

تجزیه ارتباطی برخی صفات فیزیولوژیک در گردوی ایرانی تحت تنش خشکی با استفاده از نشانگرهای SSR

آیدا طاهری^۱، نسرين سیدی^{۲*} و بابک عبدالهی مندولکانی^{۳،۴}

^۱ دانش‌آموخته کارشناسی ارشد جنگلداری، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه ارومیه

^۲ استادیار گروه جنگلداری، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه ارومیه

^۳ دانشیار گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

^۴ گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۹/۲۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۳/۲۳)

چکیده

چوب مرغوب و میوه عالی گردو از لحاظ اقتصادی دارای ارزش زیادی است، به طوری که از گذشته تا امروز به شدت از آن بهره‌برداری شده و در قانون حفاظت از جنگل‌ها و مراتع، به عنوان گونه حفاظت‌شده معرفی شده است. عملکرد گونه‌های جنس گردو، به ویژه *Juglans regia* در سال‌های مرطوب افزایش و در سال‌های خشک کاهش می‌یابد. از این رو توجه به شاخص‌های فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی و شناسایی نواحی ژنومی دخیل در مقاومت به خشکی به منظور انتخاب ارقام مقاوم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این تحقیق به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی دانه‌های گردو و شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی در شرایط نرمال و بعد از تنش خشکی از نشانگرهای SSR استفاده شد. ده مکان SSR در مجموع ۵۳ آلل را تولید کردند. همه مکان‌های SSR مورد مطالعه انحراف معنی‌داری ($p \leq 0.01$) از تعادل هاردی-واینبرگ نشان دادند. دندروگرام حاصل از روش Neighbour-Joining، ۶۲ دانه‌ال گردو را در چهار گروه اصلی قرار داد. بررسی ساختار جمعیت با نرم‌افزار Structure 2.3.1، دو زیرجمعیت احتمالی ($k=2$) را شناسایی کرد. نتایج تجزیه ارتباط به روش MLM نشان داد که در شرایط نرمال مکان‌های WGA9 و WGA69 با صفات رسانایی روزنه، تعرق، فتوسنتز و تعداد برگ سبز سالم ارتباط دارند. در شرایط تنش، ارتباط معنی‌داری بین مکان WGA1 و صفت غلظت CO_2 اتافک زیر روزنه وجود داشت که این مکان ۰/۷۵ از تغییرات مربوط به این صفت را توجیه می‌کرد. نتایج این تحقیق در برنامه‌های اصلاح گردو به منظور شناسایی ارقام مقاوم به خشکی کاربرد دارد.

واژه‌های کلیدی: تنش خشکی، تنوع ژنتیکی، روش Mixed linear model، صفات فیزیولوژیک.

مقدمه و هدف

گردو (*Juglans regia* L.) از خانواده Juglandaceae گیاهی یک پایه و کاملاً دگرگشن است و توسط باد گرده افشانی می شود (Ghanadha et al., 2003). خانواده Juglandaceae دارای ۶۰ گونه است که ۲۰ گونه از آنها در جنس *Juglans* قرار می گیرد. مشهورترین گونه آنها گردوی پارسی (*J. regia*) است (Ducci et al., 1997; McGranahan et al., 1998). گردوی ایرانی مهم ترین گونه تیره Juglandaceae بوده و از نظر تعداد کروموزوم، دیپلوئید و دارای ۳۲ کروموزوم است (MacGranahan et al., 1998). ایران با تولید ۱۴/۷ درصد در مقام دوم تولید گردو در جهان جای دارد و به همراه چین (۴۳ درصد) و آمریکا (۱۴/۲ درصد) از اصلی ترین تولیدکنندگان گردو در سطح جهان محسوب می شود (FAO, 2014). به منظور اصلاح گردو از سال ۱۳۶۲ برنامه شناسایی، ارزیابی و جمع آوری ژنوتیپ های گردوی کشور توسط بخش تحقیقات باغبانی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه دانهال و بذر در مناطق گردوخیز در ایران آغاز شد (حسینی و همکاران، ۱۳۹۱). درک سازوکارهای فیزیولوژیک که سبب سازگار شدن گیاه در شرایط محدودیت رطوبتی و حفظ رشد و تولید در طول دوره خشکی می شوند می تواند در انتخاب ژنوتیپ های متحمل به خشکی و استفاده از این صفات در برنامه های اصلاحی مؤثر باشد (Zaharieva et al., 2001). تنش خشکی بیشتر جنبه های رشد گیاه و فرایندهای فیزیولوژیک آن را تحت تأثیر قرار می دهد (Hung, 2000). اگر آب قابل دسترس برای ریشه گیاه محدود شود یا سرعت تعرق بسیار زیاد شود، گیاه تنش خشکی را تجربه می کند که این شرایط در مناطق و اقلیم های خشک و نیمه خشک مشاهده می شود (Reddy et al., 2004). در کشور ما به جز سواحل دریای خزر و قسمت های کوچکی از شمال غربی کشور بقیه مناطق جزء مناطق خشک و نیمه خشک محسوب می شوند و مناطق خشک کشور از مناطق نیمه خشک وسعت بیشتری

دارند (اهدایی، ۱۳۷۲). متوسط بارندگی در کشور حدود ۲۵۰ میلی متر است که این مقدار یک سوم متوسط بارندگی در جهان است. با توجه به اینکه گردو بیشتر در نواحی خشک و نیمه خشک کشور کشت و کار می شود، شناسایی نواحی ژنومی مرتبط با تحمل به تنش خشکی و انتخاب ژنوتیپ های مقاوم به خشکی در گردو ضروری به نظر می رسد.

شناسایی سیستماتیک مکان یابی صفات کمی^۱ در گیاهان اولین بار توسط گروه Steven Tanksley توصیف شد (Paterson et al., 1988). از آن زمان به بعد مکان یابی صفات کمی به طور گسترده در گیاهان برای بررسی ژنتیکی زیست توده، محصول و صفات مقاومت به بیماری استفاده شد (Bernardo, 2008). (Rönnberg-Wästljung et al., 2005) چند مکان صفات کمی کنترل کننده را در هیبرید *Salix dasyclados* × *Salix viminalis* که اثر زیادی بر بازده مصرف آب داشتند شناسایی کردند. Steffen et al. (2013) پس از بررسی ۱۰ پروونانس از دانهال های *Pinus sylvestris* L. در یک آزمایش گلخانه ای برای مقایسه تنش خشکی و شرایط بدون تنش خشکی نشان دادند که رشد ریشه های تمام منشأها تحت رژیم خشکی به طور چشمگیری کاهش یافت. (Dubos and Plomion 2003) ۴۸ ژن مرتبط با خشکی را در دانهال های *Pinus pinaster* Ait. شناسایی کردند. بسیاری از این ژن ها با پروتئین های مربوط به عملکردهای شناخته شده در گیاهان، مانند تأثیر پروتئین ها در فتوسنتز، متابولیسم کربوهیدرات، سنتز دیواره سلولی و دفاع گیاه مطابقت داشتند. (Gonzalez-Martinez 2006) با استفاده از عدم تعادل لینکاژی ۱۸ ژن را برای تحمل خشکی در *Pinus taeda* شناسایی کردند که اکثر این ژن های متحمل به تنش خشکی، غیر از *ccoamt-1* و *erd3* نشان دهنده انتخاب طبیعی بودند.

در سال های اخیر روش مکان یابی ارتباطی^۲ یا

¹ Quantitative trait locus

² Association mapping

گیاهان استفاده می‌شود (Ghavami et al., 2011).

در روش MLM هم ساختار جمعیت و هم روابط خویشاوندی بین افراد (ماتریس K) با استفاده از چند نشانگر پیش‌بینی شده و در مدل به‌عنوان متغیرهای کمکی^۵ استفاده می‌شوند. تجزیه ارتباط در گیاهان مختلفی مانند جو (Kraakman et al., 2006)، گندم (Ghavami et al. 2011; Zhang et al., 2012)، ذرت (Andersen et al., 2007)، کاج *Pinus taeda* (Chang et al., 1996)، سیب *Malus domestica* (Cevik et al., 2009) BORKH. و *Eucalyptus nitens* (Thumma et al., 2004) *Eucalyptus globules* استفاده شده است.

در مطالعه‌ای (Neale and Savolainen 2004) نشان دادند که مکان‌های ژنی انتخاب‌شده به‌کمک روش تجزیه ارتباطی دارای مزایای مهمی از قبیل داشتن سطوح مناسب از تنوع نوکلئوتیدی و همچنین امکان ارزیابی دقیق فنوتیپ نتاج است که می‌توانند در برنامه‌های گزینش نشانگر استفاده شوند. با این حال مکان‌یابی ارتباطی ممکن است همیشه برای تمام گونه‌ها امکان‌پذیر نباشد، زیرا تفاوت‌های بیولوژیکی عمده‌ای حتی در درون یک گونه وجود دارد. البته شایان ذکر است که برخلاف درختان میوه و گیاهان زراعی، جمعیت‌های مربوط به درختان جنگلی، ساختار ژنتیکی ساده‌ای ندارند و بنابراین استفاده از روش تجزیه ارتباط در درختان جنگلی به‌منظور شناسایی ارتباطات نشانگر-صفت بسیار مفید است (Awais Khan et al., 2012).

با توجه به اینکه تاکنون از تجزیه ارتباطی در گردوی ایرانی برای شناسایی نشانگرهای مرتبط با تغییرات صفات فیزیولوژیک و مورفولوژیک تحت

تجزیه ارتباطی^۱ معرفی شده است که نه تنها امکان مکان‌یابی دقیق و مطمئن ژن‌ها و مکان‌های کنترل‌کننده صفات کمی را فراهم می‌کند، بلکه امکان شناسایی نواحی کروموزومی دیگری را که در مطالعات مبتنی بر پیوستگی امکان‌پذیر نیستند نیز میسر می‌سازد. در این روش، تهی، جمعیت در حال تفرق که نیاز به زمان زیادی دارد، ضرورتی ندارد. از طرف دیگر کراسینگ اورهایی که در حین تهیه جمعیت‌های در حال تفرق صورت می‌گیرد، محدود است که این امکان مکان‌یابی دقیق را فراهم نمی‌سازد (Bressegello and Sorrells, 2006). روش تجزیه ارتباط، روشی جایگزین برای غلبه بر محدودیت‌های استفاده از مکان‌یابی صفات کمی است. در این روش همبستگی بین ژنوتیپ و فنوتیپ صفات مورد مطالعه در افراد غیرمرتبط بررسی می‌شود برخلاف مکان‌یابی صفات کمی، در این روش از یک منبع جمعیتی وسیعی استفاده می‌شود (Bressegello and Sorrells, 2006; Ersoz and Bukler, 2007; Myles et al., 2009). ساختار جمعیت، اندازه نمونه و فراوانی آللی خاص ممکن است توانایی این روش در شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات را تحت تأثیر قرار دهد و موجب ارتباطات دروغین نشانگر-صفت^۲ شود (Zhang et al., 2012). به‌منظور به حداقل رساندن نتایج دروغین در مطالعات مرتبط با تجزیه ارتباط لازم است ابتدا ساختار جمعیت و روابط خویشاوندی در جمعیت مورد استفاده مطالعه شده و در تجزیه ارتباط لحاظ شود (Yu and Buckler, 2006). روش‌های GLM^۳ و MLM^۴ به‌منظور تجزیه ارتباط پیشنهاد شده است. در روش GLM ساختار جمعیت (ماتریس Q) با استفاده از چند نشانگر که به‌صورت تصادفی در ژنوم توزیع شده‌اند پیش‌بینی شده و در تجزیه ارتباط به‌عنوان کواریت در مدل وارد می‌شود. از این‌رو در این روش نتایج حاصل از ارتباطات دروغین بین نشانگر-صفت به حداقل می‌رسد. امروزه روش آماری MLM به‌طور گسترده‌ای برای تجزیه ارتباط در

¹ Association analysis

² False marker-trait associations

³ General linear model

⁴ Mixed linear model

⁵ Covariate

شرایط تنش خشکی استفاده نشده است، این تحقیق در راستای بررسی تنوع ژنتیکی دانه‌های گردو و ارزیابی پتانسیل روش تجزیه ارتباط به‌منظور شناسایی نشانگرهای SSR مرتبط با برخی صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک تحت شرایط نرمال و خشکی اجرا شد.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر شامل دو بخش است. در بخش نخست با آزمایش اولیه‌ای بر روی ۳۲ دانه‌ال گردوی ایرانی سطح تنش خشکی مناسب مشخص شد و در بخش دوم تنش خشکی ۵۰ درصد بر روی ۳۰ دانه‌ال گردوی ایرانی اعمال و صفات فیزیولوژیکی مربوط به هر یک از پایه‌ها اندازه‌گیری شد. پس از آن DNA کل نمونه‌های گیاهی شامل ۶۲ دانه‌ال به‌روش CTAB (Doyle and Doyle, 1990) استخراج و با نشانگرهای SSR ارزیابی شد. به‌منظور شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی تجزیه ارتباط به‌روش MLM انجام گرفت. عملیات آزمایشگاهی در آزمایشگاه ژنومیکس پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه صورت گرفت.

تعیین سطح تنش خشکی

به‌منظور تعیین سطح تنش خشکی دانه‌ال‌های گردو، ۳۲ دانه‌ال دوساله با ژنوتیپ‌های مشخص و همگن از نهالستان تهیه شده و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با هشت تکرار (چهار تیمار) بررسی شدند. شرایط تنش خشکی در سه تیمار (سه سطح) اعمال شد و در تیمار شاهد آبیاری به‌صورت ۱۰۰ درصد به‌اجرا درآمد. برای اعمال تنش با استفاده از تانسیومتر، مکش خاک در رطوبت‌های وزنی مختلف محاسبه شد و با رسم منحنی رطوبتی خاک، مقدار آب لازم در ظرفیت زراعی و تخلیه رطوبتی ۷۵، ۵۰ و ۲۵ درصد به‌دست آمد. سپس رطوبت

گلدان‌های تحت تنش به ۵۰، ۷۵ و ۲۵ درصد تخلیه رطوبتی رسید، درحالی‌که گلدان‌ها در تیمار شاهد از طریق آبیاری منظم در محدوده ظرفیت زراعی نگهداری شدند. یک ماه پس از آبیاری تیمارهای مختلف میزان فتوسنتز، تعرق، هدایت روزنه‌ای و غلظت CO_2 اتاقک زیر روزنه با استفاده از دستگاه تبادلات گازی (IRGA) (مدل LCA4، شرکت ADC انگلستان) اندازه‌گیری شد. بدین منظور اندازه‌گیری‌ها در یک محدوده از تابش فعال فتوسنتزی ثبت شد (منجم و همکاران، ۱۳۹۰). پس از تجزیه و تحلیل داده‌ها مشخص شد که تنش در محدوده ۵۰ درصد تخلیه رطوبتی، دانه‌ال‌های گردو را به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر قرار داده و صفات اندازه‌گیری‌شده را کاهش می‌دهد. در مرحله بعد ۳۰ دانه‌ال گردوی دوساله دیگر تحت تنش ۵۰ درصد تخلیه رطوبتی قرار گرفتند و تعداد برگ سبز، میزان فتوسنتز، تعرق، هدایت روزنه‌ای و غلظت CO_2 اتاقک زیر روزنه با استفاده از دستگاه تبادلات گازی (IRGA) در شرایط نرمال و تنش در یک محدوده از تابش فعال فتوسنتزی محاسبه شد. سپس تنوع ژنتیکی کل نمونه‌های گیاهی (۶۲ نمونه) شامل بخش اول (۳۲ نمونه) و بخش دوم (۳۰ نمونه) با نشانگرهای SSR ارزیابی شد و تجزیه ارتباط به‌منظور شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی در مرحله قبل از اعمال تنش بر روی کل نمونه‌ها (۶۲ نمونه) و در مرحله بعد از اعمال تنش، بر روی ۳۸ نمونه انجام گرفت که شامل ۸ دانه‌ال مربوط به تیمار ۵۰ درصد آبیاری از ۳۲ نمونه بخش اول به‌علاوه کل ۳۰ دانه‌ال بخش دوم تحت تیمار ۵۰ درصد آبیاری بودند.

نشانگرهای SSR

در این تحقیق از ۱۰ جفت آغازگر SSR (Woeste et al., 2002; Dangl et al., 2005) استفاده شد (جدول ۱). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

گروه‌بندی دانه‌های مورد مطالعه با استفاده از تجزیه کلاستر به‌روش Neighbor Joining با نرم‌افزار Tassel 3.0 (Bradbury and Zhang, 2011) انجام گرفت. به‌منظور تعیین زیرگروه‌های احتمالی و بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت، از نرم‌افزار Structure 2.3.1 (Pritchard *et al.*, 2000) در دو مرحله استفاده شد. مرحله اول آنالیزها قبل از اعمال تنش بر روی ۶۲ دانه‌ها گردو در حالت Admixture با ۵۰۰۰۰ بار Burn-in و ۵۰۰۰۰ تکرار MCMC^۱ در مقادیر مختلف K (از ۱ تا ۲۰ و ۱۰ تکرار برای هر K) و مرحله دوم آنالیزها بعد از اعمال تنش بر روی ۳۸ دانه‌ها گردوی ایرانی در حالت Admixture با ۱۰۰۰۰ بار Burn-in و ۵۰۰۰۰ تکرار MCMC در مقادیر مختلف K (از ۱ تا ۱۰ و ۱۰ تکرار برای هر K) انجام گرفت. عدد K بهینه براساس روش ΔK در هر دو مرحله محاسبه و تعیین شد. میانگین شاخص تثبیت (Fst) و ماتریس سهم عضویت (Q) برای مقدار بهینه K با استفاده از همین نرم‌افزار محاسبه شد. از ماتریس روابط خویشاوندی^۲ استفاده شد و همچنین به‌منظور شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات مورد مطالعه در شرایط نرمال و تنش از تجزیه ارتباط به‌روش MLM در نرم‌افزار Tassel 3.0 بهره گرفته شد.

نتایج

نتایج آزمون t جفتی نشان داد که مقدار تمامی مشخصه‌های فتوسنتز، تعرق، هدایت روزنه‌ای و غلظت CO₂ اتاقک زیر روزنه در تمام تیمارها در طول تنش کاهش یافته است، ولی کاهش این پارامترها در تیمار اول (۱۰۰ درصد آبیاری) و تیمار دوم (۷۵ درصد آبیاری) معنی‌دار

به‌روش (Dangl *et al.*, 2005) در دستگاه ترموسایکلر (Applied Biosystem, USA) در حجم ۲۰ میکرولیتری شامل ۲۰ نانوگرم DNA ژنومی، بافر استخراج 10X، کلرید منیزیم ۲۵ میلی‌مول، ۰/۲ میلی‌مول از هر dNTPs، یک واحد آنزیم DNA polymerase Taq و یک میکرومول از هر کدام از آغازگرهای مستقیم (Forward) و معکوس (Reverse) انجام گرفت. چرخه حرارتی واکنش‌های PCR شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵۰ ثانیه، اتصال در دمای مناسب برای هر جفت آغازگر به مدت ۴۰ ثانیه، بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه و در پایان چرخه‌ها بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت هفت دقیقه انجام گرفت. الکتروفورز محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز سه درصد با ولتاژ ۸۰ به‌مدت دو تا سه ساعت انجام گرفت و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید صورت پذیرفت و عکس‌برداری با استفاده از دستگاه ژل داکيومنت بیورد (Gel logic 212 pro, Carestream, Bio Rad, USA) انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

در بخش اول آزمایش تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها برای صفات مورد مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS 21 انجام گرفت. باندهای حاصل از نشانگرهای SSR به‌صورت هم‌بارز امتیازدهی شدند و شاخص‌های مرتبط با تنوع ژنتیکی شامل میانگین هتروزیگوتی مورد انتظار (He) و مشاهده شده (Ho)، شاخص اطلاعاتی شانون (I)، تعداد آلل‌های مؤثر (Ne) و آزمون کای اسکور به جهت بررسی انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ برای مکان‌های SSR با استفاده از نرم‌افزار GenA1Ex 6.4 (Peakall and Smous, 2006) محاسبه شد.

¹ Marker Chain Monte Carlo

² Kinship matrix

معنی‌دار ($P\text{-value} < 0.05$) میزان فتوسنتز، تعرق و هدایت روزنه‌ای بعد از اعمال تنش نسبت به قبل از آن مشاهده شد، درحالی‌که کاهش غلظت CO_2 اتاقک زیر روزنه معنی‌دار نبود (جدول ۱).

نبود. در تیمار سوم (۵۰ درصد آبیاری) اختلاف میزان فتوسنتز و تعرق در شرایط قبل و بعد از اعمال تنش خشکی معنی‌دار بود و سایر پارامترها اختلاف معنی‌داری نشان ندادند. در تیمار چهارم (۲۵ درصد آبیاری) نیز کاهش

جدول ۱- میانگین صفات فیزیولوژیک اندازه‌گیری شده دانه‌های گردو تحت تیمارهای مختلف آبیاری قبل و بعد از اعمال تنش خشکی

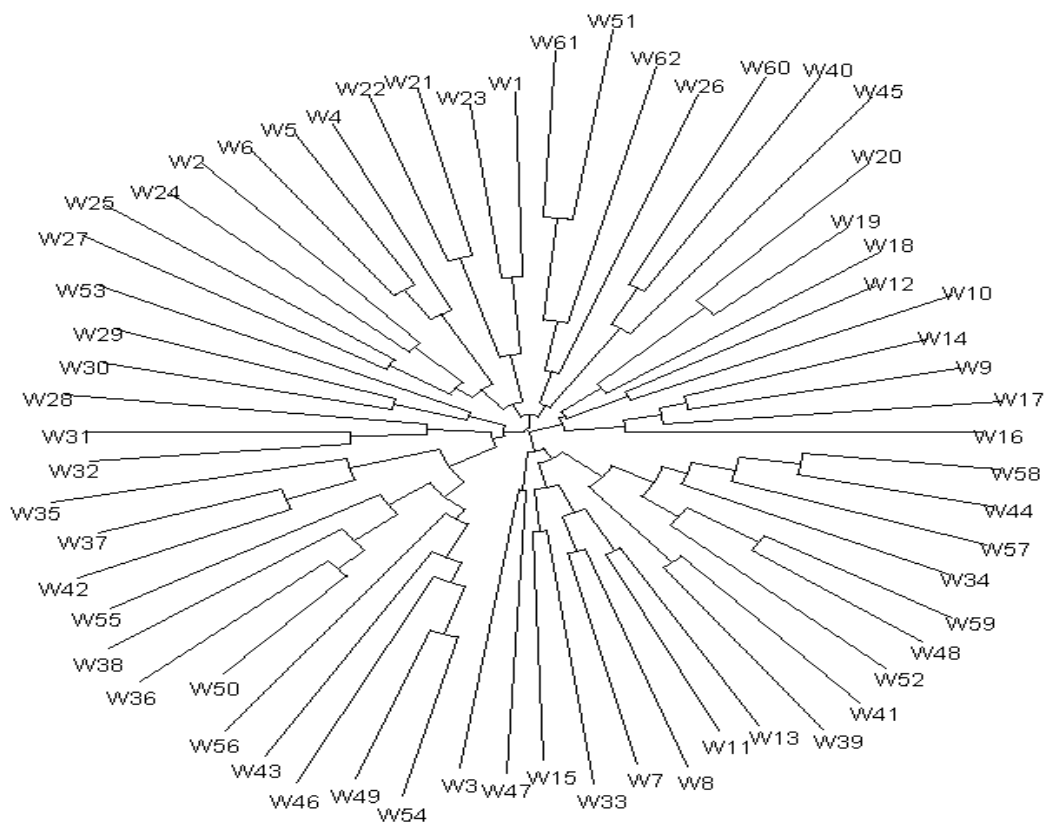
تیمار	میانگین فتوسنتز ($\mu\text{mol.m}^{-2}\text{ s}^{-1}$)		میانگین تعرق ($\text{mmol.m}^{-2}\text{ s}^{-1}$)		میانگین هدایت روزنه‌ای ($\text{mmol.m}^{-2}\text{ s}^{-1}$)		میانگین غلظت CO_2 اتاقک زیر روزنه (ppm)	
	قبل از تنش	بعد از تنش	قبل از تنش	بعد از تنش	قبل از تنش	بعد از تنش	قبل از تنش	بعد از تنش
۱ (۱۰۰ درصد آبیاری)	۶/۵۰	۶/۳۵	۰/۹۵	۰/۹۳	۱۷/۶۶	۱۷/۸۳	۱۷۴/۰۰	۱۷۵/۵۰
۲ (۷۵ درصد آبیاری)	۷/۱۳	۶/۱۶	۰/۹۲	۰/۸۱	۱۴/۲۹	۱۲/۲۴	۲۵۹/۱۱	۲۵۵/۷۸
۳ (۵۰ درصد آبیاری)	۶/۲۳	۴/۵۷	۰/۸۰	۰/۶۵	۱۲/۲۶	۷/۴۴	۲۵۰/۲۲	۲۳۲/۲۲
۴ (۲۵ درصد آبیاری)	۶/۴۲	۳/۸۹	۱/۱۶	۰/۷۰	۱۵/۴۳	۶/۹۲	۱۸۰/۰۰	۱۵۸/۶۷
کل	۶/۵۷	۵/۲۱	۰/۹۶	۰/۷۷	۱۴/۸۳	۱۰/۹۲	۲۱۷/۰۳	۲۰۶/۴۰

دندروگرام حاصل از روش Neighbor-Joining، ۶۲ دانه‌های گردو را در چهار گروه اصلی قرار داد (شکل ۱). به‌منظور بررسی ساختار جمعیت و تعیین زیرگروه‌های احتمالی در جمعیت مورد مطالعه از نرم‌افزار Structure 2.3.1 استفاده شد. پس از محاسبه مقادیر مختلف K (براساس روش ΔK)، در شرایط قبل از اعمال تنش خشکی (۶۲ نمونه) مقدار $K=2$ و در شرایط تنش (۳۸ نمونه) $K=3$ مناسب‌ترین عدد برای محاسبه متوسط شاخص تثبیت (Fst) برای هر گروه برآورد شد. در بارپلات ارائه‌شده برای ۶۲ نمونه (شکل ۲) محور افقی مربوط به دانه‌ها و محور عمودی سهم تعلق هر فرد به هر گروه را نشان می‌دهد. همچنین در این پلات هر گروه با رنگی متمایز مشخص شده است که دو رنگ مجزا از هم برای هر فرد نشان‌دهنده تعلق آن فرد به یکی از دو گروه یا هر دو گروه است.

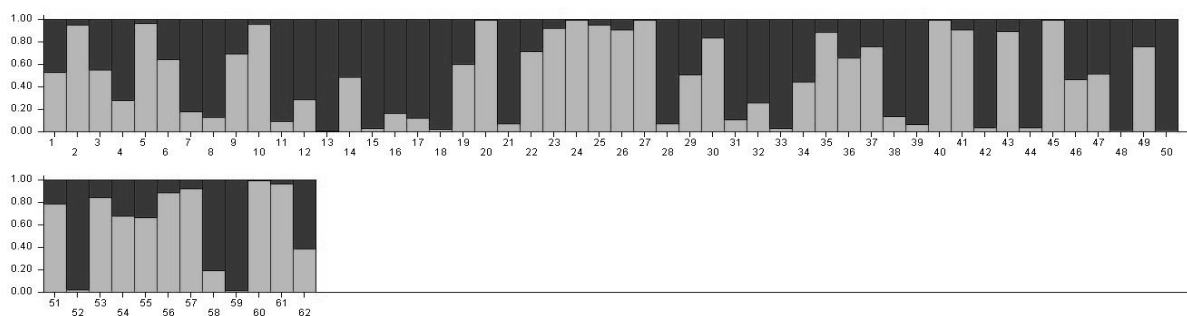
ده مکان SSR در مجموع ۵۳ آلل در ۶۲ دانه‌های گردو تولید کرد. کمترین و بیشترین تعداد آلل، به ترتیب مربوط به مکان‌های WGA69، WGA71 (چهار آلل) و WGA1 (هفت آلل) بود. تعداد آلل‌های موثر از ۲/۸۵ تا ۵/۷۹ متغیر و میانگین آن ۴/۳۰ بود که کمترین و بیشترین مقدار آن به ترتیب مربوط به مکان‌های WGA71 و WGA202 بود. میانگین هتروزیگوتی مشاهده‌شده در تمام مکان‌های ژنی ۰/۴۶ بود. که مکان WGA276 بیشترین میزان این شاخص را نشان داد. میانگین هتروزیگوتی مورد انتظار در جمعیت مطالعه‌شده برای ۱۰ مکان SSR، ۰/۷۶ بود. همچنین کمترین و بیشترین میزان هتروزیگوتی مورد انتظار به ترتیب توسط مکان‌های WGA71 و WGA202 تولید شد (جدول ۲). همه مکان‌های SSR مورد مطالعه در جمعیت انحراف معنی‌داری ($p \leq 0.01$) از تعادل هاردی-واینبرگ نشان دادند.

جدول ۲- شاخص‌های مرتبط با تنوع ژنتیکی برای نشانگرهای SSR در جمعیت گردوی مورد مطالعه

نشانگر	دمای اتصال (°C)	تعداد آلل (Na)	تعداد آلل موثر (Ne)	شاخص شانون (I)	هتروزیگوتی مشاهده شده (Ho)	هتروزیگوتی مورد انتظار (He)
WGA1	۵۸	۷	۴/۹۱	۱/۷۲	۰/۰۸	۰/۸۰
WGA4	۵۸	۵	۳/۷۹	۱/۳۸	۰/۰۲	۰/۷۴
WGA9	۵۷	۶	۵/۱۰	۱/۷۱	۰/۷	۰/۸۰
WGA69	۵۸	۴	۳/۲۹	۱/۲۸	۰/۷۳	۰/۷۰
WGA71	۵۹	۴	۲/۸۵	۱/۱۷	۰/۰۰	۰/۶۵
WGA89	۵۸	۵	۳/۹۵	۱/۴۶	۰/۴۰	۰/۷۵
WGA118	۵۹	۵	۴/۰۱	۱/۴۹	۰/۶۳	۰/۷۵
WGA202	۶۰	۶	۵/۷۹	۱/۷۷	۰/۸۵	۰/۸۳
WGA276	۵۸	۶	۵/۲۴	۱/۷۱	۰/۸۸	۰/۸۱
WGA321	۵۷	۵	۴/۰۳	۱/۴۹	۰/۳۲	۰/۷۵
میانگین		۵/۳	۴/۳۰	۱/۵۲	۰/۴۶	۰/۷۶



شکل ۱- دندروگرام ۶۲ دانهال گردو با استفاده از روش Neighbor-Joining براساس ۱۰ مکان SSR



شکل ۲- بار پلات رسم شده توسط نرم افزار Structure 2.3.1 بر مبنای داده‌های حاصل از ۱۰ مکان SSR، محور افقی مربوط به دانه‌هاست و محور عمودی سهم تعلق هر فرد به هر گروه را نشان می‌دهد.

بیشترین میزان تغییرات صفت فتوسنتز را توجیه می‌کرد ($R^2=0/55$). بیشترین تنوع مربوط به صفت تعداد برگ سبز با $R^2=0/40$ توسط نشانگر WGA1 تبیین می‌شد. در شرایط تنش فقط نشانگر WGA1 ارتباط معنی‌داری ($P \leq 0.05$) با صفت غلظت CO_2 اتاقلک زیر روزنه‌ای نشان داد ($R^2=0.64$). ارتباط معنی‌داری بین سایر نشانگرهای و صفات مورد مطالعه در شرایط تنش وجود نداشت.

نتایج تجزیه ارتباط به روش MLM نشان داد که بین نشانگرهای SSR و صفات تعداد برگ سبز، تعرق، هدایت روزنه‌ای و فتوسنتز در شرایط نرمال ارتباط معنی‌داری وجود دارد (جدول ۳). بین صفات تعداد برگ سبز، تعرق، هدایت روزنه‌ای و فتوسنتز با مکان‌های ژنی WGA69، WGA9 و WGA1 ارتباط معنی‌داری وجود داشت. در مجموع ۱۰ آلل و سه مکان از ۱۰ نشانگر ریزماهواره ارتباط معنی‌داری با تغییرات چهار صفت داشتند. نشانگر WGA9

جدول ۳- نشانگرهای SSR مرتبط با صفات مطالعه شده در شرایط قبل از اعمال تنش خشکی در دانه‌های گردو

P-value	R^2	مکان ژنی	Trait
			Number of green leaves
۰/۰۱*	۰/۴۰	WGA1	(تعداد برگ سبز)
			Transpiration
۰/۰۱*	۰/۵۰	WGA9	(تعرق $mmol.m^{-2} s^{-1}$)
			Conductance
۰/۰۳*	۰/۴۵	WGA69	(هدایت روزنه‌ای $mmol.m^{-2} s^{-1}$)
			Photosynthesis
۰/۰۱*	۰/۵۵	WGA9	(فتوسنتز $\mu mol.m^{-2} s^{-1}$)
۰/۰۱*	۰/۴۹	WGA69	

* معنی داری در سطح ۵ درصد

بحث

پژوهش (Karimi et al. 2008) بر روی ۲۸ ژنوتیپ از چهار توده گردوی ایرانی در استان همدان با استفاده از ۱۱ نشانگر SSR، میانگین تعداد آلل‌های مشاهده‌شده در هر توده برای کلیه مکان‌های ژنی جمعیت‌های گردو ۳/۵۵-۲/۹۱ با میانگین ۳/۲۵ بود و میانگین شاخص شانون برای کلیه توده‌ها ۰/۹۳ بود. تفاوت موجود به احتمال زیاد به دلیل گزینش برای صفات مطلوب در جمعیت‌های گردو در استان همدان و بنابراین کاهش تنوع آلی در این جمعیت‌ها و همچنین کم بودن تعداد نمونه‌های مطالعه‌شده است. در پژوهشی دیگر (Fornari et al. 2001) با بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های گردوی آسیایی و اروپایی با استفاده از نشانگرهای آلوزایم و ایزوزایم ۲/۲۹-۲/۱۴ آلل در هر جمعیت شناسایی کردند. این تفاوت و کم بودن میانگین تعداد آلل‌های مشاهده‌شده در پژوهش (Fornari et al. 2001) ممکن است به توانایی بیشتر نشانگر SSR در نشان دادن چندشکلی ژنتیکی در جمعیت‌ها نسبت به آلوزایم و ایزوزایم مرتبط باشد. در مطالعه کنونی، همه مکان‌های SSR مورد استفاده، انحراف معنی‌داری را از تعادل هاردی-واینبرگ نشان دادند. طبق قانون تعادل هاردی-واینبرگ احتمال دارد این انحراف به دلیل گزینش دانه‌های مورد بررسی برای پرورش در نهالستان به صورت انتخابی و بر اساس یک رشته ویژگی‌های خاص و منحصر به فرد صورت گرفته باشد برای مثال صفاتی گزینش شوند که سبب افزایش هموزیگوتی در دانه‌های گردو شده باشد و یا ممکن است به دلیل محدود کردن جمعیت‌ها در انتخاب دانه‌های مناسب برای پرورش باشد. تجزیه ساختار جمعیت و تأیید گروه‌بندی با استفاده از روش Admixture، دو گروه احتمالی را در ۶۲ نمونه شناسایی کرد، ولی مقادیر کم Fst و ضرایب تعلق افراد به گروه‌ها نشان داد که تمام دانه‌های گردوی بررسی شده به جز تعداد اندکی به هر دو گروه تعلق داشتند. شباهت زیاد و عدم تمایز کافی بین گروه‌های احتمالی ممکن است حاکی از وجود

در این تحقیق تنوع ژنتیکی ۶۲ دانه‌های گردو با استفاده از ۱۰ مکان SSR مطالعه شد. در مجموع ۵۳ آلل در این جمعیت شناسایی شد که تعداد آلل‌ها از چهار تا هفت به ازای هر مکان ژنی متغیر بود. (Dangle et al. 2005) از ۱۴ نشانگر SSR برای شناسایی ۴۷ ژنوتیپ گردوی ایرانی و یک پایه هیبرید استفاده کرده و به ازای هر مکان ژنی سه تا هشت آلل را شناسایی کردند. (Victory et al. 2006) با کاربرد همین نشانگرها در آمریکا ۴۶ تا ۹۰ آلل به ازای هر مکان ژنی در گردوی سیاه مشاهده کردند. برای تمام مکان‌های ژنی تعداد آلل گزارش شده توسط این پژوهشگران بیشتر از مقدار مشاهده‌شده در تحقیق حاضر بود. این تفاوت در تعداد آلل‌ها ممکن است ناشی از وحشی بودن توده‌های گردوی سیاه و عدم دخالت‌های بشری و تفاوت در شرایط محیطی آنها باشد. در بررسی تنوع ژنتیکی ۲۸ ژنوتیپ گردوی ایرانی با استفاده از ۱۱ نشانگر SSR توسط (Karimi et al. 2008) در مجموع ۴۷ آلل شناسایی شد که تعداد آلل در هر مکان از ۲ تا ۹ متغیر بود. حداقل و حداکثر تعداد آلل در این مطالعه به ترتیب در مکان‌های WGA71 (۲ آلل) و WGA276 (۹ آلل) بود. که در تحقیق حاضر نیز کمترین آلل در مکان WGA71 مشاهده شد. در پژوهشی دیگر که توسط (Mahmoodi et al. 2013) بر روی ۱۶ نمونه از بانک ژن و ۵ رقم از گردوی ایرانی در ارومیه انجام گرفت، میانگین تعداد آلل‌ها در هر مکان ۴/۲۵ گزارش شد که با میانگین تعداد آلل در هر مکان در تحقیق حاضر با توجه به زیاد بودن تعداد نمونه‌های مورد مطالعه (۵/۳) تا حدودی مطابقت دارد. تطابق این پژوهش با تحقیق حاضر به این دلیل است که در هر دو بررسی از گردوهایی استفاده شد که شرایط محیطی یکسان و احتمالاً منشأ مادری مشابهی دارند و میانگین تعداد آلل‌های مشاهده‌شده در گردوهای تحقیق حاضر ۵/۳ و میزان شاخص شانون ۱/۵۲ بود. در حالی که در

پایه‌های مادری مشابه و گرده‌افشانی یکنواخت و همچنین پدیده دگرگشتی موجود بین دانه‌های گردو باشد (Fornari *et al.*, 1999).

مکان‌یابی ارتباطی براساس مبنای ژنتیکی مرتبط با صفات متنوع به‌طور موفقیت‌آمیزی در درختان جنگلی انجام گرفته است. اطلاعات نشانگری به-دست‌آمده از نقشه‌های پیوستگی، محدودیت‌هایی همچون در دسترس نبودن جمعیت‌های در حال تفرق، نبود لینکاژ مناسب بین صفات گیاهی و نشانگرهای مولکولی و زمان ناکافی، کارایی این نقشه-ها را در زمینه شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات گیاهی کاهش می‌دهد (Gupta *et al.*, 2005). با توجه به اینکه روش تجزیه ارتباطی با از بین بردن این محدودیت‌ها و همچنین با در نظر گرفتن ساختار و روابط خویشاوندی (روش MLM) و حذف ارتباط دروغین نشانگر-صفت، اطلاعات نشانگری مناسبی را در اختیار محققان قرار می‌دهد، در این تحقیق از روش MLM برای بررسی ارتباط نشانگر-صفت در دانه‌های گردوی ایرانی (*Juglans regia* L.) استفاده شد. و مشخص گردید که در شرایط قبل از اعمال تنش، خشکی فتوسنتز ارتباط معنی‌داری را با دو مکان ژنی WGA9 و WGA69 نشان داد. درحقیقت قبل از اعمال تنش فتوسنتز تحت کنترل تعداد ژن‌های بیشتری است. درحالی‌که بعد از اعمال تنش مکان ژنی WGA1 غلظت CO₂ اتاقلک زیر روزنه را کنترل می‌کند. در شرایط کمبود آب به‌علت آنکه جذب CO₂ از طریق روزنه‌ها کاهش می‌یابد، تثبیت کربن و در نتیجه مقدار فتوسنتز کم می‌شود (Cakmak, 2002). بسته شدن روزنه‌ها در طی تنش گرچه به‌منظور کاهش هدررفت آب صورت می‌گیرد، به‌واسطه مانع از ورود CO₂ می‌تواند فتوسنتز را به کمتر از نقطه جبرانی کاهش دهد (Francisco *et al.*, 1995). در نتیجه در مطالعه حاضر وجود مکان ژنی WGA1 در گیاهان تحت تنش می‌تواند اهمیت زیادی در مقاومت به خشکی آنها داشته باشد. در شرایط نرمال نشانگر

WGA9 بیشترین میزان تغییرات صفت فتوسنتز را توجیه کرد ($R^2=0.55$) و در شرایط تنش نیز فقط نشانگر WGA1 ارتباط معنی‌داری ($P \leq 0.05$) با صفت غلظت CO₂ اتاقلک زیر روزنه‌ای نشان داد ($R^2=0.64$). همچنین ارتباط معنی‌داری بین مکان ژنی WGA9 با صفات تعرق و فتوسنتز و بین مکان ژنی WGA69 با صفات هدایت روزنه‌ای و فتوسنتز در شرایط نرمال وجود دارد که به خاصیت پلپوتروپی (ژن‌های چنداثره) یا پیوستگی مکان‌های کنترل‌کننده صفات ربط داده شد (Nicholas *et al.*, 2008).

درختان جنگلی با گستره وسیعی از صفات مختلف می‌توانند خشکی را تحمل کنند. توانایی تحمل خشکی در درختان، وابسته به توانایی آنها برای به حداقل رساندن هدررفت آب و افزایش جذب آب است (Chaves *et al.*, 2003). بررسی‌های مربوط به پاسخ‌های ژنتیکی درختان جنگلی به خشکی با هدف بهبود شناسایی ژن‌های متحمل به خشکی آغاز شد. برای مثال تعدادی از ژن‌های کنترل‌کننده مرتبط با خشکی اولین بار در کاج تدا *Pinus taeda* از طریق تجزیه و تحلیل cDNA (DNA کلروپلاستی) تعدادی از ژن‌های مربوط به استرس خشکی مشخص شدند و توانستند چهار مکان مربوط به کمبود آب را شناسایی کنند. براساس تشابه توالی ژن‌های مشخص‌شده، تصور شد که اکثر این ژن‌ها در تقویت دیواره سلولی برای سازگاری به شرایط کمبود آب نقش دارند (Chang *et al.*, 1996). (Rönberg-Wästljung *et al.*, 2005) تعدادی مکان صفات کمی در *Quercus robur* L. و (Brendel *et al.*, 2008) ۱۰ مکان صفات کمی کنترل‌کننده را که اثر زیادی بر بازده مصرف آب (WUE) داشتند شناسایی کردند. تنوع آنها نشان‌دهنده پیچیدگی تحمل به تنش خشکی در گونه‌های درختی جنگلی است که توسط ژن‌های زیادی کنترل می‌شود.

همچنین مکان‌یابی ارتباطی در اسکن کل ژنوم *Picea glauca* و پلی مورفیسم تکنوکلوتیدی

منابع

اهدایی، بهمن، ۱۳۷۲. انتخاب برای مقاومت به خشکی در گندم، مجموعه مقالات اولین کنگره زراعت و اصلاح نباتات ایران، ۱۵-۱۸ شهریور، تهران، ۴۳-۴۶.

حسینی، داراب، جمال عاطفی، روح‌الله حق‌جویان، رعنا دستجردی، منصوره کشاورزی، محمدرضا مظفری، اصغر سلیمانی، علیرضا رحمانیان، فرامرز نعمت‌زاده و علی مالعیر، ۱۳۹۱. معرفی رقم Cultivar Release جمال، رقم جدید گردوی ایرانی برای کاشت در مناطق معتدل سرد ایران، مجله به-نژادی نهال و بذر، ۳ (۱-۲۸): ۵۲۵-۵۲۷.

منجم، سالار، علی احمدی و ولی‌اله محمدی، ۱۳۹۰. اثر تنش خشکی بر میزان فتوسنتز، تسهیم مواد پرورده و عملکرد دانه ارقام کلزا، مجله علوم زراعی ایران، ۱۳ (۳): ۵۳۳-۵۴۷.

Andersen, J.R., I. Zein, G. Wenzel, B. Krützfeldt, J. Eder, M. Ouzunova, and T. Lübberstedt, 2007. High levels of linkage disequilibrium and associations with forage quality at a Phenylalanine Ammonia-Lyase locus in European maize (*Zea mays* L.) inbreds, *Theoretical and Applied Genetics*, 114:307-319.

Awais Khan, K., and S.K. Schuyler, 2012. Association mapping in forest trees and fruit crops, *Experimental Botany*, 63(11): 4045-4060.

Bernardo, R., 2008. Molecular markers and selection for complex traits in plants: learning from the last 20 years, *Crop Science*, 48: 1649-1664.

Bradbury, P.J., Z. Zhang, D.E. Kroon, T.M. Casstevens, Y. Ramdoss, and E.S. Buckler, 2011. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples, *Bioinformatics*, 26:2633-2635.

(SNP) در گستره وسیعی ارزیابی شد و به‌عنوان نشانگرهای ژنتیکی برای اهداف مربوط به نقشه‌برداری به‌کار رفت (Namroud *et al.*, 2008). امروزه نقشه ژنتیکی بسیاری از درختان جنگلی تولید شده و بسیاری از مکان‌های صفات کمی برای صفات مرتبط با خشکی شناخته شده است و به‌سرعت در ارقامی مانند هیبریدهای بید (*Salix dasyclados* × *Salix viminalis*) رو به رشد است (Hamanishi and Campbell, 2011). با توجه به نتایج حاصل، می‌توان از نشانگر WGA1 که پیوستگی زیادی را در شرایط تنش با صفت غلظت CO₂ اتاقت زیر روزنه‌ای (R²=0.64) نشان داد، در برنامه‌های اصلاحی گردو برای شناسایی و گزینش واریته‌های مقاوم به خشکی استفاده کرد. البته بهتر است این نشانگرها قبل از استفاده در برنامه‌های اصلاحی در ژرم‌پلاسما بزرگی از دانه‌های گردو ارزیابی و تأیید شوند تا اشتباهات ناشی از مکان‌یابی ارتباطی به حداقل برسد (Awais Khan and Schuyler, 2012). همچنین پیشنهاد می‌شود به‌منظور دسترسی به منابع دقیق و مورد اطمینان، از تعداد دانه‌ها و تعداد نشانگرهای SSR بیشتر و همچنین از نشانگرهای متنوع دیگر نیز استفاده شود تا نشانگرهای مرتبط با صفات مقاومت به خشکی با کارایی و اطمینان بیشتر شناسایی شود. همچنین باید ارزیابی فنوتیپی و یادداشت‌برداری صفات نیز در شرایط محیطی مختلف انجام گیرد تا نشانگرهای پیوسته‌ی پایدار در شرایط محیطی مختلف شناسایی شود. البته برای درک و اطمینان از وجود ارتباط پیوسته بین نشانگرها و صفات مختلف و همچنین شناسایی مکان‌های کنترل‌کننده این صفات بر روی کروموزوم‌ها، تهیه جمعیت‌های در حال تفرق مانند F₁ و دابل هاپلوئیدها^۱ ضروری است (Naghavi *et al.*, 2007).

¹ Double haploid

- Breseghe, F., and M.E. Sorrells, 2006. Association analysis as a strategy for improvement of quantitative traits in plants, *Crop Science*, 46: 1323-1330.
- Cakmak, I., 2002. The role of potassium in alleviating detrimental effects of abiotic stresses in plants. In: Proceedings of the IPI Congress on Feed the soil to feed the people: the role of potash in sustainable agriculture, 8-10.
- Cevik, V., C.D. Ryder, A. Popovich, K. Manning, G.J. King, and G. Seymour, 2009. A FRUITFULL-like gene is associated with genetic variation for fruit flesh firmness in apple (*Malus domestica* Borkh.), *Tree Genetics and Genomes*, 6: 271-279.
- Chang, S., J.D. Puryear, M.A.D.L. Dias, E.A. Funkhouser, R.J. Newton, and J. Cairney, 1996. Gene expression under water deficit in loblolly pine (*Pinus taeda*): isolation and characterization of cDNA clones, *Physiologia Plantarum*, 97: 139-148.
- Chaves, M.M., J.P. Maroco, and J.S. Pereira, 2003. Understanding plant responses to drought—from genes to the whole plant, *Functional Plant Biology*, 30: 239-264.
- Dangl, G.S., K.E. Woeste, M.K. Aradhya, A. Koehmstedt, C. Simon, D. Potter, C.A. Leslie, and G.H. McGranahan, 2005. Characterization of fourteen microsatellite markers for genetic analysis and cultivar identification of walnut, *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130(3): 348-354.
- Doyle, J.J., and J.L. Doyle, 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue, *Focus*, 12: 13-15.
- Dubos, C., and C. Plomion, 2003. Identification of water-deficit responsive genes in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) roots, *Plant Molecular Biology*, 51: 249-262.
- Ducci, F., A. Rogatis, and R. Proietti, 1997. Protezione delle risorse genetiche di *Juglans regia* L., *Annali Istituto Sperimentali Selvicoltura*, 26: 35-55.
- Ersoz, E.S., J. Yu, and E.S. Buckler, 2007. Applications of linkage disequilibrium and association mapping in crop plants. In: RK Varshney, R Tuberosa, eds, Genomics-assisted crop improvement, *Genomics approaches and platforms*, 1: 97-119.
- FAO, 2014. The state of food and agriculture, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Fornari, B., F. Cannata, M. Spada, and M.E. Malvolti, 1999. Allozymes analysis of genetic diversity and differentiation in European and Asiatic walnut (*Juglans regia* L.) populations, *Forest Genetic*, 6: 115-127.
- Fornari, B., M.E. Malvolti, D. Taurchini, S. Fineschi, I. Beritognolo, E. McCaglia, and F. Cannata, 2001. Isozyme and organellar DNA analysis of genetic diversity in natural/naturalized European and Asiatic walnut (*Juglans regia* L.) populations, *Acta Horticulturae*, 544: 167-178.
- Francisco, I.P., L.S. Endolz, and J. Pardos, 1995. Constraints by water stress on plant growth. In: M. Pessarkli (ed.), *Plant and crop stress*, 247-260.
- Ghanadha, M.R., M. Zahravi, and K. Vahdati, 2003. Breeding Horticultural Crops. Dibagaran Tehran Press, (Translated in Persian), 344 pp.
- Ghavami, F., E.M. Elias, S. Mamidi, O. Ansari, M. Sargolzaei, T. Adhikari, M. Mergoum, and S.F. Kianian, 2011. Mixed model association mapping for Fusarium head blight resistance in Tunisian-derived durum wheat populations, *G3: Genes/Genomes/Genetics*, 1:209-218.
- Gonzalez-Martinez, S.C., E. Ersoz, G.R. Brown, N.C. Wheeler, and D.B. Neale, 2006. DNA sequence variation and selection of tag single-nucleotide polymorphisms at candidate genes for drought-stress response in *Pinus taeda* L., *Genetics*, 172: 1915-1926.
- Gupta, P.K., S. Rustgi, and P.L. Kulwal, 2005. Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects, *Plant Molecular Biology*, 57: 461-485.
- Hamanishi, E.T., and M.M. Campbell, 2011. Genome-wide responses to drought in forest trees, *Forestry*, 84(3): 273-283.
- Hung, B., 2000. Role of root morphological and physiological characteristics in drought resistance of plant, *Plant Environmental Interaction*, 39-64.

- Karimi, R., A. Ershadi, and K. Vahdati, 2008. Analysis of genetic diversity among some Persian walnut Populations of Hamedan Province using SSR markers, *Plant Production Technology*, 9(2): 43-53.
- Kraakman, A.T.W., F. Martínez, B. Mussiraliev, F.A. Van Eeuwijk, and R.E. Niks, 2006. Linkage disequilibrium mapping of morphological, resistance, and other agronomically relevant traits in modern spring barley cultivars, *Molecular Breeding*, 17:41-58.
- Mahmoodi, R., F. Rahmani, and R. Rezaee, 2013. Genetic diversity among *Juglans regia* L. genotypes assessed by morphological traits and microsatellite markers, *Spanish Journal of Agricultural Research*, 11(2): 431-437.
- McGranahan, G.H., A. Charles, C.A. Leslie, H.A. Philips, and A. Dandaker, 1998. Walnut propagation. In: D. Ramos (ed.), *Walnut Production Manual*, University of California, DANR Publ., Davis, 71-83.
- Myles, S., J. Peiffer, P.J. Brown, E.S. Ersoz, Z. Zhang, D.E. Costich, and E.S. Buckler, 2009. Association mapping: critical considerations shift from genotyping to experimental design, *The Plant Cell*, 21: 2194-2202.
- Naghavi, M.R., M. Mardi, S.M. Pirseyedi, M. Kazemi, P. Potki, and M.R. Ghaffari, 2007. Comparison of genetic variation among accession of *Aegilops tauschii* using AFLP and SSR markers, *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54:237-290.
- Namroud, M.C., J. Beaulieu, N. Juge, J. Laroche, and J. Bousquet, 2008. Scanning the genome for gene single nucleotide polymorphisms involved in adaptive population differentiation in white spruce, *Molecular Ecology*, 17: 3599-3613.
- Neale, D.B., and O. Savolainen, 2004. Association genetic of complex traits in conifers, *Trend Plant Science*, 9: 325-330.
- Nicholas, K., K.R. Ukrainetz, D. Shawn, and D. Mansfield, 2008. Identification of quantitative trait loci for wood quality and growth across eight full-sib coastal Douglas-fir families, *Tree Genetics and Genomes*, 4: 159-170.
- Paterson, A.H., E.S. Lander, J.D. Hewitt, S. Peterson, S.E. Lincoln, and S.D. Tanksley, 1988. Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms, *Nature*, 335: 721-726.
- Peakall, R., and P.E. Smouse, 2006. GENALEX 6.4: Genetic analysis in Excel, Population genetic software for teaching and research, *Molecular Ecology Notes*, 6: 288 - 295.
- Pritchard, J.K., M. Stephens, and P. Donnelly, 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data, *Genetics*, 155: 945-959.
- Pressoir, Y.J.G., W.H. Briggs, B.I. Vroh, and M. Yamasaki, 2006. A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness, *Nature Genetics*, 38:203-208.
- Reddy, A.R., K.V. Claitanya, and M. Vivekanadan, 2004. Drought induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism I higher plants, *Journal of Plant Physiology*, 161: 1189-1202.
- Rönnerberg-Wästljung, A.C., C. Glynn, and M. Weih, 2005. QTL analyses of drought tolerance and growth for a *Salix dasyclados* × *Salix viminalis* hybrid in contrasting water regimes, *Theoretical and Applied Genetics*, 110: 537-549.
- Steffen, T., F. Barbara, K. Monika, and M. Annette, 2013. Large-scale genetic structure and drought-induced effect on European Scots pine (*Pinus sylvestris* L.), *European Journal of Forest Research*, 132: 481-496.
- Thornsberry, J.M., M.M. Goodman, J. Doebley, S. Kresovich, D. Nielsen, and E.S. Buckler, 2001. Dwarf8 polymorphisms associate with variation in flowering time, *Nature Genetics*, 28: 286-289.
- Thumma, B.R., M.F. Nolan, R. Evans, and G.F. Moran, 2005. Polymorphisms in Cinnamoyl CoA Reductase (CCR) are associated with variation in microfibril angle in *Eucalyptus* spp, *Genetics*, 171: 1257-1265.

Victory E.R., J.C. Glaubitz, O.E. Rhodes, and K.E. Woeste, 2006. Genetic homogeneity in *Juglans nigra* (Juglandaceae) at nuclear microsatellites, *American Journal of Botany*, 93: 118-126.

Woeste, K., R. Burns, O. Rhodes, and C. Michler, 2002. Thirty polymorphic nuclear microsatellite loci from black walnut, *Journal of Heredity*, 93: 58-60.

Yu, J.M., and E.S. Buckler, 2006. Genetic association mapping and genome organization of maize, *Current Opinion in Biotechnology*, 17:155-160.

Zaharieva, M., E. Gaulin, M. Havaux, E. Ac evedo, and P. Monneveeux, 2001. Drought and heat responses in the wild wheat relative *Aegilops geniculata* Roth, *Crop Science*, 41: 1321-1329.

Zhang, Q., C. Wu, F.Y. Ren, and C. Zhang, 2012. Association analysis of important agronomical traits of maize inbred lines with SSRs, *Journal of Crop Science*, 6: 1131-1138.

Association analysis of some physiological traits in Persian walnut under drought stress by SSR markers

A. Taheri¹, N. Seyedi^{2*}, and B. Abdollahi Mandoulakani^{3,4}

¹ M.Sc. in Forestry, Faculty of Natural Resources, Urmia University, I. R. Iran

² Assistant Prof., Forestry Department, Faculty of Natural Resources, Urmia University, I. R. Iran

³ Associate Prof., Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, I. R. Iran

⁴ Department of Agricultural Biotechnology, Institute of Biotechnology, Urmia University, I. R. Iran

(Received: 17 December 2014, Accepted: 13 June 2015)

Abstract

Walnut has a high economic value because of the good quality of wood and fruits. So this species has been harvested since many years ago till today and has been introduced as a protected species. The performance of *Juglans regia* increases in wet years, but reduces in dry years, hence paying attention to physiological and morphological parameters in order to identify the genomic regions related to drought resistant is important for breeding programs in walnut. In this study, genetic diversity by SSR markers has been evaluated. Also, the association of used primers with physiological and morphological traits were analyzed before and after drought stress. 10 SSR primer pairs generated 53 alleles in 62 walnut seedlings. All loci showed significant difference ($p \leq 0.01$) from the Hardy-Weinberg. Dendrogram of the Neighbour-Joining method showed that 62 walnut seedlings divided to four main groups. Analyses of population structure by Structure 2.3.1 software identified two sub populations ($k=2$). Based on association mapping analysis, by using MLM (mixed linear model) method, transpiration, conductance and photosynthesis have been controlled by WGA9 and WGA69 loci in normal condition. In stress condition WGA1 loci showed relationship with CO₂ concentration that was covered %75 of variations of this trait. The results of this study can be used in breeding programs of *Juglans regia* to identify drought resistant varieties.

Keywords: Drought stress, Genetic diversity, Mixed linear model, Physiological traits.