

تنوع ژنتیکی ارقام و ژنوتیپ‌های پسته از نظر مقاومت به بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه (*Phytophthora drechsleri*) و ارتباط آن با

مارکرهای مولکولی SCoT

Genetic diversity of pistachio cultivars and genotypes in terms of resistance to crown and root rot (*Phytophthora drechsleri*) and its relationship with SCoT molecular markers

شیرین خدادادی^۱، حسین دشتی^۱، روح‌الله صابری^۲، خلیل ملک‌زاده^۱، علی تاج آبادپور^۳

۱- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استاد، استادیار، گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشکده

کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر (عج)، رفسنجان، ایران

۲- دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر (عج)، رفسنجان، ایران

۳- استادیار، مؤسسه تحقیقات پسته کشور، رفسنجان، ایران

Khodadadi Sh¹, Dashti H², Saberi R³, Malekzadeh Kh², Tajabadi pour A⁴

1- Graduated MSc Student, Professor, Assistant Professor, Department of Genetic
and Plant Production, Vali-e-Asr University, Rafsanjan, Iran

2- Associate Professor, Department of Plant Protection, Vali-e-Asr University,
Rafsanjan, Iran

3- Assistant Professor of Pistachio Research Center, Rafsanjan, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: dashti@vru.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۳/۱۷ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۳)

چکیده

دانش تنوع ژنتیکی همراه با مدیریت صحیح ژرم‌پلاسما را می‌توان در انتخاب ژنوتیپ‌ها در برنامه‌های به‌نژادی و حفاظت منابع ژنتیکی استفاده نمود. روش‌های مولکولی همراه با روش‌های آماری چندمتغیره، پتانسیل قابل توجهی جهت بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان دارند. در این پژوهش، تعداد ۲۰ رقم پسته در گلخانه نسبت به قارچ عامل پوسیدگی ریشه و طوقه ارزیابی شدند و صفات نمره بیماری (score)، درصد مرگ و میر و وزن خشک گیاه اندازه‌گیری شد. جهت بررسی تنوع ژنتیکی مقاومت به این بیماری از ۱۲ آغازگر مولکولی SCoT استفاده شد. ارزیابی فنوتیپی، ارقام پسته را به ۴ گروه مقاوم، نیمه‌مقاوم، نیمه‌حساس و حساس تقسیم نمود. در ارزیابی تنوع ژنتیکی با آغازگرهای SCoT، از ۱۲۲ باند تولید شده ۱۰۵ باند، چند شکل بودند. تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها براساس باندهای به‌دست آمده مطابقت خوبی با گروه‌بندی فنوتیپی نداشت؛ لذا به‌منظور شناسایی باندهایی که بیشترین ارتباط را با صفات فنوتیپی مربوط به مقاومت به گموز داشتند، از روش‌های رگرسیون جزئی (PLS) و رگرسیون گام‌به‌گام استفاده شد. در رگرسیون گام به گام ۷ مکان انتخاب شدند که مقاومت به بیماری گموز را ۷۷ تا ۸۶ درصد توجیه نمودند و با تجزیه خوشه‌ای براساس این ۷ مکان، دو گروه حاصل شد که از طریق تجزیه ارتباط (جدول توافق) رابطه این گروه‌بندی براساس صفات فنوتیپی اثبات شد. این ۷ مکان، عکس‌العمل ژنوتیپ‌های پسته در مقابل بیماری گموز را به مقدار زیادی توجیه نمودند که از آغازگرهای SCoT17، SCoT16، SCoT12 و SCoT20 تولید شدند؛ لذا برای مطالعه تنوع ژنتیکی ارقام پسته در مقابل گموز می‌توان این آغازگرها را پیشنهاد نمود.

واژه‌های کلیدی

آغازگر SCoT

تنوع ژنتیکی

رگرسیون جزئی (PLS)

گموز

گیاه پسته

مقدمه

پسته (*Pistacia vera* L.) از مهم‌ترین محصولات ایران است و با شرایطی مثل آب آبیاری شور و خشکسالی و کمبود آب سازگار است (Abrishami 1995). یکی از مهم‌ترین بیماری‌های پسته، بیماری گموز (انگومک) است که باغداران بیشتر آن را به نام شیره سیاه می‌شناسند (Ashkan et al. 1997). این بیماری ناشی از گونه‌های مختلف شبه قارچ فیتوفتورا می‌باشد که باعث خسارت شدید در باغ‌های آلوده می‌شود و لذا دارای اهمیت ویژه‌ای می‌باشد. این بیماری گاهی تا حدود ۱۰ تا ۱۲ درصد خسارت می‌زند (Mirabolfathy et al. 1990). انتخاب ارقام جدید پسته با عملکرد کمی و کیفی بیشتر و سازگاری با شرایط مختلف اقلیمی جهت استفاده از آن‌ها در مناطق مختلف پسته‌کاری از اهداف اصلی بخش به‌نژادی است (Omidi et al. 2010). تنوع ژنتیکی در گیاهان و جمعیت‌های گیاهی از نظر کاربردی مورد توجه است. با به‌کارگیری نشانگرهای مولکولی، اصلاح گیاهان با سرعت و سهولت بیشتری انجام می‌شود 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 (Mirzaie et al. 2012). نشانگرهای AFLP، RAPD، SSR و ISSR از نشانگرهای مورد استفاده برای مطالعه تنوع ژنتیکی و روابط بین گونه‌ها و ارقام پسته هستند (Rafieezadeh et al. 2015). محققان، با استفاده از نشانگر RAPD، هویت ژنتیکی ژنوتیپ‌های پسته جدیدی با عنوان سیاه‌برگ را بررسی و گزارش نموده‌اند که ویژگی‌های ژنتیکی سیاه‌برگ ارتباط خیلی نزدیکی به رقم تجاری اوحدی دارد، همچنین از تکنیک RAPD می‌توان برای مطالعه تنوع ژنتیکی ارقام پسته استفاده کرد (Javanshah et al. 2007). در پژوهشی تنوع ژنتیکی ۳۰ رقم ماده پسته اهلی و یک ژنوتیپ نر با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR، RAPD و SSR بررسی و نشان داده شد که نشانگرهای RAPD، سپس ISSR و SSR بیشترین قابلیت تفکیک‌پذیری ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را دارند (Baghizadeh et al. 2010). در پژوهشی روابط ژنتیکی ۳۰ رقم ماده پسته اهلی و یک ژنوتیپ نر با استفاده از نشانگرهای ISSR

بررسی و مشخص شد که تنوع ژنتیکی نسبتاً پایینی در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه وجود دارد، با وجود این، نشانگر ISSR این تنوع را به وضوح نشان داد (Noroozi et al. 2009). امروزه استفاده از روش تجزیه ارتباط برای شناسایی مکان‌های ژنی دخیل در صفات کمی و کیفی استفاده می‌شود. این روش شامل استفاده از ژرم‌پلاسما گیاهان برای شناسایی نشانگرهای مولکولی مرتبط با صفات مورد بررسی است (Fanizza et al. 2005; Gupta et al. 2005). آغازگرهای SCOT¹ (کدون آغاز هدف واقع شده) نشانگرهایی از DNA را تولید می‌کنند که دارای منطقه کوتاه حفاظت شده ATG می‌باشند که مکمل کدون شروع ژن‌ها است. طول آغازگر در آن‌ها ۲۴-۱۸ نوکلئوتید است و مزیت آن این است که ژن‌های ساختاری (Functional genes) را هدف قرار می‌دهند (Gupta et al. 2019). این نشانگرها غالب بوده و تکرارپذیری آن‌ها با استفاده از نمونه‌های تکراری مورد تایید قرار گرفته است و کاربرد آن‌ها در تجزیه‌های ژنتیکی، تجزیه تفرق توده‌ای و تجزیه QTL تجویز شده است (Collard and Marckill 2009). تنوع ژنتیکی، رابطه فیلوژنتیک و ساختار جمعیت ۵۰ نمونه از سه گونه پسته ایرانی با استفاده از آغازگرهای SCOT و صفات مورفولوژیکی مورد بررسی قرارگرفت و ارتباط صفات فنوتیپی و داده‌های مولکولی حاصل از SCOT از طریق رگرسیون چندگانه بررسی شد. در این پژوهش آغازگرهای SCOT، ۷۶ نوار را در کل جمعیت با پلی مورفیسم بالای ۹۸٪ تولید کردند که نشان دهنده توان این آغازگرها در تمایز ژنتیکی بین گونه‌های پسته است. همبستگی معنی‌داری بین صفات مورفولوژیکی و مارکرهای SCOT مشاهده شد و سه نوار اختصاصی در *P. vera* و *P. atlantica* تشخیص داده شد که می‌توانند برای طراحی آغازگرهای SCAR از آن‌ها استفاده شود و در انتخاب به‌کمک نشانگر (MAS) مورد استفاده قرار گیرند (Zarei and Erfani-moghadam 2021). بررسی تنوع ژنتیکی داخل سه گونه پسته توسط آغازگرهای SCOT نشان داد که بیشترین تنوع مربوط به داخل گونه *P. khinjuk* و سپس *P. atlantica* و *P. vera* می‌باشد و *P. vera* و *P. khinjuk* نزدیک‌ترین گونه‌های خویشاوند بودند و *vera* و *atlantica* بیشترین اختلاف ژنتیکی را داشتند (Zarei and

¹ Start Codon Targeted

و ISSR فقط نشانگر SCoT قادر به تمایز بین ژرمپلاسما سیب‌زمینی بود (Gorji et al. 2011). همچنین جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی در انگور، نشانگر اسکات توانایی تمایز بالایی برای بررسی چندشکلی دارد (Collard and Marckill 2009). علاوه بر این در پژوهشی تنوع ژنتیکی ۱۶ توده ایرانی رازیانه با استفاده از ۱۵ آغازگر اسکات مورد ارزیابی قرار گرفت که میزان شباهت بین گونه‌ها براساس اطلاعات نشانگرها ۰/۶۶ گزارش شد (Nikkerdar et al. 2018). از آنجایی‌که تاکنون پژوهشی به‌منظور شناسایی نشانگرهای مولکولی و بررسی تنوع ژنتیکی ارقام پسته در واکنش به بیماری گموز پسته انجام نشده است؛ این پژوهش به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی و تجزیه ارتباط صفات مرتبط با مقاومت به بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه پسته با نشانگرهای مولکولی SCoT انجام شده است.

مواد و روش‌ها

۲۰ رقم پسته در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار (گلدان)، و هر گلدان حاوی هفت بذر مورد ارزیابی قرار گرفتند. فهرست ارقام مورد استفاده و محل جمع‌آوری آن‌ها در جدول ۱، آورده شده است.

در این آزمایش، از جدایه‌ای از گونه *Phytophthora drechsleri* (بخش تحقیقات گیاهپزشکی مؤسسه تحقیقات پسته کشور) به شماره IPRPh-1-1 جداسازی شده از منطقه موسی‌آباد رفسنجان استفاده شد. به‌منظور ایجاد بیماری در نهال‌های پسته، روی طوقه نهال، محل مناسبی جهت مایه‌زنی در نظر گرفته شد و با پنبه آغشته به الکل ۷۰ درصد ضدعفونی سطحی شد. سپس با اسکارپل استریل قطعه‌ای از پوست به ابعاد حدود ۴-۱۰×۳ میلی‌متر برداشته شد. به‌طوری‌که پوست برداشته شده از یک طرف به ساقه اتصال داشته باشد. آنگاه قطعه‌ای به اندازه مشابه از حاشیه فعال پرگنه فیتوفتورا رشد یافته روی محیط غذایی CMA در محل زخم گذاشته و مجدداً پوست روی آن قرار داده شد. جهت جلوگیری از خشک شدن و جابه‌جا شدن پلاک‌های فیتوفتورا، در محل مایه‌زنی شده، روی آن با یک لایه پارافیلیم پوشانده شد.

erfani-Moghadam 2021). ۳۶ آغازگر هدفمند SCoT برای مطالعه ۴۸ نمونه از گونه *Jatropha curcas*، گیاه دانه روغنی از خانواده فرفیون از کشورهای مختلف مورد استفاده قرار گرفت که ۷۴٪ از آغازگرها پلی مورفیسم نشان دادند. از بین این آغازگرها سه آغازگر ۶، ۲۶ و ۲۷ نمونه‌های خوراکی و سمی را از هم تفکیک می‌کردند. نشانگرهای چند شکل به‌دست آمده از این سه آغازگر به نشانگر SCAR تبدیل شد که اسکار مربوط به SCoT-6 کودامیننت و اسکارهای مربوط به SCoT-26 و ۲۷ دامیننت بودند. اسکار مربوط به SCoT-6 در تشخیص هیبریدهای بین نمونه‌های سمی و غیر سمی مورد تایید قرار گرفت (Mulpuri et al. 2013). تنوع ژنتیکی و روابط بین ۴۷ نمونه از ژرم پلاسما انبه و سه گونه از خویشاوندان آن با استفاده از ۳۳ آغازگر SCoT مورد تجزیه تحلیل قرار گرفت که ۲۷۳ نوار تولید کردند که ۷۶٪ آن‌ها پلی مورف بودند و تشابه ژنتیکی از ۰/۵۳ تا ۰/۹۲ را نشان دادند و ۵۰ نمونه را به شش کلاستر تبدیل کرد که اطلاعات مفیدی را جهت مدیریت ژرم پلاسما و اتخاذ استراتژی‌های اصلاحی انبه فراهم می‌کند (Cong et al. 2019). با انجام تجزیه تنوع ژنتیکی با نشانگرهای RAPD، SCoT و ISSR فقط نشانگر SCoT قادر به تمایز بین ژرمپلاسما سیب‌زمینی بود (Gorji et al. 2011). همچنین جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی در انگور، نشانگر اسکات توانایی تمایز بالایی برای بررسی چندشکلی دارد (Collard and Marckill 2009). ارزیابی تنوع ژنتیکی ۹۶ لاین اصلاحی گندم دوروم با استفاده از ۱۲ آغازگر SCoT انجام شد. نتایج نشان داد که ۷۶ نوار تولید شده، محتوای چندشکلی (PIC) و شاخص نشانگری (MI) بالایی را در جمعیت نشان دادند لذا این نشانگرها کارایی زیادی در بروز تنوع ژنتیکی ژرمپلاسما دوروم داشته و توانسته است ژنوتیپ‌های با منشاء متفاوت را در تجزیه خوشه‌ای از هم تفکیک نماید (Shayegan et al. 2019). در ارزیابی تنوع ژنتیکی ۵۳ توده از سه گونه متعلق به جنس *Aegilops* دونوع آغازگر SCoT و TRAP مورد مقایسه قرار گرفتند که آغازگرهای SCoT متوشط شاخص محتوای چندشکلی و همچنین سهم بیشتری در بروز تنوع ژنتیکی درون گونه از TRAP داشتند اما TRAP بیشترین تنوع بین گونه‌ای را نشان داد (Ahmadi et al. 2021). با انجام تجزیه تنوع ژنتیکی با نشانگرهای RAPD، SCoT

جدول ۱- ارقام و ژنوتیپ‌های پسته مورد مطالعه

ردیف	ژنوتیپ	علامت اختصاری	محل تهیه و جمع آوری
۱	اکبری	Ak	باغات پسته رفسنجان
۲	اوحدی-رفسنجان	Oh-R	مؤسسه تحقیقات پسته رفسنجان
۳	اوحدی-نوق	Oh-N	مؤسسه تحقیقات پسته رفسنجان
۴	احمدآقایی	Ah	مؤسسه تحقیقات پسته رفسنجان
۵	فندوقی	Fa	باغات پسته رفسنجان
۶	بادامی ریز-زرند	Ba-Z	مؤسسه تحقیقات پسته رفسنجان
۷	بادامی فیض آباد	Ba-F	مؤسسه تحقیقات پسته رفسنجان
۸	کله قوچی	K	باغات پسته رفسنجان
۹	پاکزاد	P	باغات پسته رفسنجان
۱۰	ممتاز	Mom	باغات پسته رفسنجان
۱۱	چروک	Ch	مؤسسه تحقیقات پسته رفسنجان
۱۲	ایتالیایی	Ita	مؤسسه تحقیقات پسته رفسنجان
۱۳	سرخس	Sa	مؤسسه تحقیقات پسته رفسنجان
۱۴	قزوینی	Qa	مؤسسه تحقیقات پسته رفسنجان
۱۵	سفیدپسته نوق	Sef-N	مؤسسه تحقیقات پسته رفسنجان
۱۶	ناشناخته (بینام)	N	رفسنجان-ریسه
۱۷	-	A*	حاصل از تلاقی (Ohadi × m1)
۱۸	-	F*	حاصل از تلاقی (Ohadi × m۲)
۱۹	-	E*	حاصل از تلاقی (Ohadi × m۳)
۲۰	UCB1	UCB1	(P.atlantica × P.integerrima) شرکت تولید نهال طوبا - کرمان

m_3 و m_2 , M_1 ژنوتیپ‌های نر در مؤسسه تحقیقات پسته رفسنجان، E^* , F^* , A^* ژنوتیپ‌هایی هستند که از تلاقی مصنوعی به‌دست آمده‌اند.

مجموع نمره بوته‌ها در گلدان

تعداد کل بوته‌ها در گلدان

تعداد بوته‌های خشک‌شده

کل بوته‌ها

× ۱۰۰

رابطه (۱)

رابطه (۲)

DNA ژنومی از برگ‌های جوان برداشت‌شده با استفاده از روش CTAB^۱ با اندکی تغییر استخراج شد (Doyle and Doyle 1987). کمیت و کیفیت DNA با دستگاه نانودراپ و ژل آگارز یک درصد انجام گرفت. هر نمونه از واکنش PCR^۲ با حجم ۲۰ میکرولیتر تهیه شد که شامل ۱۰ میکرولیتر از مستر ۲x شرکت دنازیست، یک میکرولیتر آغازگر با غلظت ۱۰ میکرومولار، ۲ میکرولیتر از DNA الگو با غلظت ۱۰ نانوگرم DNA و ۷ میکرولیتر آب دوبار تقطیر بود. در این پژوهش از ۱۲ آغازگر SCoT به شرح جدول ۷ استفاده شد. برنامه PCR در ترموسایکلر مدل Bio Rad, C1000[™] در ۴۰ سیکل انجام شد که شامل ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۴-۵۶°C بسته به آغازگر به مدت ۳۰ ثانیه و

گلدان‌های تیمار شده در گلخانه با دمای ۲۸-۳۰ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۰-۶۰ درصد و ۱۶ ساعت نور نگهداری شدند (Erwin and Ribeiro 1996).

یک ماه بعد از مایه‌زنی در نهال‌ها، تعداد نهال خشک‌شده در هر گلدان یادداشت‌برداری شد. سپس گلدان‌ها را خالی کرده و برای هر نهال نمره بیماری (Score) در نظر گرفته شد. روش نمره‌دهی بر اساس مقیاس صفر تا پنج به شرح زیر برای هر گیاه داخل گلدان انجام گرفت ۰= ریشه‌ها و طوقه‌ها بدون لکه نکروزه؛ ۱= ریشه دارای یک یا چند لکه نکروزه و طوقه فاقد علائم؛ ۲= ریشه دارای لکه‌های ممتد نکروزه (نکروزه شدن بیشتر از ۲۵٪ و کمتر از ۵۰٪ ریشه‌ها) و طوقه بدون علائم؛ ۳= نکروزه شدن بیشتر از ۵۰٪ ریشه‌ها و سیاه‌شدگی طوقه؛ ۴= ریشه‌ها تقریباً سیاه‌رنگ با توسعه ۷۵٪ سیاه‌شدگی طوقه؛ ۵= سیاه شدن ریشه و طوقه سبزخشکیدگی و مرگ گیاه (Ownley et al. 2003). میانگین نمره در بوته در هر گلدان طبق رابطه (۱) به‌دست آمد. با استفاده از رابطه (۲) درصد مرگ‌ومیر هر گلدان محاسبه شد.

¹ Cetyltrimethyl ammonium bromide

² Polymerase Chain Reaction

$$R_p = \sum I b_i \quad \text{رابطه (۳)}$$

$$D_i = \sum P_i^2 \quad \text{رابطه (۴)}$$

$$D_I = \frac{(\sum D_i)}{n} \quad \text{رابطه (۵)}$$

نتایج و بحث

نتایج بررسی صفات فنوتیپی اندازه‌گیری شده در گلخانه نتایج تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده (جدول ۲)، در گلخانه نشان داد که بین ارقام مختلف از نظر نمره بیماری و وزن خشک بوته در سطح ۰/۰۵ و از نظر صفت مرگ‌ومیر در سطح ۰/۰۱ اختلاف معنی‌داری وجود دارد. مقایسات میانگین صفات براساس آزمون دانکن انجام گرفت (جدول ۳). با توجه به جدول ۴، بیشترین مرگ‌ومیر به ترتیب مربوط به رقم سفید پسته نوق، E و سرخس بود. کمترین میزان مرگ‌ومیر مربوط به رقم UCB1 است. از نظر نمره بیماری، رقم E و سفیدپسته نوق بیشترین نمره بیماری را گرفته و کمترین نمره بیماری را UCB1، پاکزاد و قزوینی دارا می‌باشند. بیشترین وزن خشک مربوط به UCB1، احمدآقایی، پاکزاد، بادامی ریز زرد و قزوینی است و کمترین وزن خشک مربوط به رقم سفیدپسته نوق است. با توجه به نتایج، رقم سفیدپسته نوق با بیشترین میزان مرگ‌ومیر و نمره بیماری وزن خشک پایین، رقمی حساس به بیماری گموز می‌باشد و رقم UCB1 با کمترین میزان مرگ‌ومیر و نمره بیماری و وزن خشک رقمی مقاوم به این بیماری می‌باشد.

در ۷۲°C به مدت ۹۰ ثانیه و به مدت ۵ دقیقه در ۷۲°C درجه در سیکل آخر به عنوان بسط تکمیلی بود. از ژل ۱/۵ درصد جهت الکتروفورز و جداسازی محصولات PCR استفاده شد. از Red Safe به منظور رنگ‌آمیزی DNA و از نور UV به منظور آشکارسازی قطعات تکثیر شده استفاده شد.

برای بررسی چند شکلی بین ژنوتیپ‌ها به حضور یک باند خاص عدد یک و عدم حضور آن عدد صفر داده شد و ماتریس یک و صفر تشکیل شد. ماتریس تشابه به روش مقابله ساده^۱ و رسم دندروگرام با استفاده از نرم‌افزار NTSYS2.02e به روش Complete Linkage انجام شد. برای هر آغازگر در این آزمایش قدرت تفکیک^۲ (R_p) محاسبه شد، این ضریب بیانگر میزان کارایی هر نشانگر برای جداسازی و تفکیک نمونه‌های مورد مطالعه است (Prevost and Wilkinson 1999). این شاخص بر اساس رابطه (۳) محاسبه می‌شود. شاخص تنوع یک باند (D_i) به صورت رابطه (۴) تعریف می‌شود که در آن p_i فراوانی i امین آل (باند) می‌باشد و شاخص تنوع برای هر آغازگر عبارتست از جمع D_i های باندهای آن آغازگر (Milbourne et al. 2010). متوسط شاخص تنوع برای هر آغازگر از رابطه (۵) به دست می‌آید، که n تعداد مکان تکثیر هر آغازگر است. به منظور انجام تجزیه واریانس و مقایسه میانگین صفات گلخانه‌ای از نرم‌افزار آماری SAS و برای گروه‌بندی و انجام تجزیه حداقل مربعات جزئی (PLS) و همچنین به منظور بررسی رابطه بین صفات گلخانه‌ای و نتایج ملکولی از نرم‌افزار MINITAB 14 استفاده شد.

¹ Simple Matching

² Resolving power

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات نمره بیماری، مرگ و میر و وزن خشک بوته در گلخانه

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		اسکور بیماری ^۱	مرگ و میر ^۲	وزن ماده خشک ^۱
ژنوتیپ	۱۹	۰/۰۰۳۳۵۹۵۸*	۰/۱۱۶۹۸۹۲۴**	۰/۱۰۴۸۷۳۸۶*
خطای آزمایشی	۳۷	۰/۰۰۱۷۶۶۵۹	۰/۰۴۸۳۴۷۶۱	۰/۰۳۴۱۵۱۷۲
CV(%)		۶/۷	۲۶/۲	۲۳/۷

۱، این صفات تبدیل لگاریتمی شده‌اند. ۲، تبدیل آرک-سینوس انجام شده

*, ** به ترتیب معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱

جدول ۳- مقایسه میانگین ارقام پسته برای صفات نمره بیماری، مرگ‌ومیر و وزن خشک بوته به روش LSD در سطح ۰/۰۵

رقم یا ژنوتیپ	DW	*DW (g)	Mo	%Mo	Sc	*Sc
Ak	۰/۱۸۹ ^{abcde} ±۰/۷۱۰	۴/۱۳	۰/۲۲۱ ^{def} ±۰/۶۵۴	۶۰/۸	۰/۰۴۲ ^{bcd} ±۰/۶۲۵	۳/۲۲
Oh-R	۰/۱۲۲ ^{abcde} ±۰/۷۴۴	۴/۵۵	۰/۱۸۴ ^{cdef} ±۰/۷۵۰	۶۸/۲	۰/۰۴۴ ^{cd} ±۰/۶۰۷	۳/۰۵
Oh-N	۰/۱۰۹ ^{abc} ±۰/۸۲۹	۵/۷۵	۰/۱۸۸ ^{cdef} ±۰/۸۷۵	۷۶/۸	۰/۰۵ ^{bcd} ±۰/۶۲۷	۳/۲۴
Se-N	۰/۱۰۹ ^f ±۰/۳۴۳	۱/۲۰	۰/۲۵۳ ^a ±۱/۴۵۸	۹۹/۴	۰/۰۳۷ ^a ±۰/۶۹۹	۴/۰۰
N	۰/۱۸۷ ^{ab} ±۰/۸۹۰	۶/۷۶	۰/۲۳۶ ^{cdef} ±۰/۷۲۹	۶۶/۶	۰/۰۶۹ ^{cd} ±۰/۶۰۱	۲/۹۹
Ita	۰/۱۹۴ ^{cdef} ±۰/۵۳۶	۲/۴۴	۰/۱۵۱ ^{cd} ±۰/۹۶۹	۸۲/۴	۰/۰۴۳ ^{abc} ±۰/۶۵۱	۳/۴۸
Ba-Z	۰/۱۴۱ ^a ±۰/۹۹۸	۸/۹۵	۰/۲۲ ^{cde} ±۰/۸۹۹	۷۸/۳	۰/۰۳۹ ^{bcd} ±۰/۶۲۷	۳/۲۴
Qa	۰/۱ ^a ±۰/۹۷۱	۸/۳۵	۰/۲۱۳ ^{ef} ±۰/۵۳۷	۵۱/۲	۰/۰۳۷ ^d ±۰/۵۷	۲/۷۲
Sa	۰/۲۴۴ ^{def} ±۰/۵۱۳	۲/۲۶	۰/۱۴۸ ^{bc} ±۱/۰۴	۸۶/۲	۰/۰۳۴ ^{ab} ±۰/۶۸	۳/۷۹
Ba-f	۰/۲۷۳ ^{ab} ±۰/۸۶۹	۶/۴۰	۰/۲۷۹ ^{cdef} ±۰/۸۵۸	۷۵/۷	۰/۰۳۶ ^{abc} ±۰/۶۶	۳/۵۷
K	۰/۲۲۳ ^{abcd} ±۰/۸۱۱	۵/۴۷	۰/۲۵۴ ^{cdef} ±۰/۸۵	۷۵/۱	۰/۰۴۱ ^{abc} ±۰/۶۴۸	۳/۴۵
P	۰/۲۷۷ ^a ±۰/۹۸۸	۸/۷۳	۰/۱۸ ^{cdef} ±۰/۶۷۷	۶۲/۷	۰/۰۴ ^d ±۰/۵۷۵	۲/۷۶
M	۰/۱ ^{ab} ±۰/۸۸۳	۶/۶۴	۰/۱۶ ^{cdef} ±۰/۷۷۵	۷۰/۰	۰/۰۴۴ ^{bcd} ±۰/۶۱۲	۳/۰۹
Ch	۰/۱۴۱ ^{abcd} ±۰/۷۹۹	۵/۳۰	۰/۲۲۶ ^{cdef} ±۰/۷۸۵	۷۰/۷	۰/۰۳۲ ^{cd} ±۰/۵۹۵	۲/۹۴
Fa	۰/۱۵۱ ^{ab} ±۰/۸۶۳	۶/۲۹	۰/۲۱۳ ^{def} ±۰/۶۲۴	۵۸/۴	۰/۰۴۲ ^{cd} ±۰/۵۹۴	۲/۹۳
Ah	۰/۲۵۲ ^a ±۰/۹۸۹	۸/۷۵	۰/۲۳۸ ^{cdef} ±۰/۷۵۱	۶۸/۲	۰/۰۴۳ ^{cd} ±۰/۶۰۶	۳/۰۴
A	۰/۲۵۴ ^{abcd} ±۰/۷۹۶	۵/۲۵	۰/۳۱۴ ^{cdef} ±۰/۷۸۲	۷۰/۵	۰/۰۳۲ ^{cd} ±۰/۶۰۶	۳/۰۴
F	۰/۱۴۴ ^{bcd} ±۰/۶۴۱	۳/۳۸	۰/۱۸۷ ^{cd} ±۰/۹۲۹	۸۰/۱	۰/۰۴۲ ^{bcd} ±۰/۶۱۹	۳/۱۶
E	۰/۱۳۷ ^{ef} ±۰/۴۶۷	۱/۹۳	۰/۲۲۸ ^{ab} ±۱/۳۵	۹۷/۶	۰/۰۴۱ ^a ±۰/۶۹۸	۳/۹۹
UCB1	۰/۱۴۱ ^a ±۱/۰۱۴	۹/۳۳	۰/۲۲۱ ^f ±۰/۵۳۲	۵۰/۷	۰/۰۳۸ ^d ±۰/۵۷	۲/۷۵
LSD5%	۰/۳۰۶۸		۰/۳۶۵۲		۰/۰۶۹۶	

DW: وزن خشک Mo: درصد کشندگی SC: اسکور بیماری. *: ارزش واقعی صفت (untransformed)

مرگ‌ومیر افزایش می‌یابد. همبستگی بین وزن خشک بوته با میزان مرگ‌ومیر و نمره بیماری به ترتیب برابر با $0/829^{**}$ و $0/812^{**}$ می‌باشد. با افزایش وزن خشک بوته میزان مرگ‌ومیر و نمره بیماری کاهش می‌یابد.

جدول ۴- همبستگی بین صفات نمره بیماری، مرگ‌ومیر و وزن خشک در گلخانه

اسکور بیماری	مرگ و میر	صفت
	$0/904^{**}$	اسکور بیماری
$0/812^{**}$	$0/829^{**}$	وزن خشک

**, معنی‌دار در سطح ۰/۰۱

تجزیه خوشه‌ای ارقام و ژنوتیپ‌های پسته براساس روش Ward و فاصله اقلیدسی به عنوان معیار فاصله و بر اساس صفات استاندارد شده نمره بیماری و درصد کشندگی انجام گرفت. به علت اینکه وزن خشک برای هر ژنوتیپ نمی‌تواند معیاری از مقاومت ژنوتیپ به بیماری باشد (به علت عدم وجود شاهد برای هر ژنوتیپ) این صفت در محاسبات بعدی دخالت داده نشد. تجزیه

بنی‌هاشمی (Banihashemi 1998) واکنش گونه‌های *Pistacia* را به گونه‌های فیتوفتورا بررسی نمود و نشان داد که *P. atlantica* و دورگ UCB1 به تمام گونه‌های فیتوفتورا مقاوم هستند. حساسیت رقم سرخس به تمام گونه‌های فیتوفتورا از جمله *P. pistaciae* بسیار زیاد می‌باشد، بنابراین استفاده از این پایه در زمین‌های آلوده به عوامل پوسیدگی طوقه و ریشه قابل توصیه نیست و همچنین پایه‌های بادامی ریز زرد و قزوینی مقاومت بالایی نسبت به تمام گونه‌های فیتوفتورا از جمله *P. pistaciae* دارند (Mehrnejad and Javanshah 2010). در مطالعه‌ای در شرایط گلخانه واکنش طوقه و ریشه دانه‌های نه ماهه ارقام سرخس، بادامی و قزوینی به *P. drechsleri* و *P. citrophthora* مورد بررسی قرار گرفت، براساس نتایج به دست آمده، رقم قزوینی مقاوم‌ترین و سرخس حساس‌ترین می‌باشد (Banihashemi and Moradi 2004). که نتایج این آزمایش با پژوهش‌های پیشین مشابه است.

نتایج همبستگی صفات (جدول ۴) نشان داد که همبستگی بین نمره بیماری با مرگ‌ومیر دارای ضریب مثبت و معنی‌دار ($0/904^{**}$) می‌باشد. با افزایش نمره بیماری (حساسیت) میزان

قرار گیرد. بیشترین میزان قدرت تفکیک مربوط به آغازگر SCOT16 (۱۰/۲) و کمترین مقدار آن مربوط به آغازگر SCOT36 برابر با ۱/۹ بود (جدول ۷). هر چه قدرت تفکیک مربوط به آغازگر بیشتر باشد، کارایی آغازگر در تفکیک و جداسازی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بیشتر است (Dhief et al. 2011).

گروه‌بندی ژنوتیپ‌های پسته با استفاده از نشانگرهای مولکولی SCOT بر اساس ماتریس تشابه و دندروگرام تجزیه خوشه‌ای میزان تشابه ۷۷٪ برای نزدیک‌ترین ژنوتیپ‌ها (احمدآقایی و بادامی فیض آباد) و ۴۷٪ برای دورترین ژنوتیپ‌ها (اکبری و UCB1) متغیر بود (ماتریس تشابه نشان داده نشده). این بیانگر وجود تنوع قابل توجه بین ژنوتیپ‌های پسته مورد مطالعه است.

تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های پسته را در تشابه ۴۸٪ در سه گروه قرار داد. گروه A شامل ۱۱ ژنوتیپ (اکبری، سفید پسته نوق، ناشناخته، E، اوحدی رفسنجان، احمدآقایی، بادامی فیض آباد، اوحدی نوق، بادامی ریز زرنند، کله قوچی و پاکزاد) می‌باشد و گروه B شامل ۵ ژنوتیپ (ایتالیایی، A، قزوینی، سرخس و F) می‌باشد و گروه C شامل ۴ ژنوتیپ ممتاز، فندق، چروک و UCB1 می‌باشد (شکل ۳).

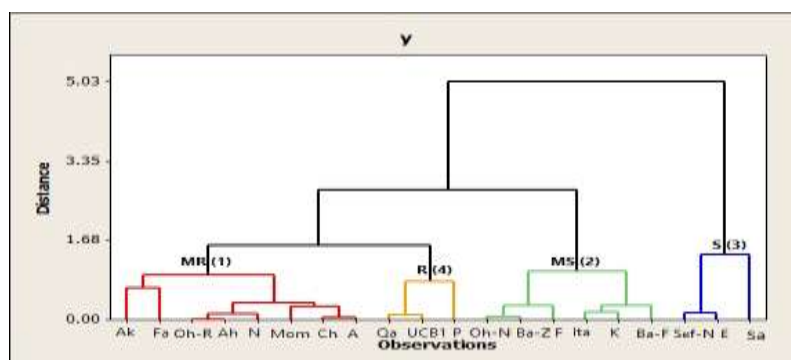
نتایج تجزیه ارتباط فنوتیپی و تنوع ژنوتیپی براساس نشانگرهای مولکولی SCOT

دندروگرام حاصل از ۱۰۵ مکان (شکل ۳)، مطابقت و ارتباط مناسبی را با گروه‌بندی حاصل از صفات فنوتیپی (شکل ۱) نشان نداد.

خوشه‌ای، در فاصله ۱/۶۷ ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را به ۴ گروه تقسیم نمود (شکل ۱). براساس این تقسیم‌بندی گروه ۴ با توجه به بردار میانگین (جدول ۶) با کمترین میزان مرگ‌ومیر و نمره بیماری گروه مقاوم (R) نامیده شد که کمترین تنوع درون گروهی را داشت (جدول ۵) و گروه ۳ با بیشترین میزان مرگ‌ومیر و نمره بیماری و بیشترین تنوع درون گروهی (جدول ۵ و ۶) گروه حساس (S) نامیده شد که تقریباً با نتایج حاصل از مقایسات میانگین صفات (جدول ۳) مطابقت دارد. تعداد ۸ ژنوتیپ در گروه ۱ و ۶ ژنوتیپ در گروه ۲ قرار گرفتند که براساس بردار میانگین (جدول ۶) به ترتیب نیمه مقاوم (MR) و نیمه حساس (MS) نامیده شدند. UCB1 و قزوینی در مطالعات دیگران نیز مقاوم به گموز معرفی شده‌اند (Banihashemi 1995 1998). همچنین رقم سرخس در منابع نیز به عنوان حساس‌ترین رقم نسبت به گموز معرفی شده است (Moradi and Banihashemi 2002)، که با نتایج این پژوهش همخوانی دارد.

نتایج بررسی مولکولی

آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش در کل ۱۲۲ مکان را شناسایی نمودند که ۱۰۵ مکان چندشکل بودند. آغازگر SCOT16 با تکثیر ۱۴ مکان، بیشترین تعداد مکان و آغازگر SCOT7 با تکثیر ۵ مکان کمترین مکان را شناسایی نمودند. آغازگر SCOT36 دارای کمترین میزان شاخص تنوع (۱/۵۲) و آغازگر SCOT16 دارای بیشترین میزان شاخص تنوع (۴/۷۶) بود، که می‌تواند بهتر از بقیه آغازگرهای استفاده شده فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌ها را مشخص کند (شکل ۲). این آغازگر می‌تواند در مطالعات بعدی به عنوان آغازگری مناسب در تشخیص تنوع ژنتیکی پسته مورد استفاده



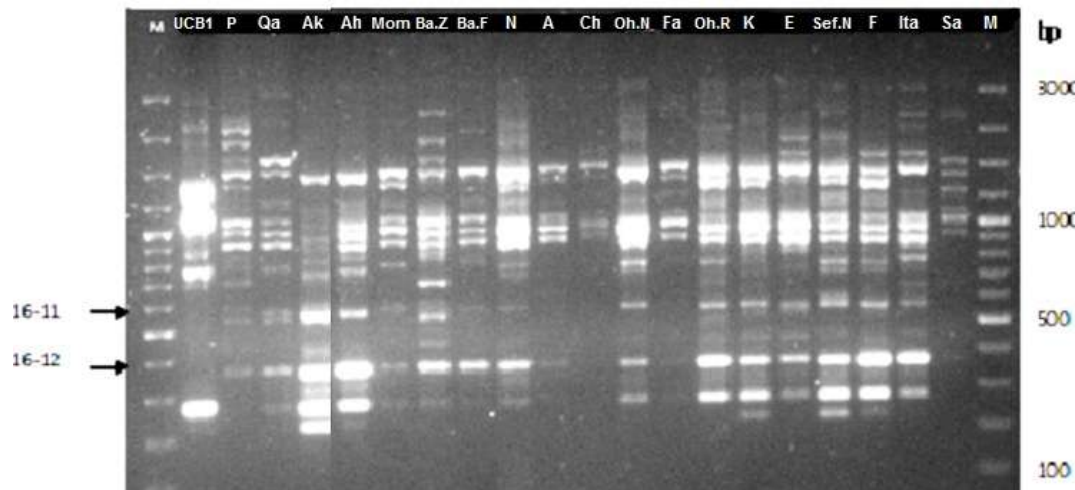
شکل ۱- دندروگرام تجزیه خوشه‌ای ارقام پسته به روش وارد با استفاده از صفات فنوتیپی و فاصله اقلیدسی

جدول ۵- گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای، فاصله از مرکز و مجموع مربعات داخل گروه‌ها.

ارقام و ژنوتیپ‌های داخل هر خوشه	حداکثر فاصله از مرکز	متوسط فاصله از مرکز	مجموع مربعات داخل خوشه	تعداد	خوشه
اکبری، فندوقی، اوحدی رفسنجان، احمدآقایی، ناشناخته (بینام)، ممتاز، چروک و 'A'	۰/۶۶۴۲	۰/۳۰۴۶	۱/۰۰۹۸	۸	۱
اوحدی نوق، بادامی ریز زرنده، ایتالیایی، کله قوچی، بادامی فیض اباد و F	۰/۵۳۰۱	۰/۳۷۳۱	۰/۹۰۳۵	۶	۲
سفید پسته نوق، سرخس و E	۰/۸۷۰۷	۰/۵۸۱۱	۱/۱۴۶۰	۳	۳
قزونی، پاکزاد، UBC1	۰/۴۹۵۲	۰/۳۳۰۱	۰/۳۷۳۴	۳	۴

جدول ۶- بردار میانگین صفات مرگ‌ومیر و نمره بیماری در کلاسترهای مختلف

خوشه ۴	خوشه ۳	خوشه ۲	خوشه ۱	صفت
-۱/۲۱۵۲	۱/۸۴۳۴	۰/۳۱۳۸	-۰/۴۷۰۹	مرگ و میر
-۱/۲۶۰۴	۱/۸۳۲۲	۰/۳۶۸۱	-۰/۴۹۰۵	اسکور بیماری
مقاوم	حساس	نیمه حساس	نیمه مقاوم	وضعیت خوشه



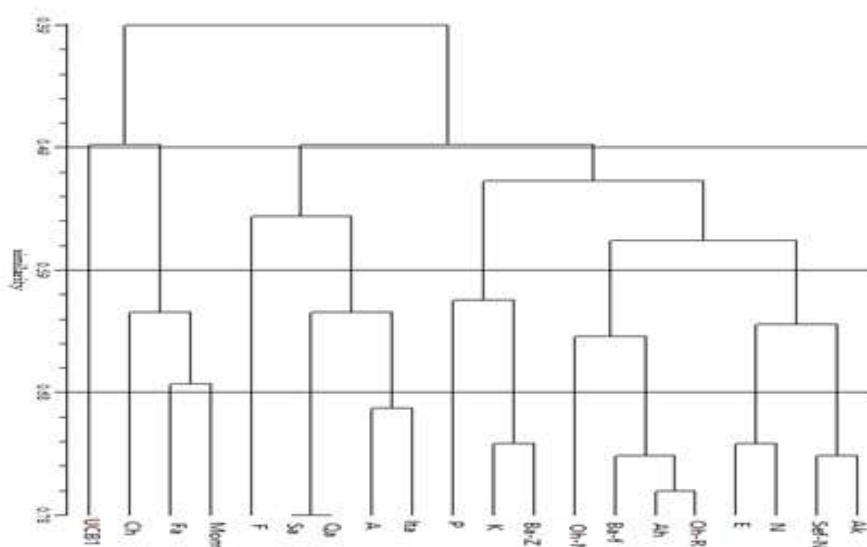
شکل ۲- تصویر ژل مربوط به آغازگر SCOT16 فلش‌ها نشانگرهای مرتبط با مقاومت به گموز را نشان می‌دهند.

جدول ۷- آغازگرهای مورد استفاده، تعداد کل باندهای تولید شده، تعداد مکان چندشکل، شاخص تنوع برای هر آغازگر، متوسط شاخص تنوع و قدرت تفکیک در جایگاه SCOT در نمونه‌های مورد مطالعه

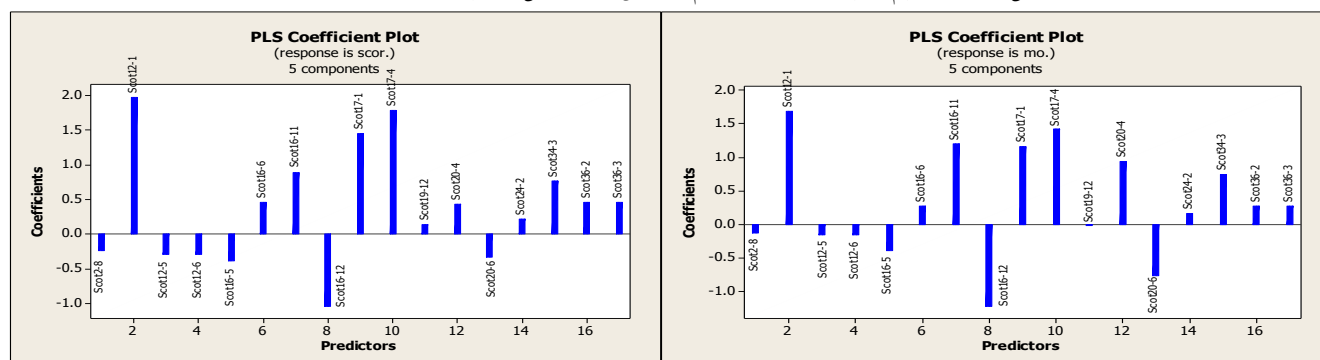
متوسط شاخص تنوع (DI)	شاخص تنوع (Di)	قدرت تفکیک (Rb)	نسبت چند شکلی	مکان‌های چند شکل	متوسط باند در هر مکان	تعداد کل باند	توالی	آغازگر
۰/۴۰	۴/۹	۶/۴	۱	۱۲	۱۰/۶۶	۱۲۸	CAACAATGGCTACCACCC	SCoT2
۰/۴۱	۲/۸۸	۳/۶	۱	۷	۱۲/۸۵	۹۰	CAACAATGGCTACCACCG	SCoT3
۰/۴۱	۲/۰۷	۳/۳	۱	۵	۹/۴	۴۷	CAACAATGGCTACCACGG	SCoT7
۰/۳۲	۳/۸۷	۴/۳	۱	۱۲	۱۱/۷۵	۱۴۱	ACGACATGGCGACCAACG	SCoT12
۰/۳۴	۴/۶۶	۱۰/۲	۱	۱۴	۸/۵	۱۱۹	ACCATGGCTACCACCGAC	SCoT16
۰/۳۸	۲/۷۱	۴/۳	۱	۷	۱۱/۸۵	۸۳	ACCATGGCTACCACCGAG	SCoT17
۰/۳۸	۳/۵۲	۴/۷	۱	۹	۱۰/۶۶	۹۶	ACCATGGCTACCACCGCG	SCoT19
۰/۴۰	۲/۸۵	۲/۴	۱	۷	۸/۵۷	۶۰	ACCATGGCTACCACCGCG	SCoT20
۰/۴۲	۴/۶۷	۷/۳	۱	۱۱	۱۰/۰۹	۱۱۱	ACGACATGGCGACCCACA	SCoT21
۰/۴۳	۳/۸۷	۶/۳	۱	۹	۱۱/۴۴	۱۰۳	CACCATGGCTACCACCAT	SCoT24
۰/۴۵	۲/۷۳	۳/۹	۱	۶	۹/۸۳	۵۹	ACCATGGCTACCACCGCA	SCoT34
۰/۲۵	۱/۵۲	۱/۹	۱	۶	۶/۵	۳۹	GCAACAATGGCTACCACC	SCoT36

داشته باشند (حذف لوکوس‌هایی با ضریب رگرسیون $|b| \leq 0.05$). نتایج مربوط به حذف لوکوس‌ها نشان داده نشده). در نهایت تعداد لوکوس‌ها به ۱۷ لوکوس یا متغیر X کاهش یافت (شکل ۴). در این مرحله، شرایط برای اعمال رگرسیون گام‌به‌گام فراهم شد (Agrama 1996) (۱۷ < ۲۰). با اعمال رگرسیون گام‌به‌گام ۷ نشانگر (لوکوس) وارد مدل مرگ‌ومیر شدند (جدول ۸). در این مرحله تابع نهایی براساس صفت Mo (مرگ‌ومیر) به‌عنوان متغیر وابسته و ۷ لوکوس به‌عنوان متغیرهای مستقل ساخته شد (معادله ۱). سپس همین ۷ مکان به‌عنوان متغیرهای مستقل برای صفت نمره بیماری (Score) نیز در نظر گرفته شد و با دستور Inter یک مدل برای صفت نمره بیماری هم ساخته شد (معادله ۲).

به‌منظور پیدا نمودن لوکوس‌هایی که بتوانند تنوع فنوتیپی مرتبط با عکس‌العمل ارقام به گموز را توجیه نمایند، اقدام به انتخاب لوکوس‌هایی شد که بیشترین ارتباط را با صفات مرگ‌ومیر و نمره بیماری داشته باشند. به‌دلیل اینکه تعداد متغیرهای X (تعداد جایگاه تکثیر) نسبت به تعداد نمونه‌ها خیلی بیشتر بود و اعمال رگرسیون معمولی گام‌به‌گام برای بررسی ارتباط امکان‌پذیر نبود؛ برای کاهش تعداد متغیرهای X، از PLS که تجزیه به مؤلفه‌های اصلی را با رگرسیون ترکیب می‌کند و تعداد متغیرها را به تعداد کمتری به‌عنوان مؤلفه تبدیل نموده و در عین حال مؤلفه‌هایی را انتخاب می‌نماید که بیشترین همبستگی را با متغیر تابع Y داشته باشد، استفاده شد (Abdi 2003; Mevik and Coderkvist 2004). بدین ترتیب که در طی ۴ مرحله لوکوس‌هایی انتخاب شدند، که بیشترین تأثیر را در مؤلفه‌های انتخابی و همچنین پیشگویی Y



شکل ۳- دندروگرام تجزیه خوشه‌ای ۲۰ رقم به روش لینکاژ کامل و ضریب تشابه مقابله ساده.



شکل ۴- انتخاب نهایی ۱۷ لوکوس با بیشترین اثر بر روی صفات مرگ‌ومیر (mo) و نمره بیماری (Score).

جدول ۸- نتایج رگرسیون گام به گام حاصل از روش Stepwise برای صفت مرگومیر (Mo)

مرحله	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷
عدد ثابت	۰/۳۹	-۰/۰۶	-۰/۷۶	-۱/۴	-۲/۲۴	-۲/۳۵	-۲/۵۲
SCoT20-6	-۰/۹۸*	-۰/۹۸*	-۰/۹۱*	-۰/۶۳ ^{ns}	-۰/۴۹ ^{ns}	-۰/۶۴ ^{ns}	-۰/۴۸ ^{ns}
SCoT16-11		۰/۹۱*	۰/۹۱*	۰/۹۱**	۰/۷۳*	۱/۲۹**	۱/۱۸**
SCoT17-4			۰/۸۳*	۱/۰۸*	۰/۹۸*	۱/۱۱**	۰/۹۶**
SCoT17-1				۰/۶۶ ^{ns}	۰/۸۸*	۱/۰۱**	۱/۱۶**
SCoT12-1					۰/۹۴ ^{ns}	۱/۳*	۱/۴۵**
SCoT16-12						-۰/۹۱ ^{ns}	-۱/۱*
SCoT20-4							۰/۷۲*
S	۰/۸۹	۰/۷۷	۰/۷	۰/۶۵	۰/۶۱	۰/۵۵	۰/۴۶
R-Sq	۲۴/۲۹	۴۶/۳۲	۵۷/۹۲	۶۶/۴۶	۷۲/۴۷	۷۹/۱	۸۶/۳۴
R-Sq(adj)	۲۰/۰۹	۴۰/۰۱	۵۰/۰۳	۵۷/۵۲	۶۲/۶۳	۶۹/۴۵	۷۸/۳۸

ns، *، ** به ترتیب عدم معنی دار در سطح ۰/۰۵، معنی دار در سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱

تجزیه می‌کند (Greenacre 1993). در این تجزیه مقدار X^2 متوسط کل جدول توافق یعنی $\frac{X^2}{n}$ بین مؤلفه‌ها براساس درجه اهمیت آن‌ها توزیع می‌شود و سهم هر مؤلفه تعیین می‌شود.

معادله ۱:

$$M0 = -2.25 - 0.48SCoT20 - 6 + 1.18SCoT16 - 11 + 0.96SCoT17 - 4 + 1.16SCoT17 - 1 + 1.45SCoT12 - 1 - 1.1SCoT16 - 12 + 0.72SCoT20 - 4$$

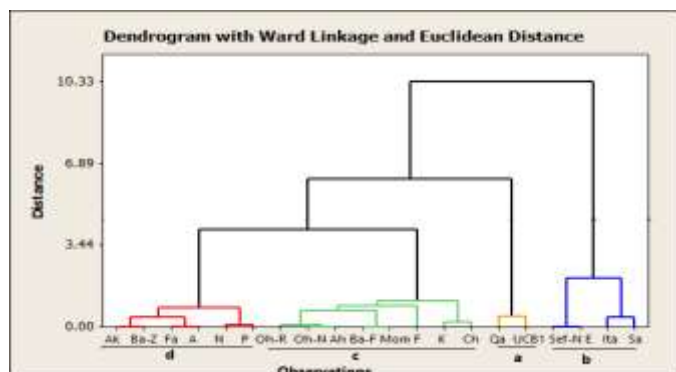
معادله ۲:

$$Score = -3.09 + 1.7 SCoT12 - 1 + 0.9092 SCoT16 - 11 - 0.734 SCoT16 - 12 + 1.35 SCoT17 - 1 + 1.07 SCoT17 - 4 + 0.3625 SCoT20 - 4 - 0.1218 SCoT20 - 6$$

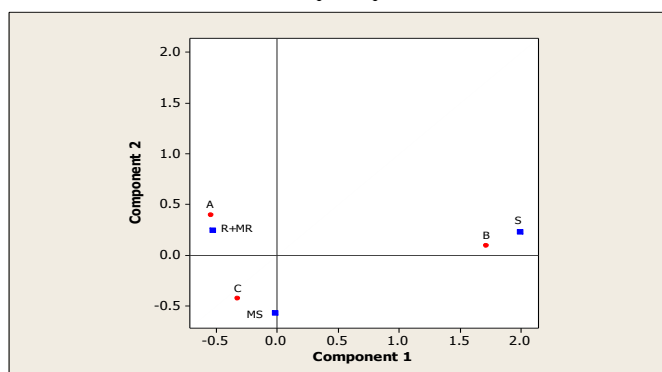
به منظور اثبات ارتباط لوکوس‌ها با مقاومت و یا حساسیت به گموز، مقادیر مرگومیر و نمره بیماری را برای هریک از ارقام یا ژنوتیپ‌ها توسط معادلات ۱ و ۲ برآورد نموده و تجزیه خوشه‌ای فنوتیپی بر اساس مقادیر برآورد شده انجام شد (شکل ۵)، که تشابه زیادی با شکل ۱ دارد. تجزیه خوشه‌ای، ژنوتیپ‌های پسته را به چهار گروه تقسیم نمود. بر اساس این تقسیم‌بندی، خوشه ۴ یا a با کمترین میزان مرگومیر و نمره بیماری به عنوان گروه مقاوم و همچنین ارقام خوشه ۳ یا b با بیشترین میزان مرگومیر و نمره بیماری به عنوان گروه حساس در نظر گرفته شد و خوشه‌های ۱ و ۲ به ترتیب به عنوان گروه‌های نیمه مقاوم (d) و نیمه حساس (c) معرفی شدند (جدول‌های ۹ و ۱۰).

تجزیه ارتباط ساده^۱ رابطه گروه‌بندی دوطرفه (جدول دوطرفه) را به ما نشان می‌دهد. این روش یک جدول توافق را مثل حالت تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) در داده‌های چندمتغیره پیوسته به مؤلفه‌هایی که مربوط می‌شوند به ردیف‌ها و ستون‌هایی که اندازه این ضرایب مانند PCA نشان‌دهنده درجه اهمیت آن‌هاست،

¹ Simple Corresponding analysis

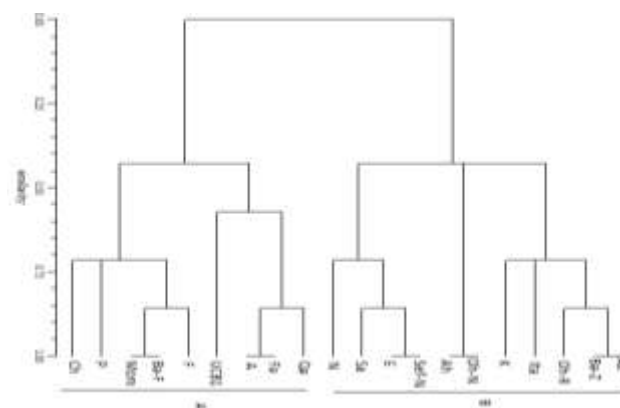


شکل ۵- تجزیه خوشه‌ای براساس مقادیر برآورد شده صفات نمره بیماری و مرگومیر



شکل ۶- توزیع گروه‌های به دست آمده از گروه‌بندی براساس صفات فنوتیپی در گلخانه (S و MS) و گروه‌های حاصل از برآورد صفات فنوتیپی براساس معادلات رگرسیون (A، B و C) در فضای دوبعدی مبتنی بر دو مؤلفه مستخرج از تجزیه ارتباط ساده

روی ردیف ۳ و یا گروه B که گروه حساس‌ها می‌باشد و دارای ضریب ۱/۹۸۷ روی ستون ۲ که گروه حساس‌ها می‌باشد) و مؤلفه دوم، مؤلفه مقاومت (دارای ضریب ۰/۳۸۹ روی ردیف ۱ یا گروه A که گروه مقاوم‌ها می‌باشد و دارای ضریب ۰/۲۴۵ روی ستون ۱ که گروه مقاوم‌ها می‌باشد) نامیده شد و توزیع گروه‌های به‌دست آمده از گروه‌بندی براساس صفات فنوتیپی در گلخانه (R+MR، MS و S) و گروه‌های حاصل از برآورد صفات فنوتیپی براساس معادلات رگرسیون (A، C و B) در فضای دو بعدی مبتنی بر دو مؤلفه مذکور نشان می‌دهد که تطابق و ارتباط بسیار خوبی بین این دو گروه‌بندی وجود دارد (شکل ۶). لذا این ۷ لوکوس می‌توانند به میزان ۸۸/۴ درصد از تنوع فنوتیپی مقاومت و حساسیت به گموز را توجیه نمایند. در ادامه تجزیه ارتباط، تجزیه خوشه‌ای ۲۰ ژنوتیپ پسته با استفاده از ۷ لوکوسی که وارد مدل رگرسیون شدند، انجام شد. رابطه این دندروگرام (شکل ۷) با دندروگرام فنوتیپی (شکل ۱) از طریق تجزیه ارتباط مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۷- گروه‌بندی ارقام پسته براساس ۷ مکان نشانگری اسکات به دو گروه

A و B

مقدار X^2 این جدول (جدول ۱۱) برابر با ۱۷/۶۹۸ است که متوسط X^2 آن (سهم هر مؤلفه) $۱۷/۶۹۸ \div ۲۰ = ۰/۸۸۴۵$ می‌باشد (جدول ۱۲). اولین مؤلفه ۸۴/۵۳ درصد از X^2 کل را توجیه می‌کند و مؤلفه دوم ۱۵/۴۷ درصد (جدول ۱۲). برای بررسی سهم هر یک از ردیف‌ها و ستون‌ها بر روی هر مؤلفه، ضرایب ردیف‌ها و یا ستون‌ها بر روی هر یک از مؤلفه‌ها محاسبه شده است. بر اساس ضرایب به‌دست آمده برای ردیف‌ها (جدول ۱۳) و ستون‌ها (جدول ۱۴) مؤلفه اول، مؤلفه حساسیت (دارای ضریب ۱/۷۱۸

جدول ۹- گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای

رقم و ژنوتیپ	تعداد	خوشه
اکبری، بادامی ریز زرد، فندق، ناشناخته (بینام)، پاکزاد و A	۶	d
اوحدی رفسنجان، اوحدی نوق، احمدآقایی، بادامی فیض آباد، ممتاز، کله قوچی، چروک، A, F,	۸	c
سفید پسته نوق، سرخس، ایتالیایی، E	۴	b
UCB1، قزوینی	۲	a

جدول ۱۰- بردار میانگین صفات مرگومیر و نمره بیماری در خوشه‌های مختلف

خوشه ۴	خوشه ۳	خوشه ۲	خوشه ۱	صفت
-۱/۸۱۹۹	۱/۴۵۹	۰/۱۳۸۸	-۰/۵۵۱۲	مرگ و میر
-۱/۹۰۸۲	۱/۴۹۸۶	۰/۱۱۲۵	-۰/۵۱۳	اسکور بیماری
مقاوم (a)	حساس (b)	نیمه حساس (c)	نیمه مقاوم (d)	وضعیت خوشه

جدول ۱۱- جدول توافقی حاصل از خوشه‌بندی ارقام پسته براساس داده‌های گلخانه و داده‌های برآورد شده توسط رگرسیون

گروه‌بندی	براساس داده‌های فنوتیپی در گلخانه			Total
	R+MR	MS	S	
براساس داده‌های برآورد شده از طریق رگرسیون	A=a+d (R) C=c (MS) B=b (S)	۷ ۴ ۰	۱ ۴ ۳	۸ ۸ ۴
کل	۱۱	۶	۳	۲۰

$$X^2 = 17.698***$$

همبستگی دو گروه‌بندی

$$\phi = \sqrt{\frac{17.698}{20}} = 0.94$$

جدول ۱۲- نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی جدول توافق و سهم هر مؤلفه

مؤلفه	The X^2 justified	درصد از کل	تجمعی X^2
۱	۰/۷۴۷۷	۸۴/۵۳	۰/۸۴۵۳
۲	۰/۱۵۴۷	۱۵/۴۷	۱
کل	۰/۸۸۴۵		

جدول ۱۳- ضرایب ردیف‌ها در هر مؤلفه حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

ردیف	نام	درصد سهم هر ردیف از کل X^2	ضرایب ردیف روی مؤلفه ۱	ضرایب ردیف روی مؤلفه ۲
۱	A	۲۰/۱%	-۰/۵۴	۰/۳۸۹
۲	C	۱۳%	-۰/۳۱۸	-۰/۴۳۲
۳	B	۶۶/۹%	۱/۷۱۸	۰/۰۸۵

جدول ۱۴- ضرایب ستون‌ها در هر مؤلفه حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

ستون	نام	درصد سهم هر ستون از کل X^2	ضرایب ستون روی مؤلفه ۱	ضرایب ستون روی مؤلفه ۲
۱	R+MR	۲۱/۳%	-۰/۵۳۲	۰/۲۴۵
۲	MS	۱۰/۸%	-۰/۰۱۸	-۰/۵۶۵
۳	S	۶۷/۸%	۱/۹۸۷	-۰/۲۳

جدول ۱۵- جدول توافقی حاصل از خوشه‌بندی ارقام پسته براساس داده‌های گلخانه و داده‌های حاصل از ۷ مکان انتخابی

گروه‌بندی	براساس صفات فنوتیپی گلخانه				کل
	S حساس	MS نیمه حساس	MR نیمه مقاوم	R مقاوم	
براساس دندروگرام حاصل از ۷ مکان مارکری SCoT	۰	۱	۴	۳	۸
	۳	۴	۵	۰	۱۲
کل	۳	۵	۹	۳	۲۰
P-value= $\chi^2_{19}/n=۰/۰۴۲^*$					

زرنده، اوحدی رفسنجان، ایتالیایی، کله قوچی، اوحدی نوق، احمدآقایی، سفید پسته نوق، E، سرخس و ناشناخته) می‌باشد (شکل ۸) و این بدین معناست که این دو گروه هیچ‌گونه شباهتی از نظر این ۷ مکان مرتبط با عکس العمل به بیماری گموز ندارند، لذا در نهایت باید گفت ارقام پسته در این مطالعه با توجه به ژنوتیپ‌های موجود در هر گروه به‌طورکلی به دو گروه مقاوم (A) و حساس (B) تبدیل شدند (شکل ۸). براساس معادلات ۱ و ۲ این ۷ نشانگر عبارتند بودند از (SCoT12-1، SCoT16-11، SCoT16-12، SCoT17-1، SCoT17-4، SCoT20-4 و SCoT20-). (6)

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از بررسی فنوتیپی ارقام پسته در عکس العمل به بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه تفاوت‌های معنی‌داری را بین ارقام نشان داد و مشخص شد که مقاوم‌ترین ارقام (وزن خشک بالا، نمره بیماری و درصد مرگومیر پایین) ارقام قزوینی، پاکزاد و

از دندروگرام حاصل از ۷ مکان نشانگر، دو گروه به‌دست آمد که با چهار گروه به‌دست آمده از دندروگرام فنوتیپی، مورد تجزیه X^2 قرار گرفت (جدول ۱۵)، که در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که این ۷ مکان نشانگر، مکان‌هایی هستند که می‌توانند به میزان زیادی تنوع ژنتیکی عکس‌العمل ۲۰ رقم پسته را نسبت به بیماری گموز توجیه نمایند. براساس ماتریس تشابه (جدول ماتریس تشابه نشان داده نشده) و دندروگرام تجزیه خوشه‌ای میزان تشابه بین ۱۰۰٪ برای نزدیک‌ترین ژنوتیپ‌ها (اکبری با بادامی ریز زرنده، اوحدی نوق با احمدآقایی، سفید پسته نوق با E، فندقی با A و بادامی فیض آباد با ممتاز) و صفر برای دورترین ژنوتیپ‌ها (سرخس با UCB1) متغیر بود (شکل ۷). تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های پسته را در تشابه صفر (۰) در دو گروه قرار داد. گروه A شامل ۹ ژنوتیپ (قزوینی، فندقی، A، UCB1، F، بادامی فیض‌آباد، ممتاز، پاکزاد و چروک) می‌باشد و گروه B شامل ۱۱ ژنوتیپ (اکبری، بادامی ریز

معرفی شدند. همان‌طوری که تجزیه به مؤلفه‌های اصلی در تجزیه ارتباط نشان داد اولین مؤلفه که حدود ۸۴ درصد از تنوع عکس‌العمل این ارقام به گموز را بیان نمود، مؤلفه حساسیت بود و تنها ۱۵٪ از تنوع توسط مؤلفه دوم یعنی مؤلفه مقاومت توجیه شد. در هر صورت در این ارقام مورد مطالعه ارقام قزوینی و پاکزاد و پایه UCB1 بیشترین مقاومت را نشان دادند و در اینجا نشانگرهایی معرفی و پیشنهاد شد که با این تنوع مرتبط بوده و می‌توان این نشانگرها را به‌عنوان نشانه‌هایی جهت مطالعه تنوع مقاومت و همچنین حساسیت پسته پیشنهاد و استفاده کرد.

هیبرید UCB1 می‌باشند و حساس‌ترین ارقام (وزن خشک پایین، نمره بیماری و درصد مرگ‌ومیر بالا) سرخس، سفیدپسته نوق و E می‌باشند، که نتایج تجزیه خوشه‌ای نیز ارقام پسته را به ۴ گروه مقاوم، نیمه‌مقاوم، نیمه‌حساس و حساس تقسیم نمود؛ اما باید گفت که این تقسیم‌بندی نسبی است و هیچکدام از ارقام کاملاً مقاوم (فاقد آلودگی به بیماری) نبودند. بعضی از آن‌ها از مقاومت نسبی برخوردار بودند و تعدادی هم حساس معرفی شدند در مطالعات دیگران هم رقم قزوینی و پایه UCB1 مقاوم و ارقام اکبری و احمد آقایی ارقام نیمه مقاوم و سرخس حساس‌ترین

منابع

- Abdi H (2003) Partial least square regression (PLS regression). Encyclopedia for research methods for the social sciences 6:792-795.
- Abrishami MH (1995) Irani pistachio and comprehensive history. Tehran, Iran (In Farsi).
- Ahmadi J, Fabriki-Ourang S, Pour-Aboughadareh A (2019) Evaluation of genetic diversity in Aegilops populations possessing D genome using SCoT and TRAP markers. Modern Genetic Journal 14 :221-230 (In Farsi).
- Agrama, HA (1996) Sequential path analysis of grain yields its component in maize. Plant Breeding 115:343-346.
- Ashkan M, Aboosaeedi D, Banihashemi Z (1997) Investigation of Dispersion of *Phytophthora* Species Affecting Crown and Root Decay of Pistachio Trees in Rafsanjan. Plant diseases 132-133.
- Baghizadeh A, Noroozi SH, Jalili Javaran M (2010) Study on genetic diversity of some Iranian pistachio (*Pistacia vera* L.) cultivars using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Inter Sequence Repeat (ISSR) and Simple Sequence Repeat (SSR) markers. A comparative study. African Biotechnology 9:7632-7640.
- Banihashemi Z (1998) Assessment of Pistachio root stocks to *Phytophthora* spp. The causal agents of pistachio gummosis. Iranian Journal of Plant Pathology 34:63-66 (In Farsi).
- Banihashemi Z, Moradi M (2004) The frequency of isolation of *Phytophthora* spp. from crown and root of pistachio nut tree and reaction of the crown and root to the causal agent. Journal of Plant Pathology 40:57-75 (In Farsi).
- Banihashemi ZN, Kaska AB, Kuden L, Ferguson L, Michailides T (1995) Identification of *Phytophthora* species associated with pistachio gummosis in southern Iran. Acta Horticulture 419:349-352.
- Collard BCY, Mackill DJ (2009) Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. Plant Molecular Biology Reporter 27:86-93.
- Cong Luo, Xin-Hua He, Hu Chen, Shi-Jin Ou, Mei-Ping Gao, (2010). Analysis of diversity and relationships among mango cultivars using Start Codon Targeted (SCoT) markers, Biochemical Systematics and Ecology 38:1176-1184.
- Dhief A, Ferdaws G, Tibra T, Neffati M, Samir A (2011) Natural genetic variation in calligonum tunisian genus analyzed by RAPD markers. African Journal of Biotechnology 10:9766-9778.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantions of fresh leaf tissue. Phytochemical Bullten 19:11-15.
- Erwin DC, Ribeiro OK (1996) Phytophthora diseases worldwide. American Phytopathological Society (APS Press).
- Fanizza G, Lamaj F, Costantini L, Chaabane R, Grando MS (2005) QTL analysis for fruit yield components in table grapevines (*Vitis vinifera*). Theoretical Applied Genetics 111:658-664.
- Gorji AM, Pocza P, Polgar Z, Taller J (2011) Efficiency of arbitrarily amplified dominant markers (SCoT, ISSR and RAPD) for diagnostic fingerprinting in tetraploid potato. American Journal of Potato Research 88:226-237.
- Greenacre MJ (1993) Correspondence Analysis in Practice. Academic Press, Harcourt, Brace and Company.
- Gupta PK, Rustgi S, Kulwal PL (2005) Linkage disequilibrium and association studies in higher plants. Present status and future prospects. Plant Molecular Biology 57:461-485.
- Gupta V, kumar jatav P, Ul haq S, Kumar S, Khurana V, Kothari SL, Kachhwaha S (2019) Translation initiation codon (ATG) or SCoT markers-based polymorphism study within and across various *Capsicum* accessions: insight from their amplification, cross-transferability and genetic diversity. Journal of Genetics 98:1-12

- Javanshah A, Tajabadipour A, Mirzaei S (2007) Identification of a new phenotype (Siah Barg) of pistachio (*Pistacia vera* L.) with shiny-blackish green leaves using RAPD assay. *Agricultural, Biological, and Environmental Statistics* 92:307-310.
- Mehrnejad MR (2010) The parasitoids of the pistachio hull borer moth, *Arimania komaroffi*, short report. *Applied Entomology and Phytopathology* 77:131-133.
- Mevik BH, Cederkvist HR (2004) Mean squared error of prediction (mse_p) estimates for principal component regression (PCR) and partial least squares regression (PLSR). *Journal of Chemometrics* 18:422-429.
- Milbourne D, Meyer R, Bradshaw JF, Baird E, Bonar N, Provan J, Powell W, Waugh R (2010) Comparison of PCR based marker system for the analysis of genetic relationship in cultivated potato. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 10:204-210.
- Mirabolfathy M, Ershad J, Hejaroud GA (1990) Study of pistachio gummosis in Rafsanjan area. *Iranian Journal of Plant Pathology* 26:1-13 (In Farsi).
- Mirzaie S, Rahimi M, Tajabadipour A, Bahar M, Sharif Nabi B (2017) Regression relationship analysis of performance-related traits with RAPD molecular markers in pistachio (*P. vera* L.). *Journal of Horticultural Science* 31:90-98 (In Farsi).
- Moradi M, Banihashemi Z (2002) The relative frequency of *phytophthora* species from the crown and root of the trees in Fars and Kerman provinces and the determination of the crown and root resistance and the common pistachio base. In: *Proceedings of 14th Iranian Plant Protection Congress*. Iran, Isfahan University of Technology (In Farsi).
- Mulpuri S, Muddanuru T, Francis G (2013) Start codon targeted (SCoT) polymorphism in toxic and non-toxic accessions of *Jatropha curcas* L. and development of a codominant SCAR marker. *Plant Science* 207:117-127
- Nikkerdar F, Farshadfar M, Ebrahimi MA, Shirvani H (2018) Genetic Diversity among Fennel (*Foeniculum Vulgare* Mill.) Landrace using Scot Markers. *Journal of Crop Breeding* 24:95-102.
- Noroozi SH, Baghizadeh A, Javaran MJ (2009) The genetic diversity of Iranian pistachio (*Pistacia vera* L.) cultivars revealed by ISSR markers. *Biological Diversity and Conservation* 2:50-56.
- Omidi L, Dashti H, Mozafari V, Tajabadipour A (2010) Effect of foliar and soil application of zinc and copper on some quantitative and qualitative properties of Pistachio trees. *Journal of science and technology of Agriculture and Natural Resources* 52:149-162 (In Farsi).
- Ownley BH, Duffy BK, Weller DM (2003) Identification and manipulation of soil properties to improve the biological control performance of phenazine-producing *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology* 69:3333-3343.
- Prevost A, Wilkinson MJ (1999) A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 98:107-112.
- Rafiezadeh A, Koohidakhkordi M (2017) A review on the use of molecular markers to study genetic diversity in Pistachios. *National Conference scientific approach in industry green gold, pistachio*. Iran, Islamic Azad University of Damghan (In Farsi).
- Shaygan N, etminan A, majidi hervan E, azizinezhad R, mohammadi R. (2021) Evaluation of molecular diversity in breeding lines of durum wheat using SCoT markers. *Modern Genetic Journal*. 16:151-160 (In Farsi).
- Zarei A, Erfani-Moghadam J (2021) SCoT markers provide insight into the genetic diversity, population structure and phylogenetic relationships among three *Pistacia* species of Iran. *Genet Resour Crop Evol* 68:625-1643.