بررسی تنوع ژنتیکی برخی توده‌های گردوی ایرانی (*Juglans regia*) استان همدان با استفاده از نشانگر مولکولی SSR

Analysis of Genetic Diversity Among Some Persian Walnut (*Juglans regia*) Populations of Hamedan Province Using SSR Markers

روح‌الله کریمی[1]، احمد ارشادی[2*] و کورش وحدتی[3]

چکیده

ایران به‌عنوان یکی از منابع غنی ذخایر ژنتیکی گردو در جهان به حساب می‌آید. بررسی تنوع ژنتیکی موجود در این ذخایر ژنتیکی جهت شناسایی و معرفی ژنوتیپ‌های برتر اولین گام در هر برنامه مرتبط با حفاظت و توسعه پایدار کشت گونه‌های گیاهی است. نشانگر SSR به‌دلیل داشتن مزایای فراوان از جمله چند شکلی بالا و وراثت هم‌بارز نشانگر ایده‌آل در شناسایی ارقام و مطالعه روابط ژنتیکی توده‌ها، خصوصاً در گیاهان هتروزیگوت دگرگشن مانند گردو می‌باشند. در این پژوهش تنوع و ساختار ژنتیکی چهار توده گردو مشتمل بر 28 ژنوتیپ در استان همدان با استفاده از 11 نشانگر SSR بررسی و در مجموع 47 آلل چند شکل شناسایی شد. میانگین تعداد آلل‌های مشاهده شده به ازای هر مکان ژنی معادل 4/3 آلل بود. تعادل هاردی- واینبرگ درون توده‌ها برقرار بود ولی بین توده‌ها در بیشتر مکان‌های ژنی برقرار نشد که ممکن است ناشی از فشار گزینش و انتخاب طبیعی در شرایط اقلیمی مختلف باشد. بیش‌ترین فاصله ژنتیکی بین توده‌های تویسرکان و ملایر و کم‌ترین آن بین توده‌های تویسرکان و سرکان بود. بر اساس شاخص شانون توده‌های همدان و ملایر به‌ترتیب دارای بیش‌ترین و کم‌ترین تنوع درون جمعیتی بودند. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضریب تشابه نی و به روش UPGMA، توده‌ها را به 2 گروه تقسیم کرد. دسته بندی توده‌ها با استفاده از داده‌های مولکولی با دسته بندی آن‌ها بر اساس موقعیت جغرافیایی انطباق پیدا کرد.

واژه‌های کلیدی: گردو، ساختار ژنتیکی، آغازگر، نشانگر SSR، تجزیه خوشه‌ای

Archive of SID

1و 2. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

3. دانشیار گروه باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

*: نویسنده مسئول Email: Ershadi@basu.ac.ir این مقاله بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول می باشد.

www.SID.ir

مقدمه

خانواده جوگلانداسه شامل 7 جنس و حدود 60 گونه درخت یک‌پایه و خزان‌دار است. جنس جوگلانس شامل 20 گونه درخت است که همگی میوه خوراکی تولید می‌کنند (*مک‌گراناهان* و *لسلی*[1]، 1990). در این میان گردوی ایرانی (*Juglans regia* L.) از نظر باغبانی بیشتر توسعه پیدا کرده و در سطح وسیع کشت می‌شود. این گونه یک‌پایه و باد گرده افشان است که توسط روش تولید مثلی مبتنی بر دگرگشنی متمایز می‌شود. این ویژگی ناشی از ناهم‌رسی گل‌های گردو بوده که مانع از خویش آمیزی می‌شود (*فورناری*،[2] و همکاران، 1999). گردو از گذشته‌های بسیار دور در ایران کشت و کار شده و ژنوتیپ‌های خودروی آن در جنگل‌های شمال و غرب به وفور یافت می‌شود. اکثر ژنو تیپ‌های موجود بذری بوده و به‌روش جنسی تکثیر می‌شوند. بررسی ساختار ژنتیکی این ژنو تیپ‌ها جهت شناسایی، انتخاب و نگهداری ذخایر ژنی آنها حائز اهمیت می‌باشد (وحدتی، 2001).

از روش‌های مختلفی برای بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین قرابت ژنتیکی بین ارقام و توده‌های گردوی اروپایی و آسیایی و شناسایی ارقام تجاری گردو استفاده شده است که از آن جمله می‌توان به بررسی شاخص‌های مورفولوژیک (حق‌جویان،1381؛ *اورل*[3] و همکاران، 2003)، آلوزایم (*فورناری* و همکاران ،1999)، ایزوزایم (*فورناری* و همکاران 2001)، نشانگر RFLP (*علای*[4] و همکاران، 1992)، نشانگر RAPD (*نایسیس*[5] و همکاران، 1998)، نشانگرAFLP (*بایزیت*[6]، 2007) و نشانگر ISSR (پوتر[7]، 2006) اشاره کرد.

در شیوه سنتی، ارزیابی تنوع ژنتیکی بر اساس خصوصیات فنولوژیک و مورفولوژیک صورت می‌گیرد، این روش زمان‌بر بوده و به خصوص در مورد درختان میوه تعدادی از صفات تحت تاثیر تغییرات محیطی قرار می‌گیرد. روش‌های مولکولی فرصت جدیدی برای توصیف ژنتیکی ارقام و ژنوتیپ‌های گیاهی فراهم کرده است. نشانگر SSR به‌دلیل داشتن مزایای فراوان از جمله چند شکلی بالا و وراثت هم‌بارز (ارشادی، 1381) نشانگر کارآمد در شناسایی ارقام، انگشت نگاری "دی ان آ"، تعیین تنوع ژنتیکی و بررسی روابط ژنتیکی توده‌ها (*وانگ*[8]، 2005)، به خصوص در گیاهان هتروزیگوت دگرگشن (*گیلفورد*[9]، 1997) مانند گردو می باشند. با توجه به غنی بودن ذخایر ژنتیکی گردو در استان همدان و جایگاه ویژه این استان در تولید گردو تا کنون اطلاعات ژنتیکی در مورد توده‌های گردوی ایرانی در این استان بر اساس این نشانگر مولکولی گزارش نشده است و بررسی تنوع ژنتیکی میان و درون توده‌های گردوی ایرانی در این استان به‌عنوان یک نیاز احساس می‌شود. لذا با توجه به اهمیت تعیین تنوع ژنتیکی ارقام گیاهی به‌عنوان یک مطالعه پایه و هم‌چنین کارایی بالای نشانگر مولکولی SSR در این زمینه، در پژوهش حاضر تنوع ژنتیکی توده‌های گردوی ایرانی در استان همدان با استفاده از این نشانگر بررسی شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

مطالعه حاضر طی سال‌های 86-84 و در دو مرحله عملیات صحرایی شامل نمونه برداری از برگ‌های تازه سرشاخه‌های جوان درختان چهار توده گردوی ایرانی در استان همدان (تویسرکان، سرکان، ملایر و همدان) و کارهای آزمایشگاهی شامل استخراج DNA، تکثیر با دستگاه PCR، الکتروفورز و غیره در آزمایشگاه باغبانی و بیوتکنولوژی دانشگاه بوعلی سینا همدان انجام شد. توده‌های مورد بررسی در عرض جغرافیایی 59-49 درجه شمالی و 34 درجه طول جغرافیایی واقع شده بودند. درختانی که حداکثر 15 کیلومتر با هم فاصله داشتند به‌عنوان یک توده در نظر گرفته شدند و فاصله درختان انتخاب شده در داخل هر توده حداقل 100 متر بود. بسته به تراکم درختان در هر منطقه، از هر توده به‌طور تصادفی 9-6 درخت (ویکتوری[10]، 2006) و در مجموع از 4 توده 28 درخت انتخاب و درختان پلاک کوبی شدند. در اوسط مرداد ماه از هر درخت 6-4 برگ تازه جمع‌آوری و در داخل ازت مایع منجمد شد و برای استخراج DNA به آزمایشگاه منتقل شدند.

استخراج DNA

استخراج DNA به روش دویل و دویل[11](1989) با اندکی تغییرات انجام شد. کمیت و کیفیت DNA با دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز روی ژل آگارز تعیین گردید. در این پژوهش 11 جفت آغازگر SSR مورد استفاده قرار گرفت که مشخصات آن‌ها در جدول 1 آورده شده است.

1. McGranahan & Leslie
2. Fornari *et al.*
3. Orel *et al.*
4. Aly *et al.*
5. Niceses *et al.*
6. Bayazit
7. Poter
8. Wang
9. Guilford
10. Victory
11. Doyel and Doyel

Archive of SID
www.SID.ir

جدول 1: مشخصات آغازگرهای SSR استفاده شده در این تحقیق

Table 1: Characteristics of the SSR primers used in this study

مکان ژنی Locus	توالی آغازگرها Primers sequence	دمای اتصال Annealing temperature (°C)	منبع Reference
WGA001	F: TTGGAAGGGAAGGGAAATG	56	Dangel et al. 2005
	R: CGCGCACATACGTAAATCAC		
WGA009	F: CATCAAAGCAAGCAATGGG	56	Dangel et al. 2005
	R: CCATTGCTCTGTGATTGGG		
WGA089	F: ACCCATCTTTCACGTGTGTG	60	Dangel et al. 2005
	R: TGCCTAATTAGCAATTTCCA		
WGA202	F: CCCATCTACCGTTGCACTTT	59	Dangel et al. 2005
	R: GCTGGTGGTTCTATCATGGG		
WGA225	F: AATCCCTCTCCTGGGCAG	53	Dangel et al. 2005
	R: TGTTCCACTGACCACTTCCA		
WGA276	F: CTCACTTTCTCGGCTCTTCC	56	Dangel et al. 2005
	R: GGTCTTATGTGGGCAGTCGT		
WGA321	F: TCCAATCGAAACTCCAAAGG	58	Dangel et al. 2005
	R: GTCCAAAGACGATGATGGA		
WGA332	F: ACGTCGTTCTGCACTCCTCT	56	Dangel et al. 2005
	R: GCCACAGGAACGAGTGCT		
WGA349	F: TGGCGAAAGTTTATTTTTTGC	55	Dangel et al. 2005
	R: ACAAATGCACAGCAGCAAAC		
WGA32	F: CTCGGTAAGCCACACCAATT	57	Woeste et al. 2002
	R: ACGGGCAGTGTATGCATGTA		
WGA71	F: ACCCGAGAGATTTCTGGGAT	57	Woeste et al. 2002
	R: GGACCCAGCTCCTCTTCTCT		

بهینه سازی شرایط و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR)

واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز با اندکی تغییرات نسبت به روش *دانگل*[1] و همکاران (2005) در حجم 15 میکرولیتر شامل 25 نانوگرم DNA، 0/2 میلی‌مولار آغازگر، 2 میلی‌مولار کلرید منیزیم، 200 میکرومولار dNTPs، نیم واحد تک دی ان آ پلیمراز و یک برابرغلظت بافر PCR بود. تکثیر در یک دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت اپندورف با چرخه-های حرارتی شامل واسرشته سازی اولیه در دمای 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه و 30 چرخه شامل واسرشته سازی در دمای 94 درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک دقیقه، اتصال در دمای مناسب هر آغازگر (جدول 1) به مدت 1 دقیقه، بسط در دمای 72 درجه سانتی‌گراد به‌مدت 40 ثانیه و بسط نهایی در 72 درجه سانتی‌گراد به‌مدت 2 دقیقه انجام شد. قبل از الکتروفورز 5 میکرولیتر دای فرمامید شامل80% (حجم به حجم) فرمامید، 10 میلی‌مولار EDTA، یک میلی-گرم در میلی‌لیتر زایلن سیانول و یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر برومو فنول بلو به هر یک از تیوپ‌های حاوی محصولات PCR اضافه شد و لوله‌ها تا انجام الکتروفورز در یخچال با دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. نمونه‌ها قبل از بارگذاری روی ژل به‌مدت 5 دقیقه در دمای94 درجه سانتی‌گراد واسرشته شده و الکتروفورز با استفاده از دستگاه الکتروفورز عمودی مدل Plan. Sci.1400 و روی ژل پلی اکریل آمید واسرشته ساز6% (7 مولار اوره + بافر تی بی ئی 5 برابر غلظت) و در شرایط 60 وات و 1500 ولت به‌مدت یک ساعت انجام شد. برای آشکار سازی باندها، رنگ‌آمیزی ژل به روش نیترات نقره (*باسام*[2] و همکاران، 1991) انجام شد.

1. Dangel

2. Bassam

Archive of SID

www.SID.ir

تجزیه داده‌ها

قطعات تکثیر شده توسط جفت آغاز گرها امتیاز بندی شدند. به این منظور سبک‌ترین باند به‌عنوان اولین آلل و با حرف A و با افزایش اندازه باندها از حروف دیگر استفاده شد. داده‌های به‌دست آمده از امتیاز دهی آلل‌ها به‌صورت انفرادی وارد نرم افزار شد. شاخص‌های زیر برای ارزیابی تنوع ژنتیکی توده‌های گردوی ایرانی محاسبه شد: تعداد آلل‌های در هر مکان ژنی، تعداد آلل‌های موثر، درصد مکان‌های ژنی چند شکل، هتروزیگوسیتی قابل انتظار، هتروزیگوسیتی مشاهده شده، انحراف از تعادل هاردی - واینبرگ برای هر مکان ژنی در هر توده و برای هر مکان ژنی در کل توده‌ها با استفاده از آزمون F *رایت*[1] (1978) و معنی‌دار شدن انحراف از تعادل هاردی - واینبرگ با استفاده از آزمون کای- اسکوار (*وانگ*، 2005). برای گروه بندی توده‌ها، از تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضریب تشابه *نی*[2] (1978) و الگوریتم UPGMA انجام گرفت. با این‌حال تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های گردو با استفاده از ضریب تشابه جاکارد انجام شد. تمام محاسبات با استفاده از نرم‌افزار POPGENE.Ver. 1.32 و NTSYS Ver.2.02 انجام گرفت.

نتایج

هر 11 جفت آغازگر SSR مورد استفاده الگوی نـواری چند شکل را در ژنوتیپ‌های گردو تکثیر کردند و در مجمـوع 47 آلل چند شکل در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه شناسایی شد. تعداد آلل‌ها در هر جایگاه ژنی از 2 تا 9 آلل بـا میـانگین 4/3 آلل متغیر بود. حداقل تعداد آلـل مشـاهده شـده مربـوط بـه مکان ژنی WGA71 (دو آلل) و حداکثر تعـداد آلـل مشـاهده شده مربوط به مکان ژنی WGA276 (9 آلل) بود. تعداد آلل-های موثر در مکان‌هـای ژنـی در محـدوده 1/97 تـا 5/89 بـا میانگین 3/35 بود. از 11 مکان ژنی تکثیـر شـده بـیش‌تـرین میـزان هتروزیگوسـیتی مشـاهده شـده مربـوط بـه مکـان ژنـی WGA321 و WGA32و معـادل 1 و کـم‌تـرین میـزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده مربوط به مکـان ژنـی WGA71 و WGA89 و معـادل 0/73 بـود. میـانگین هتروزیگوسـیتی مشاهده شده در تمام مکان‌های ژنی برابر 0/88 بود. میـانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده در تمام مکـان‌هـای ژنـی مـورد مطالعه بیشتر از هتروزیگوسیتی قابل انتظار بـود. بـیش‌تـرین میزان محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) مربوط به مکـان-هـای ژنـی WGA32 , WGA009 , GA276 و WGA225 و کم‌تـرین میـزان PIC مربـوط بـه مکـان ژنـی WGA71 بـود (جدول 2).

تنوع ژنتیکی درون توده‌ها بر اساس میانگین 11 مکان ژنی مورد بررسی در جدول 3 نشان داده شده است. توده‌های مورد بررسی از نظر تعداد آلل‌های مشاهده شده و تعداد آلل‌های موثر اختلاف قابل توجهی را نشان دادند. میانگین آلل‌های مشاهده شده در هر توده برای کلیه مکان های ژنی2/91 تا 3/55 با میانگین 3/25 بود. آلل موثر در هر توده از 2/43 تا 2/98 متغیر بوده و میانگین آن 2/70 بود. هتروزیگوسیتی مشاهده شده در محدوده 0/829 تا 0/915 با میانگین 0/877 بود. میانگین هتروزیگوسیتی قابل انتظار 0/652 و دامنه آن از 0/627 تا 0/677 در بین توده‌های مورد بررسی بود. بیش‌ترین و کم‌ترین میانگین محتوای اطلاعات چند شکلی به‌ترتیب مربوط به توده‌های گردوی همدان (0/636) و ملایر (0/579) بود. بالاترین میزان شاخص شنون، که نشان دهنده تنوع درون جمعیتی است، در توده گردوی همدان 1/11 و کم‌ترین مقدار این شاخص در توده گردوی تویسرکان 0/581بود. هم‌چنین توده همدان با میانگین 3/55 آلل و توده ملایر با میانگین 2/91 آلل به‌ترتیب بالاترین و پائین‌ترین تنوع آللی را به ازاء هر مکان ژنی داشتند (جدول 3). بررسی تعادل هاردی- واینبرگ درون هر توده نشان داد که اگر چه توده ملایر در دو مکان ژنی و توده‌های همدان، تویسرکان و سرکان هر کدام در یک مکان ژنی از تعادل هاردی- واینبرگ انحراف دارند ولی ژنوتیپ‌های درون این توده‌ها در اکثر مکان های ژنی از تعادل هاردی- واینبرگ تبعیت می‌کنند. بر خلاف این نتیجه، در بین توده‌ها در بسیاری از مکان‌های ژنی مقدار آماره کای اسکور معنی‌دار بوده و بیان‌گر انحراف از تعادل هاردی - واینبرگ بود.

تنوع ژنتیکی بین توده‌ها و ژنوتیپ‌ها با استفاده از ضریب تشابه *نی* (1978) مطالعه شده و تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA انجام گرفت. فاصله ژنتیکی بین توده‌ها بر اساس ضریب تشابه *نی* در جدول 4 نشان داده شده است. بیش‌ترین فاصله ژنتیکی بین توده‌های تویسرکان و ملایر 0/4 و کم‌ترین فاصله ژنتیکی بین توده‌های تویسرکان و سرکان 0/07 بود. توده همدان نیز فاصله ژنتیکی کمی با توده‌های تویسرکان و سرکان نشان داد.

1. Wright
2. Nei

Archive of SID
www.SID.ir

جدول2: شاخص‌های تنوع ژنتیکی به‌دست آمده در توده‌های گردوی ایرانی با استفاده از 11 مکان‌های ژنی SSR

Table 2: The obtained genetic parameters in Persian walnut populations with 11 SSR loci

مکان ژنی Locus	همozygوسیتی مشاهده شده Observed Hemozygosity	هتروزیگوسیتی مشاهده شده Observed Heterozygosity	همozygوسیتی مورد انتظار Expected Hemozygosity	هتروزیگوسیتی مورد انتظار Expected Heterozygosity	محتوای اطلاعات چند شکلی polymorphism information content	تعداد آلل های مشاهده شده Number of observed allels	تعداد آلل های موثر Number of effective allels
WGA276	0.1429	0.8571	0.1545	0.8455	0.8304	9	5.89
WGA009	0.1200	0.8500	0.1869	0.8131	0.7968	5	4.92
WGA32	0.0000	1.0000	0.2313	0.7687	0.7545	6	4.07
WGA089	0.2692	0.7308	0.4495	0.5505	0.5399	4	2.17
WGA321	0.0000	1.0000	0.3151	0.6849	0.6712	5	3.04
WGA225	0.0370	0.9630	0.2502	0.7498	0.7359	4	3.79
WGA001	0.0714	0.9286	0.3435	0.6565	0.6448	3	2.82
WGA332	0.0370	0.9630	0.3885	0.6165	0.6001	3	2.50
WGA349	0.2308	0.7692	0.3273	0.6727	0.6598	3	2.94
WGA71	0.2692	0.7308	0.4970	0.5030	0.4933	2	1.97
WGA202	0.1538	0.8462	0.3597	0.6403	0.6280	3	2.69
میانگین Mean	0.1210	0.8790	0.3185	0.6815	0.6676	4.27	3.35

Archive of SID

www.SID.ir

جدول3: تنوع ژنتیکی درون توده‌های گردوی ایرانی بر اساس 11 مکان ژنی SSR

Table 3: Genetic variation within Persian walnut populations based on 11 SSR loci

محتوای اطلاعات چند شکلی polymorphism information content	شاخص شنون Shannon index	هتروزیگوسیتی مورد انتظار expected heterozygosity	هتروزیگوسیتی مشاهده شده Observed Heterozygosity	آلل های موثر effective allels	آلل های مشاهده شده observed allels	توده Population
0.5794	0.9365	0.6268	0.9147	2.43	2.91	ملایر Malayer
0.6364	1.110	0.6873	0.8576	2.98	3.55	همدان Hamadan
0.5811	0.5811	0.6296	0.9074	2.52	3	تویسرکان Tuyserkan
0.6120	1.077	0.6624	0.8290	2.88	3.54	سرکان Serkan
0.6022	0.9262	0.6515	0.8771	2.70	3.25	میانگین Mean

Archive of SID

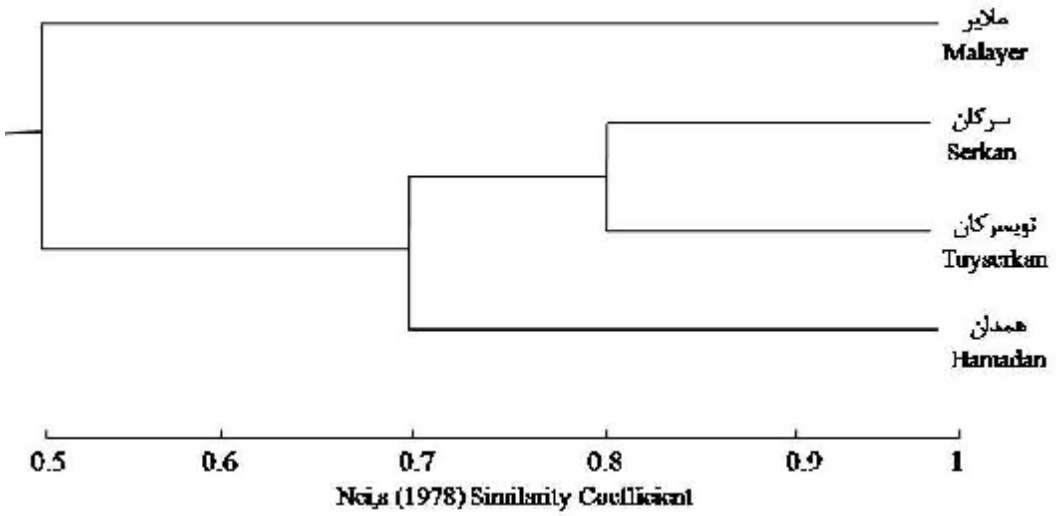
www.SID.ir

جدول 4: فاصله ژنتیکی بین توده‌های گردوی ایرانی بر اساس ضریب تشابه نی (1978) و روش UPGMA

Table 4: Genetic distance among Persian walnut populations based on Nei,s (1978) similarity coefficient and UPGMA method

توده Population	ملایر Malayer	همدان Hamadan	تویسرکان Tuyserkan	سرکان Serkan
ملایر Malayer	***			
همدان Hamadan	0.2207	***		
تویسرکان Tuyserkan	0.3999	0.1099	***	
سرکان Serkan	0.2508	0.0780	0.0717	***

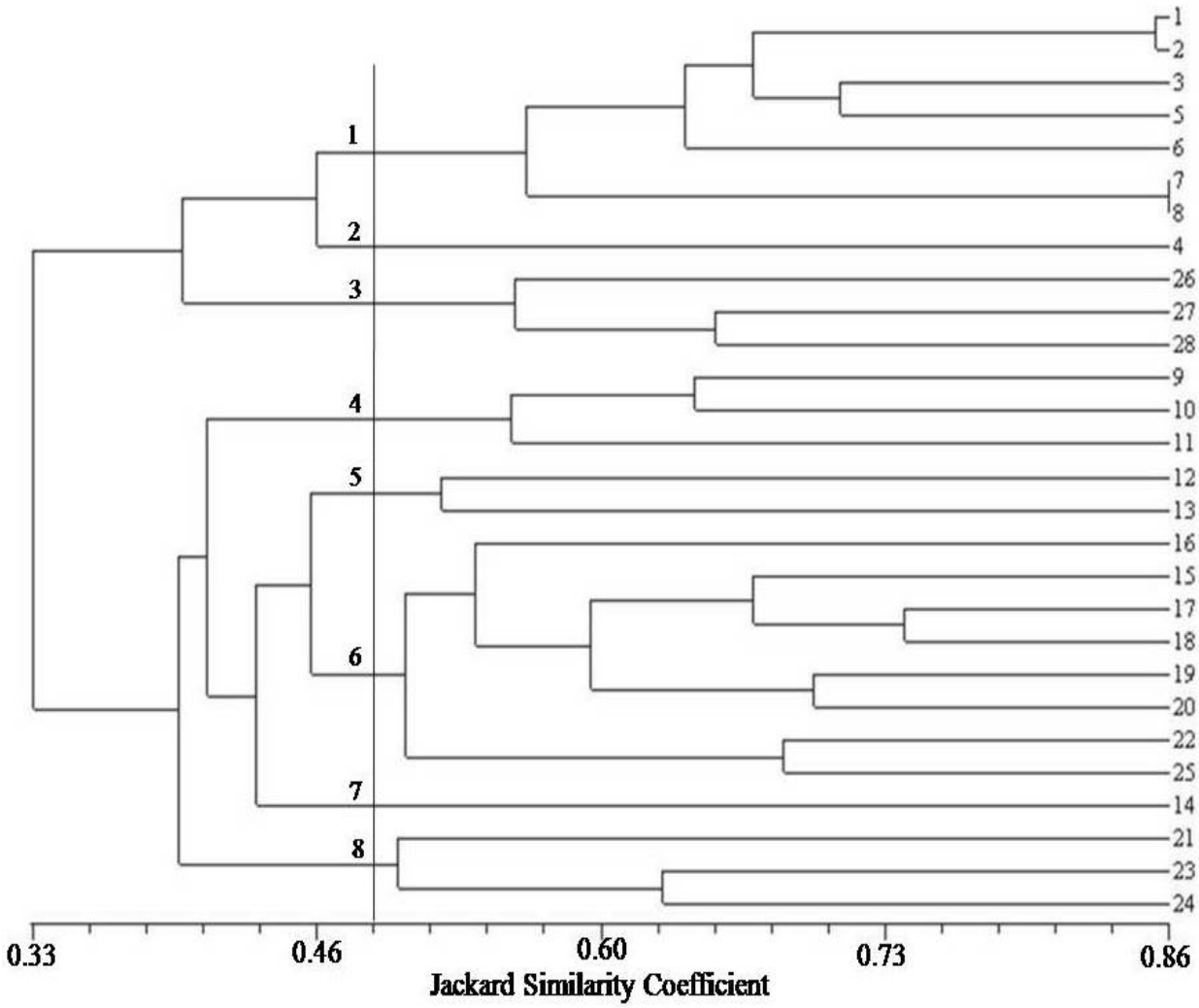
دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای اطلاعات 11 نشانگر SSR در توده‌های گردوی ایرانی با استفاده از ضریب تشابه نی و به روش UPGMA در شکل 1 نشان داده شده است. توده‌های مورد بررسی به دو گروه منطقی تقسیم شده‌اند. گروه اول شامل توده ملایر می‌باشد که به‌صورت مجزا قرار گرفته است. گروه دوم شامل توده‌های همدان، تویسرکان و سرکان است که در این گروه بیش‌ترین تشابه ژنتیکی مربوط به توده‌های سرکان و تویسرکان است که با هم در یک گروه قرار گرفتند و با توجه به نزدیکی جغرافیایی این مناطق، قرار گرفتن این سه توده در یک گروه قابل انتظار می‌باشد. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های گردوی مورد بررسی بر اساس ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA در شکل 2 آمده است. با قطع دندروگرام در ضریب تشابه 0/5، هشت گروه حاصل شد. در شکل 2 ژنوتیپ‌های شماره 1-7 مربوط به توده گردوی ملایر، شماره 8-14 مربوط به توده گردوی همدان، شماره 15-21 مربوط به توده گردوی تویسرکان و ژنوتیپ‌های شماره 22-28 مربوط به توده گردوی سرکان است. تمام ژنوتیپ‌های مربوط به توده ملایر به‌جز ژنوتیپ شماره 4 در یک گروه قرار گرفتند که نشان دهنده قرابت ژنتیکی در ژنوتیپ‌های این توده است. ژنوتیپ‌های همدان به‌صورت متفرق و در گروه‌های 1، 4، 5 و 7 قرار گرفتند. کلیه ژنوتیپ‌های تویسرکان به‌جز 21 در گروه شماره 6 قرار گرفتند. برخی ژنوتیپ‌های سرکان به‌صورت مجزا در گروه 3 و بقیه در کنار ژنوتیپ‌هایی از تویسرکان در گروه‌های 6 و 8 قرار گرفتند. ژنوتیپ‌های ملایر و تویسرکان تشابه درون جمعیتی بیشتری نشان دادند در صورتی‌که ژنوتیپ‌های همدان و سرکان تنوع بیشتری داشته و در چند گروه مجزا قرار گرفتند.



شکل 1: دندروگرام تنوع ژنتیکی بین توده‌های گردو ایرانی بر اساس ضریب تشابه نی (1978) و روش UPGMA

Figure 1: Dendrogram of genetic diversity among Persian walnut populations based on Nei,s (1978) Similarity Coefficient and UPGMA method

www.SID.ir



شکل 2: نمودار تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های گردوی ایرانی بر اساس ضریب جاکارد و روش UPGMA

Figure 2: Dendrogram of genetic diversity among Persian walnut population based on Jackard Similarity Coefficient and UPGMA method

بحث

در این پژوهش ثابت کردیم که نشانگرهای SSR توسعه یافته در گردوی سیاه (*Juglans nigra* L.) می‌تواند برای شناسایی تنوع و همبستگی ژنتیکی موجود در توده‌های گردوی ایرانی موثر واقع شود. از 11 مکان ژنی تکثیر شده، برای بررسی تنوع ژنتیکی در 28 ژنوتیپ از 4 توده طبیعی گردوی ایرانی در استان همدان استفاده شد که در مجموع توانستند 47 آلل با دامنه 9-2 آلل در هر مکان ژنی را شناسایی کنند. میانگین تعداد آلل‌ها برای هر مکان ژنی 4/27 بود. تعداد آلل‌های موثر به ازای هر مکان ژنی 5/89 - 1/97 و میانگین آن معادل 3/35 بود. *دانگل* و همکاران (2005) از 14 نشانگر SSR برای شناسایی 47 ژنوتیپ گردوی ایرانی و یک پایه هیبرید استفاده کردند و به ازای هر مکان ژنی 8-3 آلل را شناسایی کردند. *فورونی*[1] و همکاران (2006) با استفاده از 12 نشانگر SSR توانستند 8-3 آلل به ازای هر مکان ژنی را در گردوهای واقع در کامپانیای ایتالیا شناسایی کنند. بیشتر بودن تعداد آلل‌های مشاهده شده در هر مکان ژنی در این مطالعه می‌تواند به دلیل تنوع بالاتر توده‌ها و ژنوتیپ‌های گردوی موجود در ایران در مقایسه با ارقام و ژنوتیپ‌های خارجی باشد که این خود نیز احتمالاً ناشی از طبیعی بودن توده‌های مورد مطالعه و وجود والدهای متنوع در این توده‌ها می‌باشد که طی سال‌های متمادی منجر به ایجاد تلاقی‌های تصادفی و ایجاد تنوع شده است. ویکتوری و همکاران (2006) با کاربرد همین نشانگرها تعداد 90-46 آلل را به ازای هر مکان ژنی در گردوی سیاه مشاهده کردند.

1. Foroni

www.SID.ir

برای تمام مکان های ژنی تعداد آلل گزارش شده توسط این پژوهش‌گران بیشتر از مقدار مشاهده شده در مطالعه حاضر بود. این تفاوت در تعداد آلل‌ها می‌تواند ناشی از وحشی بودن توده‌های گردوی سیاه و عدم دخالت‌های بشری در آن‌ها، تفاوت در محیط اکو جغرافیایی و تعداد زیاد جمعیت های بررسی شده در مقایسه با این پژوهش باشد. چهار جفت آغازگر مربوط به مکان ژنی WGA32, WGA009, GA276 و WGA225بیش‌ترین محتوای اطلاعات چند شکلی را نشان داده و به‌عنوان آغازگرهای مفید و کار آمد برای بررسی تنوع ژنتیکی گردوی ایرانی معرفی می‌شوند. تاکنون کار ژنتیکی مبتنی بر نشانگر مولکولی SSR روی توده‌های گردوی ایرانی در ایران گزارش نشده است. حق‌جویان (1381) تنوع ژنتیکی توده‌های گردوی تویسرکان و چهار مجموعه گردوی کشور (کرج، شاهرود, ارومیه و مشهد) جمع‌آوری شده در کلکسیون کمال آباد مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر را با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیک و رپید مورد ارزیابی قرار داد و در نهایت گزارش داد که ژنوتیپ‌های مورد بررسی از تنوع ژنتیکی و مورفولوژیک بالایی برخوردارند و دلیل این تنوع را بذری بودن درختان گردو عنوان کرد. کلیه مکان‌های ژنی مورد بررسی چند شکلی نشان دادند. در مطالعات *دانگل* و همکاران (2005) برای شناسایی 47 ژنوتیپ گردوی ایرانی 91% از مکان‌های ژنی دارای چندشکلی بودند.

میانگین تعداد آلل‌های مشاهده شده در جمعیت‌های گردوی استان همدان 3/55-2/91 با میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده 0/88 بود. این در حالی‌است که *فورناری* و همکاران (2001) ضمن بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های گردوی آسیایی و اروپایی با استفاده از آلوزایم و ایزوزایم 2/29- 2/14 آلل در هر جمعیت شناسایی کردند و میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده در مطالعه آن‌ها معادل 0/4 بود. این تفاوت می‌تواند به توانایی بالاتر نشانگر SSR در نشان دادن چند شکلی ژنتیکی میان و درون جمعیت‌ها نسبت به آلوزایم و ایزوزایم مرتبط باشد. *وانگ* و همکاران (2005) با مقایسه سه نشانگر رپید، ایزوزایم و SSR در نوعی نوئل (*Picea asparata* L.) نشان دادند که بیش‌ترین چند شکلی نمایان شده مربوط به نشانگر SSR و کم‌ترین چند شکلی مربوط به ایزوزایم بود. هم‌چنین جمعیت‌های گردوی مورد بررسی توسط این پژوهش‌گران تحت دخالت بشری و گزینش برای صفات مطلوب قرار گرفته و لذا با گذشت زمان دچار رانش ژنتیکی شده‌اند که همین موضوع منجر به کاهش تنوع آللی درون این جمعیت‌ها شد. نتایج این بررسی‌ها نشان داد که گردوی ایرانی دارای هتروزیگوسیتی نسبتاً بالایی در سطح درون توده‌ای می‌باشند که این موضوع مربوط به روش تولید مثلی گردو و دگر گرده افشان بودن این گیاه است (*فورناری* و همکاران، 2001).

برقراری تعادل هاردی- واینبرگ درون توده‌ها می‌تواند به‌دلیل تکثیر جنسی و پدیده دگرگشنی در توده‌های گردوی ایرانی باشد و عدم برقراری این تعادل بین تعدادی از توده‌ها در برخی از مکان‌های ژنی به‌دلیل محدودیت در جریان ژنی و انتقال منابع ژنتیکی بین توده‌ها می‌باشد که این موضوع ناشی از جدایی جغرافیایی توده‌های مورد بررسی است. *فورونی* و همکاران (2006) نیز برقراری تعادل هاردی- واینبرگ درون توده‌ها را به درجه بالای دگرگشنی گردو مربوط دانستند. برقراری تعادل هاردی- واینبرگ درون همه توده‌ها و سطح هتروزیگوسیتی مناسب، حاکی از توانایی بالای گردوی ایرانی برای حفظ تنوع ژنتیکی حتی در حضور فرسایش ژنتیکی و عوامل برهم زننده تعادل جمعیت را تایید می‌کند (*فورناری* و همکاران، 2001). شاخص‌های ژنتیکی به‌دست آمده با نشانگر SSR سطوح بالایی از تنوع ژنتیکی را در همه توده‌های گردوی ایرانی تایید کرد.

این مطالعه نشان داد که تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای در توده‌های گردوی ایرانی در استان همدان وجود دارد. با وجود فاصله جغرافیایی نسبتاً کم بین توده‌ها، تنوع ژنتیکی مشاهده شده بین آن‌ها قابل ملاحظه بود. فاصله ژنتیکی بین توده‌ها به‌جزء در مورد توده ملایر در سایر موارد از فاصله جغرافیایی بین توده‌ها تبعیت می‌کرد. کم‌ترین فاصله ژنتیکی مربوط به جمعیت‌های تویسرکان و سرکان بود که با هم فاصله جغرافیایی کمی داشتند. نتایج این بررسی به‌خوبی نشان داد که 11 نشانگر SSR استفاده شده در این پژوهش دارای قابلیت‌های لازم برای ارزیابی تنوع ژنتیکی بین و درون توده‌ها و هم‌چنین شناسایی ژنوتیپ‌های گردوی ایرانی می‌باشند.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

ارشادی، ا. 1381. بررسی گرده افشانی و تشکیل میوه و ارزیابی ارقام سیب ایرانی با استفاده از نشانگرهای مولکولی. پایان‌نامه دکتری، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران.

حق‌جویان، ر. 1381. بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های گردوی تویسرکان و چهار مجموعه گردوی کشور با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیک و رپید (RAPD). رساله دکتری علوم باغبانی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات.

Aly, M. M., Robert, A., Fjellstrom, G., McGranahan, G. H. and Parfitt, E. 1992. Origin of walnut somatic embryos determine by RFLP and Isozyme analysis. Hort Science 27(1): 61-63.

Bassam, B. J., Caetano-Anolles G. and Gresshoff, P. T. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry.196: 80-83.

Bayazit, S., Kazan, K., Golbitti, S., Cevik, V., Ayanogla, H., and Ergul, A. 2007. AFLP analysis of genetic diversity in low chill requiring walnut (*Juglans regia* L.) genotyping from Hatay, Turkey. Scientia Horticulturae. 111: 394-398.

Dangl, G. S., Woeste, K. E. Aradhya, M. K. Koehmstedt, A., Simon, C., Potter, D., Leslie, C. A. and McGranahan, G. H. 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 Doyle, J. L. 1989. A rapid DNA isolation procedure from small quantities of fresh leaf tissues. Phytochemical Bulletin. 19:11-15.

Fornari, B., Canata, F., Spada, M. And Malvolti, M. E. 1999. Alozyme analysis of genetic diversity differentiation in European and Asiatic walnut (*Juglans regia* L.) populations .Forest Genetics. 6(9): 115-127.

Fornari, B., Malvolti, M. E., Taurchini, D., Fineschi, S., Beritognolo, I., McCaglia, E. And Cannata, F. 2001. Isozym and organellar DNA analysis of genetic diversity in natural/naturalised European and Asiatic walnut (*Juglans regia*) populations. Acta Horticulturae. 544: 167-178.

Foroni, I., Woeste, K., Monti, L. M. and Rao, R. 2006. Identification of 'Sorrento' walnut using simple sequence repeats (SSRs). Genetic Resources and Crop Evolution. 85: 311-321

Guilford, P., Prakash, S., Zhu, J. M., Rikkerink, E., Gardiner, S., Bassett. H. and Forster, R. 1997. Microsatellites in Malus × domestica (apple) : abundance, polymorphism and cultivar identification. Theoretical and Applied Genetics. 94: 249-254.

McGranahan, G. H. and Leslie, C. A. 1990. Walnut'' PP. . 907-951. In: Moore JN and Belington JR(eds). Genetic resourses of fruit and crop. Vol 2. ISSH, Wageningen.

Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetices. 89:583-590

Niceses, F. P., Hormaza, J. I. and McGranahan, G. H. 1998. Molecular characterization and genetic relatedness among walnut (*Juglans regia* L.) genotypes based on RAPD markers. Euphytica 101:199-206.

Orel, G.,. Marchant, A. D., McLeod, J. A. and Richards, G. D. 2003. Characterisation of 11 Juglandaceae genotypes basedon morphology cpDNA and RAPD. Hort Science. 38(6):1178-1183.

Potter, D., Gao, F., Aiello, G., Leslie, C. and McGranahan, G. H. 2002. Intersimple sequence repeat markers for fingerprinting and determining genetic relationships of walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. Journal of the American Society for Horticultural Science. 127:75-81.

Vahdati, K. 2000 .Walnut situation in Iran. Nucis-Newsletter. 9: 32-33.

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

Wang,Y., Lue, J., Xue, X., Korpelainen, H. and Li, C. 2005. Diversity of microsatellite markers in the population of *Picea asperata* originating from the mountains of China. Plant science. 168: 707-714.

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

Wright, s. 1978. Evalution and genetics of populations,PP.304-311. In: Weir, B. S. Variability within and among populations. Vol 4,University of Chicago press, Chicago.

Archive of SID

www.SID.ir

Analysis of Genetic Diversity Among Some Persian Walnut Populations of Hamedan Province Using SSR Markers

Karimi[1], R., Ershadi[2*] A. and Vahdati[3], K.

Abstract

Iran is on of the rich genetic resources of Persian walnut. Using the genetic variation of this gene pool for identifying and introducing new promising genotypes and cultivars counts as a first step of breeding programs. Molecular methods has provides a new opportunity for genetic study of plant varieties. Considering many advantages including high polymorphism and co-dominant mode of inheritance make Simple Sequence Repeat (SSR) as ideal markers in cultivar identification and study the genetic relationship of populations especially in allogam heterozygote plants like Persian walnut. In this study, the genetic diversity and structure of four Persian walnut (*Juglans regia* L.) populations including 28 genotypes in hamedan province was studied using 11 SSR markers. In total, 47 polymorphic alleles were detected. The average of observed alleles was equal to 4.3 in each locus. Hardy-Weinberg (HW) equilibrium was not detected in most of the loci that could be related to selection pressure and natural selection in different climatic conditions. The highest genetic distance was found between Tuyserkan and Malayer populations and lowest genetic distance was found between Tuyserkan and Serkan populations. Cluster analysis based on Nei similarity coefficient matrix using UPGMA method classified the populations into two main groups. Classification of populations based on molecular data did match with their geographical situations.

Keywords: Walnut, Genetic structure, Primer, SSR marker, Cluster analysis

Archive of SID

1. Former M.Sc student, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan.
2. Assistant Professor, Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan.
3. Associate Professor, Department of Horticulture, College of Abouraihan, University of Tehran, Tehran.
∗: Corresponding author - Email: Ershadi@basu.ac.ir

www.SID.ir