

بررسی ساختار تنوع ژنتیکی جمعیت‌های درختان بنه (*P. atlantica* *subsp. mutica*) با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD-PCR

- ❖ **علی اشرف مهرابی***؛ دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران
- ❖ **پیمان غلامی**؛ دانش‌آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشکده تحصیلات تکمیلی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
- ❖ **علیرضا اطمینان**؛ استادیار گروه مهندسی کشاورزی گرایش اصلاح نباتات، دانشکده تحصیلات تکمیلی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
- ❖ **سمیرا محمدی**؛ دانش‌آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

چکیده

گونه بنه (*P. atlantica subsp. mutica*) از بارزترین گونه‌های جنگلی ایران است که از گذشته‌های دور بهره‌برداری شدیدی از آن صورت گرفته است. شناخت تنوع ژنتیکی جمعیت‌های مختلف بنه، اهمیت زیادی برای احیا، توسعه و ترمیم رویشگاه‌های این گونه دارد. در این تحقیق، به منظور بررسی تنوع ژنتیکی، ۱۰ جمعیت بنه شامل ۵۹ ژنوتیپ با استفاده از ۱۳ آغازگر RAPD، در مجموع ۹۷ آلل با میانگین ۷/۴۶ آلل برای هر آغازگر تولید شد که ۱۰۰ درصد آلل‌ها چندشکل بودند. محتوای اطلاعات چندشکلی از ۰/۱۱ برای آغازگر Oligo342 تا ۰/۲۱ برای آغازگر Oligo18 و شاخص نشانگر از ۰/۳۹ برای آغازگر Oligo203 تا ۴/۳۵ برای آغازگر Oligo342 متفاوت بود. جمعیت آبدانان بیشترین میزان آلل‌های چندشکل (۵۷/۷۳) و شاخص شانون (۰/۲۵۱) را نشان داد و بیشترین میزان شاخص تصحیح‌شده هتروژنی (۰/۱۷۲) نیز در جمعیت بانه مشاهده شد؛ درحالی که کمترین میزان آلل‌های چندشکل (۱۳/۴۰ درصد)، شاخص تصحیح‌شده هتروژنی (۰/۰۷۴) و شاخص شانون (۰/۰۸۱) در جمعیت خارج از زاگرس مشاهده شد. تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که سطح بیشتری از تنوع به درون جمعیت‌ها (۷۸ درصد) تعلق داشت، درحالی که ۲۲ درصد تنوع در بین جمعیت‌ها مشاهده شد. تجزیه خوشه‌ای نتوانست ژنوتیپ‌ها را به‌طور کامل از هم تفکیک کند و نبود ارتباط بین تنوع مولکولی و تنوع جغرافیایی را نشان داد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، با وجود در معرض خطر بودن این گونه ارزشمند، تنوع ژنتیکی کافی برای احیا، توسعه و ترمیم رویشگاه‌های این گونه وجود دارد.

واژگان کلیدی: بنه، تجزیه خوشه‌ای، تجزیه واریانس مولکولی، تنوع ژنتیکی، نشانگر RAPD-PCR.

مقدمه

جنس پسته (*Pistacia*) عضوی از خانواده سماق (*Anacardiaceae*) با ۱۱ گونه است [۱]. سه گونه پسته زراعی یا خندان (*P. vera*)، پسته خنجوک (*P. khinjuk*) و بنه (*P. atlantica*) در ایران وجود دارند. بنه شامل سه زیرگونه موتیکا (*P. atlantica subsp. mutica*)، کوردیکا (*P. atlantica subsp. kurdica*) و کابولیکا (*P. atlantica subsp. cabulica*) است [۲، ۳]. گونه بنه به‌عنوان یکی از گونه‌های بومی ایران حدود ۲/۵ تا ۳ میلیون هکتار از سطح کشور را می‌پوشاند [۴].

بنه زیرگونه موتیکا (*P. atlantica subsp. mutica*) گونه‌ای دیپلوئید ($2n=2x=28$)، درختچه‌ای، دوپایه و خزان‌کننده است. این گونه به دلایل مختلفی از لحاظ اقتصادی اهمیت دارد، از جمله تولید سقز، میوه و محصولات فرعی (روغن و ...) و استفاده‌های دارویی و خوراکی متعدد آن، و نیز کاربرد میوه و شاخ‌وبرگ آن در تغذیه و تولید علوفه؛ از لحاظ زیست‌محیطی نیز به دلیل تأثیر در حفاظت منابع آب و خاک، تلطیف آب‌وهوای منطقه، تأثیر آن در پناهگاه‌های حیات وحش و سازگاری زیاد این گونه با شرایط مختلف اکولوژیکی از اهمیت خاصی برخوردار است. رویشگاه‌های این گونه با ارزش به دلایلی از جمله آتش‌سوزی، چرای مفرط دام، توسعه اراضی کشاورزی، سقزگیری نادرست، عوامل ژنتیکی و محیطی مختلف به همراه سایر فعالیت‌های انسانی مورد تخریب و تجاوز قرار گرفته و تنوع زیستی اعم از گیاهی و جانوری موجود در این رویشگاه‌ها را نیز در معرض تهدید قرار داده است [۵، ۶]. داده‌های ژنتیک جمعیت می‌تواند اطلاعات ارزشمندی برای مدیریت و حفاظت گونه‌ها فراهم کند [۷]، بنابراین با شناخت تنوع ژنتیکی

جمعیت‌های مختلف بنه می‌توان گام مهمی در زمینه توسعه و ترمیم رویشگاه‌های این گونه با ارزش برداشت. نشانگر مولکولی RAPD از لحاظ تکنیکی دارای سرعت و سهولت اجراست [۸] و نیز پرکاربردترین روش در مطالعه تنوع ژنتیکی و روابط بین ارقام و گونه‌های پسته است [۹-۱۸].

طایفه علی‌اکبرخانی و همکاران (۲۰۱۳) در ارزیابی تنوع ژنتیکی پسته‌های منطقه خراسان با استفاده از صفات موفولوژیکی و نشانگر RAPD، تنوع ژنتیکی زیادی در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی مشاهده کردند [۹]. نصرتی و همکاران (۲۰۱۲) تنوع ژنتیکی را در جمعیت‌های نر و ماده *P. atlantica* در دو منطقه مختلف در آذربایجان شرقی (ارسباران و جزیره) ارزیابی کردند. نتایج نشان داد که تنوع ژنتیکی در جمعیت بزرگ‌تر ارسباران نسبت به جمعیت کوچک‌تر جزیره بیشتر بود [۱۰]. در بررسی تاقی‌زاد و همکاران (۲۰۱۰) در مورد ارزیابی تنوع ژنتیکی ارقام پسته ایرانی با استفاده از نشانگرهای RAPD، ۶۹ درصد آل‌های تکثیرشده چندشکل بودند [۱۱]. سیدی و همکاران (۲۰۱۰) الگوی پروتئینی سه جمعیت پسته وحشی (*P. atlantica* Desf) را برای تعیین تنوع ژنتیکی بررسی کردند که دندروگرام به‌دست‌آمده قادر به جداسازی کامل جمعیت‌ها از یکدیگر نشد، ولی تا حدودی توانست سه جمعیت را از یکدیگر تفکیک کند [۶]. حاجی‌رضایی و همکاران (۲۰۰۹) با ارزیابی تنوع ژنتیکی تعدادی از ارقام پسته استان کرمان براساس نشانگر RAPD، نشان دادند که ژنوتیپ‌های مشابه که از نقاط متفاوت جمع‌آوری شده بودند در گروه‌های یکسان قرار گرفتند [۱۲]. کفکاس و همکاران (۲۰۰۶) برای تعیین تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم پسته وحشی، نشانگرهای AFLP

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این پژوهش نمونه‌های برگ‌های تازه از ۱۰ جمعیت بنه شامل ۵۹ ژنوتیپ از استان‌های ایلام، کرمانشاه، کردستان، لرستان، اصفهان و سیستان و بلوچستان جمع‌آوری شد (جدول ۱). نمونه‌های جمع‌شده پس از ثبت مشخصات به‌طور جداگانه در کاغذ آلومینیوم پیچیده و در نیتروژن مایع منجمد شده و تا زمان استخراج DNA در فریزر -۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

ISSR و RAPD را به‌کار بردند. دندروگرام به‌دست‌آمده ژنوتیپ‌ها را در دو گروه اصلی قرار داد [۱۳]. در مطالعه کفکاس (۲۰۰۵) با استفاده از نشانگر RAPD سطح بالایی از چندشکلی در پسته وحشی *p. atlantica* Desf. به‌دست آمد [۱۴]. میرزایی و همکاران (۲۰۰۵) با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD، گونه‌های پسته وحشی را در چهار گروه طبقه‌بندی کردند [۱۵]. هدف این تحقیق، بررسی میزان تفرق ژنتیکی و تنوع آلی درون و بین جمعیت‌های غرب کشور در مقایسه با ژنوتیپ‌های جمع‌آوری‌شده از مناطق دیگر کشور است.

جدول ۱. منشأ جغرافیایی ژنوتیپ‌های بنه استفاده‌شده در این تحقیق

ردیف	نام رویشگاه	کد رویشگاه	تعداد نمونه	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی
۱	ایلام	I	۶	۴۲° ۴۶'	۶۳° ۳۳'
۲	آبدانان	A	۱۱	۲۳° ۴۷'	۶۵° ۳۳'
۳	بانه	Ban	۴	۲۰° ۴۶'	۵۲° ۳۶'
۴	باینگان	Bay	۹	۱۵° ۴۶'	۵۸° ۳۴'
۵	پاوه	P	۹	۳۵° ۴۶'	۰۴° ۳۵'
۶	جوانرود	J	۳	۴۹° ۴۶'	۸۱° ۳۴'
۷	قلاجیه	Q	۵	۵۲° ۴۶'	۱۰° ۳۴'
۸	کوشک	K	۸	۹۱° ۴۵'	۰۸° ۳۴'
۹	مربوان	M	۲	۱۷° ۴۶'	۳۱° ۳۵'
۱۰	خارج از زاگرس (تفت)	Sis	۱	۸۵° ۶۰'	۴۵° ۲۹'
	خارج از زاگرس (چندق)	Isf	۱	۶۷° ۵۱'	۶۵° ۳۳'

استخراج DNA ژنومی

استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های برگ‌های به‌روش CTAB براساس دستورالعمل دوپیل و دوپیل (۱۹۸۷) [۱۹] با اندکی تغییر انجام گرفت. کیفیت و کمیت DNA نمونه‌ها با استفاده از روش‌های الکتروفورز DNA با ژل آگارز ۰/۸ درصد و نیز اسپکتروفتومتری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر بررسی و DNA نمونه‌ها تا حدود ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شد.

مراحل واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱ میکرولیتر DNA ژنومی (غلظت ۱۰۰ نانوگرم)، ۲ میکرولیتر بافر ۱۰X، ۱/۵ میکرولیتر کلرید منیزیم ۲۰ میلی‌مولار، ۰/۴ میکرولیتر dNTPs ۱ میلی‌مولار، ۱/۲ میکرولیتر آغازگر (غلظت ۱۰ پیکومول)، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمرز (۵ واحد) و در نهایت ۱۳/۶ میکرولیتر آب دو بار تقطیر انجام گرفت. چرخه حرارتی

5.0 محاسبه و با استفاده از نرم‌افزار XLSTAT مقایسه شدند. با استفاده از داده‌های حاصل از ماتریس فاصله دایس و الگوریتم NJ، تجزیه خوشه‌ای با نرم‌افزار MEGA 3.1 انجام گرفت. با روش تجزیه به مختصات اصلی با استفاده از نرم‌افزار GenAIEx 6.41 گروه‌بندی جمعیت‌ها در نمودارهای سه‌بعدی ترسیم‌شده با نرم‌افزار Minitab 16 بررسی شد. محاسبه فاصله ژنتیکی درون جمعیت‌ها نیز با استفاده از نرم‌افزار MEGA 3.1 انجام گرفت. سپس با استفاده از نرم‌افزار GenAIEx 6.41 فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها، میزان آلل‌های چندشکل، شاخص اطلاعات شانون و شاخص تصحیح‌شده هتروژنی محاسبه شد و تجزیه واریانس مولکولی نیز انجام گرفت.

نتایج و بحث

محاسبه چندشکلی، محتوای اطلاعات چندشکلی و

شاخص نشانگر

از ۲۰ آغازگر RAPD به کاررفته، ۱۳ آغازگر چندشکلی مناسبی نشان دادند و امتیازدهی شدند. از این تعداد آغازگر، در مجموع ۹۷ باند (آلل) چندشکل در محدوده بین ۱۲۰ تا ۲۵۰۰ جفت باز تکثیر شد، به طوری که تعداد آلل‌ها از ۲ تا ۱۶ متغیر بود و میانگین آلل‌های تولیدشده، ۷/۴۶ برای هر آغازگر به دست آمد. آغازگر Oligo348 با ۱۶ آلل بیشترین و آغازگر Oligo33 با ۲ آلل کمترین آلل را در میان آلل‌های تولیدی توسط هر آغازگر داشتند (جدول ۲). در بررسی تقی‌زاد و همکاران (۲۰۱۰) در مورد ارزیابی تنوع ژنتیکی ارقام پسته ایرانی با استفاده از نشانگرهای RAPD، ۶۹ درصد آلل‌های تکثیرشده چندشکل بودند و تعداد آلل‌های چندشکل

شامل ۴ دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱۰ چرخه اولیه به صورت تاج داوون (Touchdown) صورت گرفت، به این صورت که دمای اتصال آغازگر به رشته الگو ۵ درجه سانتی‌گراد بالاتر از دمای اتصال واقعی در نظر گرفته شد و به ازای هر چرخه، ۰/۵ درجه از دمای اتصال کاهش یافت تا به دمای اتصال واقعی برسد و ۲۵ چرخه شامل ۳۰ ثانیه واسرشته‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، دمای توصیه‌شده برای هر آغازگر به مدت ۴۵ ثانیه (برای اتصال آغازگرها) و ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای بسط انجام گرفت و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه صورت پذیرفت. قطعات DNA تکثیرشده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر 1X TAE، تفکیک و برای رنگ‌آمیزی ژل از محلول اتیدیوم برمایند استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

به منظور تجزیه و تحلیل نتایج، باندهای حاصل از تکثیر DNA نمونه‌ها با استفاده از هر آغازگر به عنوان داده‌های اولیه با اعداد یک (وجود باند) و صفر (نبود باند) نمره‌دهی شدند. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) با استفاده از فرمول $PIC = 1 - \sum p_{ij}^2$ محاسبه شد که در آن P_{ij} بیانگر فراوانی آلل i ام برای نشانگر j ام است، همچنین میزان شاخص نشانگر (MI) براساس فرمول $MI = PIC \times N \times \beta$ محاسبه شد [۲۰]. در اینجا PIC میانگین میزان اطلاعات چندشکلی برای هر آغازگر، N تعداد کل باندها برای هر آغازگر و β نسبت چندشکلی برای هر آغازگر است. ماتریس‌های فاصله همراه با روش‌های اتصال میانگین (UPGMA) و اتصال مجاور (NJ) با استفاده از نرم‌افزار DARwin

Oligo345، کمترین میزان MI (۰/۳۹) برای آغازگر Oligo203 و میانگین MI (۱/۵۵) برآورد شد. در مطالعه تقی‌زاد و همکاران (۲۰۱۰) درباره ارزیابی تنوع ژنتیکی ارقام پسته ایرانی با استفاده از نشانگرهای RAPD، میزان PIC بین ۰/۲۸ تا ۰/۴۵ با میانگین ۰/۳۹ بود. میزان MI از ۱ تا ۵/۲۶ متغیر و دارای میانگین ۲/۳۲ بود [۱۱]. با توجه به اینکه شاخص نشانگری (MI) معیاری کلی برای تعیین کارایی نشانگر در تخمین چندشکلی است، نشانگر Oligo345 با داشتن بیشترین میزان MI نشان‌دهنده کارایی زیاد و قدرت تشخیص بهتر این نشانگر در تعیین فاصله ژنتیکی است؛ بنابراین می‌توان استفاده از این نشانگر را در تشخیص تنوع ژنتیکی تمام گونه‌های پسته در اولویت قرار داد.

محاسبه ماتریس‌های فاصله ژنتیکی و ضرایب همبستگی کوفتیک

در این پژوهش همه ماتریس‌های فاصله شامل دایس (Dice)، جاکارد (Jaccard)، اوشیایی (Ochiai) و سوکال (Sokal) با روش‌های اتصال میانگین (UPGMA) اتصال مجاور (NJ) با استفاده از نرم‌افزار DARwin 5.0 محاسبه و براساس ضرایب کوفتیک حاصل از آزمون مانتل با استفاده از نرم‌افزار XLSTAT مقایسه شدند. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده (جدول ۳)، ماتریس دایس و الگوریتم NJ ضریب کوفتیک بیشتری نشان داد و در گزارش نتایج از آنها استفاده شد.

بین ۴ تا ۱۹ با میانگین ۸/۸ آلل برای هر آغازگر به‌دست آمد. اندازه قطعات تکثیری بین ۲۵۰ تا ۲۵۰۰ جفت باز بود [۱۱]. در مطالعه حاجی‌رضایی و همکاران (۲۰۰۹) با ارزیابی تنوع ژنتیکی تعدادی از ارقام پسته استان کرمان براساس نشانگر RAPD، نیز اندازه قطعات تکثیری در محدوده ۱۰۰ تا ۲۵۲۰ جفت باز بود [۱۲]. همچنین در بررسی کفکاس (۲۰۰۵) آلل‌هایی در محدوده ۱۵۰ تا ۲۵۰۰ جفت باز با نشانگرهای چندشکل RAPD تولید شد و تعداد آلل‌ها بین ۵ تا ۱۷ و میانگین ۱۰/۵ آلل برای هر آغازگر به‌دست آمد [۱۴]. در بررسی طایفه علی‌اکبرخانی و همکاران (۲۰۱۳) در ارزیابی تنوع ژنتیکی پسته‌های منطقه خراسان با نشانگر RAPD درصد چندشکلی ۹۲/۸۳ درصد گزارش شد [۹] که به نتایج این تحقیق نزدیک است. میانگین آلل‌های تولیدشده در این تحقیق ۷/۴۶ محاسبه شد که با نتایج بررسی کفکاس و همکاران (۲۰۰۶) با میانگین ۷/۳۵ آلل برای هر آغازگر RAPD [۱۳] و مطالعه بارزانی و همکاران (۲۰۰۳) در بررسی جمعیت‌های پسته ترکمن با میانگین ۷/۷۵ آلل برای هر آغازگر RAPD همخوانی دارد [۱۸]. میزان محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) و شاخص نشانگر (MI) برای هر آغازگر، جداگانه محاسبه شد که نتایج آن در جدول ۲ آورده شده است. بیشترین میزان PIC (۰/۴۴) در آغازگر Oligo342 و کمترین میزان PIC (۰/۱۱) در آغازگر Oligo18 مشاهده شد و میانگین PIC (۰/۲۱) به‌دست آمد. بیشترین میزان MI (۴/۳۵) برای آغازگر

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده به همراه محتوای اطلاعات چندشکلی و شاخص نشانگر آنها

نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال (°C)	تعداد آلل‌ها	تعداد آلل‌های چندشکل	درصد چندشکلی	PIC	MI	اندازه قطعات تکثیری (جفت باز)
Oligo18	5'-GG GCC GTT TA-3'	۳۲	۵	۵	۱۰۰	۰/۱۱	۰/۵۵	۳۵-۱۱۰۰
Oligo29	5'-CC GGC CTT AC-3'	۳۴	۷	۷	۱۰۰	۰/۱۸	۱/۲۶	۴۸-۱۳۰۰
Oligo33	5'-CC GGC TGG AA-3'	۳۴	۲	۲	۱۰۰	۰/۲۲	۰/۴۴	۴۵-۶۵۰
Oligo203	5'-CA CGG CGA GT-3'	۳۴	۳	۳	۱۰۰	۰/۱۳	۰/۳۹	۴۸-۹۰۰
Oligo211	5'-GA AGC GCG AT-3'	۳۳	۱۰	۱۰	۱۰۰	۰/۲۱	۲/۱	۱۲۰-۱۳۵۰
Oligo213	5'-CA GCG AAC TA-3'	۳۰	۴	۴	۱۰۰	۰/۲۸	۱/۱۲	۵۵-۱۱۰۰
Oligo214	5'-CA TGT GCT TG-3'	۳۰	۹	۹	۱۰۰	۰/۲۲	۱/۹۸	۴۵-۱۴۰۰
Oligo342	5'-GA GAT CCC TC-3'	۳۲	۳	۳	۱۰۰	۰/۴۴	۱/۳۲	۵۰-۸۵۰
Oligo343	5'-TG TTA GGC TC-3'	۳۰	۵	۵	۱۰۰	۰/۱۲	۰/۶	۳۵-۱۳۰۰
Oligo345	5'-GC GTG ACC CG-3'	۳۶	۱۵	۱۵	۱۰۰	۰/۲۹	۴/۲۵	۱۵۰-۲۲۰۰
Oligo347	5'-TT GCT TGG CG-3'	۳۳	۹	۹	۱۰۰	۰/۱۸	۱/۶۲	۳۷۰-۲۰۰۰
Oligo348	5'-CA CGG CTG CG-3'	۳۶	۱۶	۱۶	۱۰۰	۰/۱۷	۲/۷۲	۱۸۰-۱۶۰۰
Oligo349	5'-GG AGC CCC CT-3'	۳۶	۹	۹	۱۰۰	۰/۱۹	۱/۷۱	۳۲۰-۲۵۰۰
میانگین	-	-	۷/۴۶	۷/۴۶	۱۰۰	۰/۲۱	۱/۵۵	-

جدول ۳. ضرایب همبستگی کوفتیک

الگوریتم ترسیم دندروگرام			
NJ	UPGMA		
۰/۹۴۰ ***	۰/۷۳۴ ***	دایس	
۰/۹۰۴ ***	۰/۸۷۲ ***	جاکارد	تابع محاسبه ماتریس
۰/۹۳۳ ***	۰/۸۰۳ ***	اوشیایی	فاصله
۰/۹۰۱ ***	۰/۸۹۷ ***	سوکال	
$\Gamma_{Dice-Jaccard} = ۰/۹۹۴ ***$			

***=معنی‌دار در سطح ۰/۰۰۱

محاسبه فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها

فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها با استفاده از ماتریس فاصله دایس محاسبه شد که بر این اساس میانگین فاصله ژنتیکی برابر ۰/۷۲۶ بود و کمترین فاصله ژنتیکی با میزان ۰/۱ (بین دو ژنوتیپ از پاوه) و بیشترین فاصله ژنتیکی نیز با میزان ۱ برای تعدادی از ژنوتیپ‌ها به دست آمد.

تجزیه خوشه‌ای

تجزیه خوشه‌ای با استفاده از داده‌های حاصل از ماتریس فاصله دایس و الگوریتم NJ، با نرم‌افزار MEGA 3.1 انجام گرفت. دندروگرام به دست آمده (شکل ۱)، ژنوتیپ‌ها را در هشت گروه اصلی تقسیم کرد که در گروه اول ۴۳ ژنوتیپ از آبدانان، باینگان، پاوه، بانه، جوانرود، مریوان، قلاج، کوشک، ایلام و سیستان و

دوم و ۹/۲۵ درصد توسط بعد سوم توجیه شد. براساس این نمودار جمعیت‌های ایلام، باینگان و پاوه خیلی نزدیک‌اند و همچنین جمعیت‌های کوشک و میوان نیز خیلی نزدیک‌اند. دورترین جمعیت‌ها نیز جمعیت‌های جوانرود و خارج از زاگرس هستند.

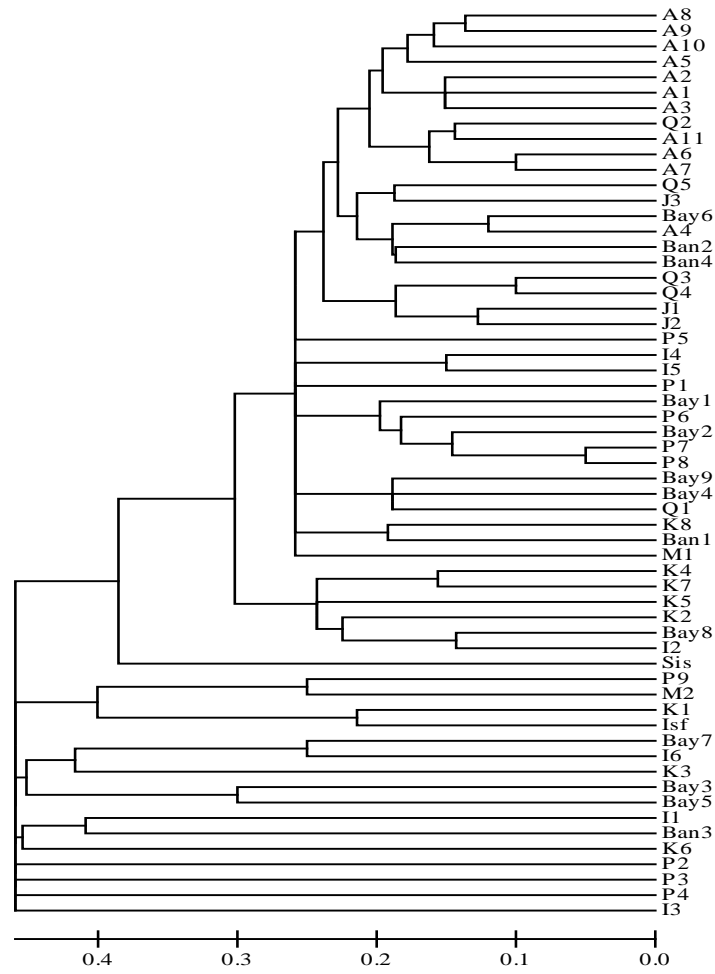
محاسبه فاصله ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها

برای آگاهی از تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها، فواصل ژنتیکی درون جمعیت‌ها براساس ماتریس عدم تشابه دایس با استفاده از نرم‌افزار MEGA 3.1 و نیز ماتریس فاصله و تشابه بین جمعیت‌ها با استفاده از نرم‌افزار GenAlEx 6.41 از طریق شاخص تصحیح شده *Nei*، محاسبه شد. فاصله ژنتیکی درون جمعیت‌ها دامنه‌ای از ۰/۳۶۳ تا ۰/۸۵۰ داشت که کمترین فاصله ژنتیکی درون جمعیت‌ها (۰/۳۶۳) مربوط به جمعیت آبدانان و بیشترین فاصله ژنتیکی (۰/۸۵۰) مربوط به جمعیت ایلام بود. بیشترین فاصله ژنتیکی شاخص *Nei*، میان دو جمعیت جوانرود و خارج از زاگرس (۰/۱۸۰) و کمترین فاصله نیز میان جمعیت‌های ایلام و پاوه (۰/۰۰۰)، ایلام و باینگان (۰/۰۰۱) و پاوه و باینگان (۰/۰۰۲) محاسبه شد؛ به عبارت دیگر این جمعیت‌ها بیشترین شباهت ژنتیکی را با یکدیگر دارند (جدول ۴). محاسبه فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌ها نتایج تجزیه به مختصات اصلی (شکل ۲) را تأیید کرد.

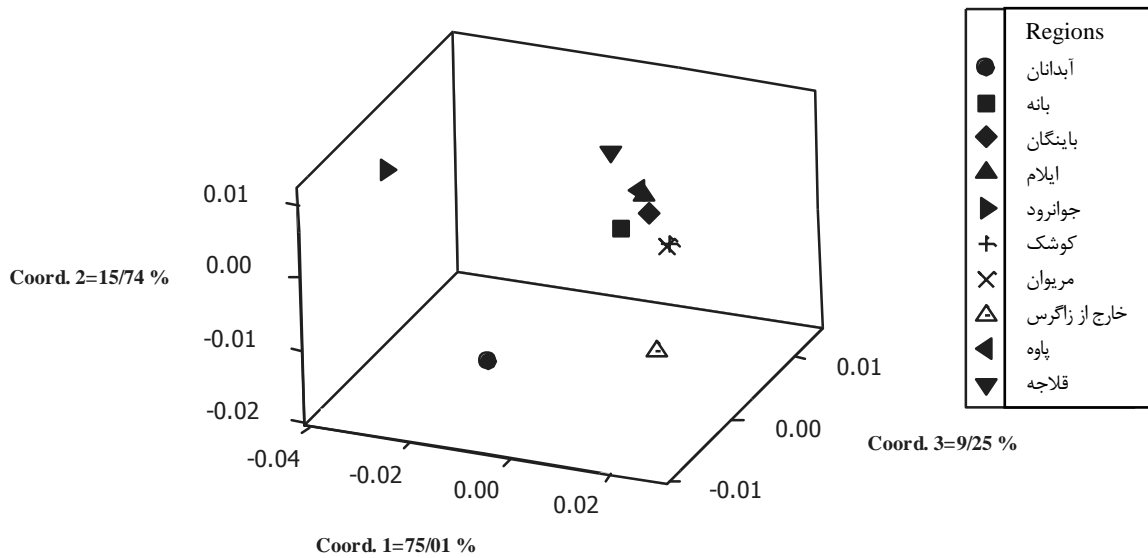
بلوچستان؛ در گروه دوم چهار ژنوتیپ از پاوه، میوان، کوشک و اصفهان؛ در گروه سوم پنج ژنوتیپ از باینگان، ایلام و کوشک؛ در گروه چهارم سه ژنوتیپ از ایلام، بانه و کوشک؛ در گروه‌های پنجم، ششم و هفتم هر کدام یک ژنوتیپ از پاوه؛ و در گروه هشتم یک ژنوتیپ از ایلام قرار گرفت. نتایج حاصل از این دندروگرام، نبود ارتباط بین تنوع مولکولی مورد مطالعه و تنوع جغرافیایی را نشان می‌دهد، به طوری که ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده در یک استان یا شهر در گروه‌ها یا زیرگروه‌های جداگانه‌ای قرار گرفته‌اند که نشان‌دهنده تفاوت ژنتیکی زیاد این ژنوتیپ‌هاست. از طرف دیگر بسیاری از ژنوتیپ‌هایی که در یک گروه قرار گرفته‌اند از مناطق جغرافیایی متفاوت‌اند که این مورد دلیل تشابه ژنتیکی گسترده این ژنوتیپ‌هاست؛ ولی در مطالعه سیدی و همکاران (۲۰۱۰) هرچند دندروگرام قادر به جداسازی کامل جمعیت‌ها از یکدیگر نشد، تا حدودی سه جمعیت را از یکدیگر تفکیک کرد [۶].

تجزیه به مختصات اصلی جمعیت‌ها

به منظور بررسی بهتر و دقیق‌تر تنوع و رابطه میان جمعیت‌ها، با روش تجزیه به مختصات اصلی انجام گرفته با نرم‌افزار GenALEX 6.41، گروه‌بندی جمعیت‌ها در یک نمودار سه‌بعدی ترسیم شده با نرم‌افزار Minitab 16 بررسی شد. پراکنش جمعیت‌ها در سه بعد تجزیه به مختصات اصلی (شکل ۲) در مجموع ۱۰۰ درصد تغییرات را توجیه کرد که ۷۵/۰۱ درصد آن توسط بُعد اول، ۱۵/۷۴ درصد توسط بُعد



شکل ۱. گروه‌بندی ژنوتیپ‌های بنه با استفاده از روش دایس و الگوریتم NJ



شکل ۲. نمودار سه‌بعدی پراکنش جمعیت‌های بنه بر روی سه محور مختصات اول، دوم و سوم

جدول ۴. مقادیر فاصله ژنتیکی درون جمعیت‌ها، فاصله ژنتیکی (پایین قطر) و همسانی ژنتیکی (بالای قطر) بین جمعیت‌های بنه

جمعیت	درون جمعیت‌ها	بین جمعیت‌ها									
		ایلام	آبدانان	بانه	باینگان	پاوه	جوانرود	قلاجیه	کوشک	مربوان	خارج از زاگرس
ایلام	۰/۸۵۰	***	۰/۹۰۰	۰/۹۹۴	۰/۹۹۹	۱/۰۰۱	۰/۸۹۵	۰/۹۴۴	۰/۹۹۶	۰/۹۸۸	۰/۹۷۳
آبدانان	۰/۳۶۳	۰/۱۰۵	***	۰/۹۳۴	۰/۹۰۸	۰/۸۸۸	۰/۹۱۵	۰/۹۴۶	۰/۹۰۹	۰/۹۱۸	۰/۸۷۱
بانه	۰/۷۱۹	۰/۰۰۶	۰/۰۶۸	***	۰/۹۹۳	۰/۹۸۸	۰/۹۱۸	۰/۹۶۲	۰/۹۹۳	۰/۹۹۳	۰/۹۶۸
باینگان	۰/۷۱۳	۰/۰۰۱	۰/۰۹۷	۰/۰۰۷	***	۰/۹۹۸	۰/۸۹۴	۰/۹۴۵	۰/۹۹۷	۰/۹۸۶	۰/۹۶۸
پاوه	۰/۸۱۹	۰/۰۰۰	۰/۱۱۸	۰/۰۱۲	۰/۰۰۲	***	۰/۸۹۰	۰/۹۳۲	۰/۹۹۴	۰/۹۸۷	۰/۹۷۳
جوانرود	۰/۳۷۰	۰/۱۱۰	۰/۰۸۹	۰/۰۸۶	۰/۱۱۲	۰/۱۱۷	***	۰/۹۴۰	۰/۸۷۹	۰/۸۸۴	۰/۸۳۵
قلاجیه	۰/۴۰۱	۰/۰۵۷	۰/۰۵۵	۰/۰۳۹	۰/۰۵۶	۰/۰۷۰	۰/۰۶۱	***	۰/۹۴۱	۰/۹۵۰	۰/۸۸۸
کوشک	۰/۷۷۲	۰/۰۰۴	۰/۰۹۶	۰/۰۰۷	۰/۰۰۳	۰/۰۰۶	۰/۱۲۹	۰/۰۶۰	***	۰/۹۹۳	۰/۹۸۰
مربوان	۰/۸۴۶	۰/۰۱۲	۰/۰۸۶	۰/۰۰۷	۰/۰۱۴	۰/۰۱۳	۰/۱۲۴	۰/۰۵۲	۰/۰۰۸	***	۰/۹۷۶
خارج از زاگرس	۰/۷۶۵	۰/۰۲۸	۰/۱۳۸	۰/۰۳۳	۰/۰۳۳	۰/۰۲۸	۰/۱۸۰	۰/۱۱۸	۰/۰۲۰	۰/۰۲۴	***

محاسبه شاخص‌های تنوع ژنتیکی

با استفاده از آنالیز داده‌ها در نرم‌افزار 6.41 GenAIEx، میزان آل‌های چندشکل، شاخص تصحیح‌شده هتروژنی و شاخص اطلاعات شانون برای هر جمعیت و میانگین کل آنها به دست آمد (جدول ۵). جمعیت آبدانان بیشترین درصد آل‌های

چندشکل (۵۷/۷۳) و شاخص شانون (۰/۲۵۱) را نشان داد. بیشترین شاخص تصحیح‌شده هتروژنی (۰/۱۷۲) نیز در جمعیت بانه مشاهده شد. کمترین میزان آل‌های چندشکل (۱۳/۴۰)، شاخص تصحیح‌شده هتروژنی (۰/۰۷۴) و شاخص شانون (۰/۰۸۱) نیز مربوط به جمعیت خارج از زاگرس بود.

جدول ۵. محاسبه شاخص‌های تنوع ژنتیکی برای جمعیت‌های بنه

جمعیت	تعداد نمونه	درصد مکان‌های چندشکل	شاخص تصحیح شده هتروژنی	شاخص اطلاعات شانون
ایلام	۶	۳۵/۰۵	۰/۰۹۸±۰/۰۱۵	۰/۱۴۵±۰/۰۲۲
آبدانان	۱۱	۵۷/۷۳	۰/۱۶۷±۰/۰۱۸	۰/۲۵۱±۰/۰۲۶
بانه	۴	۴۴/۳۳	۰/۱۷۲±۰/۰۲۲	۰/۲۲۸±۰/۰۲۸
باینگان	۹	۳۵/۰۵	۰/۰۹۲±۰/۰۱۵	۰/۱۴۰±۰/۰۲۲
پاوه	۹	۴۴/۳۳	۰/۰۸۸±۰/۰۱۴	۰/۱۴۳±۰/۰۲۰
جوانرود	۳	۲۷/۸۴	۰/۱۱۶±۰/۰۲۰	۰/۱۴۷±۰/۰۲۵
قلاجیه	۵	۳۸/۱۴	۰/۱۲۹±۰/۰۱۹	۰/۱۸۱±۰/۰۲۵
کوشک	۸	۳۸/۱۴	۰/۱۰۱±۰/۰۱۶	۰/۱۵۳±۰/۰۲۲
مربوان	۲	۲۲/۶۸	۰/۱۲۵±۰/۰۲۴	۰/۱۳۷±۰/۰۲۶
خارج از زاگرس	۲	۱۳/۴۰	۰/۰۷۴±۰/۰۱۹	۰/۰۸۱±۰/۰۲۱
میانگین	۵۹	۳۵/۶۷	۰/۱۱۶±۰/۰۰۶	۰/۱۶۱±۰/۰۰۸

تجزیه واریانس مولکولی

در تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) که با استفاده از نرم‌افزار GenALEX 6.41 صورت گرفت، این امکان وجود دارد که اجزای واریانس محاسبه و سهم هر یک از آنها در تنوع کل برآورد شود. نتایج تجزیه واریانس مولکولی (جدول ۶) نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری در سطح آماری ۱ درصد بین

جمعیت‌ها وجود دارد که براساس این اطلاعات، ۷۸ درصد از تنوع کل مربوط به تنوع درون جمعیت‌ها و ۲۲ درصد آن مربوط به تنوع بین جمعیت‌هاست که با یافته‌های نصرتی و همکاران (۲۰۱۲) با ۷۷ درصد تنوع درون جمعیت‌ها و ۲۳ درصد تنوع بین جمعیت‌ها تطابق دارد [۱۰].

جدول ۶. تجزیه واریانس مولکولی جمعیت‌های بنه

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	درصد واریانس	آماره PhiPT	درصد احتمال معنی‌داری
بین جمعیت‌ها	۹	۱۹۲/۸۳۳	۲۱/۴۲۶	٪۲۲	۰/۲۱۷**	۰/۰۱
درون جمعیت‌ها	۴۹	۴۰۶/۱۱۶	۸/۲۸۸	٪۷۸		
جمع کل	۵۸	۵۹۸/۹۴۹		٪۱۰۰		

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که در جمعیت‌های با تعداد ژنوتیپ‌های زیادتر تنوع ژنتیکی بیشتر از جمعیت‌های با تعداد ژنوتیپ‌های کمتر است. این موضوع نشان‌دهنده اثر اندازه جمعیت بر تنوع ژنتیکی است [۱۰]. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای، قادر به گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها براساس مناطق جغرافیایی نبود و آغازگرهای به‌کار گرفته شده کارایی متوسطی در شناسایی این تنوع نشان دادند.

با توجه به اینکه آگاهی از الگوی پراکنش تنوع ژنتیکی یکی از گام‌های پایه‌ای برای پایه‌ریزی اقدامات حفاظتی مؤثر ذخایر ژنتیکی گونه‌های گیاهی است و نظر به بیشترین تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها و تمایز ژنتیکی زیاد میان جمعیت‌های مورد مطالعه، راهبرد حفاظت برای این گونه، هم شامل حفاظت در محل و هم حفاظت در خارج از محل می‌شود.

حفاظت در محل برای حفظ ذخایر ژنتیکی این گونه توصیه می‌شود، زیرا رویشگاه‌های این گونه با ارزش به دلایلی از جمله آتش‌سوزی، چرای مفرط دام، توسعه اراضی کشاورزی، سقزگیری نادرست، عوامل ژنتیکی و محیطی مختلف به‌همراه سایر فعالیت‌های انسانی مورد تخریب و تجاوز قرار گرفته است. بنابراین، تهیه و اجرای طرح‌های مدیریت منابع جنگلی در مناطق گسترش این گونه، خروج دام و قرق کامل رویشگاه‌های این گونه و تهیه بذرهای سالم و تولید نهال این گونه و توزیع و کشت آن در مناطق مختلف جنگل‌های کشور برای حفاظت از این گونه توصیه می‌شود. حفاظت در خارج از محل و تهیه بانک ژرم‌پلاسما برای این گونه با استفاده از بذر و نهال برگرفته از مناطق مختلف و نگهداری آنها در بانک‌های بذر برای بهره‌برداری در نسل‌های بعد نیز راهکاری برای حفظ تنوع ژنتیکی این گونه است.

References

- [1]. Zohary, M. (1952). A monographical study of the genus *Pistacia*. Journal of Botany Jerusalem Series, 5: 187-228.
- [2]. Karimi, H.R., Zamani, Z., Ebadi, A., and Fatahi, M.R. (2009). Morphological diversity of *Pistacia* species in Iran. Genetic Resources and Crop Evolution, 56(4): 561-571.
- [3]. Pazouki, L., Mardi, M., Shanjani, P.S, Hagidimitriou, M., Pirseyedi, S.M., Naghavi, M.R., Avanzato, D., Vendramin, E., Kafkas, S., Ghareyazie, B., Ghaffari, M.R., and Khayam Nekoui, S.M. (2010). Genetic diversity and relationships among *Pistacia* species and cultivars. Conservation Genetics, 11(1): 311-318.
- [4]. Padulosi, S., and Hadj-Hassan, A. (1998). Towards a comprehensive documentation of distribution and use of *Pistacia*: genetic diversity in Central and West Asia, North Africa and Mediterranean Europe. Report of the IPGRI Workshop.
- [5]. Zahedi Pour, H., Fatahi, M., and Mirdavoodi, H. (2007). study of distribution and habitats characteristics of wild *Pistacia* in Markazi Province: Area of Saghez mountain of Tafresh Township. Iranian Journal of Biology, 20(2): 191-199.
- [6]. Seyedi, N., Jalali, S.Gh.A., Moghaddam, M., Tabari, M., and Mohammadi, S.A. (2010). Application of seed storage protein in intra-specific variation in three population of *Pistacia atlantica* Desf.. Journal of Plant Biology, 2(6):1-14.
- [7]. Schwartz, M.K., Luikart, G., and Waples, R.S. (2006). Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. Trends in *Ecology & Evolution*, 22(1): 25-33.
- [8]. Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Levak, K.J., Rafalski, J.A., and Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphism amplification by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, 18(22): 6531-6535.
- [9]. 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(1): 171-192.
- [10]. Nosrati, H., Husainpourfeizi, M.A., Khorasani, M., Razban-Haghighi, A., and Nikniazi, M. (2012). Sex ratio and genetic diversity in the dioecious *Pistacia atlantica* (Anacardiaceae). Journal of Agrobiology, 29(1): 41-46.
- [11]. Tagizad, A., Ahmadi, J., Haddad, R., and Zarrabi, M. (2010). A comparative analysis of ISSR and RAPD markers for studying genetic diversity in Iranian pistachio cultivars. Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding, 1(1): 6-16.
- [12]. Hajirezayi, M., Baghizadeh, A., Javadi, G.H., and Sadeghizadeh, M. (2010). Genetic diversity assessment of a few numbers of pistachio cultivars in Kerman province based on RAPD markers. Iranian Journal of Biology, 22(3): 462-469.
- [13]. Kafkas, S., Ozkan, H., Erol Ak, B., Acar, I., Alti, H.S., and Koyunky, S. (2006). Detecting DNA polymorphism and genetic diversity in a wide pistachio germplasm: comparison of AFLP, ISSR, and RAPD markers. Journal of the American Society for Horticultural Science, 131(4): 522-529.
- [14]. Kafkas, S. (2005). Detection of polymorphic RAPD markers for *Pistacia atlantica* Desf.. Option Mediterraneens, Serie A. 63:341-346
- [15]. Mirzaei, S., Bahar M., and Sharifnabi, B. (2005). A phylogenetic study of Iranian wild pistachio species and some cultivars using RAPD markers. Acta Horticulture, 726: 39-43.

- [16]. Kafkas, S., Perl-treves, R. (2002). Inerspecific relationships in *pistacia* based on RAPD fingerprinting. *Journal of Horticultural Science*, 37(1): 168-171.
- [17]. Al-Saghir, M.G., and Duncan, M.P. (2006). Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) study of *Pistacia* species (Anacardiaceae). *Asian Journal of Plant Sciences*, 5(6): 1002-1006.
- [18]. Barazani, O., Atayev, A., Yakubov, B., Kostiukovsky, V., Popov, K., and Golan-Goldhirsh, A. (2003). Genetic variability in Turkmen populations of *Pistacia vera* L.. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 50(4): 383-389.
- [19]. Doyle, J.J., and Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.
- [20]. Powell, W., Morgante, M., Ander, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingy, S., and Rafalaski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) marker for germplasm analysis. *Journal of Molecular Breeding*, 2(3):225-238.