلاش برای شناسایی و تعیین خصوصیات ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف بسیار اهمیت دارد (Askari et al. 2010; Moazeni et al., 2016a) تنوع ژنتیکی یک عنصر اساسی برای پیشرفت ژنتیکی، حفظ جمعیت‌ها، تکامل و سازگاری به شرایط محیطی متغییر و مختلف می‌باشد (Mohammadabadi et al. 2017; Ghasemi et al. 2010). در سال‌های اخیر چندین سیستم نشانگری جدید مبتنی بر PCR توسعه‌یافته است که در بین آن‌ها نشانگرهای CBDP از جمله نشانگرهای نوظهور در عرصه بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت به‌شمار می‌آیند. این نشانگرها با استفاده از نواحی حفاظت شده ژنوم می‌توانند چندشکلی مبتنی بر نقاط هدفمند ژنوم ایجاد نمایند. نشانگر CBDP ازجمله نشانگرهای مولکولی قدرتمندی است که می‌توان به‌وسیله آن ژن‌ها را هدف قرار داد. آغازگرهای این نشانگر از جعبه CAAT ناحیه پیش‌برنده ژن‌ها طراحی می‌شوند (Singh et al. 2014). جعبه CAAT با توالی توافقی GGCCAATCT تقریبا در ۸۰ جفت بازی ناحیه بالادست کدون آغاز در ژن‌های یوکاریوتی واقع شده است که در فرآیند رونویسی نقش مهمی را ایفا می‌کند (Benoist et al. 1980). نوکلئوتیدهای CAAT در ناحیه مرکزی جعبه CAAT حفاظت شده بوده و در اغلب موارد نوکلئوتید C قبل از نوکلئوتیدهای CAAT قرار گرفته‌است. نشانگرهای CBDP، از تنوع موجود در نواحی غنی از ژن (gene-rich) ژنوم‌های گیاهی مشتق شده‌اند و از تکرارپذیری بالا برخوردار هستند. از سوی دیگر، استفاده از آن‌ها آسان بوده و نیاز به آگاهی از توالی ژنوم ندارد و همچنین نشانگرهای ذکر شده از نواحی عملکردی ژنوم تولید می‌شوند. مجموع ویژگی‌های ذکر شده سبب می‌شود که نشانگرهای CBDP در برنامه‌های اصلاحی گیاهان نظیر شناسایی ژنوتیپ، تهیه نقشه‌های پیوستگی و QTL بسیار مفید واقع شوند (Shahmuradov et al. 2003). به دلیل موفقیت بالای آغازگرهای CBDPدر تولید نشانگرها در گونه‌های مختلف گیاه کتان نتیجه‌گیری شده است که می‌توان از آنها به طور بالقوه برای ارزیابی تنوع ژنتیکی، شناسایی رقم، ساخت نقشه پیوستگی و انتخاب به کمک نشانگر استفاده کرد (Singh et al. 2014). در گندم دوروم نشانگرهای CBDP بر اساس مقادیر بالای میانگین محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) و شاخص نشانگری (MI) کارایی بالایی در تعیین تنوع ژنتیکی نشان دادند (Heidari et al. 2017). در مطالعه تنوع ژنتیکی زیتون با ۲۵ آغازگر CBDP، شاخص PIC و MI آغازگرها به ترتیب ۰/۹۴ و ۵/۶۴ بودند که بیانگر کارایی و قدرت تمایز بالای نشانگرهای CBDP می‌باشد. همچنین پارامترهای ژنتیکی تنوع ژنی نی (H) و شاخص شانون (I) در ارقام خارجی نسبت به ارقام ایرانی بالاتر بودند (Fabriki Ourang et al. 2019).

از اواسط سال ۱۹۸۰ شناسایی ژنومی و انتخاب با استفاده از فن‌آوری نشانگرهای مبتنی بر PCR توسعه یافت که از میان آن‌ها RAPD فراوانترین کاربرد را در مورد پسته داشته است (Williams et al. 1990). در تحقیقی به‌منظور مطالعه تنوع ژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های نر و ماده پسته از ۱۲ نشانگر RAPD استفاده شد. نتایج نشان داد که ژنوتیپ‌های نر تنوع ژنتیکی بالاتری نسبت به ژنوتیپ‌های ماده داشتند، دلیل آن پیوند نزدن ژنوتیپ‌های نر موجود در باغ‌های پسته بوده که باعث ایجاد تنوع وسیع‌تری

در ژنوتیپ‌های نر در مقایسه با ارقام ماده شده است (Hajizadeh et al. 2013). در مطالعه دیگری تنوع ژنتیکی و الگوهای ارتباطی ۱۵ رقم *P.vera* با استفاده از نشانگر RAPD مورد مطالعه قرار گرفت. براساس نتایج به‌دست آمده، دو گروه اصلی شامل گروه مدیترانه‌ای (ارقام منشاء گرفته از ناحیه مدیترانه اروپا، شمال آفریقا و ناحیه خاورمیانه) و گروه ایران خزر (ژرم پلاسم‌های موجود در شرق کوه‌های زاگرس) تفکیک شدند (Hormaza et al. 1994).

در پژوهشی Kafkas et al. (2002) از ۱۰ آغازگر RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی و فیلوژنی برخی از ارقام پسته ترکیه و فلسطین اشغالی استفاده کردند. در این پژوهش چهار گونه پسته مورد مطالعه به‌طور کاملاً واضح از یکدیگر جدا شدند. در پژوهشی Iranjo et al. (2015) با بررسی تنوع ژنتیکی ۵۰ ژنوتیپ پسته وحشی شامل ۵ گونه *P. vera*، *P. khinjuk*، *P. atlantica*، *P. mutica* و *P.eurycarpa* با استفاده از نشانگر RAPD به این نتیجه رسیدند که شباهت ژنتیکی از ۰/۳ تا ۰/۸۶ درصد و محتوای چندشکلی اطلاعات (PIC) از ۰/۸ تا ۰/۹۹ متغیر بود. در پژوهشی دیگر که به‌منظور بررسی روابط ژنتیکی بین ۳۱ رقم پسته با استفاده از چهار جفت آغازگر ریز ماهواره (SSR)، ۱۰ آغازگرRAPD و سه آغازگر ISSR انجام شد، همبستگی بالایی بین ماتریس‌های شباهت حاصل از دو نشانگرISSR وRAPD مشاهده گردید (Golan-Goldhirsh et al. 2004).

طی تحقیقی که بر روی ۳۳ رقم پسته تونس با کمک ۳۱ نشانگر ISSR انجام گرفت، نشانگر ISSR نقش موثری در تعیین چندشکلی مولکولی و بررسی ارتباط ژنتیکی در مطالعات ژرم پلاسم پسته از خود نشان داد (Fares et al. 2009). در بررسی تنوع ژنتیکی ۱۹ پسته ایرانی با استفاده از ۲۰ آغازگر ISSR مشاهده شدکه از مجموع ۱۱۴ مکان ژنی تکثیرشده ۷۳ مکان چندشکل بودند و استفاده از نشانگرهای ISSR برای طبقه‌بندی و بررسی تنوع ژنتیکی ارقام پسته مناسب می‌باشد (Tagizad et al. 2010). در آزمایشی بر روی ۱۳ ژنوتیپ پسته با استفاده از نشانگر ISSR، از بین ۲۸ مکان تولید شده، ۱۳ مکان چندشکل (۴۶/۴۲ درصد) بوده و نتایج نشان از تنوع کم بین ارقام مورد آزمایش و راندمان بالای نشانگر ISSR درتعیین تنوع بین ارقام پسته داشت (Norozi et al. 2009). در تحقیق دیگری که به‌منظور مطالعه تنوع ژنتیکی ۱۰ گونه پسته در نواحی الجزایر با استفاده از شش نشانگر ISSR انجام شد از بین ۱۱۱ باند تکثیر یافته، ۶۰ باند چندشکل بودند (Kebour et al. 2012). بررسی تنوع ژنتیکی ارقام و گونه‌های وحشی پسته موجود در ایران، به همراه ۲۲ رقم خارجی با استفاده از نشانگر SSR نشان داد که این نشانگر می‌تواند به‌طور واضح ارقام و گونه‌های ایرانی را از غیرایرانی تفکیک نموده و نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که جریان ژنی بین ارقام ایرانی و جمعیت‌های وحشی پسته وجود داشته‌است (Pazouki et al. 2010).

اولین گام در زمینه به‌نژادی پسته، دست‌یابی به منابع ژنتیکی آن، بررسی تنوع و روابط ژنتیکی بین ارقام مختلف می‌باشد. با به‌کارگیری نشانگرهای مولکولی، اصلاح گیاهان با سرعت و سهولت بیشتر و نیز انتخاب والدین برای تلاقی‌ها در برنامه‌های اصلاحی با اطمینان بیشتری انجام می‌گیرد . لذا هدف اصلی از این پژوهش بررسی میزان تنوع ژنتیکی موجود در ارقام ایرانی و

خارجی پسته‌های موجود در ایران با استفاده از یک سیستم نشانگری کارکردی نظیر نشانگرهای CBDP می‌باشد. علاوه‌براین، نشان دادن قابلیت این سیستم در تفکیک و گروه‌بندی ارقام پسته از دیگر اهداف این تحقیق به‌شمار می‌آید.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی، استخراج و تعیین کیفیت و کمیت DNA: در این پژوهش ۷۳ ژنوتیپ پسته (۶۳ رقم ایرانی و ۱۰ رقم خارجی) با استفاده از ۲۵ نشانگر CBDP (جدول ۳) مورد بررسی قرار گرفتند. کلیه ارقام مورد مطالعه (جدول ۱) از یک مرکز کشاورزی در استان قزوین (منطقه پاپلی وسطی) به‌صورت نمونه برگی جمع‌آوری شدند. نمونه‌های برگی برای هر رقم از پنج درخت نر و ده درخت ماده برداشت و ترکیب شدند و جهت نگهداری به یخچال ۸۰- درجه سلسیوس انتقال یافتند. استخراج DNA از نمونه‌های برگی با استفاده از روش CTAB[1] با اندکی تغییرات انجام شد (Doyle and Doyle 1987). کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از طریق اسپکتروفتومتری با دستگاه نانودراپ (Nanodrop, BioRAD) و الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد مشخص گردید. بعد از کمیت سنجی DNA، برای هم غلظت نمودن تمام نمونه‌های DNA، رقیق سازی نمونه‌ها انجام و غلظت DNA تمام نمونه‌ها به ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر رسانده شد.

اجزای PCR و واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی با آغازگرهای CBDP: در این تحقیق از ۲۵ آغازگر CBPD (Singh et al. 2014) استفاده گردید. سنتز آغازگرها توسط شرکت سیناکلون انجام گردید که طبق دستور شرکت سازنده رقیق شده و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. جهت یافتن بهترین دمای اتصال جفت آغازگرها، PCR با شیب دمایی (Gradiant PCR) برای تمام آغازگرها انجام گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از مخلوط واکنش شرکت امپلیکون (Ampliqon, 5200300-1250) انجام شد. مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۲/۵ µl Master mix (۲X)، ۲ µl آغازگر (۱۰µM)، ۱ µl DNA (۵۰ ng) و ۹/۵ µl H_2O تهیه شد. چرخه حرارتی استفاده شده در برنامه PCR برای سیستم نشانگری CBDP در جدول ۲ نشان داده شده است. جداسازی و آشکارسازی قطعات تکثیر شده با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ ۹۰ به مدت ۱۲۰ دقیقه و با استفاده از بافر TAE 1x انجام گرفت. جهت رنگ‌آمیزی از محلول Safe view II استفاده شد و قطعات تکثیری توسط نور UV در دستگاه Gel Documentation آشکارسازی شدند.

تجزیه داده‌ها: پس از انجام واکنش PCR، الگوهای باندی براساس حضور و عدم حضور باند به‌صورت صفر و یک امتیازدهی و ماتریس اعداد صفر و یک برای آغازگرهای مورد استفاده تهیه شد. برای تعیین کارایی آغازگرهای مورد استفاده، معیارهای محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) و شاخص نشانگری (MI) محاسبه شدند.

[1] Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide

جدول ۱. اسامی و کد ارقام پسته ایرانی و خارجی

Table 1. The names and code of Iranian and foreign pistachio cultivars

کد Code	نام رقم Cultivar	کد Code	نام رقم Cultivar name	کد Code	نام رقم Cultivar name	کد Code	نام رقم Cultivar name
P_1	رضایی Rezaei	P_{20}	حاج حسین دامغان Hajhossein	P_{39}	احمداقایی بارانی Ahmadagaei	P_{58}	آریا آمریکایی Ari amerikaei
P_2	عبدالهی Abdollahi	P_{21}	رضوی Razavi	P_{40}	احمداقایی پردانه Ahmadagaei	P_{59}	نر آمریکایی(پیترزوراندی) Nare amerikaei
P_3	پاکزادی Pakzadi	P_{22}	نیش کلاغی۲ Nishkalagi2	P_{41}	احمدآقایی Ahmadagaei	P_{60}	قزوینی کال خندان سیمرغ Gazvini kalkhandane simorg
P_4	نظری Nazari	P_{23}	خنجری Khanjari	P_{42}	احمداقایی قطعه ۸ تات Ahmadagaei	P_{61}	قزوینی ق ۱۸پاپلی Gazvini g18 papli
P_5	بادامی کج Badami kaj	P_{24}	شاپسند Shahpasand	P_{43}	اکبری قطعه ۵ تات Akbari gete5 tat	P_{62}	فندقی امینیان Fandigi aminian
P_6	سیف الدینی Seifoddini	P_{25}	سفیدخراسان Sefidkhorasan	P_{44}	اکبری قطعه ۷ پاپلی Akbari gete7	P_{63}	فندقی ۴۸ Fandogi 48
P_7	نیش کلاغی ۱ Nishkalagi1	P_{26}	شستی Shasti	P_{45}	شاپسند۲ Shahpasand2	P_{64}	فندقی رضایی Fandogi rezaei
P_8	جباری Jabbari	P_{27}	عامری Ameri	P_{46}	فندقی علی ابادی غریشی۱	P_{65}	فندقی علی ابادیغریشی Fandogi aliabadi goreishi
P_9	لاهیجانی Lahijani	P_{28}	سبزپسته Sabzpesteh	P_{47}	احمد اقایی و احدی بارانی	P_{66}	فندقی لکو Fandigi lako
P_{10}	محسنی Mohseni	P_{29}	تاج آبادی Tajabadi	P_{48}	احمداقایی بارانی Ahmadagadi	P_{67}	ممتاز۱ Momtaz1
P_{11}	سیریزی Sirizi	P_{30}	حضرتی Hazrati	P_{49}	احمداقایی کد۱۰۱ Ahmadagaei	P_{68}	داریوش Dariush
P_{12}	موسی‌آبادی Mosaabadi	P_{31}	رحیم‌آبادی Rahimabadi	P_{50}	احمداقایی ق ۱۷پ ۱۰۵ Ahmadagaei	P_{69}	آریایی Ariaei
P_{13}	عباسعلی Abbasali	P_{32}	قدرو ghadro	P_{51}	احمداقایی ق۱۲پ۱۰۶ Ahmadagaei	P_{70}	کرمان Kerman
P_{14}	کله قوچی Kalegochi	P_{33}	احمداقایی تات ۱۰۸ Ahmadagaei	P_{52}	احمداقایی ق۱۳پ ۱۰۷ Ahmadagaei	P_{71}	گلدن هیل Goldenhil
P_{15}	چوروک خورد Chorok	P_{34}	احمداقایی تات ۱۰۹ Ahmadagaei	P_{53}	ممتاز۲ Momtaze2	P_{72}	لاست هیل Losthil
P_{16}	کریم ابادی Karimabadi	P_{35}	احمداقایی ۱۷ پاپلی Ahmadagaei	P_{54}	هراتی Harati	P_{73}	آژینا Azhina
P_{17}	کله قوچی شاپسند Kalegochi	P_{36}	احمداقایی ۱۲ پاپلی Ahmadagaei 12papli	P_{55}	هراتی بارانی Harati barani		
P_{18}	پسته گرم Pesteh	P_{37}	احمدآقایی ۱۳ پاپلی Ahmadagaei	P_{56}	ایتالیایی ریز Italiaei riz		
P_{19}	برگ سیاه Barg siah	P_{38}	احمداقایی تات ۱ Ahmadagaei tat1	P_{57}	ایتالیایی درشت Italiaei dorosht		

جدول ۲. چرخه حرارتی برنامه PCR برای سیستم نشانگری CBDP

Table 2. Thermal cycle of PCR program for CBDP marker system

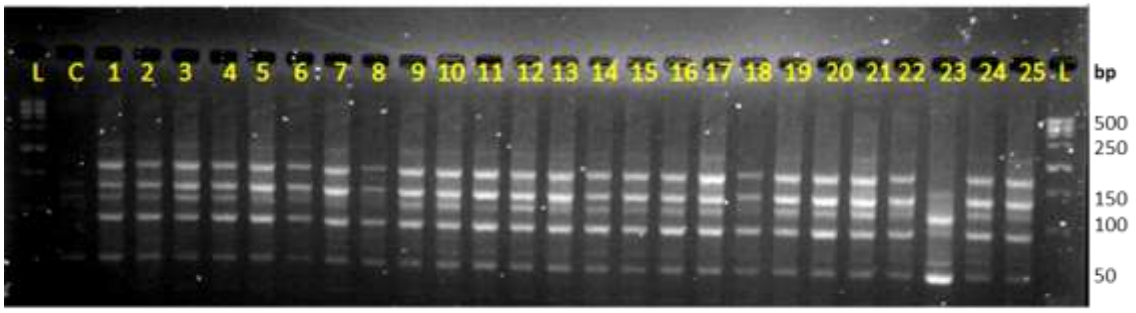
مرحله (Step)	زمان (min)Time	دما (°C)Temperature	تعداد چرخه (Cycle No.)
واسرشت‌سازی اولیه (First denaturation)	3	94	1
واسرشت‌سازی (Denaturation)	1	94	5
اتصال آغازگر (Annealing)	1	35	
بسط آغازگر (Extension)	1	72	
واسرشت سازی (Denaturation)	1	94	35
اتصال آغازگر (Annealing)	1	55	
بسط آغازگر (Extension)	1	72	
بسط نهایی (Final extension)	10	72	1

برای تعیین تنوع ژنتیکی بین و درون گونه‌ها، تجزیه واریانس مولکولی AMOVA با اســتفاده از نرم‌افزار GenALEX انجام شد. جهت بررسی و مقایسه میزان تنوع ژنتیکی موجود در هر یک از دو گروه ارقام ایرانی و خارجی، پارامترهای ژنتیکی درصد مکان‌های چندشــکل (PPL)، شــاخص شــانون (I)، تنوع ژنی Nei (H)، تعداد آلل‌های مشــاهده شــده (Na)، تعداد آلل‌های مؤثر (Ne)، ضــریب تمایز ژنی (Gst) و جریان ژنی (Nm) با اســتفاده از نرم‌افزارهای GenALEX و POP-GENE برآورد شــدند. گروه‌بندی ارقام بر اساس ماتریس تشابه جاکارد و به روش UPGMA با استفاده از نرم‌افزار NTSYS صورت گرفت. تجزیه تابع تشخیص با استفاده از نرم‌افزار SPSS ver. 22 انجام گرفت و تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) با هدف ارزیابی و تایید نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای با استفاده از نرم افزار GenALEx V6.50 (Peakall and Smouse 2006) محاسبه گردید.

نتایج و بحث

توانایی تکثیر، چندشکلی، شاخص نشانگری و قدرت تفکیک آغازگرها: از ۲۵ آغازگر مورد مطالعه ۲۴ آغازگر CBDP، ۶۵۵۸ قطعه DNA را در مجموع ۷۳ رقم تکثیر کردند. الگوی باندی آغازگر CAAT19 در تعدادی از ارقام پسته مورد مطالعه در شکل ۱ نشان داده شده است. بیشترین تعداد قطعات تکثیر شده متعلق به آغازگر CAAT2 (۷۵۴ قطعه در مجموع ۷۳ ژنوتیپ) وکمترین متعلق به آغازگر CAAT23 (۸ قطعه) بود. بیشترین و کمترین درصد چندشکلی به ترتیب متعلق به آغازگرهای CAAT2 (۹۲ درصد) و CAAT23 (صفر درصد) با میانگین چندشکلی کل ۷۲/۶۸ درصد بود (جدول ۳). در پژوهش Taqhizad et al. (2010) برای مطالعه تنوع ژنتیکی ۱۹ ژنوتیپ پسته اهلی با استفاده از ۲۰ آغازگر ISSR میزان چندشکلی را ۶۴ درصد گزارش کرده‌اند. همچنین در تحقیق Kafkas et al. (2006) با استفاده از ۲۰ آغازگر ISSR روی ارقام پسته میزان چند شکلی

حدود ۴۶/۲ درصد مشاهده شد. Norozi et al. (2009) نیز در آزمایشی بر روی ۳۱ ژنوتیپ پسته، ۴۶/۴۲ درصد چندشکلی را مشاهده کردند. با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان گفت که نشانگرهای CBDP با میزان چندشکلی بالاتر برای بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های پسته مناسب می‌باشند.



شکل ۱. الگوی باندی تکثیر شده توسط آغازگر CAAT19 برای برخی ارقام پسته ایرانی و خارجی. L: نشانگر اندازه ملکولی 50bp (sinaclon) و C: کنترل منفی

Figure 1. Banding pattern amplified by CAAT19 primer for some Iranian and foreign pistachio cultivars. L: 50bp ladder, C: Negative control

مقدار PIC از حداقل صفر درصد برای آغازگر CAAT23 تا حداکثر ۰/۹۲ برای آغازگر CAAT2 متغیر بود. میانگین PIC برای آغازگرهایCBPD در این مطالعه ۰/۷۶ به‌دست آمد و آغازگرهای CAAT2، CAAT18، CAAT14 و CAAT10 به‌ترتیب بیشترین مقدار PIC را به خود اختصاص دادند و نسبت به آغازگرهای دیگر قدرت تشخیص بهتری در تعیین فاصله ژنتیکی داشتند (جدول ۳). در بین شاخص‌های بیانگر کارایی یک سیستم نشانگری، شاخص PIC از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، زیرا این شاخص قابلیت سیستم نشانگری در تعیین پتانسیل آغازگرها در ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌ها را نشان می‌دهد (Powell et al. 1996). مقدار PIC بالاتر از ۰/۵ بیانگر قدرت بالای نشانگرها در تشخیص تنوع ژنتیکی در بین ژنوتیپ‌ها می‌باشد (Tams et al. 2005). بنابراین تمام آغازگرهای CBDP استفاده شده در این تحقیق (با مقادیر PIC بیشتر از ۰/۶۵ به‌جز آغازگر CAAT23) توانایی بالایی در تفکیک و ارزیابی تنوع ژنتیکی ارقام پسته داشتند. مقادیر بالای PIC آغازگرهای CBDP در مقایسه با سایر نشانگرها در تحقیقات مختلف نظیر ISSR و RAPD در پسته و مریم گلی (Tagizad et al. 2010; Yousefiazar-Khanian et al. 2015)، AFLP در گندم (Bohn et al. 1999)، SCoT در تعدای از گیاهان (Rajesh et al. 2015; Etminan et al. 2018; Pour-Aboughadareh et al. 2017, 2018) و SSR در زیتون (Gismondi and Canini 2013; Biton et al. 2012; Marra et al. 2013) حاکی از کارایی بالای آغازگرهای CBDP در تفکیک و تمایزافراد می‌باشد.

استفاده از PIC به تنهایی به‌عنوان شاخص قدرت تفکیک نشانگر، به‌خصوص برای نشانگرهای با امتیازدهی غالب ممکن است نشان دهنده کارایی واقعی آن‌ها نباشد، ولی شاخص نشانگری MI با در نظر گرفتن تعداد نشانگرهای تولید شده در محاسبات،

این نقص را جبران می‌کند (Prevost and Wilkinson 1999). MI علاوه بر پارامترهای مذکور در محاسبه PIC، از تعداد مکان ژنی چندشکل حاصل از آغازگر نیز در برآورد قدرت تفکیک آغازگر استفاده می‌کند. در پژوهش حاضر، میانگین MI برای آغازگرهای CBDP ۲/۶۵ به‌دست آمد و آغازگر CAAT2 بیشترین (۸/۵۲) و آغازگر CAAT23 کمترین (صفر) شاخص MI را نشان دادند (جدول ۳).

تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA): بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی (جدول ۴)، چهار درصد از تغییرات کل داده‌ها مربوط به تنوع بین دو گروه ارقام ایرانی و خارجی بوده و ۹۶ درصد از سهم تغییرات مربوط به تنوع ژنتیکی درون گروهی بود. بالا بودن تنوع ژنتیکی درون گروهی مشاهده شده بین ارقام مورد ارزیابی پسته می‌تواند به‌دلیل تنوع بالا و زمینه ژنتیکی بسیار متفاوت درون ارقام ایرانی و خارجی و همچنین منشاء ژنتیکی متفاوت آن‌ها باشد که آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق به‌خوبی قادر به نشان دادن این تنوع بودند. علاوه بر واریانس درون و بین گروهی، مقادیر Gst و Nm برای دو گروه ارقام پسته مورد مطالعه محاسبه گردید (جدول ۴). Gst به‌عنوان یک شاخص مهم در تعیین واریانس ژنتیکی، نسبت تنوع بین جمعیتی را به تنوع کل نشان می‌دهد. مطابق تئوری نی (Nei 1978) مقادیر Gst بیشتر از ۰/۱۵، بین ۰/۰۵ تا ۰/۱۵ و کمتر از ۰/۰۵ به‌ترتیب سطوح بالا، متوسط و پایین تنوع ژنتیکی را نشان می‌دهند. با توجه به نتایج که مقدار Gst برابر با ۰/۰۴ به‌دست آمد سطح پایین تنوع بین گروهی را در ژرم‌پلاسم ارقام پسته مورد مطالعه می توان گزارش نمود. علاوه براین، Nm که به‌عنوان معیاری از جریان ژنی در نظر گرفته می‌شود، اگر مقدار Nm بیشتر از یک باشد جریان ژنی مانع از ایجاد تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها شده و اگر Nm کمتر از یک باشد منجر به ایجاد تمایز بین جمعیت‌ها خواهد شد (Yan et al. 2019). میزان Gst با میزان جریان ژنی رابطه عکس دارد، به عبارتی دیگر وقتی میزان Gst در کمترین مقدار ممکن باشد، میزان جریان ژنی بین نمونه‌ها در بیشترین مقدار ممکن می‌باشد، به بیانی دیگر ارتباط بین نمونه‌ها کمتر می‌باشد. با توجه به نتایج به‌دست آمده مقدار جریان ژنی (Nm) برابر با ۱۱/۰۳ بود که این مقدار نشان دهنده احتمال وقوع جریان ژنی بین ارقام خارجی و ایرانی پسته می‌باشد.

بررسی تنوع ژنتیکی موجود در ارقام پسته ایرانی و خارجی: به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی در ارقام ایرانی و خارجی پسته، برخی از پارامترهای تنوع ژنتیکی مانند تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na)، تعداد آلل‌های موثر (Ne)، شاخص اطلاعات شانون (I)، شاخص تنوع ژنی نی (H) و درصد چندشکلی مکان‌های ژنی (PPL) برای ارقام ایرانی و خارجی پسته محاسبه و نتایج آن‌ها در جدول ۵ نشان داده شده‌است. تعداد آلل‌های مشاهده شده دارای میانگین ۱/۷۰ بود و ارقام ایرانی با متوسط ۱/۷۶ تعداد آلل مشاهده شده بالاتری نسبت به ارقام خارجی (۱/۶۳) داشتند. متوسط تعداد آلل‌های موثر نیز برابر با ۱/۴۹ بود که ارقام ایرانی بامیانگین ۱/۵۱ دارای تعداد آلل موثر بیشتری نسبت به ارقام خارجی (۱/۴۷) بودند. تعداد قطعه تکثیر شده متفاوت در ارقام ایرانی (۷۷/۵۶) بیشتر از ارقام خارجی (۶۷/۸۰) بود.

جدول ۳. مشخصات آغازگرهای CBDP و شاخص‌های محاسبه شده برای آغازگرها

Table 3. Characteristics of CBDP primers and calculated indices for primers

نام آغازگر Primer name	توالی آغازگر (′3→′5) Primer sequence	Tm(C°)	TAB	NL	EMR	MI	PIC
CAAT2	TGAGCACGATCCAATAAT	49.9	754	18	9.17	8.52	0.92
CAAT3	TGAGCACGATCCAATACC	53.1	172	4	1.85	1.28	0.69
CAAT4	TGAGCACGATCCAATAAG	50.8	312	7	3.68	3.03	0.82
CAAT5	TGAGCACGATCCAATCTA	51.6	281	7	3.79	3.11	0.81
CAAT6	TGAGCACGATCCAATCAG	53.5	398	8	5.37	4.60	0.85
CAAT7	TGAGCACGATCCAATCGA	55.1	212	6	2.86	2.30	0.80
CAAT8	TGAGCACGATCCAATCGG	56.2	275	8	3.71	3.16	0.85
CAAT9	TGAGCACGATCCAATGAT	52.6	274	5	2.64	2.08	0.78
CAAT10	TGAGCACGATCCAAT GTT	53.2	429	12	5.35	4.71	0.88
CAAT11	TGAGCACGATCCAATTGC	54.8	126	4	0.61	0.47	0.77
CAAT12	TGAGCACGATCCAATATA	48.9	162	3	0.59	0.39	0.65
CAAT13	TGAGCACGATCCAATGAG	53.5	218	5	2.45	1.93	0.78
CAAT14	TGAGCACGATCCAATGCG	57.3	409	9	5.52	4.86	0.88
CAAT15	TGAGCACGATCCAATTGA	52.9	71	2	0.47	0.23	0.49
CAAT16	TGAGCACGATCCAATTCA	52.9	312	6	4.21	3.44	0.81
CAAT17	TGAGCACGATCCAATTTG	52.1	342	10	4.62	4.02	0.87
CAAT18	CTGAGCACGATCCAATAG	51.4	309	11	4.17	3.68	0.88
CAAT19	CTGAGCACGATCCAATAC	51.7	272	6	2.75	2.27	0.82
CAAT20	CTGAGCACGATCCAATAT	50.5	211	5	2.37	1.76	0.74
CAAT21	CTGAGCACGATCCAATCA	53.5	394	8	3.87	3.35	0.86
CAAT22	CTGAGCACGATCCAATCG	54.8	255	5	2.15	1.71	0.79
CAAT23	CTGAGCACGATCCAATGG	54.6	8	0	0	0	0
CAAT24	CTGAGCACGATCCAATGA	53.5	177	4	1.59	1.17	0.73
CAAT25	CTGAGCACGATCCAATGT	53.8	185	6	1.87	1.7	0.78
CAAT1	TGAGCACGATCCAATAGC	53.5	–	-	–	–	–
میانگین			273.25	6.63	3.15	2.65	0.76

PIC، MI، EMR، NL، TAB و Tm به‌ترتیب شاخص‌های محتوای چندشکلی اطلاعات، شاخص نشانگری، نسبت مجموع موثر (تعداد متوسط باند برای هر ژنوتیپ)، تعداد آلل، تعداد کل قطعات تکثیر شده و نقطه ذوب آغازگر می‌باشند.

دو پارامتر ژنتیکی شاخص تنوع ژنی نی و شاخص شانون نسبت به سایر پارامترها از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند و مقادیر بالای این دو شاخص بیانگر سطح بالای تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های مورد ارزیابی است. ارقام ایرانی از نظر هر دو شاخص نی و شانون از مقادیر بالاتری (به‌ترتیب ۰/۴۳ و ۰/۲۹) نسبت به ارقام خارجی (به‌ترتیب ۰/۳۹ و ۰/۲۷) برخوردار بودند. این شاخص‌ها نشان دادند که تنوع آللی و ژنتیکی در بین ارقام ایرانی بیشتر از ارقام خارجی است. طبق محاسبات درصد چندشکلی باندها دربین ارقام ایرانی برابر با۷۷/۵۶ درصد و دربین ارقام خارجی برابر با ۶۷/۸۰ درصد بود (جدول ۵).

جدول ٤. تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) ارقام پسته ایرانی و خارجی با استفاده از نشانگرهای CBDP

Table 4. Analysis of Molecular Variance (AMOVA) of Iranian and foreign pistachio cultivars using CBDP markers

Nm	Gst	درصد تغییرات Variation%	واریانس برآورد شده Estimated Variance	میانگین مربعات (MS)	درجه آزادی (df)	منبع تغییرات (S.O.V)
		4	1.21	49.92	1	بین گروهها (Among groups)
11.03	0.04	96	29	29	71	درون گروها (Within groups)
		100	30.21		72	کل Total

جدول ٥. برآورد پارامترهای ژنتیکی در ارقام پسته ایرانی و خارجی با استفاده از نشانگرهای CBDP

Table 5. Estimation of genetic parameters in Iranian and foreign pistachio cultivars using CBDP markers

پارامتر ژنتیکی Genetic parameter	ارقام ایرانی Iranian cultivars	ارقام خارجی Foreign cultivars	کل Total
1.70±0.03	1.63±0.04	1.76±0.03	تعداد آلل‌های مشاهده شده (Na) No. of Different Alleles
1.49±0.02	1.47±0.03	1.51±0.03	تعداد آلل‌های مؤثر (Ne) No. of Effective Alleles
0.41±0.01	0.39±0.02	0.43±0.02	شاخص شانون (I) Shannon's Index
0.28±0.01	0.27±0.01	0.29±0.01	تنوع ژنتیکی نی (H) Nei genetic diversity
72.68	67.80	77.56	درصد چندشکلی مکان‌های ژنی Loci polymorphism %

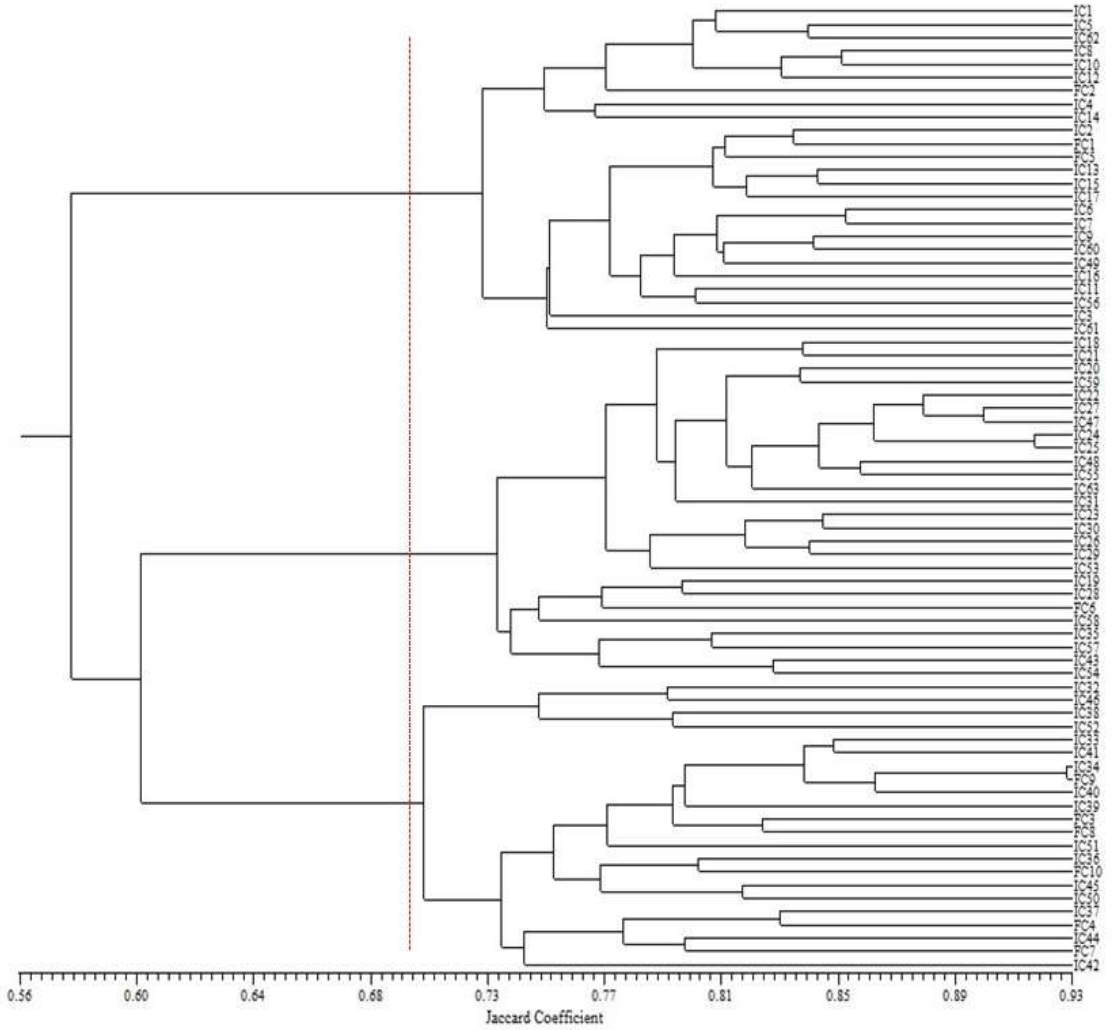
گروه‌بندی ارقام با تجزیه خوشه‌ای: به‌منظور توصیف دقیق‌تر روابط بین گونه‌های ارزیابی شده، تجزیه خوشه‌ای با روش‌ها و ضرایب مختلف بررسی شده و در نهایت با استفاده از ماتریس جاکارد و به روش UPGMA انجام شد. متوسط ضریب تشابه بین ارقام ۰/۶۸ بود و ضریب کوفنتیک برای کلاستر ترسیم شده در مقایسه با سایر روش‌های تجزیه خوشه‌ای دارای بالاترین (۰/۹۸) مقدار خود بود. ضریب کوفنتیک بالاتر از ۰/۸ برازش قوی دندروگرام ترسیم شده را نشان می‌دهد (Rohlf 2000). بر اساس خط برش در دندروگرام ترسیم شده (شکل ۲)، ۷۳ رقم پسته در سه گروه اصلی از هم متمایز شدند که هر کدام از گروه‌های اصلی به چند زیرگروه تفکیک شدند (شکل ۲). گروه اول شامل ارقام ایرانی نیش‌کلاغی۲، احمدآقایی قطعه۱تات، احمدآقایی قطعه ۱۷ پاپلی کد۱۰۵، اکبری قطعه ۷ پاپلی، شاپسند۲، احمدآقایی قطعه ۱تات کد۱۰۸، فندقی علی‌آبادی غریشی۱، احمد آقایی قطعه ۱۳ پاپلی

کد۱۰۷، احمدآقایی قطعه ۱۲ پاپلی کد۱۰۶، اکبری قطعه ۵ تات، احمدآقایی بارانی، احمدآقایی قطعه ۱۳ پاپلی، احمدآقایی قطعه ۸ تات، احمدآقایی کد۱۰۱، احمدآقایی قطعه ۱۲ پاپلی، احمد آقایی قطعه ۸تات کد۱۰۹ و ارقام خارجی لاستهیل، آریا آمریکایی، گلدن-هیل، آژینا، نرآمریکایی (پیترزوراندی) وکرمان بودند. در گروه دوم ارقام ایرانی شامل عامری، حضرتی، تاج آبادی، فندقی لکو، رحیم آبادی، کله قوچی شاپسند، احمد آقایی بارانی، کله قوچی، چوروک خورد، احمدآقایی پردانه، فندقی امینیان، هراتی بارانی، رضوی، قدرو، حاج حسین دامغان، کریم آبادی، برگ سیاه، قزوینی کال خندان سیمرغ، سبزپسته، پسته گرم، فندقی علی آبادی غریشی۲، احمد آقایی واحدی بارانی، فندقی رضایی، احمدآقایی قطعه ۱۷ پاپلی، قزوینی قطعه ۱۸ پاپلی و تنها رقم خارجی آریایی قرارگرفتند. درگروه سوم نیز ارقام ایرانی شامل رضایی، بادامی کج، هراتی، جباری، محسنی، موسی آبادی، نظری، خنجری، عبدالهی، عباسعلی، شاپسند۱، شستی، سیف الدینی، نیش‌کلاغی۱، لاهیجانی، ممتاز۱، احمدآقایی، سفید خراسان، سیریزی، فندقی ۴۸، پاکزادی، ممتاز۲ و ارقام خارجی شامل رقم‌های ایتالیایی درشت، ایتالیایی ریز و رقم داریوش بودند. جهت بررسی صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای از تجزیه تابع تشخیص استفاده گردید و نتایج تابع تشخیص (جدول ۶) توانست با احتمال ۱۰۰ درصد صحت گروه‌بندی و نیز تفاوت بین سه گروه تعیین شده مربوط یه تجزیه خوشه‌ای را نشان دهد.

حضور برخی از ارقام خارجی در کنار ارقام ایرانی در یک گروه دور از انتظار نبوده و با توجه به قدمت کشت و حضور ارقام خارجی در کنار ارقام ایرانی تا حدودی قابل پیش‌بینی بود. در تحقیق حاضر ارقام شستی، سیریزی و خنجری در یک گروه (گروه ۳) قرار گرفتند که منطبق با نتایج .Haji-Rezaei et al (2009) می‌باشد. رقم کله قوچی با سیف الدینی در دو گروه مجزا قرار گرفتند، با توجه به اینکه دو رقم مذکور از نظر صفات ظاهری، عادت رشد درخت، شروع گلدهی، مرحله تمام گل، طول دوره گلدهی، شکل جوانه گل، تعداد برگچه، وزن پوست سبز، وزن خشک پسته، بافت پوست سبز و شکل پسته خشک باهم تفاوت دارند (Tajabadipour 1997)، بنابراین قرار گرفتن آن‌ها در دو گروه جداگانه، نتیجه منطقی به‌نظر می‌رسد. برخلاف نتایج پژوهش حاضر،.Tagizad et al (2010) گزارش کردند که کله قوچی با سیف الدینی تشابه بالایی دارد که البته نتایج متفاوت در مورد ژنوتیپ‌های یکسان در پژوهش‌های مختلف، می‌تواند به دلیل متفاوت بودن نوع نشانگرهای مورد استفاده باشد.

تجزیه به مختصات اصلی (PCoA): به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی ارقام پسته ایرانی و خارجی، از روش تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) نیز استفاده شد. دو مولفه اول در تجزیه به مختصات اصلی حدود ۷۰ درصد از تنوع کل داده ها را توجیه نمود و نمودار بای پلات بر اساس دو مولفه اول ترسیم گردید (شکل ۳). تجزیه به مختصات اصلی نیز همانند تجزیه خوشه‌ای کل ارقام ایرانی و خارجی را به سه گروه اصلی تقسیم بندی کرد و گروه بندی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی تایید کننده گروه بندی تجزیه خوشه‌ای بود. طبق این دو تجزیه ارقام خارجی لاست‌هیل، گلدن‌هیل، آژینا، نرآمریکایی با ارقام ایرانی گروه اول شباهت داشتند. رقم خارجی آریایی شباهت بسیار با ارقام ایرانی عامری، حضرتی، تاج آبادی، فندقی لکو، رحیم آبادی، کله قوچی

و سایر ارقام گروه دوم داشتند. ارقام خارجی ایتالیایی درشت، ایتالیایی ریز و رقم داریوش نیز شباهت فراوان با ارقام ایرانی رضایی، بادامی کج، هراتی، جباری، محسنی، موسی آبادی، نظری، خنجری، عبدالهی، عباسعلی و سایر ارقام گروه سوم داشتند.



شکل ۲. تجزیه خوشه‌ای به‌روش UPGMA با ضریب تشابه جاکارد برای ارقام پسته ایرانی و خارجی با استفاده از نشانگرهای CBDP

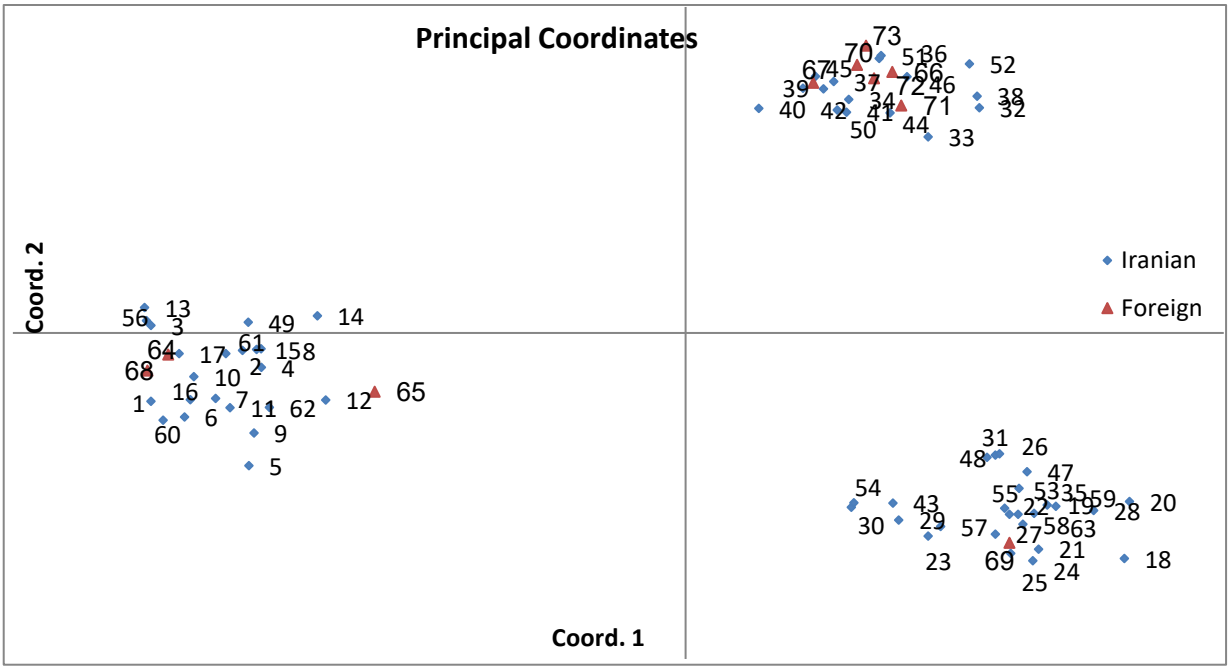
Figure 2. Cluster analysis with UPGMA method and Jaccard similarity coefficient for Iranian and foreign pistachio cultivars using CBDP markers

نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان داد که سیستم نشانگری CBDP دارای پتانسیل مناسبی در نشان دادن روابط درون گونه‌ای و گروه‌بندی افراد بر اساس ساختار ژنومی آن‌ها می‌باشد. از این‌رو شاید بتوان اظهار داشت که استفاده از این نشانگر مولکولی در آزمایشات تجزیه ارتباطی و نقشه‌یابی ژنتیکی می‌تواند به‌طور مؤثری مورد استفاده قرار گیرد. زیرا این نشانگر بر اساس تنوع ناحیه حفاظت شده عمل می‌کند و با توجه به این‌که این مناطق عموماً شامل دامین‌هایی در ارتباط با توالی‌های حفاظت‌شدهDNA درون ژن هستند و بر مناطق ژنی متمرکز می‌باشند به همین دلیل در برنامه‌های کاربردی نظیر نقشه‌یابیQTL نسبت به نشانگرهای تصادفی برتری دارند (Andersen and Lubberstedt 2003).

جدول ٦ . نسبت تخصیص صحیح افراد به درون گروهها با استفاده از تجزیه تابع تشخص

Table 6. The ratio of the correct allocation of individuals to groups using discriminant function analysis

گروهها و میزان صحت گروهبندی ژنوتیپها در هر گروه با تابع تشخیص Groups and the degree of accuracy of grouping genotypes in each group with the discriminant analysis			تعداد ژنوتیپ Number of genotypes	گروه Group
3	2	1		
0	0	22 (100%)	22	1
0	26 (100%)	0	26	2
25 (100%)	0	0	25	3
100%		Accuracy of grouping	صحت گروهبندی	



شکل ٣. بای‌پلات حاصل از تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) برای ارقام پسته ایرانی و خارجی با استفاده از نشانگرهای CBDP

Figure 3. Biplot of principal coordinate analysis (PCoA) for Iranian and foreign pistachio cultivars using CBDP markers

نتیجه‌گیری: در این تحقیق کارایی و قدرت تمایز نشـــانگرهای CBDP با توجه به بالا بودن میانگین محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) و شاخص نشانگری (MI) آغازگرهای مورد استفاده تایید شد. تنوع ژنی نی و شاخص شانون در ارقام ایرانی نسبت به ارقام خارجی بیشتر بودند. جریان ژنی بالایی بین ارقام پسته مشاهده شد و با توجه به تجزیه واریانس مولکولی، ۹۶ درصد از تغییرات ژنتیکی کل توسـط تنوع درون گروهی ارقام ایرانی و خارجی توجیه شـد. تجزیه کلاسـتر و تجزیه به مختصـات اصـلی نتوانست به‌طور کامل ارقام خارجی را از ارقام ایرانی تفکیک کند که این امر با توجه به قدمت کشت و حضور ارقام خارجی در کنار ارقام ایرانی تا حدودی قابل پیش‌بینی بود. طبق نتایج تنوع در ارقام ایرانی بیشـــتراز ارقام خارجی بود. بالا بودن تنوع ژنتیکی بین ارقام مختلف پســته در این مطالعه که به‌دلیل دگرگشــن بودن گیاه پســته قابل پیش‌بینی بود بیانگر اســتعداد خوب این گیاه برای اقدامات اصلاحی بوده و عامل مهم حفظ ذخایر ژنتیکی با ارزش می باشد.

سپاسگزاری: بدین وسیله از دانشگاه بین‌المللی امام خمینی(ره) جهت تامین هزینه‌های مالی این تحقیق و مرکز پژوهشی فناوری‌های نوین باغبانی پسته بابت ایجاد دسترسی و تهیه مواد گیاهی قدردانی می‌گردد.

منابع

تاج‌آبادی‌پور علی (۱۳۷۶) شناسایی برخی از ارقام پسته ایرانی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران. ص ۱۷۷.

حاجی زاده حسین آبادی محبوبه، کریمی حمیدرضا، دشتی حسین، شمشیری محمدحسین (۱۳۹۲) بررسی تنوع ژنتیکی تعدادی از ژنوتیپ‌های نر و مادهٔ پسته (*Pistacia vera L*.) با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD. به نژادی گیاهان زراعی و باغی ۱(۱)، ۲۳-۳۲.

حاجی‌رضایی معصومه، باقی‌زاده امین، جوادی غلامرضا، صادقی‌زاده مجید (۱۳۸۸) ارزیابی تنوع ژنتیکی تعدادی از ارقام پسته استان کرمان بر اساس نشانگر مولکولی RAPD. مجله زیست شناسی ایران ۲۲(۳)،. ۴۶۹-۴۶۰.

عسکری ناهید، باقی زاده امین، محمدآبادی محمدرضا (۱۳۸۹) مطالعه تنوع ژنتیکی در چهار جمعیت بز کرکی راینی با استفاده از نشانگرهای ISSR. مجله ژنتیک نوین ۵، ۴۹-۵۶.

فابریکی اورنگ صدیقه، گلمحمدی مجید، کریمی حمید (۱۳۹۷) ارزیابی روابط ژنتیکی ارقام امیدبخش و تجاری زیتون با استفاده از چند شکلی نشانگرهای هدفمند مبتنی بر جعبه CAAT ژن‌ها (CBDP). مجله بیوتکنولوژی کشاورزی ۱۰(۴)، ۹۳-۱۰۹.

محمودی مریم ، آیت اللهی مهرجردی احمد ، محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۸) تنوع ژنتیکی ژن کاپاکازئین درجمعیت بزهای کرکی راینی، سانن و وحشی با تکنیک PCR-RFLP. ژنتیک نوین ۱۴(۱)، ۷۳-۷۷.

References

Alinaghizadeh R, Mohammad Abadi MR, Moradnasab Badrabadi S (2007) Kappa-casein gene study in Iranian Sistani cattle breed (Bos indicus) using PCR-RFLP. Pakistan J Biol Sci 10 (23), 4291-4294.

Anderson JR, Lubberstedt T (2003) Functional markers in plants. Trends Plant Sci 8:554-560.

Askari N, A Baghizadeh, MR Mohammadabadi (2010) Study of genetic diversity in four populations of Raeini cashmere goat using ISSR markers. Modern Genet J 5 (2), 49-56 (In Persian).

Behboodi BS (2005) Ecological distribution study of wild pistachios for selection of rootstock. Options Mediterr 63, 61-67.

Benoist C, Ohare K, Breathnach R, Chambon P (1980) The ovalbumin gene sequence of putative control regions. Nucleic Acids Res 8, 127-142.

Biton I, Shevtsov S, Ostersetzer O et al. (2012) Genetic relationships and hybrid vigour in olive (*Olea europaea* L.) by microsatellites. Plant Breed 131, 767-774.

Bohn M, Utz HF, Melchinger AE (1999) Genetic similarities among wheat cultivars determined on the basis of RFLPs, AFLPs and SSRs and their use for predicting progeny variance. Crop Sci 39, 228-237.

Caruso T, Iannini C, Monastra F et al. (1998) Genetic and phenotypic in pistachio (*Pistacia vera* L.) germplasm collected in Mediaterranean countries. Acta Hort 470, 168-178.

Doyle JJ, Doyle JK (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bulletin 19, 11-15.

Etminan A, Pour-Aboughadareh A, Noori Aet al. (2018) Genetic relationships and diversity among wild *Salvia* accessions revealed by ISSR and SCoT markers. Biotech Biotechnol Equi 32(3), 610-617.

Fabriki Ourang S, Golmohammadie M, Karimi H (2019) Evaluation of genetic relationships among promising and commercial olive varieties using gene-targeted CAAT box-derived polymorphism (CBDP) markers. J Agri Biotech 10(4), 93-110 (In Persian)

Fares K, Guasmi F, Touil L et al. (2009) Genetic diversity of Pistachio tree using intersimple sequence repeat markers (ISSR) supported by morphological and chemical markers. Biotech 8, 24-34.

Ghasemi M, Baghizadeh A, Abadi MRM (2010) Determination of genetic polymorphism in Kerman Holstein and Jersey cattle population using ISSR markers. Aust J Basic Appl Sci 4 (12), 5758-5760.

Gismondi A, Canini A (2013) Microsatellite analysis of latial (*Olea europaea* L.) cultivars. Plant Biosyst 147, 686-691.

Golan-Goldhirsh A, Barazani O, Wang ZS et al. (2004) Genetic relationships among mediterranean Pistacia species evaluated by RAPD and AFLP markers. Plant Systematics Evol 246, 9-18.

Haji-Rezaei M, Baghizadeh A, Javadi GR, Sadeghizadeh M (2009) Genetic diversity assessment ofa few numbers of pistachio cultivars in Kerman province based on RAPD markers. Iran J Biol 22(3), 460-469. (In Persian)

Hajizadeh Hosseinabadi M, Karimi H, Dashti H, Shamshiri M (2013) Assessment of genetic diversity among some male and female pistachio (*Pistacia vera* L.) genotypes using RAPD marker. Breed Agro Horti Crop 1(1), 23-32 (In Persian)

Heidari P, Etminan A, Azizinezhad R, Khosroshahli M (2017) Genomic variation studies in durum wheat (*Triticum turgidum* ssp. durum) using CBDP, SCoT and ISSR markers. Indian J Genet Plant Breed 77(3), 379-386.

Hormaza JI, Dollo L, Polito VS (1994) Determination of relatedness and geograohpcal movement of *Pistaci vera* (Pistachio; Ana cardiaceae) germplasm by RAPD analysis. Econ Bot 48, 349-358.

Iranjo P, NabatiAhmadi D, Sorkheh K et al. (2015) Genetic diversity and phylogenetic relationships between and within wild Pistacia species populations and implications for its conservation. Northeast Forestry University and Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Kafkas S, Perl-Treves R (2002) Inter-specific relationships in the genus Pistacia L. (Anacardiaceae) based on RAPD fingerprints. Horti Sci 37, 168-171.

Kafkas S, Ozkan H, Acar I et al. (2006) Detecting DNA polymorphism and genetic diversity in a wide pistachio germplasm: comparison of AFLP, ISSR, and RAPD markers. J Am Soci Horti Sci 131(4), 522-529.

Karimi HR, Zamani Z, Ebadi A, Fatahi MR (2009) Morphological diversity of Pistacia species in Iran. Genet Resour Crop Evol 56, 561-571.

Kebour D, Boutekrabt A, Mefti M (2012) Using ISSR markers to study genetic polymorphism of pistachio (*Pistacia vera* L.) in Algeria. E3 J Biotech and Pharma Res 3(3), 47-53.

Mahmoodi M, Ayatollahi A, Mohammadabadi MR (2018) Studying exon 4 of kappa-casein gene in Kermani sheep using PCR-RFLP. Agric Biotech J 9 (3), 119-128 (In Persian).

Moazeni S, Mohammadabadi MR, Sadeghi M et al. (2016a) Association between UCP Gene Polymorphisms and Growth, Brreeding Value of Growth and Reproductive Traits in Mazandaran Indigenous Chicken. Open J Anim Sci 6, 1-8.

Moazeni SM, Mohammadabadi MR, Sadeghi M et al. (2016b) Association of the melanocortin-3(MC3R) receptor gene with growth and reproductive traits in Mazandaran indigenous chicken. J Livest Sci Technol 4, 51-56.

Mohammadabadi MR (2017) Role of clostridium perfringens in pathogenicity of some domestic animals. J Adv in Agri 7, 1117-1121.

Mohammadabadi MR, Esfandyarpoor E, Mousapour A (2017) Using inter simple sequence repeat multi-loci markers for studying genetic diversity in kermani sheep. J Res Develop 5 (2), e154.

Marra FP, Caruso T, Costa F et al. (2013) Genetic relationships, structure and parentage simulation among the olive tree (*Olea europaea* L. subsp. *europaea*) cultivated in southern Italy revealed by SSR markers. Tree Genet Genome 9, 961-973.

Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89, 583- 90.

Norozi SH, Baghizadeh M, Jalali Javaran M. (2009) The genetic diversity of Iranian pistachio (*Pistacia vera* L.) cultivars revealed by ISSR markers. Biol Diver Conserv 2, 50-56.

Pazouki L, Mardi M, Salehi Shanjani P et al. (2010) Genetic diversity and relationship among Pistacia species and cultivars. Conserv Genet 11, 311-318.

Peakall R, Smouse PE GenAlEx 6 (2006) Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Mol Ecol Notes 6, 288-295.

Prevost A, Wilkinson MJ (1999) A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. Theor Appl Genet 98, 107-112.

Pour-Aboughadareh A, Ahmadi J, Mehrabi AA et al. (2017) Assessment of genetic diversity among Iranian Triticum germplasm using agro-morphological traits and start codon targeted (SCoT) markers. Cereal Res Commun 45, 574-586.

Pour-Aboughadareh A, Ahmadi J, Mehrabi AA et al. (2018) Insight into the genetic variability analysis and relationships among some Aegilops and Triticum species, as genome progenitors of bread wheat, using SCoT markers. Plant Biosyst 152(4), 694-703.

Powell W, Morgante M, Andre C et al. (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Mol Breed 2, 225-238.

Rajesh MK, Sabana AA, Rachana KE (2015) Genetic relationship and diversity among coconut (*Cocos nucifera* L.) accessions revealed through SCoT Analysis. 3 Bitech 5, 999-1006.

Rolf FJ (2000) NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system. Applied Biostatistics Inc. NY: Exeter Publishing, Ltd. 1989.

Shahmuradov IA, Gammerman AJ, Hancock JM et al. (2003) Plant Prom: a database of plant promoter sequences. Nucleic Acids Res 31, 114-117.

Singh AK, Rana MK, Singh S et al. (2014) CAAT box-derived polymorphism (CBDP): a novel promoter-targeted molecular marker for plants. J Plant Biochem Biotechnol 23(2), 175-183.

Tagizad A, Ahmadi J, Haddad R, Zarrabi MA (2010) Comparative analysis of ISSR and RAPD markers for studying genetic diversity in Iranian pistachio cultivars. Iranian J Gene Plant Breed 1, 6-16.

Tajabadipour A (1997) Identification of some of Iranian pistachio cultivars. M.Sc. Thesis P: 177. Tehran University, IRAN. (In Persian)

Tams SH, Melchinger AE, Bauer E (2005) Genetic similarity among European winter triticale elite germplasms assessed with AFLP and comparisons with SSR and pedigree data. Plant Breed 124(2), 154-160.

Williams JGK, Kubelik AR, Levak KJ et al. (1990) DNA polymorphism amplification by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res 18, 6531-6535.

Yan W, Li J, Zheng D et al. (2019) Analysis of genetic population structure and diversity in *Mallotus oblongifolius* using ISSR and SRAP markers. Peer J 7, e7173.

Yousefiazar-Khanian M, Asghari A, Ahmadi J et al. (2016) Genetic diversity of Salvia species assessed by ISSR and RAPD markers. Not Bot Horti Agrobot 44(2), 431-436.