مجله به‌نژادی نهال و بذر
جلد ۱-۳۰، شماره ۴، سال ۱۳۹۳

ارزیابی توصیفی و تنوع ژنتیکی برخی ژنوتیپ‌های امیدبخش گردو در استان زنجان

Descriptive Assessment and Genetic Diversity of some Promising Walnut Genotypes in Zanjan Province

زهرا سفیدکوهی[۱]، علی سلیمانی[۲]، حسین جعفری[۳] و ابراهیم دستکار[۴]

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان
۳ و۴- به ترتیب استادیار و محقق، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی زنجان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۱ **تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۳/۸**

چکیده

سفیدکوهی، ز.، سلیمانی، ع.، جعفری، ح. و دستکار، ا.۱۳۹۳. ارزیابی توصیفی و تنوع ژنتیکی برخی ژنوتیپ‌های امیدبخش گردو در استان زنجان. **مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۳۰:** ۷۳۲ - ۷۱۹.

به دنبال سرمای دیررس بهاره در سال ۱۳۸۹ در مجتمع کشت و صنعت کشاورزی خرمدره استان زنجان، تعداد پانزده ژنوتیپ امیدبخش گردو با واکنش فرار از سرمازدگی، اتیکت‌گذاری شدند. خصوصیات درخت، میوه و مغز ژنوتیپ‌ها بر اساس توصیف‌نامه IPGRI ارزیابی و تنوع ژنتیکی، تمایزگذاری و گروه‌بندی آن‌ها نیز با استفاده از ۱۳ نشانگر ریزماهواره ارزیابی شد. سیزده نشانگر SSR مورد استفاده توانست ۳۷ آلل را در اندازه‌های بین ۲۰۹ تا ۳۰۸ جفت باز شناسایی کند. میانگین تعداد آلل‌ها برای ۱۳ مکان ژنی ۲/۸۴ بود. از بین نشانگرها، جایگاه‌های WGA276 و WGA071 به ترتیب از بالاترین و پائین‌ترین توانایی ایجاد تمایز در بین ژنوتیپ‌ها برخوردار بودند. گروه‌بندی مورفولوژیکی و ملکولی تنوع ژنتیکی زیادی را در بین ژنوتیپ‌ها نشان دادند، لیکن همخوانی کمی بین نتایج دو نوع کلاستربندی به دست آمد. اگرچه تمامی ژنوتیپ‌های ارزیابی شده از نظر دیربرگدهی و تولید جوانه‌های بارده در شاخساره‌های انتهایی و جانبی مطلوب بودند، بااین‌وجود ژنوتیپ T36R67 با توجه به کثرت حضور صفات مطلوب به ویژه از نظر خصوصیات مغز، به عنوان یکی از ژنوتیپ‌های کاندید برای ارزیابی‌های تکمیلی و استفاده در تلاقی‌های هدفمند به‌نژادی پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: گردو، تنوع ژنتیکی، نشانگر ریزماهواره، خسارت سرمازدگی بهاره، خصوصیات میوه.

نویسنده مسئول: asoleimani@znu.ac.ir تلفن: ۰۲۴۱۲۲۸۳۲۰۳

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

گردوی ایرانی (*Juglans rejia* L.) یکی از منابع ارزشمند گیاهی در دنیا و ایران است. سطح زیر کشت آن در ایران حدود ۲۰۰ هزار هکتار است و یکی از محصولات مهم خشکباری ایران محسوب می‌شود. علی‌رغم چنین اهمیتی، کارهای علمی زیادی در خصوص اصلاح ارقام آن نشده و اکثر باغ‌های گردو با استفاده از نهال‌های بذری احداث شده‌اند. در چنین شرایطی وجود دوره نونهالی طولانی و تنوع ژنتیکی زیاد نهال‌های بذری از نظر صفات مختلف، ایجاد باغ‌های یکنواخت گردو را غیر ممکن می‌سازد. لذا اصلاح و معرفی ارقام مناسب در مورد این محصول ضروری به نظر می‌رسد (Hassani, 2011). تنوع زیادی از نظر خصوصیات فنولوژیکی درخت و کیفیت مغز گردو در بین درختان گردوی مناطق مختلف وجود دارد. شناسایی، حفاظت و استفاده از چنین منابع ژنتیکی غنی از اهمیت خاصی در پیشبرد برنامه‌های به‌نژادی گردو دارد (Ehteshamnia, 2009). در همین راستا و در طی اجرای برنامه‌های به‌نژادی گردو در موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج رقم جدید جمال انتخاب و معرفی شد (Hassani *et al.*, 2010).

سرمای دیررس بهاره یکی از مهم‌ترین عوامل محدود کننده تولید گردو در ایران است. بنابراین گزینش ژنوتیپ یا ارقام متحمل به تنش سرما یکی از اولویت‌های تحقیقات گردو در ایران است (Hassani, 2011). برای این منظور، گزینش درختانی که واکنش فرار (Scape) از سرمای دیررس بهاره را از طریق دیربرگ‌دهی و تولید جوانه‌های بارده به صورت جانبی دارند، از اهمیت زیادی برخوردار است (Shreve, 1999). امروزه انجام چنین گزینشی در سطح درختان میوه از طریق نشانگرهای مرفولوژیکی و ملکولی انجام می‌شود.

اگرچه نشانگرهای مورفولوژیکی برای مطالعات تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی محصولات مختلف باغی از قبیل گردو مورد استفاده قرار می‌گیرد (Ebrahimi *et al.*, 2009)، لیکن به خاطر محدودیت‌های این گونه نشانگرها از قبیل کم بودن تعداد، متاثرشدن از شرایط محیطی، وابستگی به سن و مرحله رشدی گیاه، احتمال بروز خطا در گزینش و گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد نظر در میان آن‌ها وجود دارد. از طرفی صرف شناسایی و تمایزبندی بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی، اطلاعات زیادی در مورد ساختار و تنوع ژنتیکی جمعیت گزینش شده، ارائه نمی‌کند. با وجود مطالعات زیاد انجام شده در مورد ژرم‌پلاسم گردو، گزارش‌های مربوط به ارزیابی‌های سیستمیک ملکولی در این مورد نسبتاً اندک است که از دلایل عمده آن عدم وجود نشانگرهای ملکولی اختصاصی زیاد در این مورد است. نشانگرهای ملکولی ریزماهواره از جمله نشانگرهای ملکولی است که به خاطر کاربرد و تفسیر نسبتاً ساده نتایج،

Archive of SID

www.SID.ir

وجود سیستم چندآللی، داشتن تنوع و وفور بسیار بالا در ژنوم یوکاریوت‌ها و هم‌بارز بودنشان، کاربرد وسیعی در ارزیابی‌های سیتماتیک گیاهی دارند. در آزمایشی تنوع ژنتیکی ۹۶ ژنوتیپ متعلق به پنج توده طبیعی گردوی ایرانی با استفاده از یازده مکان ژنی ریزماهواره ارزیابی شده و تنوع ژنتیکی وسیع در بین ژنوتیپ‌های مناطق مختلف جغرافیایی به دست آمد (Ehteshamnia *et al.*, 2009). هدف از مطالعه حاضر، توصیف خصوصیات درخت، میوه و مغز برخی از ژنوتیپ‌های گردوی امیدبخش و تعیین تنوع ژنتیکی، تمایز و گروه‌بندی آن‌ها با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و ملکولی ریزماهواره‌ها بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی این تحقیق شامل تعداد ۱۵ ژنوتیپ گردوی ده ساله در مجتمع کشت و صنعت کشاورزی خرمدره استان زنجان بودند که واکنش فرار از سرما را به دنبال بروز سرمای دیررس بهاره در سال ۱۳۸۹ از طریق دیربرگدهی نشان دادند. بر اساس آمار هواشناسی ایستگاه سینوپتیک خرمدره، در بهار سال ۱۳۸۹ روزهای یخبندان در فروردین ماه پنج روز بوده‌است. مطالعات توصیفی شامل ویژگی‌های عمومی رشد درخت، میوه و مغز (خصوصیات میوه و مغز روی بیست میوه از هر ژنوتیپ ارزیابی شد) در طی سال ۱۳۹۰ بر اساس توصیف‌نامه (Anonymous, 1994) IPGRI انجام شد. تمامی خصوصیات مورفولوژیکی روی نمونه‌های تصادفی انتخاب شده از ارتفاع تقریبی ۱/۵ متری از سطح زمین و در چهار جهت مختلف درخت اندازه‌گیری و ثبت شد. قدرت رشد درختان با اندازه‌گیری طول شاخه‌های انتخابی بر حسب سانتی‌متر انجام و به صورت مقایسه نسبی در کلاس‌های مختلف قرار گرفت.

نوع گلدهی از طریق اندازه گیری درصد جاری که دارای گل‌های ماده هستند، اندازه‌گیری و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به صورت مقایسه نسبی در کلاس‌های مربوطه قرار گرفتند. زمان برگدهی زمانی در نظر گرفته شد که بیش از ۵۰ درصد جوانه‌های انتهایی شروع به رشد کرده و فلس‌های جوانه باز شدند، به طوری که برگ‌های سبز داخل آن‌ها دیده می‌شد. زمان برگدهی ژنوتیپ‌های دیربرگده نیمه دوم فروردین و دو ژنوتیپ مورد مطالعه با متوسط برگدهی در نیمه اول فروردین بود، به طوری که ژنوتیپ‌های با متوسط برگدهی و دیربرگدهی اختلاف زمان برگدهی‌شان حدود هفت روز بود. فراوانی شاتون از طریق شمارش تعداد شاتون‌های تولید شده روی شاخه‌های انتخاب شده به صورت مقایسه‌ای بین ژنوتیپ‌ها به دست آمد. کلاس باردهی از طریق شمارش تعداد تقریبی میوه در شاخه های انتخاب شده به دست آمد. شکل میوه از طریق برش طولی و عرضی در جهت شکاف میوه یادداشت‌برداری شد. سختی پوست با فشار لازم برای باز شده

Archive of SID

www.SID.ir

دونیمه پوست چوبی میوه و به صورت مقایسه‌ای امتیازدهی شد. ضخامت پوست بر حسب میلی‌متر در نزدیکی وسط پوست چوبی اندازه‌گیری شد. برای تعیین کلاس وزن میوه و کلاس وزن مغز متوسط وزن بیست میوه و مغز از هر ژنوتیپ توزین و در کلاس مربوطه قرار گرفت. در خصوص تعیین کلاس رنگ مغز میوه گردو در بین ژنوتیپ‌ها، بر اساس رنگ مغز در چهار گروه خیلی روشن، روشن، کهربایی روشن و کهربایی تقسیم‌بندی شدند. برای تعیین کلاس درصد مغز از رابطه زیر استفاده شد و ژنوتیپ‌ها به طور نسبی و در مقایسه با هم‌دیگر در کلاس‌های مختلف قرار گرفتند:

۱۰۰ × (وزن میوه / وزن مغز) = درصد مغز

به‌منظور مطالعات ملکولی، DNA ژنومی از برگ‌های تازه استخراج و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) انجام شد (Naghavi *et al.*, 2005). از بین ۲۱ جفت آغازگر ریزماهواره، بعد از ارزیابی، تعداد ۱۳ جفت آغازگر به خاطر تکرارپذیری و چندشکلی بالا انتخاب شدند. واکنش PCR در حجم نهایی ۱۲ میکرولیتر شامل، ۱۰۰ نانوگرم از DNA، ۲ میکرولیتر بافر PCR، ۰/۳۶ میکرولیتر $MgCl_2$، ۰/۶ میکرولیتر از هر آغازگر، ۰/۲۴ از dNTP و یک واحد Taq پلی‌مراز با برنامه زمانی ۵ دقیقه واسرشت‌سازی اولیه در $94^{\circ}C$، ۳۰ چرخه شامل ۱ دقیقه در $94^{\circ}C$، ۲۰ ثانیه در دمای اتصال مرتبط با هر آغازگر، ۲۰ ثانیه در $72^{\circ}C$، ۶ دقیقه در $72^{\circ}C$ به عنوان بسط نهایی در دستگاه ترموسایکلر (Bio Rad, USA) انجام شد. محصولات PCR قبل از بارگذاری روی ژل با ۱۰ میکرولیتر بافر بارگذاری واسرشته ساز مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در دمای $94^{\circ}C$ واسرشت شده و بلافاصله روی توده یخ منتقل شدند. مقدار ۱۰ میکرولیتر از این ترکیب روی ژل پلی‌اکریل‌آمید استاندارد ۸ درصد بارگذاری و با استفاده از سیستم الکتروفورز عمودی (PNP-1000d, Iran) با ولتاژ ۹۰ ولت به مدت ۴ ساعت و ۳۰ دقیقه تفکیک شد. ظاهرسازی الگوی باندهای چندشکلی، به روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره انجام شد (نقوی و همکاران، ۲۰۰۵). پس از تفکیک قطعات ریزماهواره روی ژل پلی‌اکریل‌آمید، باندهای حاصله به‌صورت هم بارز (برای آنالیزا توصیفی) و کد دواسمی ۰= عدم حضور و ۱= حضور (برای تجزیه کلاستری) نمره‌دهی شد. تجزیه کلاستر با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA به کمک نرم‌افزار NTSYSpc version 2.0 انجام شد. تجزیه‌های توصیفی مولکولی شامل معیارهای میزان حاصل از چند شکلی (PIC)، تعداد آلل متفاوت (Na)، تعداد موثر آلل در هر مکان ژنی (Ne)، متوسط هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He)، متوسط هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) به کمک نرم افزار GenAlex 4.1 محاسبه شد.

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج و بحث

آماره توصیفی مربوط به صفات مورفولوژیکی پانزده ژنوتیپ گردو در جدول ۱ و مشخصات آغازگرهای ریزماهواره مورد استفاده برای تنوع ژنتیکی این ژنوتیپ‌ها در جدول ۲ نشان داده شده است.

خصوصیات عمومی رشد درختان، ویژگی‌های مربوط به میوه و مغز به ترتیب در جدول‌های ۳، ۴ و ۵ شده است. بر اساس نتایج، زمان برگدهی در اکثر ژنوتیپ‌ها، دیرهنگام (اواخر فروردین و اوایل اردیبهشت ماه) و پس از رفع خطر سرمازدگی دیررس بهاره بود. کلاستربندی بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی و از خط برش ضریب تشابهی ۰/۳۶ (با R کوفنتیک ۰/۷۴)، ژنوتیپ‌ها را در سه کلاستر اصلی قرار داد (شکل ۱)، به طوری که ژنوتیپ T36R67 در یک کلاستر جداگانه قرار گرفت. تشابه زیادی از نظر خصوصیات مورفولوژیکی بین ژنوتیپ‌های T2R15 و T3R32 و همچنین T10R43 و T8R65 و نیز T1R39 و T13R69 مشاهد شد. جمع‌آوری توده‌های بذری از یک منطقه، داشتن والد گرده یا بذری مشابه و تبادلات ژنتیکی درون گروهی از طریق گرده‌افشانی از جمله عوامل تشابه ژنتیکی افراد مذکور با یک دیگر و افراد درون یک کلاستر است. با اینحال تشابه کلی در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه کمتر بود، به طوری که زیرگروه‌های متعددی در هر کدام از کلاسترهای اصلی قابل تصور بود. به دلیل دگرگرده‌افشانی و هتروزیگوتی بالا در گردو چنین انتظاری دور از ذهن نیست، چرا که در احداث باغ‌های گردو عمدتاً از نهال‌های بذری استفاده شده است و عدم وجود باغ‌های یکنواخت و یک دست از ارقام معین تجاری اصلاح شده یکی از معضلات گردوکاری در ایران است (Hassani, 2011)

اگرچه تمامی ژنوتیپ‌های ارزیابی شده از نظر دیربرگدهی و تولید جوانه‌های بارده در شاخساره‌های انتهایی و جانبی مطلوب بودند، با این حال ژنوتیپ T36R67 در کلاستربندی مورفولوژیکی در مقایسه با ژنوتیپ‌های دیگر در کلاس مجزایی قرار گرفت. این ژنوتیپ درختی با رشد قوی، فرم رویشی نیمه مستقیم و نزدیک ۵۰ درصد جوانه‌های گل جانبی دارد. ژنوتیپی با فراوانی شاتون زیاد و دارای کلاس باردهی سنگین بوده و دارای بیشترین کلاس وزن میوه، وزن مغز، درصد مغز و چاقی مغز در مقایسه با سایر ژنوتیپ‌ها است. رنگ مغز آن روشن و جداسازی مغز از پوست چوبی آسان بود. با توجه به بالا بودن وراثت‌پذیری پذیری صفات کیفی میوه و به ویژه مغز گردو (LanYing *et al*., 2009)، به نظر می‌رسد که این ژنوتیپ کاندیدای خوبی جهت انجام ارزیابی‌های تکمیلی و استفاده به‌عنوان والد تلاقی برای انتقال صفات مطلوب به نتاج خواهد بود.

تجزیه کلاستر بر اساس داده‌های ملکولی SSR از خط برش ضریب تشابهی ۰/۵۶

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- توصیف‌نامه خصوصیات مورفولوژیکی مربوط به درخت، میوه و مغز گردو

Table 1. Morphological discriptors of walnut tree, fruit and nut

Traits	صفات	Evaluation classes کلاس‌های ارزیابی				Observed classes کلاس‌های مشاهده شده				
		حداقل شاخص Min. index	کلاس Class	حداکثر شاخص Max. index		کلاس Class	حداقل کلاس Min. class	توزیع فراوانی Frequency distribution (%)	حداکثر کلاس Max. class	توزیع فراوانی Frequency distribution (%)
Tree vigor	قدرت رشد درخت	Weak	کم 3	Vigorous	زیاد	7	3	20	7	33
Type of flowering	نوع گلدهی	Terminal	انتهایی 1	>%50	جانبی	7	3	87	5	13
Time of leafing (Bud break)	زمان برگدهی (باز شدن جوانه)	Late	دیر 1	Early	زود	5	3	13	5	87
Male floribondity	فراوانی تولید شاتون	Light	سبک 3	Heavy	زیاد	7	3	7	7	40
Bearing class	کلاس باردهی	Light	کم 3	Heavy	زیاد	7	3	7	7	40
Nut weight	وزن میوه	8.5g	1	<15.5g		9	2	20	9	7
Fruit shape	شکل میوه	Round	گرد 1	Cordate	قلبی	9	1	20	8	33
Shell texture	سطح میوه	Very Smooth	خیلی صاف 1	Very Rough	خیلی ناصاف	9	1	7	5	20
Shell seal	سختی پوست	Thin	کاغذی 1	Strong	زیاد	7	3	33	7	40
Shell thickness	ضخامت پوست چوبی	Very Thin	خیلی نازک 1	Very thick	خیلی ضخیم	9	3	40	7	27
Kernel weight	وزن مغز	<3.5	1	>6.49		9	3	13	9	7
Lose of removal	سهولت جدا کردن مغز	Very Difficult	خیلی سخت 1	Very Easy	خیلی آسان	9	1	7	9	27
Kernel plumpness	میزان پر بودن مغز	Thin	لاغر 1	Very Plump	خیلی پر	9	3	47	9	7
Kernel color	رنگ مغز	Amber	کهربایی 1	Extral Light	خیلی روشن	7	1	47	5	27
Percentage of kernel	درصد مغز	Very Low	خیلی کم 1	Very High	خیلی زیاد	9	3	13	9	13

(Anonymous, 1994)

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- فهرست و مشخصات آغازگرهای ریزماهواره مورد استفاده برای مطالعه تنوع ژنتیکی پانزده ژنوتیپ گردو

Table 2. List and characteristics of SSR primers used for genetic variation study among fifteen walnut genotypes

شماره No.	آغاز گر Primer	توالی آغازگر پیش‌رونده Forward primer sequence	توالی آغازگر معکوس Reverse primer sequence	اندازه آلل (bp)	دمای اتصال (°C)	منبع Reference
1	WGA009	CATCAA AGCAAGCAATGGG	CGCGCACATACGTAAATCAC	237-300	57	(Dangl *et al*., 2005)
2	WGA004	TGT TGC ATT GAC CCA CTT GT	TAA GCC AAC ATG GTA TGC CA	225-300	57	(Dangl *et al*., 2005)
3	WGA332	ACG TCG TTC TGC ACT CCT CT	GCC ACA GGA ACG AGT GCT	210-308	57	(Dangl *et al*., 2005)
4	WGA276	CTC ACT TTC TCG GCT CTT CC	GGT CTT ATG TGG GCA GTC GT	167-237	60	(Dangl *et al*., 2005)
5	WGA118	TGT GCT CTG ATC TGC CTC C	GGG TGG GTG AAA AGT AGC AA	187-237	59	(Dangl *et al*., 2005)
6	WGA089	ACC CAT CTT TCA CGT GTG TG	TGC CTA ATT AGC AAT TTC CA	210-257	59	(Dangl *et al*., 2005)
7	WGA202	CCC ATC TAC CGT TGC ACT TT	GCT GGT GGT TCT ATC ATG GG	195-275	60	(Dangl *et al*., 2005)
8	WGA001	ATT GGA AGG GAA GGG AAA TG	CGC GCA CAT ACG TAA ATC AC	177-224	58	(Dangl *et al*., 2005)
9	WGA069	TTA GTT AGC AAA CCC ACC CG	AGA TGC ACA GAC CAA CCC TC	160-210	59	(Woeste *et al*., 2002)
10	WGA376	GCC CTC AAA GTG ATG AAC GT	TCA TCC ATA TTT ACC CCT TTC G	233-250	59	(Woeste *et al*., 2002)
11	WGA027	AAC CCT ACA ACG CCT TGA TG	TGC TCA GGC TCC ACT TCC	209-239	59	(Woeste *et al*., 2002)
12	WGA071	ACC CGA GAG ATT TCT GGG AT	GGA CCC AGC TCC TCT TCT CT	200-234	59	(Woeste *et al*., 2002)
13	WGA032	CTC GGT AAG CCA CAC CAA TT	ACG GGC AGT GTA TGC ATG TA	164-200	59	(Woeste *et al*., 2002)

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳- خصوصیات رویشی ژنوتیپ‌های گردو در زنجان
Table 3. Vegetative traits of walnut genotypes in Zanjan

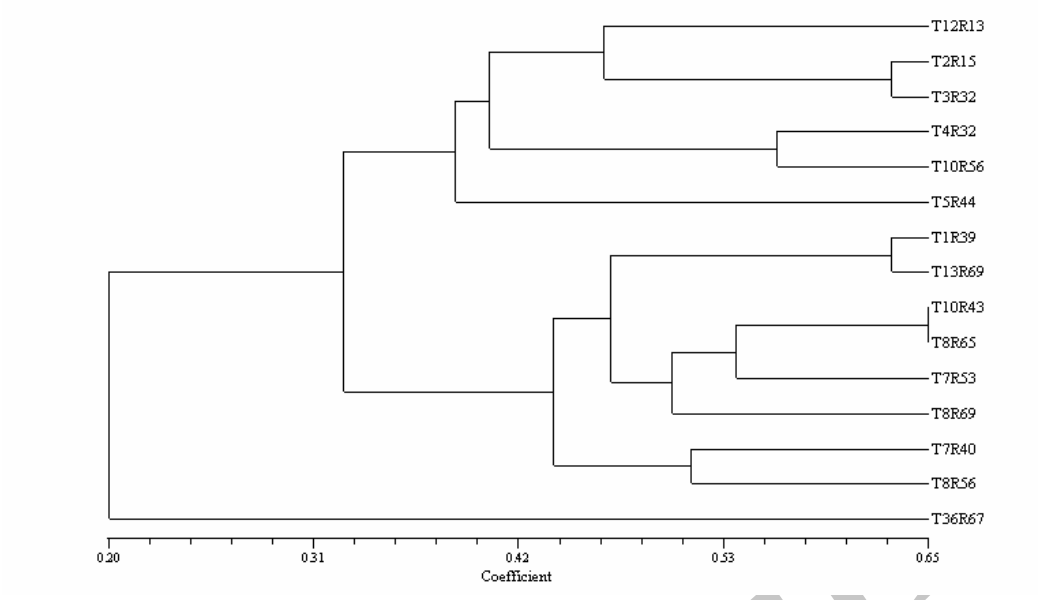
کد ژنوتیپ Genotype code	عادت رشد Growth habit	قدرت رشد Tree vigor	نوع گلدهی Type of flowering	زمان برگدهی Time of leafing	فراوانی شاتون Male floribondity	کلاس باردهی Bearing class
T12R13	گسترده Spreading	ضعیف Weak	حدواسط Intermediate	دیر Late	متوسط Medium	سبک Light
T2R15	گسترده Spreading	ضعیف Weak	حدواسط Intermediate	دیر Late	متوسط Medium	متوسط Medium
T3R32	گسترده Spreading	ضعیف Weak	جانبی <از ۵۰٪	دیر Late	متوسط Medium	متوسط Medium
T4R32	نیمه گسترده Semi spreading	ضعیف Weak	حدواسط Intermediate	دیر Late	متوسط Medium	زیاد Heavy
TIR39	نیمه گسترده Semi spreading	ضعیف Weak	حدواسط Intermediate	دیر Late	زیاد Heavy	متوسط Medium
T7R40	گسترده Spreading	حدواسط Medium	حدواسط Intermediate	دیر Late	متوسط Medium	زیاد Heavy
T10R43	گسترده Spreading	حدواسط Medium	حدواسط Intermediate	دیر Late	متوسط Medium	متوسط Medium
T5R44	نیمه مستقیم Semi erected	حدواسط Medium	حدواسط Intermediate	دیر Late	زیاد Heavy	زیاد Heavy
T7R53	نیمه گسترده Semi spreading	حدواسط Medium	حدواسط Intermediate	متوسط Medium	زیاد Heavy	زیاد Heavy
T8R56	نیمه گسترده Semi spreading	قوی Vigorous	حدواسط Intermediate	دیر Late	متوسط Medium	زیاد Heavy
T10R56	نیمه گسترده Semi spreading	حدواسط Medium	حدواسط Intermediate	متوسط Medium	زیاد Heavy	متوسط Medium
T8R65	نیمه مستقیم Semi erected	حدواسط Medium	حدواسط Intermediate	دیر Late	زیاد Heavy	متوسط Medium
T36R67	نیمه مستقیم Semi erected	قوی Vigorous	جانبی <از ۵۰٪ Later < 50%	دیر Late	زیاد Heavy	زیاد Heavy
T8R69	نیمه گسترده Semi spreading	حدواسط Medium	حدواسط Intermediate	دیر Late	متوسط Medium	متوسط Medium
T13R69	نیمه گسترده Semi spreading	قوی Vigorous	حدواسط Intermediate	دیر Late	سبک Light	زیاد Heavy

(با R کوفنتیک ۰/۸۵)، ژنوتیپ‌ها را در سه کلاستر اصلی قرار داد (شکل ۲). مشابه با نتایج کلاستربندی مورفولوژیکی، تشابه کلی در بین ژنوتیپ‌ها کمتر بود و زیرگروه‌های متعددی در هر کدام از کلاسترهای اصلی قابل تصور بود. مهم‌ترین فصل مشترک دو روش کلاستربندی، تشابه عمده ژنتیکی و مورفولوژیکی بین ژنوتیپ‌های T2R15 و T3R32 بود. جالب این که، اگرچه این دو ژنوتیپ از نظر ملکولی تشابه تقریباً صددرصدی داشتند، از نظر مورفولوژیکی تفاوت‌هایی در نوع گلدهی، کلاس باردهی، وضعیت سطح میوه، چسبندگی چوب، ضخامت پوست سبز میوه و درصد مغز نشان دادند. یکی از اهداف مطالعه حاضر تعیین تشابهات ژنتیکی و مرفولوژیکی موجود در بین ژنوتیپ‌ها بود. بر این اساس با توجه به برایند نتایج کلاستر ملکولی و مورفولوژیکی، ژنوتیپ‌های T2R15 و T3R32 تشابه ژنتیکی بالایی داشتند.

در کل همخوانی کمتری بین نتایج کلاستربندی مورفولوژیکی و مولکولی مشاهده شد. ژنوتیپ T36R67 در حالی که در کلاستر مورفولوژیکی در یک گروه مجزای اصلی قرار داشت، در کلاستر مولکولی موقعیت مشابه را ژنوتیپ T10R56 نشان داد. از دلایل عدم همخوانی کلاستربندی‌ها این که اکثر نشانگرهای SSR در ناحیه غیرکدشونده ژنوم

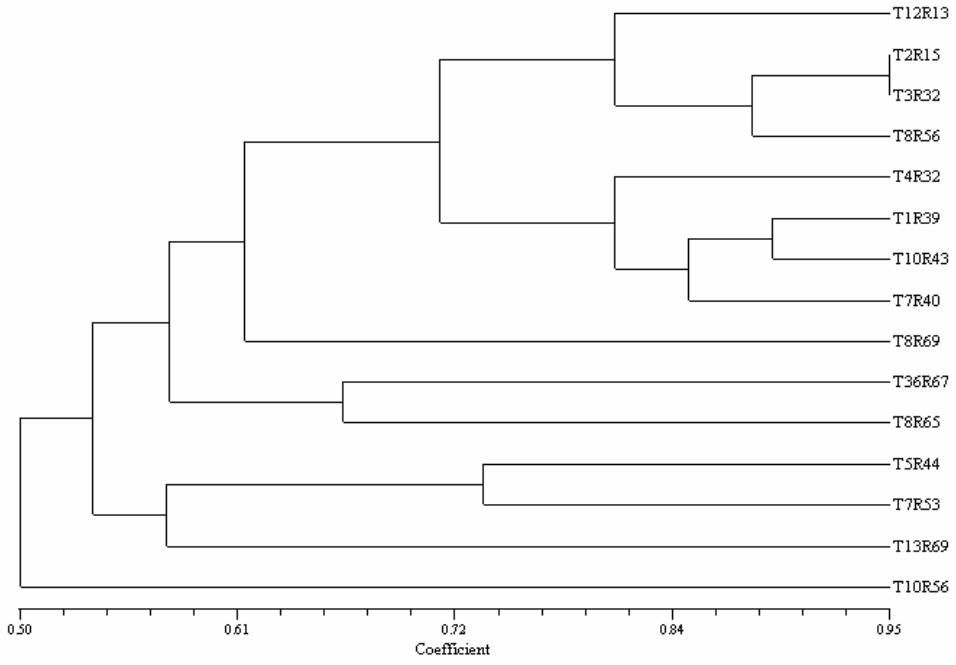
Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- کلاستربندی ژنوتیپ‌های گردو بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA

Fig. 1. Clustering of walnut genotypes based on morphological traits using Jacard similarity coefficient and UPGMA algorithm



شکل ۲- کلاستربندی ژنوتیپ‌های گردو بر اساس نشانگرهای ریزماهوراه با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA

Fig. 2. Clustering of walnut genotypes based on SSR markers using Jacard similarity coefficient and UPGMA algorithm

www.SID.ir

جدول ۴- خصوصیات میوه ژنوتیپ‌های گردو در زنجان
Table 4. Fruit traits of walnut genotypes in Zanjan

کد ژنوتیپ Genotype code	شکل میوه Fruit shape	سطح میوه Shell texture	سختی پوست Shell seal	ضخامت پوست Shell thickness	کلاس وزن میوه Fruit weight class
T12R13	گرد Round	صاف Smooth	قوی Strong	ضخیم Thick	9.5 – 10.49 ± 0.12
T2R15	بیضوی Elliptic	صاف Smooth	متوسط Medium	متوسط Intermediate	9.5 – 10.49 ± 0.11
T3R32	بیضوی Elliptic	حدواسط Intermediate	قوی Strong	ضخیم Thick	8.5 - 9.49 ± 0.21
T4R32	گرد Round	صاف Smooth	قوی Strong	ضخیم Thick	10.5 – 11.49 ± 0.14
TIR39	بیضوی Elliptic	صاف Smooth	قوی Strong	نازک Thin	8.5 - 9.49 ± 0.12
T7R40	بیضوی پهن Broad elliptic	صاف Smooth	متوسط Medium	متوسط Intermediate	12.15 – 13.49 ±0.31
T10R43	بیضوی Elliptic	صاف Smooth	ضعیف Weak	نازک Thin	8.5 - 9.49 ± 0.03
T5R44	ذوزنقه‌ای کشیده Long trapezoid	حدواسط Intermediate	متوسط Medium	متوسط Intermediate	9.5 – 10.49 ± 0.15
T7R53	ذوزنقه‌ای کشیده Long trapezoid	صاف Smooth	ضعیف Weak	متوسط Intermediate	12.15 – 13.49 ± 0.25
T8R56	بیضوی پهن Broad elliptic	صاف Smooth	متوسط Medium	نازک Thin	9.5 – 10.49 ± 0.23
T10R56	گرد Round	حدواسط Intermediate	قوی Strong	ضخیم Thick	10.5 – 11.49 ± 0.21
T8R65	بیضوی پهن Broad elliptic	صاف Smooth	ضعیف Weak	نازک Thin	13.5 – 14.49 ± 0.14
T36R67	بیضوی پهن Broad elliptic	خیلی صاف Very smooth	قوی Strong	متوسط Intermediate	>15.5 ± 0.25
T8R69	تخم‌مرغی Ovate	صاف Smooth	ضعیف Weak	نازک Thin	10.5 – 11.49 ± 0.15
T13R69	بیضوی Elliptic	صاف Smooth	ضعیف Weak	نازک Thin	8.5 - 9.49 ± 0.15

موجودات قرار دارند لذا تفاوت در سطح ملکولی آن‌ها در صفات ظاهری و قابل ارزیابی بروز نمی‌کند افزایش تعداد نشانگرها، استفاده از EST-SSR (Expressed Sequence Tags) که از نواحی کدشونده در سطح ژنوم گیاه است، و نشانگرهای ریزماهواره با توزیع وسیع در سطح کل ژنوم، موجب افزایش کارآیی مطالعات سیستماتیک ملکولی در گردو خواهد شد (Zhang *et al.*, 2010). سیزده نشانگر SSR مورد استفاده در تحقیق حاضر توانست ۳۷ آلل را در اندازه‌های بین ۲۰۹ تا ۳۰۸ جفت باز شناسایی کند. میانگین تعداد آلل‌ها برای ۱۳ مکان ژنی ۲/۸۴ بود (جدول ۶). تعداد آلل‌های مشاهده شده در جایگاه‌های WGA332 و WGA027 با نتایج دانگل و همکاران (Dangel *et al.*, 2005) مطابقت دارد. با این حال تعداد آلل‌های مشاهده در مکان‌های ژنی دیگر ریزماهواره‌ها با نتایج دیگران تطابق نداشت. تفاوت در ساختار ژنتیکی توده ارزیابی شده از دلایل این موضوع است. تعداد آلل مؤثر بیانگر تعداد آلل‌هایی است که در یک جمعیت و برای یک جایگاه ژنی مورد انتظار است. در مطالعه حاضر بیشترین تعداد آلل مؤثر در جایگاه WGA276 و کمترین نیز در جایگاه WGA071 مشاهده شد. پارامتر PIC برای جایگاه‌های ریزماهواره تعیین‌کننده توانایی

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۵- خصوصیات مغز ژنوتیپ‌های گردو در زنجان
Table 5. Kernel traits of walnut genotypes in Zanjan

کد ژنوتیپ Genotype code	کلاس وزن Weight class	راحت جدا شدن Lose of removal	چاقی Plumpness	رنگ Color	درصد مغز Kernel percentage
T12R13	4.5 – 5.49 ± 0.11	آسان Easy	پر Plump	کهربایی روشن Light amber	کم Low
T2R15	4.5 – 5.49 ± 0.06	حدواسط Intermediate	حدواسط Intermediate	کهربایی Amber	متوسط Intermediate
T3R32	4.5 – 5.49 ± 0.12	حدواسط Intermediate	حدواسط Intermediate	کهربایی Amber	کم Low
T4R32	3.5 - 4.49 ± 0.02	حدواسط Intermediate	حدواسط Intermediate	کهربایی روشن Light amber	متوسط Intermediate
TIR39	3.5 - 4.49 ±0.25	آسان Easy	پر Plump	کهربایی Amber	زیاد High
T7R40	5.5 - 6.49 ± 0.14	آسان Easy	پر Plump	کهربایی Amber	زیاد High
T10R43	4.5 – 5.49 ± 0.17	خیلی آسان Very easy	پر Plump	کهربایی Amber	زیاد High
T5R44	4.5 – 5.49 ± 0.17	حدواسط Intermediate	حدواسط Intermediate	کهربایی Amber	متوسط Intermediate
T7R53	5.5 - 6.49 ± 0.15	خیلی آسان Very easy	پر Plump	روشن Light	زیاد High
T8R56	4.5 – 5.49 ± 0.12	خیلی آسان Very easy	پر Plump	روشن Light	خیلی زیاد Very high
T10R56	4.5 – 5.49 ± 0.23	سخت Difficult	حدواسط Intermediate	کهربایی روشن Light amber	متوسط Intermediate
T8R65	5.5 - 6.49 ± 0.23	خیلی آسان Very easy	حدواسط Intermediate	کهربایی Amber	زیاد High
T36R67	> 6.49 ± 0.36	آسان Easy	خیلی پر Very plump	روشن Light	خیلی زیاد Very high
T8R69	4.5 – 5.49 ± 0.15	آسان Easy	حدواسط Intermediate	روشن Light	متوسط Intermediate
T13R69	4.5 – 5.49 ± 0.12	آسان Easy	پر Plump	کهربایی روشن Light amber	زیاد High

نشانگر در تشخیص و گروه‌بندی افراد است. بر این اساس، چهار آغازگر ریزماهواره WGA276، WGA001، WGA069 و WGA202 دارای بیشترین اطلاعات چندشکلی با قدرت تفکیک بالا بودند که با مطالعات دانگل و همکاران (Dangel *et al.*, 2005) و احتشام نیا و همکاران (Ehteshamnia *et al.*, 2009) مطابقت داشت. منفی بودن مقدار شاخص تثبیت ژنی (F) در یک توده ژنتیکی نشان از بالاتر بودن هتروزیگوتی مشاهده شده نسبت به قابل انتظار است (Shamili *et al.*, 2009). از دلایل این موضوع در تحقیق حاضر می‌توان به خصوصیات نر پیش‌رسی و دگرگرده‌افشانی در گردو اشاره کرد که باعث افزایش هتروزیگوتی ژنوتیپ‌ها در مکان‌های ژنی شده است. با این وجود، نر پیش‌رسی در گردو صد در صد نبوده و درصدی از خود باروری در بین ارقام و ژنوتیپ‌های گردو انجام می‌شود (Hassani, 2011). این موضوع می‌تواند دلیل مقادیر مثبت F در جایگاه‌های WGA376، WGA069، WGA118 و WGA001 باشد. سیزده نشانگر ریز ماهواره در مجموع چهار آلل D، C، B و A را در کل ژنوتیپ‌ها شناسایی کردند. بیشترین فراوانی آلل (۰/۹۷۶) مر بوط به جایگاه ژنی WGA071 (آلل A) و کمترین

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۶- پارامترهای ملکولی توصیفی سیزده جایگاه ریزماهواره در پانزده ژنوتیپ گردو
Table 6. Descriptive molecular parameters of thirteen microsatellite loci in fifteen walnut genotypes

جایگاه Locus	تعداد آلل متفاوت No. of Different Alleles (Na)	تعداد موثر آلل‌ها No. of effective alleles (Ne)	محتوای اطلاعات چندشکلی Polymorphism information content (PIC)	هتروزیگوستی مشاهده شده Observed heterozygosity (Ho)	هتروزیگوستی موردانتظار Expected heterozygosity (He)	شاخص تثبیت Fixation index (F)
WGA009	4	1.865	0.406	0.619	0.464	-0.335
WGA004	2	1.508	0.280	0.429	0.337	-0.273
WGA332	4	1.217	0.172	0.190	0.178	-0.070
WGA276	4	2.950	0.598	1.000	0.661	-0.513
WGA069	4	2.156	0.494	0.100	0.536	0.814
WGA376	2	1.690	0.324	0.000	0.408	1.000
WGA027	2	1.893	0.360	0.762	0.472	-0.615
WGA071	2	1.049	0.450	0.048	0.046	-0.024
WGA089	2	1.324	0.214	0.276	0.245	-0.167
WGA118	2	1.930	0.365	0.429	0.482	0.111
WGA032	2	1.690	0.324	0.571	0.408	-0.400
WGA202	3	2.172	0.436	0.857	0.540	-0.588
WGA001	4	2.056	0.475	0.333	0.514	0.351
Mean	2.846	1.808	0.346	0.433	0.407	-0.055

فراوانی الل (۰/۰۲۴) مربوط به جایگاه‌های ژنی WGA071 (آلل B) WGA332 (آلل B و D) و WGA009 (آلل C) بود. در بررسی مشابه بیشترین فراوانی آلل در جایگاه‌های ژنی WGA027 و WGA332 و کمترین فراوانی آلل در جایگاه‌های WGA009، WGA089 و WGA118 مشاهده شد (Ehteshamnia *et al.*, 2009).

اگرچه در بین ژنوتیپ‌ها، مواردی با تشابهات ملکولی و مورفولوژیکی نسبتاً زیاد مشاهد شد، لیکن تنوع و هتروزیگوتی زیادی در بین افراد مشاهده شد. طبیعت نرپیش‌رسی و دگرگرده افشانی در گردو از دلایل عمده این موضوع است. همخوانی کمی بین نتایج کلاستربندی ملکولی و مورفولوژیکی به دست آمد. از دلایل عمده استفاده از نشانگرهایی بوده است که اکثراً در نواحی غیر کدشونده ژنوم گردو بوده و لذا تظاهر فنوتیپی خاصی نداشتند. لیکن در بین نشانگرها، جایگاه‌های WGA276، WGA001، WGA069 و WGA202 بیشترین اطلاعات چندشکلی و توانایی تفکیک ژنوتیپ‌ها را نشان دادند. ژنوتیپ T36R67 با توجه به کثرت حضور صفات مطلوب به ویژه از نظر خصوصیات مغز، به عنوان یکی از ژنوتیپ‌های کاندید برای ارزیابی‌های تکمیلی و استفاده در تلاقی‌های هدفمند اصلاحی پیشنهاد می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

References

Anonymous 1994. Descriptors for Walnut (*Juglans* spp.). International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.

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. Journal of American Society for Horticultural Science 130: 348-354.

Ebrahimi, A., Fattahi Moghaddam, M. R., and Zamani, Z. 2009. Association analysis and genetic diversity of morphologically important traits using SSRs, RAPD marker in Persian walnut population. Proceedings of the 6th Horticultural Science Congress of Iran, Rasht, Iran.

Ehteshamnia, A., Sharifani, M., Vahdati, K., and Erfani Moghaddam, V. 2009. Investigation of genetic diversity among some native populations of walnut (*Juglans regia* L.) in Golestan province by SSR Markers. Journal of Plant Production, 16(4): 39-58 (in Persian).

Hassani, D. 2011. Nut Crops. pp. 187-192. In: Ganji Moghadam, E. (ed), Temperate Zone Pomology. Agricultural Education and Extension Publication, Tehran, Iran (in Persian).

Hassani, D., Atefi, J., Haghjooyan, R., Dastjerdi, R., Keshavaezi, M., Mozaffari, M. R., Soleimani, A., Rahmanian, A. R., Nematzadeh, F., and Malmir, A. 2010. Jamal, a new persian walnut cultivar for moderate-cold areas of Iran. Seed and Plant Improvement Journal 28-1 (3): 525-528 (in Persian).

LanYing, Z., QianWen, X., Li, Z., ShangJie, Z., and PingBang, W. 2009. Analysis of combining ability and heritability about nut quality of walnut. Botany Research Journal 2 (2): 24-27.

Naghavi, M. R., Ghareyazi, B., and Hosseini Salekdeh, G. 2005. Molecular Markers. University of Tehran Press, Tehran, Iran (in Persian).

Shamili, M., Fattahi Moghaddam, M. R., and Talaei, A. R. 2009. Molecular assessment of dome Mango genotypes using SSR markers. Modern Genetics Journal 4(3): 27-36 (in Persian).

Archive of SID

www.SID.ir

Shreve, L. W. 1999. Report on nut production assessment and training. Albania Private Forestry Development Program, Chemonics International Inc. USAID.

Woeste, K., Burns, R., Rhodes, O., and Michler, C. 2002. Thirty polymorphic nuclear microsatellite loci from black walnut. Journal of Heredity 93: 5-60.

Zhang, R., Zhu, A. D., Wang, X. J., Yu, J., Zhang, H. R., Gao, J. S., Cheng, Y. J., and Deng, X. X. 2010. Development of *Juglans regia* SSR markers by data mining of the EST database. Plant Molecular Biology Reporter 28 (4): 646.

Archive of SID

www.SID.ir