مجله پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد شانزدهم، شماره چهارم، ۱۳۸۸
www.gau.ac.ir/journals

بررسی تنوع ژنتیکی برخی توده‌های گردوی بومی استان گلستان با استفاده از نشانگر مولکولی ریزماهواره

*عبدا... احتشام‌نیا[۱]، مهدی شریفانی[۲]، کورش وحدتی[۳] و وحید عرفانی‌مقدم[۴]

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۲]استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۳]استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه تهران، پردیس ابوریحان، [۴]مربی گروه علوم باغبانی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۸۷/۲/۱٤ تاریخ پذیرش: ۸۸/۱/۲۵

چکیده

قبل از انجام هر کار اصلاحی شناخت تنوع ژنتیکی و پتانسیل ژنتیکی هر گونه گیاهی امری لازم و ضروری است و وجود تنوع ژنتیکی در کارهای اصلاحی به‌عنوان یک برتری تلقی می‌شود. برای بررسی تنوع ژنتیکی در ۹٦ ژنوتیپ از ۵ توده طبیعی گردوی ایرانی از ۱۱ مکان ژنی ریزماهواره استفاده شد. سیستم مارکر در مجموع توانست ۷۷ آلل را با اندازه‌ای بین ۲۷۵-۱۷٦ جفت باز شناسایی کنند. کم‌ترین و بیش‌ترین تعداد آلل مشاهده شده به‌ترتیب مربوط به مکان ژنی WGA۰۲۷ (۲ آلل) و مکان ژنی WGA۲۰۲ (۱۱ آلل) بود. میانگین تعداد آلل‌ها برای ۱۱ مکان ژنی، ۷ آلل بود. میانگین تعداد آلل‌ها برای ۱۱ مکان ژنی، ۷ آلل، و تعداد آلل‌های مؤثر در مکان‌های ژنی از ۱/۵۷ تا ۵/۳۲ متفاوت بود و میانگین تعداد آلل‌های مؤثر به ازای هر مکان ژنی ۳/۷۷ آلل گردید. به‌طورکلی روند افزایش یابنده تعداد آلل مربوط به شاخص اطلاعاتی شانون بود. این مورد برای جوامع گالیکش و کلاله مشاهده گردید. این جوامع بیش‌ترین مقدار تنوع را در درون خود دارا بودند بر خلاف دو جامعه ذکر شده توده کردکوی با کم‌ترین تعداد آلل، کم‌ترین شاخص اطلاعاتی شانون و کم‌ترین تنوع را در بین توده‌های انتخابی داشت. بیش‌ترین فاصله ژنتیکی بین توده‌های کردکوی و افراتخته (۰/۳۰) بود.

* مسئول مکاتبه: ab.ehteshamnia@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

کم‌ترین فاصله ژنتیکی بین توده‌های گالیکش و چشمه‌جوزی (۰/۱۲) بود. دسته‌بندی توده‌ها با استفاده از داده‌های مولکولی با دسته‌بندی آنها براساس موقعیت جغرافیایی انطباق پیدا نکرد.

واژه‌های کلیدی: گردو، *Juglans regia L.*، تنوع ژنتیکی، نشانگر ریزماهواره

مقدمه

شناسایی، حفاظت و استفاده از منابع ژنتیکی به‌عنوان یکی از ارزشمندترین ثروت‌های ملی هر کشور از اهمیت خاصی برخوردار است. گردوی ایرانی یکی از منابع ارزشمند گیاهی جهان و به‌ویژه ایران است، چرا که ایران با در برگیری بخش زیادی از ناحیه آسیای میانه به‌عنوان مرکز تنوع و پیدایش بسیاری از گونه‌های زراعی- باغی به‌ویژه گونه گردوی ایرانی، صاحب امتیاز خاصی در این زمینه می‌باشد (فورد، ۱۹۷۵). براساس آمار سازمان خواروبار کشاورزی جهانی (فائو)[1]، سطح زیر کشت گردو در جهان (۲۰۰۵)، ٦٥٠ هزار هکتار و تولید جهانی آن معادل ١٤٧٠ هزار تن بوده است. متوسط جهانی میزان محصول گردو در همین سال ۲/۲ تن در هکتار و متوسط تولید کشورهای چین، آمریکا و ایران به‌ترتیب ۳/۲، ۲/۸ و ۱/۸ تن در هکتار گزارش شده است. یکی از اهداف مهم در اصلاح گردو رسیدن به عملکرد منظم همراه با کیفیت بالا جهت رقابت در بازارهای جهانی می‌باشد. دست‌یابی به این هدف مستلزم استفاده از تنوع ژنتیکی ذخایر توارثی جهت شناسایی و معرفی ارقام و ژنوتیپ‌های برتر گردو است که این موضوع اولین گام در هر برنامه مرتبط با حفاظت و توسعه پایدار کشت گونه‌های گیاهی است. پتانسیل تکامل هر گیاه وابسته به وجود تنوع ژنتیکی به‌خصوص در سطح درون گونه‌ای است. قبل از انجام هر نوع کار اصلاحی شناخت تنوع ژنتیکی و پتانسیل ژنتیکی هر گونه گیاهی امری لازم و ضروری است و در کل وجود تنوع ژنتیکی در کارهای اصلاحی به‌عنوان یک برتری تلقی می‌شود (قنادها و همکاران، ۲۰۰۳). وحدتی (۲۰۰۱) به نقل از لسلی و مک‌گراناهان خاطرنشان کرد که ژنوتیپ‌های وحشی گردو در جنگل‌های شمال ایران و کپه‌داغ وجود دارد که احتمالاً منشاء اصلی گردو از این مناطق است. توده‌های پراکنده گردو در جنگل‌های شمال کشور، احتمالاً باقی‌مانده توده‌های اولیه این‌گونه هستند که روشن نمودن این موضوع اهمیت زیادی در مدیریت منابع ژنتیکی آن دارد. همچنین بررسی ویژگی‌های

1. Food and Agriculture Organization, FAO

Archive of SID

www.SID.ir

مورفولوژیکی و ژنتیکی درختان جنگلی گردو در کشورمان به‌عنوان مطالعه پایه‌ای برای شناسایی منابع ژنتیکی بومی گردوی ایرانی و مدیریت و حفاظت آنها برای استفاده در برنامه‌های اصلاحی این محصول بسیار دارای اهمیت می‌باشد (جعفری‌صیادی، ۲۰۰٦). در همین رابطه، احتشام‌نیا و همکاران (۲۰۰۹) به بررسی تنوع مورفولوژیکی توده‌های گردوی بومی استان گلستان پرداختند و ۹٦ درخت از ۵ توده گردو در ارتفاعات و مناطق جنگلی مختلف شناسایی و ارتباط بین برخی صفات کمی گردو را با ارتفاع از سطح دریا مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج این بررسی‌ها نشان داد که توده‌های گردوی بومی استان گلستان تنوع بالایی از نظر صفات مورفولوژیکی دارند. یکی از راه‌های بررسی تنوع ژنتیکی بین توده‌های گردوی ایرانی استفاده از نشانگرهای مولکولی است و در بین نشانگرهای مولکولی ریزماهواره‌ها به‌دلیل توانمندی‌های ویژه‌ای که در شناسایی تنوع ژنتیکی ارقام و گونه‌های مختلف درختان میوه دارند از کارآیی بالایی برخوردارند.

وسته و همکاران (۲۰۰۲) تعداد ۳۰ نشانگر هسته‌ای ریزماهواره را در گردوی سیاه شناسایی کردند و از آن‌ها برای مطالعات ژنتیک توده، نقشه‌های ژنومی و تعیین ژنوتیپ هم‌گروه‌ها براساس DNA، مطالعات جریان ژنی و اصلاح درختان استفاده کردند. پوله‌جیونی و همکاران (۲۰۰٤) از نشانگرهای مولکولی هم‌بارز ریزماهواره و نشانگرهای بارز RAPD و ISSR برای شناسایی گونه‌ها و هیبریدهای درون گونه‌ای جنس ژوگلانس استفاده کردند. در مجموع ۱۳ آغازگر ISSR، ۱۷ آغازگر RAPD و ۱۰ جفت آغازگر ریزماهواره توسعه یافته از *J. nigra* قادر به تکثیر محصولات PCR در گونه‌ها و هیبریدهای بین گونه‌ای شدند. این نشانگرها به‌ترتیب ۱٦۲، ۱۸۸ و ۱۱۳ باند ایجاد کردند و کل نمونه‌ها را به سه گروه: ۸۱ ژنوتیپ *Juglans nigra*، ٤۹ ژنوتیپ *Juglans regia* و ۸ ژنوتیپ هیبرید بین گونه‌ای تقسیم نمودند.

فورونی و همکاران (۲۰۰۵) از نشانگرهای ریزماهواره برای شناسایی گردوی ایرانی و ارزیابی همبستگی ژنتیکی بین ارقام و بیوتیپ گردوی سورنتو استفاده کردند. در این مطالعه با استفاده از ۲۳ جفت نشانگر ریزماهواره ۱۰ دانهال سورنتو و ٦ هم‌گروه پیوندی سورنتو با ٦ رقم گردو مورد مقایسه قرار گرفتند و در ٦ جفت از ۲۳ جفت آغازگر مورد مطالعه ۳۳ آلل را شناسایی کردند. تعداد آلل‌ها در مکان‌های ژنی از ۳ تا ۷ آلل (میانگین ۵/۵ آلل) و اندازه باندها ۱۲٦–۱۲۰ جفت باز بود. ۲ جایگاه ژنی WGA005 و WGA027 جایگاه‌های بسیار مفیدی در تمایز واریته‌های گردو بودند. دانگل و

Archive of SID

www.SID.ir

همکاران (٢٠٠٥) ابتدا از ١٤٧ جفت آغازگر برای تکثیر ریزماهواره‌ها استفاده کردند که ٦٦ جفت آغازگر تکثیر شدند و ١٤ مکان ژنی برتر را برای آنالیز یک گروه متنوع از نمایه‌های[1] گردوی ایرانی، مشتمل بر تعدادی ارقام و سلکسیون‌های برنامه‌های اصلاحی دانشگاه کالیفرنیا، دیویس و یک پایه هیبرید *J. hindsii* × *J. regia* انتخاب کردند. ویکتوری و همکاران (٢٠٠٦) همانندی ژنتیکی را در ریزماهواره‌های هسته‌ای گردوی سیاه مورد بررسی قرار دادند و ساختار توده و سطوح تنوع ژنتیکی گردوی سیاه را تخمین زدند. هتروزیگوسیتی مکان‌های ژنی چندگانه ٠/٨٠٧ و میانگین تعداد آلل در هر مکان ژنی ٢٢/٩ بود که بیانگر تنوع ژنتیکی بالای گردوی سیاه در این منطقه بود. در مطالعه فورونی و همکاران (٢٠٠٦) از ٩ نشانگر ریزماهواره برای شناسایی ٤ رقم گردوی اروپایی شامل ارقام فرانکت، مالیزیا، بلجینیا و پاریزین و ٢ رقم آمریکایی هارتلی و سر استفاده شد. نشانگرهای به‌کار رفته ٤٣ آلل مؤثر را شناسایی کردند و تعداد آلل‌های مؤثر در هر مکان ژنی ٨-٤ آلل با اندازه‌های ٢٩٦-١٣٠ جفت باز بودند. در تحقیقی دیگر فورونی و همکاران (٢٠٠٧) که از ١٢ نشانگر ریزماهواره برای شناسایی ٤٨ ژنوتیپ گردوی ایرانی استفاده کردند، توده‌های مورد مطالعه ١٦ گردوی سورنتوی پرورش یافته در کاسرتا (١٠ گیاه بذری و ٦ گیاه پیوندی) و ٢٦ کلون پیوندی در شبه‌جزیره سورنتو بودند. تمامی آغازگرها صد درصد چندشکلی نشان دادند و توانستند ٨-٣ آلل را به‌ازای هر مکان ژنی شناسایی کنند. در این مطالعه بهترین و مفیدترین آغازگرها را WGA009 و WGA071 و تعداد کل آلل‌ها را ٦٦ عدد گزارش کردند. در این مطالعه بیش‌ترین محتوای اطلاعات چندشکلی مربوط به مکان ژنی WGA05 و معادل ٠/٧١٧ بود. کریمی (٢٠٠٧) به بررسی تنوع ژنتیکی ٤٧ ژنوتیپ از ٧ توده طبیعی گردوی غرب کشور پرداخت و با استفاده از ١١ مکان ژنی ریزماهواره، در مجموع ٥٤ آلل را شناسایی نمود. سه مکان ژنی WGA276، WGA32 و WGA009 بیش‌ترین محتوای اطلاعات چندشکلی را به خود اختصاص دادند. بیش‌ترین میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده و محتوای اطلاعات چندشکلی درون توده‌ها مربوط به توده لرستان و به‌ترتیب معادل ٠/٩٨٤ و ٠/٦٤٩ بوده و کمترین میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده مربوط به توده کردستان و معادل ٠/٨٤٠٦ بود. همچنین تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ‌های مورد بررسی کاملاً از تنوع جغرافیایی تبعیت می‌کرد. محسنی (٢٠٠٧)، با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره و مورفولوژیکی به بررسی تنوع ژنتیکی ٦٦ ژنوتیپ گردوی استان

1. Accessions

Archive of SID

www.SID.ir

کرمان پرداخت. میانگین هموزیگوتی مشاهده شده برای ۱۷ مکان ژنی ریزماهواره برابر ۰/۷۷ بود. محتوای چندشکلی در تمام جایگاه‌ها بالای ۰/۵ بود و بیش‌ترین این مقدار را جایگاه‌های WGA118 و WGA071 داشتند (به‌ترتیب ۰/۸۲ و ۰/۸۱). میانگین تعداد آلل در کل جایگاه‌ها ۸/٦٥ بود. نتایج تقسیم‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از داده‌های مولکولی با دسته‌بندی آنها براساس موقعیت جغرافیایی به نسبت متفاوت بود. بین فاصله جغرافیایی و ژنتیکی توده‌ها نیز همبستگی مشاهده نشد.

در بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از داده‌های ملکولی بهترین حالت این است که نشانگرهای مولکولی از کروموزوم‌های مختلف انتخاب شده باشند و توزیع مناسب و یکنواخت در ژنوم داشته باشند. در این‌صورت همبستگی یا پیوستگی بین آنها کم خواهد بود و به مؤلفه‌های بیشتری برای توجیه تغییرات کل آنها نیاز است (محمدی و پراسانا، ۲۰۰۳).

این پژوهش به‌عنوان اولین بررسی در جهت شناسایی ژنتیکی گردوهای بومی استان گلستان دارای اهمیت می‌باشد. با توجه به توانمندی‌های ویژه نشانگرهای مولکولی ریزماهواره‌ها در شناسایی تنوع ژنتیکی ارقام و گونه‌های مختلف درختان میوه و همچنین اهمیت جنگل‌های گردوی استان گلستان به‌عنوان بخش مهمی از شمال کشور و ژرم‌پلاسم غنی گردو و با هدف شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین روابط خویشاوندی توده‌های گردوی ایرانی بومی بخشی از شمال کشور این پژوهش صورت گرفت تا در صورت اثبات وجود تنوع ژنتیکی کافی از نتایج آن در برنامه‌های اصلاحی آینده گردو در استان استفاده قرار شود.

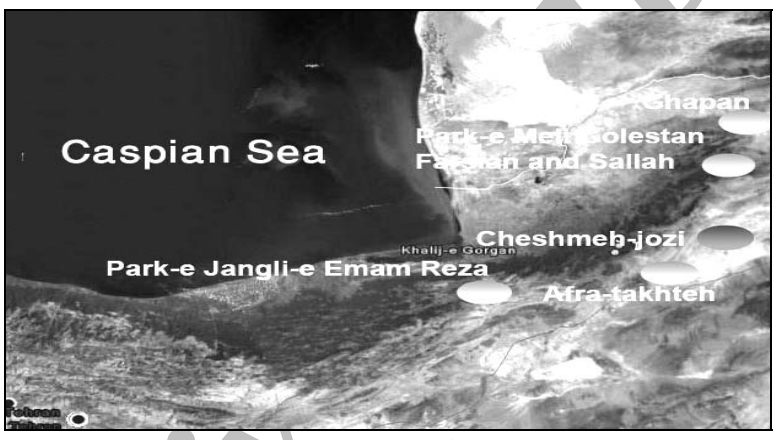
مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال‌های ۸۷-۸۵ و در دو مرحله عملیات صحرایی شامل نمونه‌برداری از برگ‌های تازه سرشاخه‌های جوان درختان جنگلی گردو مناطق مختلف استان گلستان و کارهای آزمایشگاهی شامل استخراج DNA، PCR و الکتروفورز و غیره در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. برای تعیین مناطق، در مراجعه به اداره کل منابع طبیعی استان گلستان، متأسفانه اطلاعات تدوین شده و سازمان یافته‌ای در مورد گردوهای جنگلی استان در دسترس نبود. انتخاب مناطق، براساس اطلاعات ارایه شده توسط جعفری‌صیادی (۲۰۰٦)، کارشناسان منابع طبیعی و افراد محلی در هر منطقه صورت پذیرفت. پراکنش متفاوتی از نظر توده‌های وحشی گردو در استان گلستان وجود دارد، به‌طوری‌که در برخی از شهرستان‌های استان نظیر شهرستان بندرترکمن، بندرگز

Archive of SID

www.SID.ir

و... اقلیم مناسب گردو نیست و تراکم گردو در آن مناطق عملاً صفر می‌باشد. بنابراین بسته به تراکم گردو در جنگل‌های استان و میزان دسترسی به آنها مناطق مورد نظر مشخص گردید و مناطق طوری انتخاب شدند که تمام استان را پوشش دهند. با هماهنگی‌های مسئول جنگل‌داری اداره کل منابع‌طبیعی استان، با اداره منابع‌طبیعی شهرستان‌ها در طول دوره نمونه‌برداری، در هر مرتبه به‌همراه قرقبان منطقه نمونه‌برداری در حوزه مربوطه انجام شد. در مجموع ٥ توده گردوی بومی از ارتفاعات مختلف جنگل‌های استان انتخاب گردید (شکل ١).



شکل ١- نقشه پراکنش ٥ توده گردوی انتخابی در این پژوهش در سال ١٣٨٦.

برای تعیین توده‌ها، درختانی که حداکثر ١٥ کیلومتر با هم فاصله داشتند به‌عنوان یک توده در نظر گرفته شده و درختان به‌طور تصادفی برای نمونه‌برداری انتخاب شدند (مال‌ولتی و همکاران، ١٩٩٣). بسته به تراکم درختان در هر منطقه، در هر توده ١٢ تا ٢٤ درخت، و در مجموع از کل ٥ توده، ٩٦ درخت انتخاب و درختان پلاک‌کوبی و کروکی تک‌تک درختان در هر منطقه تهیه گردید. مناطق انتخابی شامل کردکوی (پارک جنگلی امام رضا) ١٢ نمونه، علی‌آباد (شامل ٢ توده جنگل افراتخته و جنگل چشمه‌جوزی) هر کدام ٢٠ نمونه، کلاله (جنگل‌های قپان) ٢٠ نمونه و گالیکش (جنگل‌های فارسیان، صلاح و پارک ملی گلستان) ٢٤ نمونه بودند (جدول ١). برای اختصار از این پس نام شهرستان که نمونه‌برداری در آنجا صورت گرفته به‌جای مناطق آورده می‌شود، جز در مورد علی‌آباد که نام دو منطقه نمونه‌برداری شده افراتخته و چشمه‌جوزی ذکر می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- مشخصات توده‌های جنگلی نمونه‌برداری شده در استان گلستان.

مشخصات / توده	شماره نمونه	عرض‌جغرافیایی	طول‌جغرافیایی	دامنه ارتفاع (متر)
گالیکش	۱-۲٤	۳۷° ۱٤′ شمالی	٤۷′ ٥٥° شرقی	٦۰۰-۹۰۰
چشمه‌جوزی	۲٥-٤٤	۳٦° ٥۰′ شمالی	۷′ ٥٥° شرقی	۱۰۰۰-۱٤۰۰
افراتخته	٤٥-٦٤	۳٦° ٥۷′ شمالی	٥٦′ ٥٥° شرقی	۱٤۰۰-۱۷۰۰
کردکوی	٦٥-۷٦	۳٦° ٥۲′ شمالی	٦′ ٥٤° شرقی	۱٥۰-۳٥۰
کلاله	۷۷-۹٦	۳۷° ۳۱′ شمالی	٤۹′ ٥٥° شرقی	۷۰۰-۱۰۰۰

جهت استخراج DNA، نمونه‌برداری برگ از سرشاخه‌های جوان درختان انتخابی بسته به منطقه در ماه‌های فروردین و اردیبهشت ۱۳۸٦، انجام گرفت. از هر درخت ۸-٦ برگ تازه جمع‌آوری و در پاکت مربوط به هر نمونه و در بین لایه‌های یخ خشک قرار داده شد و پس از اتمام جمع‌آوری نمونه از تمامی درختان موردنظر در هر منطقه، برای استخراج DNA به آزمایشگاه انتقال داده شدند. لازم به ذکر است که از قبل اطلاعات کامل نمونه روی پاکت نوشته، و علاوه‌بر آن درون هر پاکت نیز اتیکت مربوط به هر نمونه قرار داده شد. پس از جمع‌آوری و انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، برگ‌ها تا مرحله استخراج DNA در فریزر و دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج DNA با تغییراتی نسبت به روش دویل و دویل[1] (۱۹۸۷) انجام گرفت. در این پژوهش ۱۱ جفت آغازگر ریزماهواره مورد استفاده قرار گرفت که مشخصات آنها در جدول ۲ آورده شده است. این آغازگرها براساس بررسی‌های قبلی انجام شده توسط ویستی و همکاران (۲۰۰۲) و دانگل و همکاران (۲۰۰٥) انتخاب شدند. آغازگرها توسط شرکت آلمانی متابیون ساخته شده‌اند.

بهینه‌سازی شرایط و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): دمای اتصال مناسب برای هر جفت آغازگر ریزماهواره با استفاده از واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز در شیب حرارتی تعیین گردید (جدول ۲). واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۱۰ میکرولیتر انجام شد که ترکیب و مقدار مواد واکنش PCR به شرح جدول ۳ می‌باشد. به‌جز آغازگرها، و آنزیم تک پلی‌مراز (سیناژن)، سایر مواد از شرکت فرمنتاز تهیه شدند. واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز با کمی تغییرات نسبت به روش دانگل و همکاران (۲۰۰٥) انجام شد. تکثیر با دستگاه ترموسایکلر بایوراد انجام شده که برنامه تکثیر در جدول ٤ آمده است.

1. Doyel and Doyel

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این بررسی. پرایمرهای مشخص شده با شماره ۱ از دانگل و همکاران (۲۰۰۵) و شماره ۲ از ویستی و همکاران (۲۰۰۲).

مکان ژنی		توالی آغازگرها	دمای بهینه اتصال (درجه سانتی‌گراد)	منبع
WGA۰۰۱	F	ATTGGAAGGGAAGGGAAATG	۵۸	۱
	R	CGCGCACATACGTAAATCAC		
WGA۰۰٤	F	TGTTGCATTGACCCACTTGT	۵۷	۱
	R	TAAGCCAACATGGTATGCCA		
WGA۰۰۹	F	CATCAAAGCAAGCAATGGG	۵۷	۱
	R	CCATTGCTCTGTGATTGGG		
WGA۰۸۹	F	ACCCATCTTTCACGTGTGTG	۵۹	۱
	R	TGCCTAATTAGCAATTTCCA		
WGA۱۱۸	F	TGTGCTCTGATCTGCCTCC	۵۹	۱
	R	GGGTGGGTGAAAAGTAGCAA		
WGA۲۰۲	F	CCCATCTACCGTTGCACTTT	٦۰	۱
	R	GCTGGTGGTTCTATCATGGG		
WGA۲۷٦	F	CTCACTTTCTCGGCTCTTCC	٦۰	۱
	R	GGTCTTATGTGGGCAGTCGT		
WGA۳۳۲	F	ACGTCGTTCTGCACTCCTCT	۵۷	۱
	R	GCCACAGGAACGAGTGCT		
WGA۳٤۹	F	GTGGCGAAAGTTTATTTTTTGC	۵۹	۱
	R	ACAAATGCACAGCAGCAAAC		
WGA۰۲۷	F	AACCCTACAACGCCTTGATG	۵۹	۲
	R	TGCTCAGGCTCCACTTCC		
WGA۰۷۱	F	ACCCGAGAGATTTCTGGGAT	۵۹	۲
	R	GGACCCAGCTCCTCTTCTCT		

جدول ۳- ترکیب، میزان و غلظت مواد مورد نیاز PCR.

مواد استفاده شده در واکنش PCR	مقدار مورد نیاز (میکرولیتر)	غلظت نهایی
آب دوبار تقطیر	٤/۹۵	---
(۱۰X) بافر واکنش	۱	۱X
(۲/۵mM) دأکسی‌نوکلئوتیدها	۱/۵	۰/۲mM
(۵۰mM) کلرید منیزیم	۰/۳	۲mM
(۵۰ ng/µl) آغازگر پیشرو	۰/٦	۵۰ng
(۵۰ ng/µl) آغازگر پسرو	۰/٦	۵۰ng
DNA(٦۰ ng/µl)	۱	٦۰ng
(۵Unit/µl) تک پلیمراز	۰/۰۵	۰/۲۵Unit

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ٤- شرایط دمایی و زمانی PCR.

مرحله	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان	تعداد چرخه
واسرشته سازی اولیه	٩٤	٥ دقیقه	---
واسرشته سازی	٩٤	١ دقیقه	٣٥ چرخه
اتصال آغازگرها	بسته به توالی پرایمر*	٢٠ ثانیه	
بسط آغازگرها	٧٢	٢٠ ثانیه	
بسط نهائی آغازگرها	٧٢	٦ دقیقه	---
پایان برنامه	٤	---	---

* دماهای بهینه اتصال برای هر پرایمر در جدول ٢ آمده است.

الکتروفورز: الکتروفورز با استفاده از دستگاه ژل اسکن ٢٠٠٠[1] انجام شد. ابعاد ژل ١٨×٣٢ سانتی‌متر و ضخامت ٠/٢ میلی‌متر بود. برای تهیه ٢٥ سی‌سی ژل اکریل‌آمید ٥ درصد، در بافر TBE به این‌صورت عمل شد: ٣ میلی‌لیتر محلول اکریلامید ٤٠ درصد و ٣/٦ میلی‌لیتر بافر TBE مخلوط و سپس با آب دوبار تقطیر به حجم ٢٥ سی‌سی رسانیده شد. بعد از به حجم رساندن، محلول صاف و عاری از هوا گردید. برای تهیه محلول ذخیره اکریل‌آمید ٤٠ درصد، ٣٨ گرم اکریل‌آمید و ٢ گرم بیس اکریل‌آمید همراه با مقداری آب دو بار تقطیر توسط مگنت به‌هم زده شد. برای انحلال راحت‌تر اکریل‌آمید باید آن را کمی گرم کرد و سپس حجم محلول را به ١٠٠ میلی‌لیتر رساند. این محلول را می‌توان دور از نور و در یخچال نگهداری نمود. پس از بارگذاری شیشه‌ها در دستگاه الکتروفورز، تانک بالایی با ٢٥٠ میلی‌لیتر و تانک پایینی با ٢٥٠ میلی‌لیتر بافر TBE شامل ٥٤ گرم تریس‌بیس، ٢٧/٥ گرم اسید بوریک و ٢٠ میلی‌لیتر EDTA پر شد. به تانک پایینی ٨ میکرولیتر اتیدیوم بروماید رقیق شده به نسبت ٥ میکروگرم اتیدیوم بروماید خالص در ١ میلی‌لیتر آب مقطر خالص اضافه گردید. قبل از بارگذاری نمونه‌ها، دستگاه به‌مدت ٢٠ دقیقه با ولتاژ ١٢٠٠ ولت گرم شد. سپس به کمک یک سمپلر چاهک‌ها شسته و شانه به‌دقت گذاشته شد و با سمپلر دیگر در هر چاهک ٢ میکرولیتر نمونه بارگذاری گردید. سپس به‌مدت ٢٠ ثانیه پالس‌ران انجام گردید که پالس‌ران سبب افزایش وضوح تصویر باندها و از بین بردن رنگ اضافی نمونه‌ها می‌شود و بعد از بررسی ولتاژ و دما، الکتروفورز نمونه‌ها در ٦٠ وات و ١٢٠٠ ولت انجام و بعد از ٥٠ دقیقه باندها روی مانیتور متصل به دستگاه مشاهده و تصویر ذخیره و بلافاصله نمونه بعدی روی همان ژل بارگذاری گردید.

1. Gel-Scan 2000, Corbett Research (Australia)

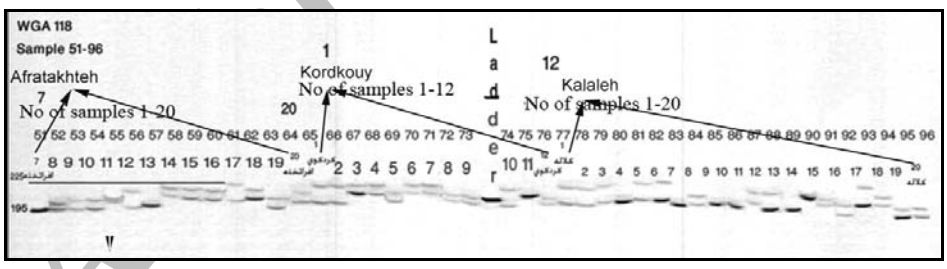
Archive of SID

www.SID.ir

از نرم‌افزار Pop Gene برای تجزیه و تحلیل پارامترهای مربوط به توده، مانند محتوای اطلاعات چندشکلی، هموزیگوسیتی و هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده، فاصله ژنتیکی توده‌ها و رسم دندروگرام توده‌ها برحسب ضریب تشابه نی استفاده شد. از نرم‌افزار NTSYS برای رسم دندروگرام ژنوتیپ‌ها براساس ضریب تشابه نی و روش گروه‌های غیروزنی جفت شده و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی استفاده گردید. از برنامه SPSS (٢٠٠٢) نیز برای رسم نمودار پراکنش آلل‌ها و ژنوتیپ‌های مورد بررسی استفاده شد.

نتایج و بحث

برای بررسی تنوع ژنتیکی در ٩٦ ژنوتیپ از ٥ توده طبیعی گردوی ایرانی از ١١ مکان ژنی استفاده شد که در مجموع توانستند ٧٧ آلل را با اندازه‌ای بین ٢٧٥-١٧٦ جفت باز شناسایی کنند. از این ١١ مکان ژنی یکی ٢ آلل، یکی ٥ آلل، سه تا ٦ آلل، دو تا ٧ آلل، یکی ٨ آلل، یکی ٩ آلل، یکی ١٠ آلل و بالاخره یکی ١١ آلل را تکثیر و تشخیص دادند (جدول ٥). در شکل ٢ چندشکلی مشاهده شده در جایگاه WGA١١٨ ارایه شده است. کمترین تعداد آلل مشاهده شده مربوط به مکان ژنی WGA٠٢٧ (٢ آلل) بود و بیش‌ترین تعداد آلل مشاهده شده را مکان ژنی WGA٢٠٢ (١١ آلل) داشت. میانگین تعداد آلل‌ها برای ١١ مکان ژنی، ٧ آلل بود.



شکل ٢- الگوی الکتروفورز آکریلامید ٥ درصد قطعات ریزماهواره در مکان ژنی WGA118.

تعداد آلل‌های به‌دست آمده در جایگاه WGA٢٧٦ با تعداد آلل به‌دست آمده از مطالعه دانگل و همکاران (٢٠٠٥) و محسنی (٢٠٠٧) مطابقت داشت. همچنین تعداد آلل به‌دست آمده در جایگاه WGA٢٠٢ در مطالعات پوله‌جیونی و همکاران (٢٠٠٦) و محسنی (٢٠٠٧) با تعداد آلل به‌دست آمده

Archive of SID

www.SID.ir

در این پژوهش یکی بود. در این بررسی تعداد آلل به‌دست آمده در جایگاه WGA0۷۱، ۵ آلل بود که با تعداد آلل در همین جایگاه در ژنوتیپ‌های کاسرتا در مطالعه فورونی و همکاران (۲۰۰۷) مطابقت دارد. در جایگاه WGA۰۰۱، ٦ آلل مشاهده شد که مشابه تعداد آلل به‌دست آمده در پژوهش دانگل و همکاران (۲۰۰۵) بود.

جدول ۵- شاخص‌های ژنتیکی مورد بررسی در مکان‌های ژنی ریزماهواره.

مکان ژنی	دامنه اندازه آلل‌ها (جفت باز)	تعداد آلل	تعداد آلل مؤثر	شاخص اطلاعاتی شانون	هتروزیگوتی مشاهده شده
WGA۰۰۱	۲۱۰-۱۷٦	٦	٤/۰۱	۱/۵۱	۰/٦۹
WGA۰۰٤	۲۰۰-۱۸۰	٦	۳/۵۷	۱/٤۲	۰/٦۱
WGA۰۰۹	۲۷۵-۲۳۰	۹	۳/۹٦	۱/٦٤	۰/۵۵
WGA۰۸۹	۲۳٤-۲۱۰	۷	۳/۱۵	۱/۳٦	۰/۷۱
WGA۱۱۸	۲۳٦-۱۹۰	۱۰	٤/۸٤	۱/۸۷	۰/٦۷
WGA۲۰۲	۱۹۸-۱۷۸	۱۱	٤/۲۹	۱/۷٦	۰/۹۱
WGA۲۷٦	۲۳۰-۱۹۰	۸	۵/۳۲	۱/۸۰	۰/۸۲
WGA۳۳۲	۲٤۰-۲۱۰	٦	۲/٦۰	۱/۲۵	۰/۱٤
WGA۳٤۹	۲۱۰-۱۸٦	۷	٤/٤٤	۱/٦۵	۰/٦۷
WGA۰۲۷	۲۲۲-۲۱۵	۲	۱/۵۷	۰/۵۵	۰/٤۰
WGA۰۷۱	۲۳۰-۲۱۰	۵	۳/٦۹	۱/٤۳	۰/۵۱
میانگین	----	۷	۳/۷۷	۱/٤۸	۰/٦۱

در جدول ٦ فراوانی آلل‌های مختلف در هر مکان ژنی به‌صورت جداگانه آورده شده است. بیش‌ترین فراوانی آلل مربوط به آلل A (معرف باند ۲۱۵ جفت باز) و آلل C (معرف باند ۲۲۵ جفت باز) است که به‌ترتیب در جایگاه‌های WGA۰۲۷ (۰/۷٦) و WGA۳۳۲ (۰/۵۷) می‌باشد. کمترین فراوانی آلل (۰/۰۰۵) مربوط به جایگاه‌های ژنی WGA009 (آلل H، I)، WGA089 (آلل G) و WGA118 (آلل J) بود. در بررسی‌های مشابه (کریمی، ۲۰۰۷)، کمترین فراوانی آلل مربوط به جایگاه ژنی WGA276 (۰/۰۱٦) و بیش‌ترین فراوانی مربوط به جایگاه WGA089 با فراوانی ۰/۵٦٦ بود. در پژوهش محسنی (۲۰۰۷) بیش‌ترین فراوانی آلل در جایگاه‌های ژنی WGA032 و WGA331 بود. تفاوت در فراوانی‌های آللی به‌دست آمده می‌تواند به‌علت متفاوت بودن توده‌های مورد بررسی باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ٦- فراوانی آلل‌هادر مکان‌های ژنی ریزماهواره مورد بررسی.

Locus/ Allele	WGA 001	WGA 004	WGA 009	WGA 089	WGA 118	WGA 202	WGA 276	WGA 332	WGA 349	WGA ٠27	WGA ٠71
A	٠/٠٣٧	٠/٠٩٩	٠/٠٣١	٠/٠١٦	٠/٠٣١	٠/٠٥٧	٠/٠٥٧	٠/٠٣٦	٠/٠٢٦	٠/٧٦٠	٠/٠٦٣
B	٠/٢٥٠	٠/٣٨٥	٠/٠٥٧	٠/١٣٥	٠/٠٣١	٠/٠٨٨	٠/٢٤٥	٠/١٧٢	٠/١٠٤	٠/٢٤٠	٠/٣١٢
C	٠/٣٢٨	٠/١٧٢	٠/٤١٧	٠/٤٩٠	٠/٠٤٧	٠/٣٥٩	٠/٢٢٤	٠/٥٧٣	٠/٢٥٥	–	٠/٣٧٠
D	٠/٢٦٠	٠/٣٠٢	٠/١٧٧	٠/١٦٧	٠/٠٨٣	٠/١٠٤	٠/٢٢٩	٠/١٥١	٠/٣٣٨	–	٠/١٢٠
E	٠/٠٩٤	٠/٠٣١	٠/١٨٧	٠/١٧٧	٠/٢٠٨	٠/٢٨١	٠/١٢٥	٠/٠٤٢	٠/١٤٥	–	٠/١٣٥
F	٠/٠٣١	٠/٠١٠	٠/٠٨٣	٠/٠١٠	٠/٣٦٥	٠/٠٤٢	٠/٠٧٢	٠/٠٢٦	٠/١٠٩	–	–
G	–	–	٠/٠٣٦	٠/٠٠٥	٠/٠٩٩	٠/٠١٠	٠/٠٣١	–	٠/٠٢١	–	–
H	–	–	٠/٠٠٥	–	٠/٠٨٣	٠/٠١٦	٠/٠١٦	–	–	–	–
I	–	–	٠/٠٠٥	–	٠/٠٤٧	٠/٠١٦	–	–	–	–	–
J	–	–	–	–	٠/٠٠٥	٠/٠١٦	–	–	–	–	–
K	–	–	–	–	–	٠/٠١٠	–	–	–	–	–

در توده‌های مورد مطالعه توده گالیکش با میانگین تعداد ٥/٠٩ آلل و توده کردکوی با میانگین ٣/٧٣ به‌ترتیب بیشترین و کمترین تعداد آلل مشاهده شده را دارا بودند. با توجه به شاخص اطلاعاتی شانون محاسبه شده، توده گالیکش و کلاله که در بین سایر توده‌ها بیش‌ترین تعداد آلل را دارا بودند، میزان شاخص شانون بالاتری نیز داشتند که بیانگر تنوع بالا در این توده‌ها می‌باشد. در طرف دیگر توده کردکوی با کمترین تعداد آلل، کمترین شاخص اطلاعاتی شانون را نیز دارد که کمترین تنوع را در بین توده‌های انتخابی دارد (جدول ٧).

جدول ٧- هتروزیگوتی و تعداد آلل‌ها و تعداد آلل مؤثر در ٥ توده مورد بررسی.

توده	تعداد نمونه	هتروزیگوتی مشاهده شده	هتروزیگوتی مورد انتظار	تعداد آلل‌ها	تعداد آلل مؤثر
گالیکش	٢٤	٠/٥٩	٠/٦٦	٥/٠٩	٣/٤٦
چشمه‌جوزی	٢٠	٠/٦٧	٠/٦٥	٤/٧٣	٣/٠٨
افراتخته	٢٠	٠/٥٤	٠/٦٨	٤/٨٢	٣/٣٩
کردکوی	١٢	٠/٦٤	٠/٦٠	٣/٧٣	٢/٧٣
کلاله	٢٠	٠/٦٠	٠/٦٨	٥/٠٠	٣/٤٣
میانگین	--	٠/٦١	٠/٧١	--	--

Archive of SID

www.SID.ir

بیش‌ترین میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده مربوط به توده چشمه‌جوزی و معادل ۰/٦٧ بود که این احتمالاً به‌دلیل بکر بودن توده مورد مطالعه و نبود دخالت‌های بشری مانند گزینش بوده است. در بین توده‌های مورد بررسی این توده بیش‌ترین فاصله را از روستاهای اطراف داشت و جالب‌تر این‌که گردوهای درختان این توده بسیار کوچک بود (برخی ژنوتیپ‌ها در حد و اندازه فندق بودند) که شانس گزینش را به‌میزان بسیار بالایی از بین برده و تأییدکننده این نتیجه می‌باشد. کمترین میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده مربوط به توده افراتخته و معادل ۰/٥٤ بود که ممکن است به‌صورت گزینشی از توده‌های سایر نواحی منشاء گرفته باشد. بررسی‌های محلی نشان داد که توده افراتخته می‌تواند از نهال‌های برتر گزینش شده از روستای افراتخته حاصل شده باشد که طی سالیان، توده کنونی را تشکیل داده‌اند. از ۱۱ مکان ژنی ریزماهواره که در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفتند، دو مکان ژنی WGA۲۷٦ و WGA۳٤۹ بیش‌ترین شاخص چندشکلی (محتوای اطلاعات چندشکلی) را به خود اختصاص دادند. بنابراین پیشنهاد می‌شود که از این مکان‌های ژنی برای آنالیز دیگر ژرم پلاسم‌های گردوی کشور استفاده شود.

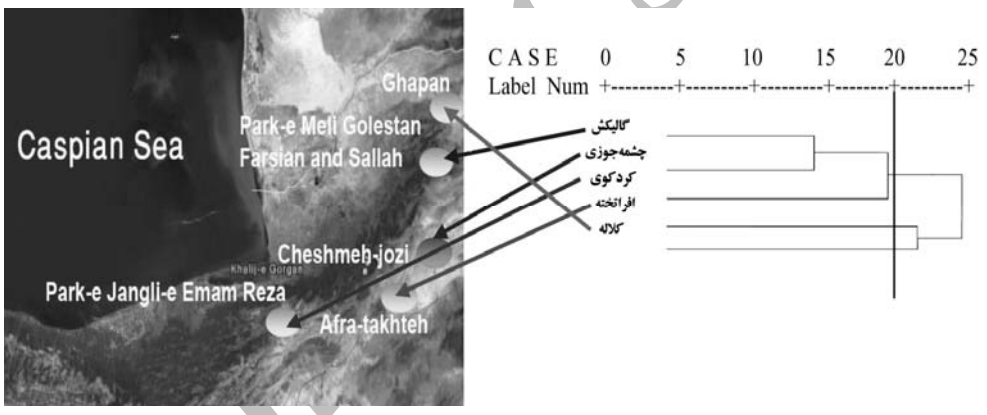
نتایج به‌دست آمده از دندروگرام تنوع ژنتیکی بین توده‌ها با استفاده از داده‌های مولکولی به روش گروه‌های غیروزنی جفت شده با استفاده از ضرایب نی، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را در دو دسته متفاوت قرار داد (شکل ۳). بیش‌ترین فاصله ژنتیکی بین توده‌های کردکوی و افراتخته (۰/۳۰) و کمترین فاصله ژنتیکی بین توده‌های گالیکش و چشمه‌جوزی (۰/۱۲) بود. در گروه اول، سه توده گالیکش و چشمه‌جوزی و کردکوی قرار گرفتند که توده کردکوی از این دو جدا گشته و در گروه مجزایی قرار دارد که احتمالاً به‌دلیل دوری جغرافیایی توده کردکوی از این دو توده باشد که فاصله جغرافیایی کمی از هم دارند. نزدیکی ژنتیکی بین دو توده گالیکش و چشمه‌جوزی می‌تواند ناشی از اشتقاق توده‌ها از یکدیگر، داشتن اجداد مشترک و انتخاب ژنوتیپ‌های برتر و کشت مجدد آنها باشد. در گروه دوم، دو توده افراتخته و کلاله قرار دارند که از نظر جغرافیایی فاصله زیادی از هم دارند.

دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای اطلاعات ۱۱ نشانگر ریزماهواره، در ژنوتیپ‌های گردوی ایرانی با استفاده از ضریب تشابه نی و به روش گروه‌های غیروزنی جفت شده در شکل ٤ نشان داده شده است. در این شکل دندروگرام ژنوتیپ‌های مورد بررسی به ٦ گروه منطقی تقسیم شده است. در

Archive of SID

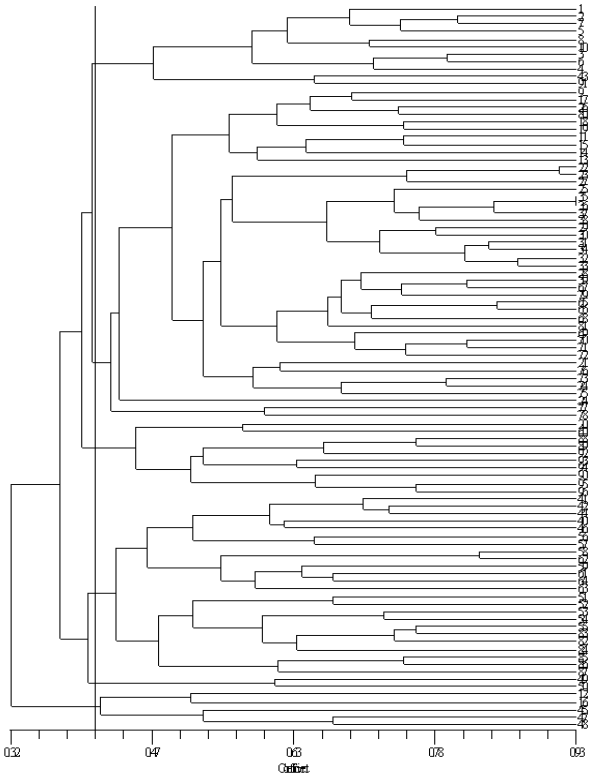
www.SID.ir

تقسیم‌بندی ژنوتیپ‌ها درختان یک توده در دسته‌های متفاوتی قرار گرفتند و این نتیجه بیانگر تنوع زیاد در بین توده‌های مختلف و درختان یک توده است. در شاخه اول ۹ ژنوتیپ از توده گالیکش و یک ژنوتیپ از چشمه‌جوزی و یک ژنوتیپ از کلاله قرار گرفتند. در شاخه دوم دندروگرام، که بزرگترین شاخه بود ترکیبی از ژنوتیپ‌های گالیکش (۱۱ ژنوتیپ)، چشمه‌جوزی (۱۵ ژنوتیپ) و تمام ژنوتیپ‌های کردکوی (۱۲ ژنوتیپ) بود. در شاخه سوم، اکثریت به ژنوتیپ‌های کلاله اختصاص داشتند. شاخه چهارم را ژنوتیپ‌های افراتخته، سپس کلاله و چشمه‌جوزی تشکیل دادند. در شاخه پنجم دو ژنوتیپ از افراتخته قرار گرفتند که نشان‌دهنده شباهت بالای این دو ژنوتیپ می‌باشد و در شاخه ششم ۳ ژنوتیپ از افراتخته و ۲ ژنوتیپ از گالیکش قرار گرفتند.



شکل ۳- دندروگرام حاصل از مطالعه تنوع ژنتیکی بین توده‌ها با استفاده از روش گروه‌های غیروزنی جفت شده و ضریب تشابه نی (۱۹۷۸).

www.SID.ir



شکل ٤- دندروگرام حاصل از مطالعه تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها با استفاده از روش گروه‌های غیروزنی جفت شده و ضریب تشابه نی (۱۹۷۸).

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی: برای خلاصه کردن اطلاعات داده‌های نشانگرهای مولکولی و وضوح بیشتر به‌خصوص هنگامی‌که ۲ یا ۳ مؤلفه اول بیش از ۲۵ درصد تغییرات را توجیه می‌کنند، می‌توان از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی در ترکیب با خوشه‌بندی استفاده کرد (محمدی و پراسانا، ۲۰۰۳). تجزیه به مؤلفه‌های اصلی براساس ماتریس تشابه به‌دست آمده از ضریب تشابه نی انجام شد. نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد که ٤٠ مؤلفه اصلی حدود ۹٦ درصد از واریانس داده‌های مولکولی را توجیه کرده‌اند. این موضوع نشان داد که نشانگرهای ریزماهواره مورد مطالعه در قسمت‌های مختلف ژنوم پراکنده می‌باشند.

Archive of SID

www.SID.ir

مقادیر مؤلفه‌های محاسبه شده برای ١٠ مؤلفه ابتدایی و میزان تغییراتی که توسط آنها توجیه می‌شوند در جدول ٨ آمده است. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد که اولین مؤلفه اصلی ١١/٣٩ درصد و دومین مؤلفه ٨/٦ درصد از کل تغییرات را توجیه می‌کند. دو مؤلفه اصلی اول ٢٠ درصد از تغییرات داده‌های مولکولی را توجیه نمودند.

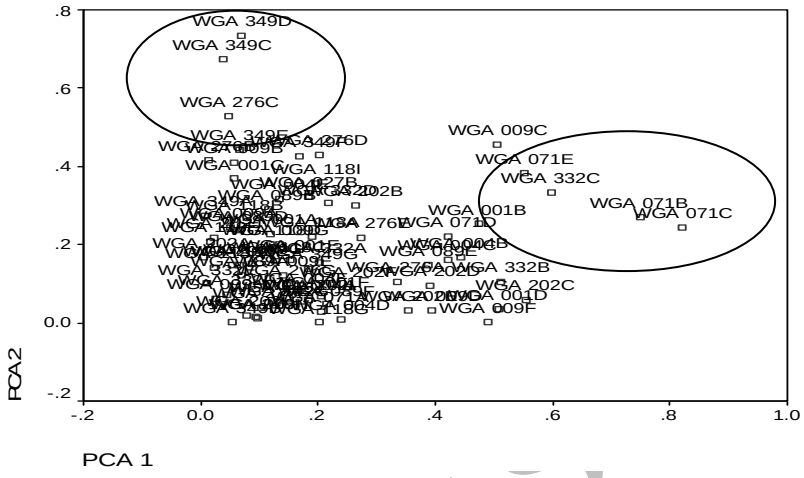
جدول ٨- تجزیه به مؤلفه‌های اصلی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره در ٥ توده مورد بررسی.

مؤلفه اصلی	درصد واریانس	درصد واریانس تجمعی
١	١١/٣٩	١١/٣٩
٢	٨/٦٠	٢٠/٠٠
٣	٧/٥٠	٢٧/٥٠
٤	٦/٠٦	٣٣/٥٦
٥	٥/٤٥	٣٩/٠٠
٦	٤/٢٦	٤٣/٢٧
٧	٣/٩٨	٤٧/٢٥
٨	٣/٨٤	٥١/٠٩
٩	٣/٥٣	٥٤/٦٢
١٠	٣/١٩	٥٧/٨١

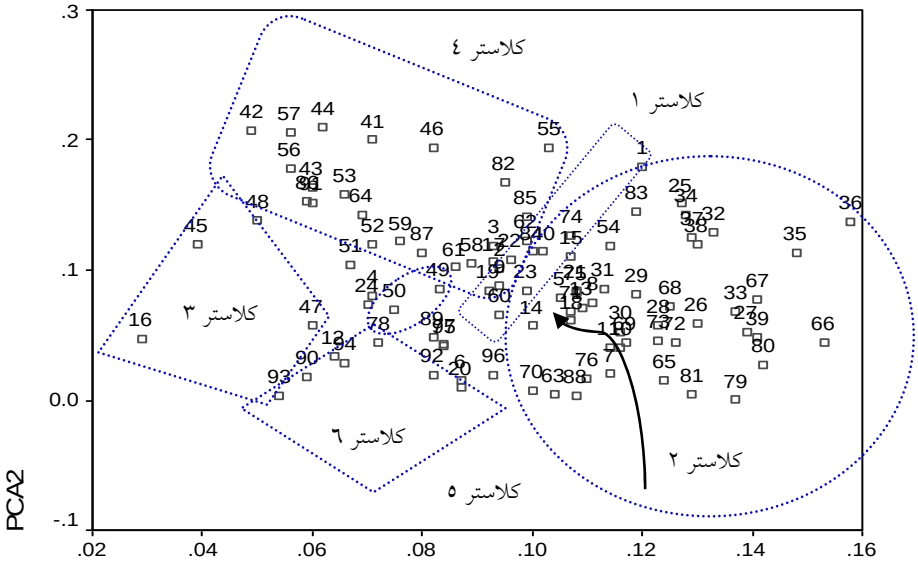
دیاگرام پراکنش متغیرها براساس مولفه اول و دوم (شکل ٥) نشان می‌دهد که در مؤلفه اول که بیش‌ترین درصد از تغییرات (١١/٣٩ درصد) را توجیه می‌نماید، تأثیرگذارترین متغیرها به‌ترتیب WGA٠٧١C (٨٢ درصد)، WGA٠٧١B (٧٥ درصد)، WGA٣٣٢C (٦٠ درصد) و WGA٠٧١E (٥٥ درصد) بودند، به‌طوری‌که این آلل‌ها تعیین‌کننده اختلاف بین ژنوتیپ‌ها می‌باشند. در مؤلفه دوم، که بعد از مؤلفه اول، بیش‌ترین سهم را در توجیه تغییرات دارد (٨/٦ درصد)، متغیرهای WGA٣٤٩D (٧٣ درصد)، WGA٣٤٩C (٦٧ درصد) و WGA٢٧٦C (٥٢ درصد) بیش‌ترین تأثیر را در تعیین اختلاف بین ژنوتیپ‌ها داشتند. مطابق با گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در دندروگرام (شکل ٦)، ژنوتیپ‌ها براساس مؤلفه‌های اصلی اول و دوم نیز در ٦ دسته متفاوت قرار گرفتند و نتیجه تجزیه به مؤلفه‌های اصلی تأئیدکننده تعداد شاخه‌های تشکیل شده در دندروگرام ژنوتیپ‌هاست.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۵- نمودار دو بعدی آل‌ها براساس مؤلفه اصلی اول و دوم.



شکل ٦- نمودار دو بعدی ژنوتیپ‌ها براساس مؤلفه اصلی اول و دوم.

www.SID.ir

نتایج این بررسی به‌خوبی نشان داد که نشانگرهای ریزماهواره دارای قابلیت‌های لازم برای ارزیابی تنوع ژنتیکی بین و درون توده‌ها و همچنین شناسایی ژنوتیپ‌های گردوی ایرانی هستند. اگرچه تعداد به نسبت کم نشانگرهای مولکولی استفاده شده در این بررسی ممکن است نتواند تمام ژنوتیپ‌های موجود در این توده‌ها را تشخیص دهد، ولی نتایج به‌دست آمده از کاربرد این نشانگرها می‌تواند زمینه‌ساز انجام کارهای اصلاحی در ارتباط با به‌نژادی و شناسایی ذخایر موجود و حفظ این ذخایر ارزشمند در مراحل بعد باشد. با وجود این‌که ایران یکی از مراکز اصلی پراکنش گردو در دنیا می‌باشد، ولی هنوز رقم تجاری خاصی در ایران اصلاح و معرفی نشده است. بیشتر مطالعات انجام شده متوجه شناسایی ژنوتیپ‌های برتر براساس صفات مورفولوژیک بوده است که این گزینش‌ها می‌تواند در سال‌های آینده منجر به فرسایش ژنتیکی گسترده‌ای در جمعیت‌های گردو شود، چرا که منجر به حذف بسیاری از ژنوتیپ‌هایی می‌شود که ممکن است در بسیاری از صفات نظیر مقاومت به بیماری‌ها، سرما و شوری سرآمد باشند ولی به لحاظ صفات کیفی میوه مطلوب نباشند. با استفاده از توانایی‌های نشانگرهای مولکولی برای انگشت‌نگاری ژنتیکی و شناسایی ارقام می‌توان اقدام به شناسایی ارقام و ژنوتیپ‌های حاوی صفات مطلوب کرد و از آنها در جهت تجمع صفات مطلوب در یک ژنوتیپ و تولید رقم تجاری جدید کارهای تلاقی استفاده کرد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از آقای مهندس علی ناصری مسئول جنگلداری اداره کل منابع طبیعی استان گلستان و همکاران ایشان و قرق‌بانان مناطق انتخابی به‌دلیل همکاری‌های صمیمانه و بی‌دریغ در راهنمایی و هماهنگی جهت شناسایی و انجام کارهای نمونه‌برداری از گردوهای جنگلی استان تشکر و سپاسگزاری می‌نمائیم.

منابع

1.Dangl, G.S., Woeste, K., Aradhya, M.K., Koehmstedt, A., Simon, C., Potter, D., Leslie, C., and McGranahan, G.H. 2005. Characterization of 14 microsatellite markers for genetic analysis and cultivar identification of walnut. J. Am. Soc. Hor. Sci. 130: 348-354.

2.Doyel, J.J., and Doyel, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 19: 11-15.

Archive of SID

www.SID.ir

3.Ehteshamnia, A., Sharifani, M., Vahdati, K., Erfani, V., Musavizadeh S.J., and Mohsenipoor, S. 2009. Investigation of morphological diversity among native populations of walnut (*Juglans regia*) in Golestan province. Gorgan, Journal of Agri. Sci. & Natur. Resour. No 5. (In Persian)
4.Forde, H.I. 1975. Walnuts, P 84-97. In: J. Janick and J.N. Moore (eds.). Advances in Fruit Breeding. Pourde Uni. Press. West Lafayett. Ind.
5.Foroni, I., Rao, R., Woeste, K., and Gallitelli, M. 2005. Characterization of *Juglans regia* L. with SSR markers and evaluation of genetic relationships among cultivars and the "Sorrento" landrace. J. Hort. Sci. Biotechnol. 80: 1. 49-53.
6.Foroni, I., Rao, R., and Woeste, K. 2006. Molecular characterization of *Juglans regia* L. cultivar with SSR markers. Acta. Hort. 705: 207-213.
7.Foroni, I., Woeste, K., Monti, L.M., and Rao, R. 2007. Identification of 'Sorrento' walnut using simple sequence repeats (SSRs). Genet Resour Crop Evol. 54: 1081-1094.
8.Ghanadha, M.R., Zahravi, M., and Vahdati, K. 2003. Breeding Horticultural Crops. Dibagaran Tehran Press, 344p. (Translated in Persian)
9.Jafari-Sayadi, M.H. 2006. Genetic Diversity of Iranian Native Walnut Population of Northern Forests and Morphological Comparison Them with Walnut other Region of Country. Ph.D. Thesis of Forest Sciences, Agricultural and Natural Resources Faculty. University of Tehran. (In Persian)
10.Karimi, R. 2007. Investigation of genetic diversity of Persian walnut populations in the west of Iran by SSR Markers. M.Sc. Thesis of Buali-sina University. (In Persian)
11.Malvolti, M.E., Paciucci, M., Cannata, F., and Fineschi, S. 1993. Genetic variation in Italian populations of *Juglans regia* L. Acta Hort. 311: 86-94.
12.Mohammadi, S.A., and Prasanna, M. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants-salient statistical tolls and considerations. Crop Sci. 43:1235-1248.
13.Mohseni, S. 2007. Investigation of genetic diversity of Persian walnut populations in Kerman province by SSR Markers. M.Sc. Thesis of Horticulture Sciences. Abureyhan Faculty. University of Tehran. (In Persian)
14.Pollegioni, P.A., Major, A., Bartoli, S., Dussi, F., and Malvolti, M.E. 2004. Application of del mp3 microsatellite and dominant molecular markers for the discrimination of species and interspecific hybrids in genus *Juglans*. Acta. Hort. 705: 191-197.
15.SPSS, 2002. SPSS for Windows, Release 11.5, Chicago, USA.
16.Vahdati, K. 2001. Walnut situation in Iran. Nucis-Newsletter, 9: 32-33.
17.Victory, E.R., Glaubitz, J.C., Rhodes, O.E., and Woeste, K.E. 2006. Genetic homogeneity in *Juglans nigra* (Juglandaceae) at nuclear microsatellites. Amer. J. Botany, 93: 118-126.
18.Woeste, K., Burns, R., Rhodes, O., and Michler, C. 2002. Thirty polymorphic nuclear microsatellite loci from black walnut. J. Hered. 93: 5-60.

Archive of SID

www.SID.ir

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

J. of Plant Production, Vol. 16(4), 2009
www.gau.ac.ir/journals

Investigation of genetic diversity among some native populations of walnut (*Juglans regia* L.) in Golestan province by SSR Markers

***A. Ehteshamnia[1], M. Sharifani[2], K. Vahdati[3] and V. Erfani Moghaddam[4]**

[1]Former M.Sc. Student, Dept. of Horticulture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [2]Assistant Prof., Dept. of Horticulture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [3]Assistant Prof., Dept. of Horticulture, University of Tehran, [4]Instructor, Dept. of Horticulture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Abstract

Recognizing of genetic diversity and genetic potential of each plant species is necessary and essential before any works on breeding program. Genetic diversity among five populations of walnut (*Juglans regia* L.) was studied using 11 SSR markers. The marker system produced 77 alleles in a range size of 176-275 bps. The minimum (2) and maximum (11) numbers of alleles were related to genetic locus of WGA027 and WGA202, respectively. The mean number of alleles for 11 loci was 7 alleles. The number of effective alleles was between 1.57 and 5.32. The mean number of effective alleles for each locus was 3.77. In general, increasing trend of the allele's number was in relation with Shannon information index. This was observed for Galikesh and Kalaleh populations. These populations had more diversity within each of them. Reversely, Kordkouy population had the lowest Shannon index and the lowest diversity among the selective populations. The highest genetic distance was between Kordkouy and Afratakhteh (0.30). The lowest distance was related to Galikesh and Cheshmah-jouzi (0.12). Classification of populations based on molecular data did not match with their geographical situations.

Keywords: Walnut, *Juglans regia* L., Genetic diversity, Microsatellaite Marker

*****Corresponding Author; Gmail: ab.ehteshamnia@gmail.com

Archive of SID

www.SID.ir