

## تجزیه ارتباط رگرسیونی صفات مرتبط با عملکرد با نشانگرهای مولکولی RAPD در پسته (*P. vera* L.)

سعید میرزایی<sup>۱\*</sup> - مهدی رحیمی<sup>۲</sup> - علی تاج آبادی پور<sup>۳</sup> - مسعود بهار<sup>۴</sup> - بهرام شریف نبی<sup>۵</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۱۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۵/۰۶

### چکیده

با بکارگیری نشانگرهای مولکولی، اصلاح گیاهان با سرعت و سهولت بیشتری انجام می‌گیرد و انتخاب والدین برای تلاقی‌های بعدی در برنامه‌های اصلاحی با اطمینان بیشتری انجام می‌گیرد. در دسترس بودن تعداد بسیار زیادی از نشانگرها و صفات مورفولوژیکی می‌تواند به مطالعه تجزیه رگرسیونی بین این نشانگرها و صفات مورفولوژیکی کمک نماید. در این تحقیق، ارتباط صفات مرتبط با عملکرد در ۲۰ ژنوتیپ پسته با استفاده از ۱۵ آغازگر RAPD مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت ۱۱ آغازگر چندشکلی نشان دادند و مجموعاً ۵۶ قطعه (لوکوس) را تکثیر کردند که از این بین ۳۶ قطعه (۶۴/۲۹ درصد) چندشکلی را با میانگین ۵/۰۹ آلل به ازای هر پرایمر نشان دادند و میزان این چندشکلی از حداقل ۲۵ درصد برای آغازگر AJ05 تا حداکثر ۸۷/۵ درصد برای آغازگر OPAD02 متغیر بود. میانگین محتوای اطلاعاتی حاصل از چند شکلی برای جایگاه‌ها ۰/۲۳ و از ۰/۰۹۵ (AJ05) و (OPAD14) تا ۰/۳۹ (OPC05) متغیر بود. برای شناسایی نشانگرهای مثبت مرتبط با صفات اجزای عملکرد، تجزیه رگرسیون گام به گام بین داده‌های مولکولی به عنوان متغیرهای مستقل و صفات مورد مطالعه به عنوان متغیرهای وابسته انجام گرفت. نوزده قطعه RAPD با شش صفت مرتبط با عملکرد ارتباط داشتند. بعضی از نشانگرهای RAPD با بیشتر از یک صفت در تجزیه رگرسیون چندگانه ارتباط داشت که می‌تواند به خاطر اثر پلیوتروپیک مکان‌های صفات کمی بر روی صفات مختلف یا پیوستگی ژن‌های مختلف باشد. برای درک این موضوع تهیه نسل‌های در حال تفرق و نقشه‌های پیوستگی ضروری می‌باشد. همچنین این نتایج می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی انتخاب به کمک نشانگر هنگامی که هیچ اطلاعات ژنتیکی در دسترس نیست، مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: آغازگر چندشکل، رگرسیون گام به گام، متغیر مستقل

### مقدمه

رشد در خاک‌های ضعیف از خصوصیات این گیاه است (۱۹).  
جنس پسته *Pistacia* از خانواده Anacardiaceae و شامل ۱۱ گونه است که فقط *P. vera* L. دارای میوه‌های خندان و از لحاظ تجاری دارای اهمیت می‌باشند (۸). اعتقاد بر این است که قدیمی‌ترین گونه موجود در این جنس، گونه *P. vera* می‌باشد و گونه‌های دیگر احتمالاً از آن مشتق شده‌اند (۲۴). کشور ایران منشأ پسته اهلی بوده به طوری که بیشترین تنوع ژنتیکی در ارتباط با ارقام پسته در ایران وجود دارد. آمار متناقضی در مورد تعداد ارقام پسته موجود در ایران وجود دارد. طبق آمار منتشر شده توسط موسسه تحقیقات پسته، تعداد ارقام موجود در ایران بیش از ۷۰ رقم می‌باشد. اگر چه بعضی از محققین عقیده دارند که برخی ارقام از لحاظ ژنتیکی یکسان می‌باشند و تعداد ارقام موجود در ایران کمتر از میزان اعلام شده است. دستیابی به منابع ژنتیکی پسته، تعیین و شناسایی صفات، خصوصیات رویشی و زایشی ارقام و فنوتیپ‌های این گیاه، اولین گام در زمینه اصلاح پسته است

پسته یکی از مهمترین محصولات باغی ایران است که سهم زیادی از درآمدهای صادراتی غیرنفتی کشور را به خود اختصاص داده است. این گیاه دوپایه، برگ ریز و دارای مرحله نونهالی طولانی بوده و بومی کوه‌های کم ارتفاع و تپه‌های خشک بیابانهای مرتفع افغانستان، ایران و ترکیه است. تحمل به شوری و خشکی و توانایی

۱ و ۲- استادیاران گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران  
(\* نویسنده مسئول: Email: s.mirzaei@kgut.ac.ir)

۳- مربی، پژوهشکده پسته، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رفسنجان، ایران  
۴ و ۵- استادان گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران



جدول ۱- نام ژنوتیپ‌های پسته مورد مطالعه  
Table 1- List of studied pistachio genotypes

ژنوتیپ Genotypes	کد Code	ژنوتیپ Genotypes	کد Code	ژنوتیپ Genotypes	کد Code
خنجری دامغان Khanjari Damghani	PVKD	راور دو Ravar 2	PVR2	اکبری Akbari	PVAK
سبز نوق Sabz-e-Nogh	PVSN	سیف‌الدینی Sifadini	PVSD	احمدآقایی AhmadAghaei	PVAH
بادامی نیش‌کلاغی Badami Nishkalaghi	PVNK	اوحدی Ohadi	PVOH	حسن‌زاده Hsanzadeh	PVHZ
بادامی راور Badami Ravar	PVBR	فندق‌ریز Fandoghi Riz	PVFR	غلامرضایی Gholamrezaei	PVGR
موسی‌آبادی Mosaabadi	PVMA	کله قوچی Kaleghochi	PVKG	قزوینی‌زودرس Ghazvini Zoodras	PVGZ
حسنی Hasani	PVHS	ممتاز Momtaz	PVMO	ایتالیایی‌زودرس Italiaei Zoodras	PVIZ
		بادامی‌زرند Badami Zarand	PVBZ	ممتاز‌تاج‌آبادی Momtaz Tajabadi	PVMT

متغیرهای مستقل) و داده‌های کمی (به عنوان متغیر وابسته) با استفاده از رگرسیون چندگانه انجام شد تا نشانگرهای موثر مرتبط با صفات عملکرد و اجزای عملکرد شناسایی شوند. رگرسیون چندگانه با استفاده از روش چند مرحله‌ای و با استفاده از نرم افزار SPSS ورژن ۲۲ انجام شد (۱۵). تجزیه بر پایه مدل چندگانه، که تغییرات در متغیر وابسته (Y میانگین ژنوتیپ برای یک صفت کمی) به یک تابع خطی از مجموعه‌ای از متغیرهای مستقل mj که نشان‌دهنده نشانگرهای RAPD بود (اولین بار به وسیله ویرک و همکاران (۱۸) شرح داده شد) انجام شد. که در آن bj نشان‌دهنده ضرایب جزیی رگرسیون است که روابط آزمایشی مشخص بین Y و mj را نشان می‌دهد. همچنین d نشان‌دهنده خطای بین ژنوتیپ‌ها بعد از رگرسیون و e خطای تصادفی Y است که شامل تنوع محیطی نیز می‌شود (۱۸). برای انتخاب متغیرهای مستقل برای تابع رگرسیون، از F با احتمال ۰/۰۴۵ و ۰/۰۹۹ به ترتیب برای وارد کردن و خارج کردن متغیرها استفاده گردید (۳ و ۱۵). نشانگرهای انتخاب شده دوباره به طور مستقل با یک مدل خطی برای تایید معنی‌داری آماره برای هر یک از نشانگرهای شناسایی شده با رگرسیون چندگانه استفاده شد (۳ و ۱۱).

### نتایج و بحث

۱۱ آغازگر چندشکل (جدول ۳) مجموعاً ۵۶ قطعه (لوکوس) را تکثیر کردند که از این بین ۳۶ قطعه (۶۴/۲۹ درصد) چندشکلی را با میانگین ۵/۰۹ الل به ازای هر آغازگر نشان دادند و میزان این چندشکلی از حداقل ۲۵ درصد برای آغازگر AJ05 تا حداکثر ۸۷/۵ درصد برای آغازگر OPAD02 متغیر بود. در این تحقیق فقط باندهای

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با شرایط دمایی بهینه شده شامل دو دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای واسرشته‌سازی اولیه‌ی DNA الگو و به دنبال آن ۴۰ چرخه شامل یک دقیقه در ۹۲ درجه سانتی‌گراد برای واسرشته‌سازی DNA الگو، یک دقیقه در ۳۵ درجه سانتی‌گراد برای اتصال آغازگر و دو دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای حرکت و بسط آغازگر روی رشته‌های DNA الگو و در انتهای برنامه پس از اتمام ۴۰ چرخه فوق، پنج دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای بسط نهایی آغازگر برای آغازگرهای سری Operon انجام شد. برای آغازگرهای سری MG و AJ واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با شرایط دمایی بهینه شده شامل دو دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای واسرشته‌سازی اولیه‌ی DNA الگو و به دنبال آن ۵۰ چرخه شامل ۴۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای واسرشته‌سازی DNA الگو، ۷۰ ثانیه در ۴۸ درجه سانتی‌گراد برای اتصال آغازگر و دو دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای حرکت و بسط آغازگر روی رشته‌های DNA الگو و در انتهای برنامه پس از اتمام ۵۰ چرخه فوق، ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای بسط نهایی آغازگر استفاده شد. محصولات PCR بر روی ژل ژل ۱/۲ درصد آگاروز بارگذاری شدند و بعد از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، ژل مذکور دو یا سه مرتبه با آب معمولی شستشو داده شد. سپس ژل به دستگاه Photo-Print ( Vilber ) (Lourmat IP-008-SD) منتقل شد. پس از مشاهده باندها در زیر نور UV از ژل عکسبرداری شد. در نهایت با توجه به اینکه RAPD یک نشانگر غالب است بنابراین قطعات تکثیر شده (باندها) براساس وجود و عدم وجودشان به ترتیب با اعداد یک و صفر برای هر ژنوتیپ مشخص شدند.

تجزیه و تحلیل ارتباط بین داده‌های مولکولی (به عنوان

تولید شده متعلق به آغازگر AJ20 و OPAD02 (۷ باند) (جدول ۳) و کمترین تعداد باندهای چندشکل متعلق به آغازگرهای OPAD14، OPAD19، AJ05 و OPAE06 (یک باند) (جدول ۳) بود.

با وضوح بالا و قابل ارزیابی بین ۳۰۰ جفت باز تا ۳۰۰۰ جفت باز طول، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند (شکل ۱). دامنه تعداد آلل‌های چندشکل بین ۱ تا ۷ متغیر بود که بیشترین تعداد باندهای چندشکل

جدول ۲- توالی‌های نوکلئوتیدی آغازگرهای انتخاب شده برای بررسی چندشکلی ارقام پسته

Table 2- Nucleotide sequences of primers selected for the study of polymorphism of pistachio

نام آغازگر	توالی آغازگر	نام آغازگر	توالی آغازگر
Primer name	Primer sequences	Primer name	Primer sequences
OPAC19	5' AGT CCG CCT G 3'	AJ20	5' ACA CGT GGT C 3'
OPAD02	5' CTG AAC CGC T 3'	OPB10	5' CTG CTG GGA C 3'
OPAD14	5' GAA CGA GGG T 3'	OPC05	5' GAT GAC CGC C 3'
OPAD19	5' CTT GGC ACG A 3'	OPAD01	5' CAA AGG GCG G 3'
OPAE06	5' GGG GAA GAC A 3'	MG1	5' AGC GCC GAC G 3'
MG12	5' CCC GCG AGT C 3'	MG11	5' AGG AGC TGC C 3'
MG16	5' GAA GAA CCG C 3'	OPB17	5' AGG GAA CGA G 3'
AJ05	5' CAG CGT TGC C 3'		



شکل ۱- الگوی باندهای آغازگر AJ05 در ارقام مختلف پسته

Figure 1- The band pattern of AJ05 primer in different genotypes of Pistachio

میزان اطلاعات چند شکلی (PIC) توانایی جداسازی و تفکیک نشانگر براساس تعداد و آلل‌های جایگاه نشانگر و فراوانی آن‌ها در مجموعه نمونه برداری است که هرچه میزان آن بالاتر باشد نمایانگر قدرت تمایز بیشتر نشانگر می‌باشد. میزان اطلاعات چند شکلی (PIC) برای نشانگرهای مورد بررسی در این مطالعه از ۰/۰۹۵ تا ۰/۳۹ با میانگین ۰/۲۳ متغیر بود و نشانگرهای OPAD14 و AJ05 کمترین و نشانگر OPC05 بیشترین میزان PIC را داشتند (جدول ۳). میزان اطلاعات چند شکلی، یکی از شاخص‌های مهم جهت مقایسه

بررسی نتایج حاصل از پژوهش‌های محققین دیگر در مورد تعداد آلل‌های مشاهده شده نشانگرهای RAPD بسیار متفاوت می‌باشد. تعداد آلل‌ها و همچنین درصد چندشکلی گزارش شده در تحقیقی برای نشانگرهای RAPD مورد استفاده متفاوت با نتایج به دست آمده در این تحقیق بود (۱۷). تفاوت در تعداد آلل شناسایی شده در مطالعات مختلف می‌تواند به دلیل منشاء و خصوصیات متفاوت ژنوتیپ‌های مورد مطالعه و نیز نشانگرهای RAPD متفاوت و همچنین شرایط متفاوت PCR موجود در این تحقیق می‌باشد.

AJ05-1) همبسته و ارتباط داشتند که به ترتیب ۷۶ و ۴۳ درصد از تغییرات فنوتیپی این صفت را توجیه نمودند (جدول ۴). این نشانگرها بیش از سایر نشانگرها می‌توانند در نواحی کدکننده این صفات نقش داشته باشند زیرا در مدل رگرسیونی وارد شده و تغییرات آن صفات را توجیه نمودند و تغییرات بیشتری از صفات مورد بررسی را نشان دادند. بعضی از این نشانگرها با بیش از یک صفت ارتباط داشتند، که با توجه به وجود همبستگی معنی‌دار بین صفات مورفولوژیکی می‌توان دریافت که برخی از این صفات پیوستگی بسیار نزدیکی با همدیگر دارند یا احتمالاً به صورت پلیوتروپی کنترل می‌شوند. با توجه به مدلی که محققین (۳ و ۱۱) برای شناسایی نشانگرهای آگاهی بخش برای صفات نشان داده‌اند، از چهار نشانگری که در توجیه تغییرات فنوتیپی صفت طول خوشه از طریق رگرسیون گام به گام نقش داشتند تنها ضریب نشانگر OPAD02-2 در حالت رگرسیون ساده معنی‌دار بود و می‌توان از آن برای شناسایی تجزیه‌ای ارتباط این صفت استفاده نمود. همچنین از چهار نشانگر صفت عرض خوشه تنها نشانگر OPAD02-2 در حالت ساده معنی‌دار بود (جدول ۵). در کل از ۱۹ نشانگر وارد شده در مدل رگرسیونی گام به گام برای این صفات تنها ۱۰ نشانگر بودند که در حالت رگرسیون ساده ضریب آن‌ها معنی‌دار بود.

با استفاده از نشانگرهای مولکولی مرتبط با صفات مورفولوژیکی مهم در تولید و اصلاح درختان میوه با استفاده از انتخاب به وسیله نشانگر (MAS)، می‌توان به شناسایی ژن‌های مهم و معرفی نشانگرهای کاندید برای مطالعه بیشتر جمعیت‌ها اقدام نمود. تا کنون از نشانگرهای زیادی جهت انجام کارهای اصلاحی استفاده شده است، اما در دسترس نبودن جمعیت‌های در حال تفرق جهت نقشه‌یابی، در اختیار نبودن زمان کافی و نبود همبستگی کافی بین صفات مورفولوژیکی و نشانگرهای مولکولی از جمله مهمترین محدودیت‌ها در زمینه شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات مورفولوژیکی می‌باشد که انجام آنالیز رگرسیونی این محدودیت را مرتفع می‌سازد.

در جدول ۶ تعداد و میانگین ژنوتیپ‌هایی که دارای آلل یا فاقد آلل برای نشانگری که وارد مدل رگرسیونی شده است نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود برای طول خوشه نشانگرهای OPAD02-2 و PB10-4 با توجه به ضرایب  $\beta$ ‌های استاندارد شده اثر کاهنده‌ای روی صفت طول خوشه داشته و داشتن آلل برای این دو نشانگر باعث کاهش می‌شود و داشتن آلل برای نشانگرهای MG12-3 و MG16-1 اثر افزایشی دارد (جدول ۴). در حالی که در جدول ۶ مشاهده می‌شود که نبود آلل برای دو نشانگر اول باعث افزایش میانگین و بودن آلل برای دو نشانگر دوم باعث افزایش میانگین شده است و لذا با توجه به میانگین ژنوتیپ‌ها برای این نشانگرها می‌توان از ژنوتیپ‌هایی که فاقد آلل برای دو نشانگر اول (OPAD02-2 و PB10-4) و واجد آلل برای دو نشانگر دوم (MG12-3 و MG16-1) هستند برای افزایش این صفت استفاده نمود و در نهایت در جهت

نشانگرهای مختلف از لحاظ قدرت تمایز آنها می‌باشد. مقادیر بالای این معیار دلالت بر چندشکلی زیاد و وجود آلل یا آلل‌های نادر در یک جایگاه نشانگری است که در تفکیک و تمایز افراد نقش بسزایی دارد. بنابراین نشانگرهایی با PIC بالا برای تمایز ژنوتیپ‌هایی با خویشاوندی نزدیک بسیار مفید خواهند بود.

در رگرسیون گام به گام صفات مرتبط با عملکرد به عنوان متغییر وابسته در مقابل نشانگرها به عنوان متغییر مستقل در نظر گرفته شد و در کل ۱۹ نشانگر (آلل) که به طور معنی‌داری همبسته و در ارتباط با صفات مرتبط با عملکرد بودند وارد مدل رگرسیونی شدند (جدول ۴) که بعضی از این نشانگر در چند صفت نقش داشتند و در نهایت ۱۳ نشانگر در توجیه تغییرات فنوتیپی این صفات موثر بودند. سایر نشانگرهای مورد مطالعه تاثیر معنی‌داری بر مدل نداشته و به همین دلیل می‌توان گفت که از این نشانگرها می‌توان در شناسایی ژنوتیپ‌های برتر از لحاظ صفات مرتبط با عملکرد استفاده نمود. نشانگرهای شناسایی شده از دو نشانگر برای صفات تعداد انشعابات خوشه، تعداد پسته خوشه و وزن پسته خشک تا پنج نشانگر برای صفت وزن پسته خندان متغیر بودند. این نشانگرها به طور منفی یا مثبت با صفات مرتبط عملکرد همبسته بودند. سهم تنوع فنوتیپی توجیه شده ( $R^2$ ) توسط هر نشانگر در جدول ۳ نشان داده شده است. محققین دیگر هم در درختان با استفاده از تجزیه رگرسیون ارتباط بین نشانگرها و صفات مورد مطالعه را شناسایی کردند و از آن‌ها برای اصلاح درختان استفاده نمودند (۸، ۱۱، ۱۲ و ۱۶).

نشانگرهای OPAD02-2، MG12-3، MG16-1 و PB10-4 با صفت طول خوشه ارتباط داشتند و توانستند ۷۵ درصد از تنوع فنوتیپی این صفت را توجیه نمایند. همچنین نشانگرهای OPAD02-2، OPAD02-2، MG12-4، OPAE06-1 و AJ20-6 ارتباط معنی‌داری با عرض خوشه نشان دادند و ۶۹ درصد از تنوع فنوتیپی این صفت را کنترل کردند. در کل دو نشانگر MG16-2 و OPAD19-1 با صفت تعداد انشعابات خوشه همبسته و ارتباط داشتند که توانستند ۴۹ درصد تنوع این صفت را توجیه نمایند. با محاسبه  $\beta$ ‌های استاندارد شده مشخص شد که اهمیت نشانگر MG16-2 بیشتر می‌باشد و اثر کاهنده‌ای دارند. درحالی که تاثیر نشانگر OPAD19-1 بر روی تعداد انشعابات خوشه نزدیک به نشانگر قبلی و اثر افزایشی هم داشت (جدول ۴). در مجموع پنج آلل (OPAD14-1، OPAD02-2، OPAD19-1، OPAC19-2 و OPB10-1) درصد قابل توجهی از تغییرات فنوتیپی صفت وزن پسته خندان ( $R^2=0/48$ ،  $R^2=0/77$ ،  $R^2=0/83$ ،  $R^2=0/91$  و  $R^2=0/93$ ) را کنترل کردند. یکی از آن‌ها، نشانگر OPAD14-1 بیشترین مقدار ضریب  $\beta$  (۰/۶۸) را داشت و همبستگی مثبت و قوی را نشان داد و از لحاظ آماری در سطح یک درصد معنی‌دار بود. دو نشانگر برای هر کدام از صفات تعداد پسته خوشه (OPAD14-1 و OPAD19-1) و وزن پسته خشک (MG12-3) و



جدول ۳- میزان محتوای اطلاعات چندشکلی آغازگرها و تعداد آللهای چندشکل برای هر آغازگر

Table 3- Polymorphic information content of primers and the number of polymorphic alleles for every primers

ردیف Row	نام پرایمر Primer name	باند مونومورف Monomorphic band	باند پلی مورف Polymorphic bands	مجموع باندها Total Bands	درصد چندشکلی Percentage of polymorphic	محتوای اطلاعاتی حاصل از چند شکلی Polymorphic information content
1	OPAC19	2	3	5	60%	0.34
2	OPAD02	1	7	8	87.5%	0.38
3	OPAD14	1	1	2	50%	0.095
4	OPAD19	1	1	2	50%	0.18
5	OPAE06	1	1	2	50%	0.18
6	MG12	1	4	5	80%	0.14
7	MG16	2	3	5	60%	0.15
8	AJ05	3	1	4	25%	0.095
9	AJ20	3	7	10	70%	0.30
10	OPB10	3	6	9	66.67%	0.25
11	OPC05	2	2	4	50%	0.39
میانگین Mean		1.82	3.27	5.09	59.02%	0.23

جدول ۴- تجزیه رگرسیون گام به گام صفات مرتبط با عملکرد (متغیرهای وابسته) و نشانگرهای RAPD (متغیرهای مستقل)

Table 4- Stepwise regression analysis of yield related traits (dependent variable) and RAPD markers (independent variables)

صفت Trait	نشانگر Marker	R	R <sup>2</sup>	خطا E	R <sup>2</sup> change	F of R <sup>2</sup> change	Standardized beta coefficients	t-value
طول خوشه Panicle length	OPAD02-2	0.52	0.27	1.44	0.27	6.77*	-0.70	-
	MG12-3	0.68	0.47	1.27	0.19	6.16*	0.68	5.14**
	MG16-1	0.81	0.65	1.06	0.18	8.38*	0.54	4.66**
	OPB10-4	0.87	0.75	0.92	0.10	6.11*	-0.35	3.87**
عرض خوشه Panicle width	OPAD02-2	0.48	0.23	1.5	0.23	5.40*	-0.46	-
	MG12-4	0.64	0.40	1.36	0.17	4.92*	0.58	3.11**
	OPAE06-1	0.75	0.56	1.21	0.15	5.47*	0.46	3.63**
	AJ20-6	0.83	0.69	1.03	0.14	6.79*	0.38	2.89*
تعداد انشعابات خوشه Panicle branching number	MG16-2	0.48	0.23	3.16	0.23	5.42*	-0.54	-
	OPAD19-1	0.70	0.49	2.66	0.25	8.37*	0.51	3.07**
وزن پسته خندان Suture pistachio weight	OPAD14-1	0.70	0.48	21.51	0.48	16.8**	0.68	9.19**
	OPAD02-2	0.88	0.77	14.78	0.29	21.12**	0.26	2.97*
	OPAD19-1	0.91	0.83	12.98	0.06	6.05*	0.40	4.86**
	OPAC19-2	0.95	0.91	10.08	0.07	11.51**	-0.35	-
	OPB10-1	0.97	0.94	8.94	0.03	5.08*	0.18	4.26**
تعداد پسته خوشه Number of pistachio	OPAD14-1	0.76	0.58	9.57	0.58	24.66**	0.79	2.25*
	OPAD19-1	0.87	0.76	7.41	0.18	13.03**	0.43	6.67**
وزن پسته خشک Pistachio dry weight	MG12-3	0.49	0.24	0.18	0.24	5.71*	0.44	-
	AJ05-1	0.66	0.43	0.16	0.19	5.72*	-0.44	2.39*

\*\* و \* به ترتیب معنی دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪

\* and \*\*: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively.

جدول ۵- تجزیه رگرسیون ساده صفات مرتبط با عملکرد (وابسته) و نشانگرهای RAPD (متغیرهای مستقل)

Table 5- Simple regression analysis of yield related traits (dependent variable) and RAPD markers (independent variables)

صفت	نشانگر	R	R <sup>2</sup>	خطا E	Standardized beta coefficients	t value
طول خوشه Panicle length	OPAD02-2	0.52	0.27	1.44	-0.52	-2.60*
	MG12-3	0.30	0.09	1.61	0.30	1.31 <sup>ns</sup>
	MG16-1	0.23	0.05	1.64	0.23	-0.73 <sup>ns</sup>
	OPB10-4	0.17	0.03	1.67	-0.17	-2.32*
عرض خوشه Panicle width	OPAD02-2	0.48	0.23	1.50	-0.48	1.48 <sup>ns</sup>
	MG12-4	0.33	0.11	1.61	0.33	1.10 <sup>ns</sup>
	OPAE06-1	0.25	0.06	1.65	0.25	2.07 <sup>ns</sup>
	AJ20-6	0.44	0.19	1.53	0.44	-2.23*
تعداد انشعابات خوشه Panicle branching number	MG16-2	0.48	0.23	3.16	-0.48	2.12*
	OPAD19-1	0.45	0.20	3.22	0.45	4.10**
وزن پسته خندان Suture pistachio weight	OPAD14-1	0.70	0.48	21.51	0.70	2.15*
	OPAD02-2	0.45	0.20	26.68	0.45	1.43 <sup>ns</sup>
	OPAD19-1	0.32	0.10	28.34	0.32	-2.55*
	OPAC19-2	0.52	0.27	25.64	-0.52	0.72 <sup>ns</sup>
	OPB10-1	0.17	0.03	29.49	0.17	4.97**
تعداد پسته خوشه Number of pistachio	OPAD14-1	0.76	0.58	9.57	0.76	1.68 <sup>ns</sup>
	OPAD19-1	0.37	0.14	13.69	0.37	2.39*
وزن پسته خشک Pistachio dry weight	MG12-3	0.49	0.24	0.18	0.49	-2.39*
	AJ05-1	0.49	0.24	0.18	-0.49	

ns, \*\* و \* به ترتیب غیرمعنی دار و معنی دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪.

ns, \* and \*\*: Non-significant and significant at 5% and 1% probability levels, respectively.

اجزای عملکرد مخصوصاً نشانگرهایی که مکان کروموزومی آنها مشخص باشد می‌توان در انتخاب اولیه ژنوتیپ‌های با عملکرد بالا گامی موثر برداشت. همچنین می‌توان باند نشانگر(ها) آگاهی بخش شناسایی شده را که R<sup>2</sup> بالایی دارند از روی ژل جدا و کلون نمود. سپس توالی شناسایی شده را در پایگاه‌های اطلاعاتی با توالی‌های موجود هم‌ردیفی نمود و ژن‌های کاندید که شباهت زیادی با نشانگرهای مورد نظر را داشتند شناسایی نمود، همچنین می‌توان از روی توالی مورد نظر آغازگرهای اسکار (SCAR) را برای صفات مورد نظر طراحی کرد و در انتخاب به کمک نشانگر در برنامه‌های اصلاحی استفاده کرد.

برای افزایش عرض خوشه هم باید به دنبال ژنوتیپ‌هایی بود که فاقد آلل برای نشانگر OPAD02-2 و دارای آلل برای نشانگرهای MG12-4، OPAE06-1 و AJ20-6 باشند. از مزایای مهم روش تجزیه ارتباطی این است که در این روش نیازی به تهیه جمعیت در حال تفرق که نیاز به زمان زیادی دارد نمی‌باشد، اگر چه بهتر است از داده‌های فنوتیپی چند ساله استفاده شود. از طرف دیگر کراسینگ‌آورهایی که در حین تهیه جمعیت‌های در حال تفرق صورت می‌گیرد، محدود می‌باشد که این امکان مکان‌یابی دقیق را فراهم نمی‌سازد. همچنین کارایی این روش برای شناسایی و مکان‌یابی ژن‌های کنترل کننده صفات مندلی نیز نشان داده شده است (۴). همچنین با استفاده از نشانگرهای آگاهی بخش مرتبط با صفات



جدول ۶- تعداد و میانگین ژنوتیپ های واجد و فاقد آلل برای نشانگرهای وارد شده در مدل رگرسیونی

Table 6-The number and mean of genotypes with and without alleles for markers entered in the regression model

صفت Trait	نشانگر Marker	تعداد ژنوتیپ های دارای آلل Numbers of genotypes with allele	تعداد ژنوتیپ های فاقد آلل Numbers of genotypes without allele	میانگین ژنوتیپ های دارای آلل The mean of genotypes with allele	میانگین ژنوتیپ های فاقد آلل The mean of genotypes without allele	میانگین کل Total mean
طول خوشه Panicle length	OPAD02-2	4	16	10.26	12.35	11.93
	MG12-3	16	3	12.17	11.23	
	MG16-1	18	2	12.06	10.83	
	OPB10-4	6	14	11.52	12.11	
عرض خوشه Panicle width	OPAD02-2	4	16	8.15	10.09	9.70
	MG12-4	18	1	9.88	9.4	
	OPAE06-1	2	18	10.93	9.57	
	AJ20-6	1	18	12.8	9.50	
تعداد انشعابات خوشه Panicle branching number	MG16-2	18	2	11.97	17.45	12.52
	OPAD19-1	2	18	17.1	12.01	
وزن پسته خندان Suture pistachio weight	OPAD14-1	1	19	17.9	27.44	26.96
	OPAD02-2	4	16	57.61	19.29	
	OPAD19-1	2	18	59.22	23.38	
	OPAC19-2	7	13	12.04	34.99	
تعداد پسته خوشه Number of pistachio	OPB10-1	17	3	28.08	20.64	26.31
	OPAD14-1	1	19	72.6	23.86	
وزن پسته خشک Pistachio dry weight	OPAD19-1	2	18	41.75	24.58	1.04
	MG12-3	16	3	1.08	0.81	
	AJ05-1	19	1	1.02	1.45	

### منابع

- 1- Afifi A., May S. and Clark V.A. 2003. Computer-aided multivariate analysis. CRC Press.
- 2- Barazani O., Atayev A., Yakubov B., Kostiuikovskiy V., Popov K. and Golan-Goldhirsh A. 2003. Genetic variability in Turkmen populations of *Pistacia vera* L. Genetic Resources and Crop evolution, 50: 383-389.
- 3- Barloy D., Lemoine J., Abelard P., Tanguy A., Rivoal R. and Jahier J. 2007. Marker-assisted pyramiding of two cereal cyst nematode resistance genes from *Aegilops variabilis* in wheat. Molecular Breeding, 20: 31-40.
- 4- Breseghello F. and Sorrells M.E. 2006. Association analysis as a strategy for improvement of quantitative traits in plants. Crop Science, 46: 1323-1330.
- 5- Collard B.C. and Mackill D.J. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 363: 557-572.
- 6- Ganopoulos I.V., Kazantzis K., Chatzicharisis I., Karayiannis I. and Tsafaris A.S. 2011. Genetic diversity, structure and fruit trait associations in Greek sweet cherry cultivars using microsatellite based (SSR/ISSR) and morpho-physiological markers. Euphytica, 181: 237-251.
- 7- Hormaza J., Plinney K. and Polito V. 1998. Genetic diversity of pistachio (*Pistacia vera*, *Anacardiaceae*) germplasm based on randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. Economic Botany, 52: 78-87.
- 8- Kafkas S. and Perl-Treves R. 2001. Molecular characterization of *P. palaestina* as a variety of *P. terebinthus*. p. 291-295. III International Symposium on Pistachios and Almonds 591,

- 9- Kar P.K., Srivastava P.P., Awasthi A.K. and Urs S.R. 2008. Genetic variability and association of ISSR markers with some biochemical traits in mulberry (*Morus spp.*) genetic resources available in India. *Tree Genetics & Genomes*, 4: 75-83.
- 10- Khadivi-Khub A. 2014. Regression association analysis of fruit traits with molecular markers in cherries. *Plant Systematics and Evolution*, 300: 1163-1173.
- 11- Martínez L., Cavagnaro P., Masuelli R. and Rodríguez J. 2003. Evaluation of diversity among Argentine grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties using morphological data and AFLP markers. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6: 244-253.
- 12- Mcharo M., Labonte D., Oard J., Kays S. and McLaurin W. 2004. Linking quantitative traits with AFLP markers in a sweetpotatoes using discriminant analysis. *Acta Horticulturae*, 637: 285-293.
- 13- Roy S. and Bargmann R.E. 1958. Tests of multiple independence and the associated confidence-bounds. *The Annals of Mathematical Statistics*, 29: 491-503.
- 14- Shalini K., Manjunatha S., Lebrun P., Berger A., Baudouin L., Pirany N., Ranganath R. and Prasad D.T. 2007. Identification of molecular markers associated with mite resistance in coconut (*Cocos nucifera* L.). *Genome*, 50: 35-42.
- 15- SPSS-Inc 2013. IBM SPSS Statistics 22 Core System User's Guide. SPSS Inc., an IBM Company Headquarters, USA.
- 16- Tajabadipur A. 1997. Identification of some pistachio cultivars. Faculty of Agriculture. Tehran University, Tehran, Iran. (in Persian with English abstract).
- 17- Tayefeh Aliakbarkhany S., Talaie A.R. and Fatahi Moghadam M.R. 2013. Investigation of genetic diversity among pistachio vera in the Khorasan by using molecular marker. *Modern Genetics Journal*, 8: 169-176. (in Persian with English abstract).
- 18- Virk P.S., Ford-Lloyd B.V., Jackson M.T., Pooni H.S., Clemeno T.P. and Newbury H.J. 1996. Predicting quantitative variation within rice germplasm using molecular markers. *Heredity*, 76: 296-304.
- 19- Whitehouse W. 1957. The pistachio nut—a new crop for the western United States. *Economic Botany*, 11: 281-321.
- 20- Williams J.G., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A. and Tingey S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535.
- 21- Wright A. and Mowers R. 1994. Multiple regression for molecular-marker, quantitative trait data from large F2 populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 89: 305-312.
- 22- Yonash N., Heller E., Hillel J. and Cahaner A. 2000. Detection of RFLP markers associated with antibody response in meat-type chickens: haplotype/genotype, single-band, and multiband analyses of RLFP in the major histocompatibility complex. *Journal of Heredity*, 91: 24-30.
- 23- Zhang J., Li X., Jiang G., Xu Y. and He Y. 2006. Pyramiding of Xa7 and Xa21 for the improvement of disease resistance to bacterial blight in hybrid rice. *Plant Breeding*, 125: 600-605.
- 24- Zohary M. 1952. A monographical study of the genus Pistacia. *Palestine Journal of Botany (Jerusalem Series)*, 5: 187-228.