

ارزیابی تنوع ژنتیکی تعدادی از ژنوتیپ‌های گردو

(*Juglans regia*) با استفاده از خصوصیات خشک میوه و نشانگرهای

ریز ماهواره

عزیز ابراهیمی^۱، محمدرضا فتاحی مقدم^{۲*}، ذبیح الله زمانی^۳

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی دانشگاه تهران

۲- استادیار گروه علوم باغبانی دانشگاه تهران

۳- دانشیار گروه علوم باغبانی دانشگاه تهران

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: rezafatahi@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۸۸/۵/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۲/۱)

چکیده

استفاده از نشانگرهای مولکولی در مطالعه ژنوم درختان میوه بویژه گردو که عمر برخی از درختان آن به صدها سال می رسد اهمیت زیادی دارد. در این مطالعه از نه آغازگر ریزماهواره جهت تعیین پروفیل ژنتیکی ۳۱ ژنوتیپ و چهار رقم خارجی گردو استفاده شد. از نه مکان مورد بررسی ۳۹ آلل چند شکل بین ۲ تا ۸ آلل در هر مکان SSRs و با متوسط ۴/۳۳ آلل مشاهده گردید. مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_o) از ۰/۴۸ تا ۰/۸۶ متفاوت بود. دسته بندی ژنوتیپ ها به روش UPGMA آنها را در چهار گروه اصلی قرار داد که این گروهها به لحاظ تنوع ژنتیکی و مناطق جغرافیایی مختلف با همدیگر ارتباط نسبی داشتند. با توجه به این نتایج ژرم پلاسم گردوهای مربوط به فارس و شهرکرد شاخص تر و از همدیگر متفاوت بودند. نتایج حاصل از داده های مورفولوژی نشان داد ژنوتیپ های 'NFE7'، 'CCGM1'، 'NFE10'، 'Z30'، 'NFE3'، 'JAHAD'، 'JAHAN1' و رقم 'SERR' دارای بهترین صفات مربوط به دانه و مغز و در حد استاندارد بودند. در این تحقیق تنوع ژنتیکی نسبتا بالایی در بین ژنوتیپ های گردو در هر دو نشانگر مورفولوژی و ریزماهواره مشاهده شد که می تواند در انتخاب ژنوتیپ ها برای اصلاح گردو مورد استفاده قرار گیرند.

واژه های کلیدی

گردو،
توالی های تکراری ساده
(ریزماهواره ها) تنوع ژنتیکی،
نشانگر مولکولی،
تجزیه خوشه ای،

مقدمه

گردو (*Juglans regia*) یکی از مهمترین محصولات خشکباری جهان است که علاوه بر مصارف غذایی در صنایع چوب نیز از ارزش اقتصادی بالایی برخوردار است (۱۲). مشهورترین گونه گردو *regia* می‌باشد که احتمالا از مناطق ایران و افغانستان تا چین منشا گرفته و سپس به سایر کشورها انتقال و گسترش یافته است (۳). تاریخچه طولانی کشت و کار گردو به صورت بذری تنوع شدیدی در درختان ایجاد کرده و سطح هتروزیگوسیتی ژنوم آن به دلیل دگر گرده افشانی و دیکوگامی و گرده افشانی با باد افزایش یافته است. بنابراین شناسایی اولیه ژرم پلاسما این گیاه به عنوان اساسی ترین گام در مطالعه ژنوم و طراحی برنامه اصلاحی آن بسیار ضروری به نظر می‌رسد.

روش‌های مختلف ارزیابی تنوع از طریق ثبت صفات مورفولوژی و نشانگرهای مولکولی انجام می‌شود که روش مرسوم و اولیه آن استفاده از صفات مورفولوژیک می‌باشد. نشانگرهای مورفولوژیک به مرحله رشد گیاه و شرایط محیطی وابسته بوده و معمولا نتایج متفاوتی طی مکان و زمان‌های مختلف نشان می‌دهند. بنابراین شناسایی دقیق‌تر ژنوتیپ‌ها نیاز به روش‌هایی دارد که تنها وابسته به خصوصیات فنوتیپی نبوده و کمتر متأثر از عوامل محیطی باشد (۱۱). در بین نشانگرهای مولکولی، ایزوزایم‌ها به عنوان اولین نشانگرهای مولکولی برای شناسایی گونه‌های گردو استفاده شدند ولی استفاده آنها به علت محدودیت تعداد سیستم‌های آنزیمی و بیان ژنتیکی آنها در بافت و زمان محدود بوده است (۷).

نشانگرهای DNA مانند RAPD دارای مزایایی از قبیل کاربرد آسان و سریع و هزینه‌های کمتر در مقایسه با سایر نشانگرها می‌باشد، با این تکنیک می‌توان به تشخیص و تمایز ارقام نزدیک گردو و همچنین شناسایی ارقام جدید پرداخت (۱۷ و ۱۸). نتایج حاصل از نشانگر RFLP نشان داده است که ژرم پلاسما کالیفرنیا، فرانسه، مرکز اروپا و ایران شباهت کمتری با گروه دوم یعنی ژرم پلاسما نپال، چین، کره و ژاپن دارند (۵). بایزیت و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از نشانگر AFLP شباهت بالایی بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در یک منطقه که نیازمند دوره سرمایی کوتاه بودند بدست آوردند، نزدیکی جغرافیایی این ژنوتیپ‌ها با

تنوع ژنتیکی آنها همبستگی قابل توجهی نشان داد. مقایسه بین دو نشانگر AFLP و SAMPL در مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گردوی ترکیه نشان داد که نشانگر SAMPL کارایی بهتری نسبت به نشانگر AFLP دارد (۱۰). این نشانگرها به دلیل دشواری کار و وقت‌گیر بودن (RFLP)، عدم تکرار پذیری (RAPD) و یا پیچیدگی کار (AFLP و SAMPL) کارایی کمتری در مقایسه با نشانگر SSR دارند.

نشانگر SSR به دلیل قابلیت‌های ویژه مانند اختصاصی بودن، تکرار پذیری بالا و توانایی مطلوب در تفکیک ژنوتیپ‌ها کاربرد بیشتر و مطمئن‌تری دارند (۲۴). اولین بار ووست و همکاران (۲۰۰۲) تعدادی از مکان‌های SSR ژنوم گردوی سیاه را مطالعه، جدا سازی و معرفی نمودند. فرونی و همکاران (۲۰۰۵) با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره، میزان تنوع ژنتیکی گردوهای موجود در سورنتو و کاستراتای ایتالیا را مورد بررسی قرار دادند که در هشت مکان پلی مورفیسم بالایی داشتند. جرال و همکاران (۲۰۰۵) از نشانگر ریز ماهواره به منظور شناسایی ارقام گردو و شجره آنها در جهت تعیین میزان تنوع ژنتیکی آنها و تسهیل مدیریت کلکسیون ارقام و کنترل تجارت مواد گیاهی استفاده کردند (۸). از نشانگر SSR در بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان دیگری از جمله انگور، بادام و پکان (از خانواده گردو) استفاده شده است (۴، ۹ و ۲۱).

در ایران سطح زیر کشت بالایی از ژنوتیپ‌های گردو در استان‌های مختلف وجود دارد، ولی اطلاعات جامعی از ژنوتیپ‌های برتر در دست نیست و بررسی آن توسط روش‌های مولکولی نیز انجام نشده است. در این تحقیق با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره کارایی این نشانگر در شناسایی و طبقه‌بندی ژرم پلاسماهای گردو در مقایسه با ارقام خارجی مورد آزمایش قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و اندازه گیری صفات میوه

در این پژوهش مجموعاً ۳۵ ژنوتیپ از استان فارس و ژنوتیپ‌های انتخاب شده از سایر مراکز تحقیقاتی موجود در چهار

الکتروفورز

ابتدا روی ژل آگاروز ۲/۵ درصد فراورده‌های واکنش زنجیره پلیمرز از لحاظ تکثیر مناسب در تمامی ژنوتیپ‌ها بررسی و سپس بر روی ژل پلی اکریلامید ۶ درصد عمودی به ابعاد ۲۱×۴۰ و قطر ۰/۴ میلی‌متر تحت شرایط واسرشته سازی (اوره ۷ M) در بافر (۰/۶X) TBE تفکیک شدند. قبل از بار گذاری محصول واکنش PCR، بافر بار گذاری (فرماید ۹۵ درصد یونیزه، pH8 و ۱۰mM EDTA، ۰/۰۵ Xylene cyanol، ۰/۰۵ درصد و Bromo Phenol Blue ۰/۰۵ درصد) به مقدار یک چهارم واکنش PCR به نمونه‌ها اضافه گردید.

مخلوط واکنش قبل از تزریق روی ژل به مدت پنج دقیقه در ۹۴ درجه سانتیگراد واسرشته شدند. قبل از بار گذاری نمونه‌ها، سیستم در توان ثابت ۹۰W اجرا گردید تا دمای ژل به ۵۵ درجه سلسیوس برسد. سپس نمونه‌ها در ژل بارگذاری شدند و الکتروفورز در دمای ۵۵ درجه سلسیوس و توان ۸۰W به مدت ۴۵ تا ۶۰ دقیقه بسته به طول باند اجرا گردید. ژل با نیترا نقره رنگ آمیزی و رویت گردید (۲) (شکل ۱). وجود یا عدم وجود یک باند چندشکل به صورت اعداد یک و صفر ثبت و ماتریس مربوطه مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

تجزیه‌های آماری

فراوانی‌های آلی (na)، تعداد آل موثر (ne)، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) و مورد انتظار (He)، قدرت تفکیک (-D=1)، شاخص شانون، تنوع درون منطقه‌ای (Hs)، تنوع کل (Ht)، نسبت تنوع بین منطقه‌ای به تنوع کل ($Gst=(H_t-H_s)/H_t$)، ($He-H_t$)، $Fin=(Ho)/He$ شاخص فیکس شدن آل‌ها، توسط برنامه POPGENE, Ver.32 محاسبه گردیدند (۲۲). الگوریتم‌های مختلف تجزیه خوشه‌ای از قبیل UPGMA جهت گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از نرم افزار Bootstrap و با ضریب تکرار ۱۰۰۰ بار انجام گرفت (۱۹). برای تجزیه داده‌های مورفولوژی از نرم افزارها XLSTAT تحت Excel استفاده شد

محال بختیاری، موسسه نهال و بذر کرج، مرکز تحقیقات گروه علوم باغبانی و چهار رقم خارجی موجود در موسسه نهال و بذر کرج مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱). تعداد ۲۰-۱۵ عدد خشک میوه به طور تصادفی از هر ژنوتیپ انتخاب و در آزمایشگاه‌های گروه علوم باغبانی دانشگاه تهران صفات مربوط به آنها (جدول ۲) بر اساس دیسکریپتور سازمان بین المللی با اندکی تغییرات مورد بررسی قرار گرفتند.

کاربرد نشانگر ریز ماهواره

استخراج DNA از برگ ژنوتیپ‌های مورد استفاده بر اساس روش موری و تامسون (۱۹۹۸) انجام گردید. تعدادی از آغازگرهای اختصاصی معرفی شده توسط ووست و همکاران (۲۰۰۲) برای واکنش زنجیره پلیمرز استفاده و انتخاب گردیدند (جدول ۳). هر واکنش PCR در حجم ۲۵ µl حاوی ۲/۵ µl بافر واکنش X ۱۰، ۱ mM MgCl₂، ۱/۵U آنزیم Taq DNA پلیمرز، ۰/۴µM از هر آغازگر، ۱۰۰ µM از مخلوط dNTPs و ۳۰ تا ۵۰ نانوگرم از DNA تهیه شد. تمام مواد لازم برای انجام واکنش PCR از شرکت سیناژن ایران تهیه شده بودند.

چرخه حرارتی شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس و به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل حرارتی که ۱۰ چرخه اول سیکل حرارتی به صورت Touch Down برنامه ریزی شده بود به این صورت که دمای اتصال آغازگر به رشته الگو ۱۰ درجه سلسیوس بالاتر از دمای اتصال آن در نظر گرفته شد (۶۰) درجه سلسیوس برای دمای اتصال ۵۰ درجه سلسیوس) و در هر چرخه دور اول با کاهش یک درجه دما، به دمای اتصال نهایی رسید. در ۲۵ سیکل بعد دمای اتصال ثابت (بسته به دمای اتصال آغازگر متفاوت بود) و زمان آن نیز ثابت و ۳۰ ثانیه بود. زمان و دمای واسرشت سازی به ترتیب ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه بود. زمان و دمای بسط رشته به ترتیب ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس مورد استفاده قرار گرفت.

¹ Discriminating power

جدول ۱- اسامی قرار دادی، کد، منشا و محل جمع آوری نمونه‌های گردوی مورد بررسی

شماره	کد	منشا	محل جمع آوری
۱	CODK4	شهرکرد	شهرکرد
۲	CCGM1	شهرکرد	شهرکرد
۳	COKH5	شهرکرد	شهرکرد
۴	CCEM1	شهرکرد	شهرکرد
۵	CCHA2	شهرکرد	شهرکرد
۶	COYK5	شهرکرد	شهرکرد
۷	CCGM2	شهرکرد	شهرکرد
۸	NFE1	باشهر	نی ریز
۹	NFE2	باشهر	نی ریز
۱۰	NFE3	باشهر	نی ریز
۱۱	NFE4	باشهر	نی ریز
۱۲	NFE5	باشهر	نی ریز
۱۳	NFE6	باشهر	نی ریز
۱۴	NFE7	باشهر	نی ریز
۱۵	NFE8	سیرک	نی ریز
۱۶	NFE9	سیرک	نی ریز
۱۷	NFE10	سیرک	نی ریز
۱۸	BFE1	روستای باغ صفا	بوانات
۱۹	BFE2	روستای قلعه سنگی	بوانات
۲۰	BFE3	روستای فنجان	بوانات
۲۱	BFE4	روستای فنجان	بوانات
۲۲	BFE5	روستای صماد جان	بوانات
۲۳	BFE6	روستای شیدان	بوانات
۲۴	JAHAN1	قزوین	کرج
۲۵	JAHAN2	قزوین	کرج
۲۶	SERR	آمریکا	کرج
۲۷	VINA	آمریکا	کرج
۲۸	Z30	قزوین	کرج
۲۹	K72	کرمان	کرج
۳۰	FRANQUETE	آمریکا	کرج
۳۱	LARA	آمریکا	کرج
۳۲	JAHAD	کرج	کرج
۳۳	ZIAABAD	ضیاء آباد	کرج
۳۴	DANESHKADEH	قزوین	کرج
۳۵	MIANEH	قره باغلو	میانه

جدول ۲- صفات کمی و کیفی و نحوه بررسی آنها در ژنوتیپ‌های گردوی ایران و چند رقم خارجی

ردیف	صفات اندازه گیری شده	اصطلاح انگلیسی	کد	واحد اندازه گیری
۱	شکل دانه	Seed shape	SSH	۱- ۹ (۱- گرد ، ۹- قلبی شکل)
۲	قطر دانه	Seed diameter	SDI	میلی متر
۳	طول دانه	Seed length	SLE	میلی متر
۴	بافت پوست	Seed texture	STE	۱ تا ۹ (۱- خیلی صاف، ۹- خیلی نا صاف)
۵	رنگ پوست	Seed color	SCOL	۱ تا ۹ (۱- خیلی روشن، ۹- خیلی تیره)
۶	روزنه انتهایی	Seed seal	SSE	۱ تا ۹ (۱- باز ۹- دارای پوشش بسیار قوی)
۷	سختی پوست	Seed hardness	SHA	۱ تا ۷ (۱- کاغذی ۹- زیاد)
۸	ضخامت تیغه میانی	Seed tegoman	STEG	۱- کم ۲- متوسط ۳- زیاد
۹	سهولت جدا شدن مغز از دانه	Removable kernel	RK	۱ تا ۹ (۱- خیلی آسان، ۹- خیلی مشکل)
۱۰	وزن دانه با پوست	Seed weight	SWE	گرم
۱۱	وزن مغز	Kernel weight	KWE	گرم
۱۲	طول مغز	Kernel length	KLE	میلی متر
۱۳	قطر مغز	Kernel diameter	KDI	میلی متر
۱۴	میزان پر بودن مغز	Kernel fill	KFI	۳- ضعیف ۵- متوسط ۷- قوی
۱۵	میزان گوشتی بودن مغز	Kernel fleshy	KFL	۳- ضعیف ۵- متوسط ۷- قوی
۱۶	چروکیدگی مغز	Kernel shrivel	KSH	۱- نوک چروکیده ۲- کمتر از ۵۰ درصد چروکیدگی ۳- بیشتر از ۵۰ درصد چروکیدگی
۱۷	رنگ مغز	Kernel color	KCOL	۱- کاملاً روشن، ۲- روشن، ۳- کهربایی روشن، ۴- کهربایی
۱۸	نقاط ریز روی مغز	Kernel spot	Ksp	۰- بدون نقطه، ۵- زیاد
۱۹	رگ بندی	Kernel viens	Kvi	۰- بدون رگه بندی، ۵- با رگ بندی زیاد
۲۰	طعم	Kernel taste	Kta	۱- مطلوب ۲- نامطلوب
۲۱	درصد مغز	Kernel percentage	KPE	درصد

جدول ۳- مشخصات نشانگرهای ریزماهوره مورد استفاده برای گردو در این مطالعه

مکان‌های ریز ماهواره در گردو	توالی	دامنه باند ایجاد شده توسط ریز ماهواره	طول آغاز گر (نوکلئوتید)	دمای اتصال آغاز گر (سلسیوس)
WGA1	F: ATT GGA AGG GAA GGG AAA TG R: CGC GCA CAT ACG TAA ATC AC	۱۸۱-۱۹۵	۲۰	۴۸
WGA9	F: CAT CAA AGC AAG CAA TGG G R: CCA TTG CTC TGT GAT TGG G	۲۳۶-۲۴۸	۱۹	۴۸
WGA27	AAC CCT ACA ACG CCT TGA TG F: R: TGC TCA GGC TCC ACT TCC	۱۹۲-۲۱۰	۲۰	۵۱
WGA32	F: CTC GGT AAG CCA CAC CAA TT R: ACG GGC AGT GTA TGC ATG TA	۱۲۰-۱۹۶	۲۰	۴۷
WGA69	F: TTA GTT AGC AAA CCC ACC CG R: AGA TGC ACA GAC CAA CCC TC	۱۵۸-۱۸۰	۲۰	۴۵
WGA71	F: ACC CGA GAG ATT TCT GGG AT R: GGA CCC AGC TCC TCT TCT CT	۱۳۶-۲۱۰	۲۰	۴۵
WGA202	F: CCC ATC TAC CGT TGC ACT TT R: GCT GGT GGT TCT ATC ATG GG	۲۳۸-۲۷۵	۲۰	۴۶
WGA276	F: CTC ACT TTC TCG GCT CTT CC R: GGT CTT ATG TGG GCA GTC GT	۱۶۵-۱۹۰	۲۰	۵۲
WAG376	F: GCC CTC AAA GTG ATG AAC GT R : TCA TCC ATA TTT ACC CCT TTC G	۲۱۸-۲۵۴	۲۰	۴۶
			۲۲	

نتایج و بحث

مشخصات مورفولوژی: میانگین صفات مهم مورد مطالعه در جدول شماره ۴ آورده شده است. میزان باردهی جانبی در ژنوتیپ 'BFE2' و 'BFE3' بالای ۸۰ درصد و وزن دانه و مغز آنها نیز بالا بود. خشک میوه بزرگ، سختی پوست متوسط، روزنه خشک میوه کاملاً بسته، رنگ مغز روشن از دیگر خصوصیات این ژنوتیپ‌ها بودند. ژنوتیپ‌های 'NFE3' و 'NFE4' دارای خصوصیات ویژه‌ای از قبیل دیربرگ دهی، باردهی جانبی، تیپ

رشد مطلوب، بافت پوست صاف، روزنه بسته، پوست ضعیف، وزن دانه و مغز بالا، رنگ روشن مغز، اندازه دانه بزرگ، بافت پوست صاف، میانگین وزن مغز به ترتیب ۷/۵ تا ۸/۵ گرم و درصد مغز ۵۲ تا ۶۰ درصد بوده که از خصوصیات بارز و بازارپسند می‌باشد. با توجه به خسارت سرمای دیررس بهاره در سال‌های اخیر انتخاب ژنوتیپ‌های دیر برگ ده که دارای کیفیت مطلوب دانه نیز باشند ضروری به نظر می‌رسد. ارقام خارجی مانند 'هارتلی'، 'فرانکت'، 'پدرو'، 'هاوارد'، 'چندلر' و 'سیسکو'

تجزیه خوشه‌ای بر اساس صفات مورفولوژیک

تجزیه خوشه‌ای بر اساس از فواصل مربع اقلیدسی ژنوتیپ‌ها که بر اساس ۲۱ صفت محاسبه شده بود انجام گرفت (شکل ۱). گروه‌بندی حاصل در بعضی از گروه‌ها با الگوی تنوع جغرافیایی توده‌ها مطابقت نداشت، به طوری که در بعضی از ژنوتیپ‌های نیریز و شهرکرد همراه با ژنوتیپ‌هایی از کرج، میانه و چند رقم خارجی در یک گروه قرار گرفتند. بر اساس خط برش ژنوتیپ‌ها به سه گروه مختلف تقسیم بندی شدند که به منظور بررسی دقت محل خط برش ژنوتیپ‌های درون سه شاخه با استفاده از تجزیه واریانس یکطرفه مورد بررسی قرار گرفتند. از بین ۲۱ صفت مورد بررسی تنها هفت صفت معنی‌دار بوده که از مهمترین آنها می‌توان به صفاتی از قبیل طول دانه، وزن مغز و درصد مغز اشاره نمود که اسامی برخی از صفات مهم مربوط به دانه در جدول شماره ۵ آورده شده است.

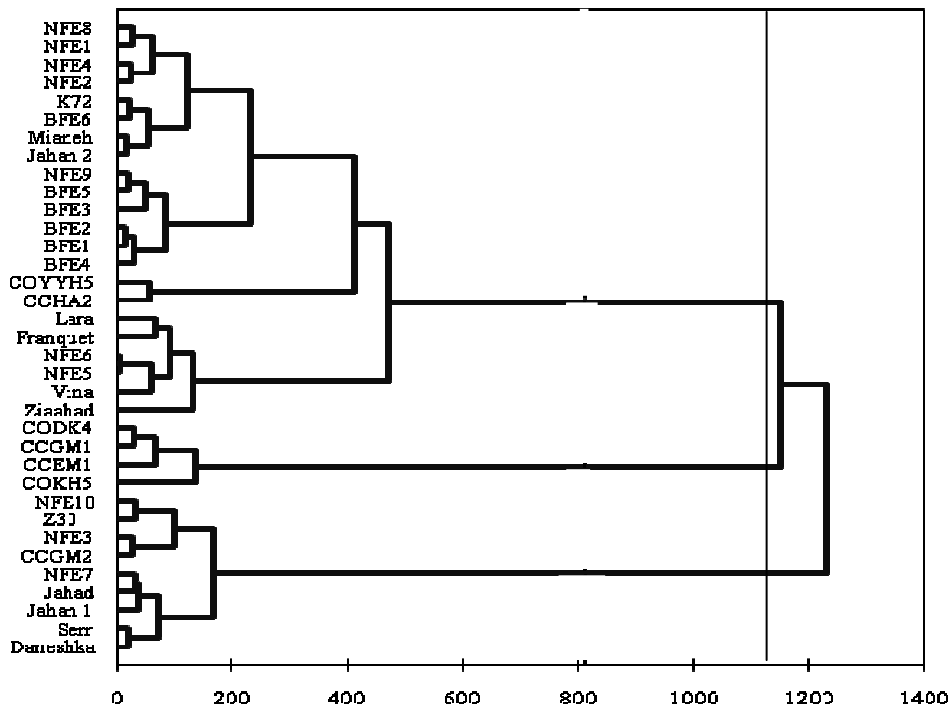
در گروه اول اکثر ژنوتیپ‌های نیریز و بوانات و رقم های 'واینا'، 'لارا' و فرانکت' قرار گرفتند. دو ژنوتیپ شهرکرد ('COYYH5'، 'CCHA2') جدا از سایر ژنوتیپ‌های مربوط به شهرکرد در گروه اول قرار گرفته که این ژنوتیپ‌ها در صفاتی از قبیل سختی پوست، وزن مغز، درصد مغز و گوشتی بودن مغز نسبت به سایر ژنوتیپ‌های شهرکرد متفاوت می‌باشند. در گروه دوم ژنوتیپ‌های 'CODK4'، 'CCGM1'، 'CCEM1' و 'COKH5' شهرکرد قرار گرفتند که همه آنها مربوط به استان چهار محال بختیاری بودند، این ژنوتیپ‌ها از طول و قطر دانه بالا و همچنین وزن دانه و مغز بیشتری در مقایسه با ژنوتیپ‌های نیریز و کرج برخوردار بودند. در گروه سوم، ژنوتیپ‌های موجود ایستگاه تحقیقات گروه علوم باغبانی، ژنوتیپ 'Z30' و رقم 'سر' و چهار ژنوتیپ از نیریز و شهرکرد قرار گرفتند. ژنوتیپ 'Z30' از لحاظ درصد مغز با رقم 'سر' برابری می‌کند که این رقم از لحاظ باردهی و عملکرد یکی از ارقام معروف آمریکا می‌باشد. میزان درصد مغز در تمامی ژنوتیپ‌های گروه سوم بالای ۶۰ درصد بوده و صفات بارزی از قبیل بافت پوست صاف، پوست ضعیف تا متوسط و گوشتی بودن مغز و پر بودن دانه می‌باشد.

دیر برگ می‌باشند که هر کدام خصوصیات ویژه‌ای دارند. به عنوان مثال رقم 'هارتلی' علیرغم دیر برگ دهی، میوه دهی انتهایی داشته و تنها ۵ درصد از جوانه‌های آن تبدیل به میوه می‌شوند (۱۴). از ارقام مورد استفاده در این آزمایش می‌توان به رقم 'سر' اشاره کرد که یکی از ارقام معروف در آمریکا بوده و میزان باردهی جانبی آن ۵۵ تا ۶۵ درصد، زود برگ، اندازه میوه بزرگ، ضخامت پوست ضعیف، بسیار زود رس ولی نسبت به کرم سیب، بلایت و ریزش گل ماده^۲ حساس می‌باشند (۱۴). رقم 'فرانکت' یک رقم فرانسوی است که در سطح وسیع در کالیفرنیا مورد کشت و کار قرار می‌گیرد و به علت دیر برگدهی (۲۶ روز بعد از رقم 'پاین' که شاخص برای زمان برگ دهی است) از سرمای دیررس بهاره مصون می‌ماند. روزه انتهایی میوه در این رقم بسته بوده و رنگ مغز بسیار روشن می‌باشد ولی میزان باردهی کم، وزن دانه و درصد مغز نیز در این رقم پایین می‌باشد (۱۴). رقم 'واینا' از تلاقی رقم 'فرانکت' و پایین بدست آمده است که میزان باردهی جانبی در این رقم ۷۰ تا ۷۵ درصد، زمان باز شدن برگ ۸ روز بعد از رقم 'پاین' و از لحاظ زمان رسیدن محصول متوسط رس می‌باشد (۲۰). ژنوتیپ 'Z30' از شهرستان کرج از وزن دانه و مغز بالایی برخوردار بوده و میزان باردهی این ژنوتیپ از رقم 'فرانکت' و 'لارا' بیشتر و برگ‌های آن ۲۰ روز زودتر از رقم 'فرانکت' باز می‌شود اما از رقم 'سر' دیر برگه‌تر می‌باشد (۱). ژنوتیپ 'K72' کرج زود برگه‌تر از 'Z30' بوده و از ارقام 'لارا'، 'فرانکت' و 'واینا' نیز زود برگ‌تر می‌باشد و همچنین میزان باردهی این رقم بیشتر از رقم 'سر'، 'لارا'، 'واینا' و 'فرانکت' می‌باشد (۱). ژنوتیپ‌های 'CCGM1' و 'CCHA2' از استان چهار محال بختیاری از لحاظ میزان عملکرد متوسط بوده، نوع میوه دهی در این ژنوتیپ‌ها به صورت جانبی، زمان باز شدن برگ‌ها متوسط و دارای مغز درشت می‌باشند. ژنوتیپ‌های 'CODK4' و 'COKH5' زود برگه می‌باشند.

^۲ Pistillate Flower Abortion

جدول ۴- میانگین عددی صفات مهم خشک میوه در ژنوتیپ‌ها و ارقام مورد بررسی

ژنوتیپ	شکل دانه (۱-۹)	قطر دانه (mm)	طول دانه (mm)	سختی پوست (۱-۷)	روزنه انتهایی (۱-۷)	راحتی جدا شدن مغز (۱-۷)	وزن دانه (g)	وزن مغز (g)	رنگ مغز (۱-۴)	درصد مغز به کل %
BFE1	۲	۳۷/۴	۴۲/۸	۵	۷	۳	۱۷/۷	۸/۸	۳	۴۹/۶
BFE2	۲	۳۸/۸	۴۴/۶	۵	۷	۳	۱۵/۵	۷/۷	۲	۵۰/۱
BFE3	۱	۴۸/۸	۳۹	۳	۳	۳	۱۵/۹	۶/۹	۳	۴۳/۷
BFE4	۱	۴۰/۸	۴۴/۹	۳	۹	۳	۱۶/۸	۸	۳	۴۷/۷
BFE5	۵	۴۰/۳	۳۵/۵	۷	۹	۳	۱۵/۳	۷/۲	۱	۴۷/۳
BFE6	۶	۳۹/۶	۴۱/۹	۵	۷	۳	۱۵/۲	۸/۴	۱	۵۴/۹
CCEM1	۵	۳۵/۸	۴۱/۸	۵	۵	۱	۱۵/۶	۸/۸	۱	۵۶/۶
CCGM1	۳	۳۸/۲	۴۴/۸	۵	۳	۳	۱۷/۲	۸/۷	۱	۵۰/۴
CCGM2	۵	۳۷	۴۱/۳	۵	۵	۱	۱۴	۸/۳	۱	۵۹/۱
CCHA2	۱	۳۶/۵	۴۰/۸	۵	۵	۱	۱۲/۴	۵/۱	۳	۴۰/۹
CODK4	۸	۳۵/۵	۴۸/۶	۵	۵	۳	۱۵/۶	۸	۳	۵۱/۲
COKH5	۸	۳۳/۴	۵۰/۸	۵	۵	۱	۱۳/۵	۸/۲	۱	۶۰/۸
COYYH5	۷	۳۳/۳	۳۹	۷	۵	۷	۱۴/۹	۵/۸	۳	۳۸/۸
DANESHKADEH	۴	۳۴	۳۶	۳	۵	۳	۱۲/۸	۸/۵	۲	۶۶/۳
FRANQUETTE	۱	۳۴	۳۴	۵	۷	۵	۱۱/۲	۵/۳	۱	۴۷/۳
Z30	۵	۳۶/۲	۳۶/۸	۵	۵	۳	۱۴/۷	۹/۸	۲	۶۷
JAHAD	۱	۳۵/۵	۳۶	۳	۱	۵	۱۳/۱	۷/۸	۲	۵۹/۸
JAHAN 1	۵	۳۴	۳۳	۵	۷	۳	۱۳	۷/۹	۲	۶۰/۷
JAHAN2	۶	۳۵	۳۹	۳	۷	۳	۱۰/۳	۵/۷	۴	۵۵/۷
K72	۶	۳۶/۳	۳۸/۷	۵	۷	۳	۱۵	۸/۳	۳	۵۵/۲
LARA	۵	۳۶	۳۳/۳	۷	۷	۵	۱۲/۵	۶/۶	۴	۵۲/۴
MIANEH	۱	۳۷/۴	۴۰/۲	۵	۹	۳	۱۳/۱	۷	۳	۵۴
NFE1	۶	۳۳/۳	۴۱/۸	۳	۵	۱	۱۳/۳	۶/۵	۱	۴۸/۹
NFE10	۶	۳۵/۳	۴۰/۳	۳	۱	۵	۱۴/۳	۹/۳	۳	۶۵/۱
NFE2	۱	۳۳/۸	۳۷/۸	۳	۱	۱	۱۲	۶/۸	۳	۵۶/۵
NFE3	۴	۳۶	۴۲/۳	۳	۵	۱	۱۴/۴	۸/۷	۱	۶۰/۷
NFE4	۶	۳۶/۳	۳۸/۳	۳	۳	۱	۱۴/۵	۷/۵	۳	۵۲
NFE5	۶	۳۳/۷	۳۸/۳	۵	۳	۴	۱۲/۸	۶/۱	۴	۴۸
NFE6	۵	۳۴/۳	۳۷/۸	۵	۳	۳	۱۲/۸	۶/۲	۴	۴۸/۱
NFE7	۱	۳۱/۷	۳۶/۳	۳	۵	۱	۱۱/۳	۶/۸	۳	۶۰/۵
NFE8	۶	۳۷/۳	۴۴/۳	۳	۱	۱	۱۴/۵	۷/۲	۳	۴۹/۷
NFE9	۵	۳۸	۳۹	۵	۷	۱	۱۷/۷	۸/۳	۲	۴۶/۸
SERR	۴	۳۲/۵	۳۶/۷	۳	۵	۳	۱۰/۲	۶/۸	۴	۶۶/۹
VINA	۷	۳۱/۷	۳۷/۲	۵	۳	۵	۹/۹	۴/۶	۱	۴۷
ZIAABAD	۱	۳۰/۵	۳۱/۳	۵	۳	۳	۷/۵	۴	۱	۵۳/۵



شکل ۱- گروه‌بندی ۳۵ ژنوتیپ و رقم گردو بر اساس صفات مورفولوژیک به روش Ward

جدول ۵- مقایسه ۸ صفت مهم مربوط به ۳ گروه مختلف بدست آمده از تجزیه واریانس

یکطرفه خوشه‌های کلاستر

گروه	قطر دانه	طول دانه	بافت پوست	روزنه انتهایی	وزن دانه مغز	وزن درصد مغز	رنگ مغز
۱	۳۶/۲	۳۹/۲۵	۴/۸	۵/۲۲	۱۳/۶	۶/۷۲	۴۹/۴۵
۲	۳۵/۸	۴۶/۵۱	۴	۴/۱۷	۱۵/۴۵	۸/۴۱	۵۴/۷۶
۳	۳۴/۷	۳۷/۶۶	۲	۴/۱	۱۳/۰۷	۸/۲۱	۶۲/۸۹
<i>P value</i>	۰/۳۶	۰/۰۰۰	۰/۹۴	۰/۴۰	۰/۲۲	۰/۰۰۳	۰/۰۰۰

مطالعه تنوع ژنتیکی با نشانگر SSR

از نه مکان ریز ماهواره‌ای مورد استفاده (جدول ۳) که تکثیر و چند شکلی مناسبی داشتند در مجموع ۳۹ آلل چند شکل مشاهده گردید که معیارهای محاسبه شده برای این جفت آغازگرهای ریز ماهواره در جدول ۶ و الگوی باندی یکی از مکان‌ها در شکل ۱ آمده است. تعداد آلل‌های مشاهده شده در هر مکان ریز ماهواره (na) بین na=۲ برای مکان WGA27 تا na=۸ برای مکان WGA202 متغیر بود. میانگین تعداد آلل مشاهده شده در این

مطالعه (na=۴/۳۳) کمتر از مقدار گزارش شده توسط جرال و همکاران در سال (۲۰۰۵) (na=۵/۳۱) که در شناسایی ارقام و شجره آنها در کالیفرنیا استفاده کردند می‌باشد اما این مقدار بیشتر از مقدار گزارش شده توسط فرونی و همکاران (۲۰۰۶) (na=۴) است که در بررسی میزان تنوع در گردوهای ایتالیا بدست آورده بودند. تعداد آلل هر مکان ریز ماهواره، مناسب بودن آن مکان را برای تخمین تنوع ژنتیکی نشان می‌دهد که باید از فراوانی و توزیع مناسب آللی نیز برخوردار باشند (۸).



شکل ۲- الگوی بانندی حاصل از تکثیر DNA گردو با استفاده از آغازگر WGA276. شماره هر ستون کد مربوط به ژنوتیپ است که در جدول ۱ آمده است و ستون اول سایز نشانگر (1kb) را نشان می‌دهد.

جدول ۶- شاخص‌های ساختار ژنتیکی مورد نظر به تفکیک هر جایگاه ریزماهوره

جایگاه (مکان) ریز ماهوره	na	ne	I	Ho	He	D	Gst	Hs	Ht	Fin (%)
WGA1	۴	۲/۲	۰/۶۶	۰/۷۷	۰/۸۵	۰/۷۴	۰/۴۵	۰/۲	۰/۳۷	۹/۴
WGA9	۳	۱/۸	۰/۵۸	۰/۶۵	۰/۷۲	۰/۷۱	۰/۵۴	۰/۱۴	۰/۳۶	۹/۷
WGA27	۲	۰/۸	۰/۶۲	۰/۴۸	۰/۵۷	۰/۶۵	۰/۵۷	۰/۱۷	۰/۴۲	۱۵/۸
WGA32	۵	۳/۶	۰/۳۸	۰/۷۸	۰/۸۵	۰/۶۶	۰/۴۵	۰/۱۲	۰/۲۶	۸/۲۳
WGA69	۷	۵/۴۲	۰/۵	۰/۷۹	۰/۸۶	۰/۷۴	۰/۵۱	۰/۱۱	۰/۳	۸/۱۴
WGA71	۴	۲/۴	۰/۴	۰/۷	۰/۸	۰/۷۲	۰/۴۳	۰/۱۲	۰/۲۸	۱۲/۵
WGA276	۵	۳/۴۳	۰/۵۱	۰/۷۴	۰/۸۴	۰/۶۵	۰/۴۷	۰/۱۷	۰/۳۸	۱۱/۹
WGA202	۸	۶/۴۱	۰/۵۳	۰/۸۶	۰/۹۳	۰/۷۴	۰/۶	۰/۱۴	۰/۳۸	۷/۵
WGA276	۵	۳/۴۳	۰/۵۱	۰/۷۴	۰/۸۴	۰/۶۵	۰/۴۷	۰/۱۷	۰/۳۸	۱۱/۹
WGA376	۸	۶/۶۳	۰/۳۹	۰/۷۲	۰/۸۱	۰/۷۷	۰/۴۳	۰/۰۹	۰/۲۵	۱۱/۱۱
میانگین	۵/۱۱	۳/۶	۰/۵	۰/۷۲	۰/۸	۰/۷	۰/۴۵	۰/۱۴	۰/۳۳	۱۰/۶۲

na: تعداد آلل‌های مشاهده شده، ne: تعداد آلل‌های موثر، I: شاخص شانون، Ho: هتروزیگوسیتی مشاهده شده، He: هتروزیگوسیتی قابل انتظار،

D: قدرت تفکیک، Gst: شاخص تنوع بین مناطق، Hs: هتروزیگوسیتی درون جمعیت، Ht: هتروزیگوسیتی کل، Fin(He-Ho/He): شاخص فیکس شدن آلل‌ها.

و به میزان ۰/۶۶ بوده و کمترین مقدار شاخص شانون نیز مربوط به جایگاه WGA32 و به میزان ۰/۳۸ بود. در مقایسه با شاخص هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) شرایط برای شاخص هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Ho) کمی متفاوت بود و میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده در این مطالعه (Ho=۰/۷۲) بیشتر از

در این مطالعه میانگین تعداد آلل موثر بدست آمده برابر ۳/۶ آلل محاسبه گردید که بیشترین تعداد آلل موثر مربوط به جایگاه WGA376 با تعداد ۶/۶۳ و کمترین مربوط به جایگاه WGA27 با تعداد ۱/۲۱ آلل موثر بود. شاخص شانون که یکی از شاخص‌های تنوع یک مکان می‌باشد برای مکان WGA1 بیشتر از سایر مکان‌ها

مقدار گزارش شده در مطالعات قبلی از جمله فرونی و همکاران در سال (۲۰۰۶) در بررسی تنوع ژنتیکی گردوهای ایتالیا ($H_o=0/46$) و جرال و همکاران (۲۰۰۵) در شناسایی شجره ارقام ($H_o=0/65$) بود. با توجه به نتایج بدست آمده میتوان گفت که مکانهای WGA069 و WGA202 با نشان دادن بیشترین هتروزیگوسیتی در نمونه‌های مورد بررسی توانستند درصد افراد هتروزیگوت بیشتری را مشخص نمایند. مقادیر ثابت نسبی آلل (Fin) از ۷/۵ درصد در مکان WGA202 تا ۱۵/۸ درصد در مکان WGA27 متغیر بوده و میانگین این شاخص برای تمامی مکان‌های مطالعه شده نیز برابر ۱۰/۶۲ درصد بود. در محاسبه مقدار D (قدرت تفکیک) نشانگرها با استفاده از فراوانی آللی، نشانگر WGA376 با ۸ آلل، بیشترین مقدار ($D=0/77$) و نشانگر WGA32 با ۵ آلل چندشکل کمترین مقدار ($D=0/66$) را نشان دادند. بیشترین میزان تنوع کل مناطق (Ht) مربوط به آغازگر WGA27 و کمترین آن مربوط به آغازگر WGA32 بود. بیشترین میزان شاخص تنوع بین مناطق (Gst) بدست آمده در آغازگرهای مورد استفاده مربوط به آغازگر WGA202 با ($Gst=0/6$) و کمترین آن مربوط به مکان‌های WGA376 و WGA71 با ($Gst=0/43$) بود که نشان دهنده این است که جفت آغازگر WGA202 میزان تنوع بین مناطق را بیشتر از سایر جفت آغازگرها نشان داده است. روش‌های زیادی جهت محاسبه تفاوت ژنتیکی در بین و درون جمعیت‌ها وجود دارد که یکی آنها محاسبه شاخص F می‌باشد. این شاخص که توسط رایت در سال ۱۹۵۱ تحت عنوان Fst نامیده شد، نشان‌دهنده تنوع آلل‌های افراد مختلف در بین مناطق می‌باشد، شاخص Fst تفاوت ژنتیکی افراد

موجود در بین جمعیت‌های مختلف را ارزیابی می‌کند و مقدار عددی آن بین صفر تا یک است چنانچه افراد جمعیت‌ها از نظر آللی کاملاً متفاوت باشند مقدار آن برابر ۱ خواهد بود (۲۴). در مطالعه جمعیت‌ها میزان Gst بالاتر از ۰/۲۵ نشان دهنده تمایز بالای جمعیت‌های مورد مطالعه از هم می‌باشد که مشخص می‌کند احتمال تلاقی غیر تصادفی و مهاجرت بین جمعیت‌ها بسیار پایین بوده است. این جمعیت‌ها تکامل مستقل داشته و از نظر ساختاری (فراوانی آلل) مستقل و تفاوت‌های بارز دارند. در چنین جمعیت‌هایی بر اساس قانون هاردی واینبرگ بین فراوانی ژنی و فراوانی ژنوتیپی رابطه ثابتی وجود دارد که در غیاب گزینش و مهاجرت این فراوانی‌ها از یک نسل به نسل دیگر ثابت باقی می‌ماند (۲۴). در تمامی آغازگرها میزان تنوع درون جمعیت‌ها کمتر از تنوع بین جمعیت‌ها بود. بیشترین شاخص تنوع بین مناطق مربوط آغازگر WGA202 (۰/۶) و کمترین آن مربوط به آغازگر WGA376 (۰/۴۳) می‌باشد که هرچه Gst بالاتر باشد، نشان دهنده شاخص تنوع بالاتر در بین مناطق مورد بررسی می‌باشد. برای تجزیه منطقه‌ای نمونه‌ها از فاصله ژنتیکی نی (۱۹۷۳) استفاده شد. با توجه به جدول ۷ بیشترین شباهت (۰/۹۹۴) بین نمونه‌های مناطق کرج و خارجی بدست آمد. میزان شباهت‌های ژنتیکی بین نمونه‌های مورد بررسی نسبتاً بالا بود. این امر نشان دهنده این واقعیت است که تنوع ژنتیکی بین مناطق در مقایسه با کل پایین بوده است به طوریکه بیشترین تنوع بین جمعیت مربوط به آغازگر WGA202 (۰/۶) و کمترین آن مربوط به آغازگر WGA376 (۰/۴۳) می‌باشد (جدول ۷).

جدول ۷- بررسی میزان تشابه و فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌های مناطق با استفاده از فاصله ژنتیکی نی (۱۹۷۸)

مناطق	شهرکرد	نی ریز فارس	بوانات فارس	کرج	خارجی
شهرکرد	-	۰/۸۱۵۴	۰/۷۳۴۱	۰/۷۸۰۷	۰/۶۲۱۵
نی ریز فارس	۰/۱۸۴۶	-	۰/۸۵۲۷	۰/۹۶۷۴	۰/۸۶۴۰
بوانات فارس	۰/۲۶۵۹	۰/۱۴۷۹	-	۰/۸۷۶۹	۰/۸۰۷۳
کرج	۰/۲۱۹۳	۰/۰۳۶۲	۰/۱۲۳۱	-	۰/۹۹۴۷
خارجی	۰/۳۷۸۵	۰/۱۳۶۰	۰/۱۹۲۷	۰/۰۰۵۳	-

بالا چپ میزان فاصله ژنتیکی و پایین راست میزان شباهت ژنتیکی (نی) (۱۹۷۸) را نشان می‌دهد

گروه‌بندی ژنوتیپ‌های گردو با استفاده از داده‌های مولکولی

SSR

برای گروه‌بندی نمونه‌های موجود از روش تجزیه خوشه‌ای براساس ضریب تشابه دایس و روش UPGMA استفاده شد (شکل ۳). میزان ضریب همبستگی بین داده‌های مورفولوژی و مولکولی ۰/۱۸ بدست آمد که معنی‌دار نمی‌باشد. نمونه‌های مورد بررسی در چهار گروه اصلی قرار گرفتند. گروه اول و دوم شامل ژنوتیپ‌های 'JAHAN1'، 'NFE1'، 'NFE2'، 'NFE3'، 'NFE5'، 'JAHAN1' و 'CCGM1' بود. از مزایای ژنوتیپ‌های 'NFE1' و 'NFE3' می‌توان به کشیدگی دانه، سختی پوست ضعیف و وزن دانه تقریباً یکسان اشاره کرد. میزان درصد مغز در دو ژنوتیپ 'JAHAN1' و 'NFE3' به میزان ۶۰/۷ درصد بوده که در مقایسه با سایر ژنوتیپ‌های موجود در این گروه از درصد مغز بالاتری برخوردار بودند.

ژنوتیپ 'JAHAN1' دارای قطر و طول دانه متوسط، بافت پوست و سختی پوست متوسط و وزن مغز بالا می‌باشد که اختلاف زیادی با ژنوتیپ 'JAHAN2' از همین محل داشت. گروه سوم شامل ارقام خارجی 'لارا'، 'فرانکت'، 'وینا'، 'سر' و سه ژنوتیپ 'DANESHKADEH'، 'MIANEH' و 'NFE10' بودند. دو رقم 'لارا' و 'فرانکت' از لحاظ طول دانه، قطر دانه، وزن دانه و مغز و درصد مغز متوسط می‌باشند. رقم 'وینا' و 'سر' از لحاظ مورفولوژی شباهت زیادی با همدیگر ندارند ولی در نتایج مربوط به نشانگر مولکولی در یک گروه قرار گرفتند. رقم 'فرانکت' یک رقم حاصل از بذر بوده ولی رقم 'وینا' یک رقم اصلاحی است که یکی از والدین آن 'فرانکت' بوده است (۱۷). بنابراین قرار گرفتن آنها در یک گروه منطقی به نظر می‌رسد.

شباهت ژنتیکی و به دنبال آن قرارگیری اکثر ارقام خارجی همراه با ژنوتیپ‌های ایرانی در یک دسته می‌تواند این نکته را یاد آور شود که این ارقام به احتمال زیاد دارای زمینه ژنتیکی مشابه بوده و از یک منطقه جغرافیایی منشا گرفته و یا اجداد مشترکی داشته باشند. یک احتمال در مورد منشا آنها می‌تواند ایران و افغانستان باشد که سپس به سایر کشورها منتقل شده است (۳). جرالد و همکاران در سال (۲۰۰۵) با بررسی ۴۸ رقم و دسته بندی آنها در

چند زیر گروه، تنوع ژنتیکی بالایی را در بین ارقام گردو گزارش کردند، نتایج آنها نشان داد که یک ژنوتیپ از افغانستان شباهت بسیار زیادی با رقم 'سر' دارد. جستروم و همکاران (۱۹۹۸) با استفاده از نشانگر RFLP گزارش کردند که ژرم پلاسما اروپا از ایران و ژرم پلاسما آسیا از کوه‌های هیمالیا منشاء گرفته است. همچنین اورل و همکاران (۲۰۰۲) با استفاده از نشانگرهای مورفولوژی RAPD و cpDNA گزارش کردند که گونه *J. regia* مربوط به آسیا می‌باشد. گروه چهارم به دو زیر گروه تقسیم‌بندی شد، در زیر گروه اول یک ژنوتیپ از کرج 'JAHAN2'، چهار ژنوتیپ از نیریز 'NFE6,7,8,9' و پنج ژنوتیپ از بوانات 'BFE1,2,4,5,6' قرار گرفت که می‌توان گفت تمامی ژنوتیپ‌های بوانات 'BFE1,2,4,5,6' در این زیر گروه قرار گرفتند. همه ژنوتیپ‌های بوانات دارای صفات مشترکی از قبیل وزن بالای دانه و بسته بودن انتهای روزنه بودند و از طرف دیگر چون ژنوتیپ‌های برتر در منطقه بوانات می‌باشند احتمالاً درختان مادری اولیه واحدی داشته و توسط باغداران با تجربه در طی زمان انتخاب شده‌اند. زیر گروه دوم شامل ژنوتیپ‌های 'NFE4'، 'ZIAABAD'، 'K72' و 'JAHAD' بوده که به جز ژنوتیپ 'NFE4' بقیه ژنوتیپ‌ها مربوط به کرج می‌باشند.

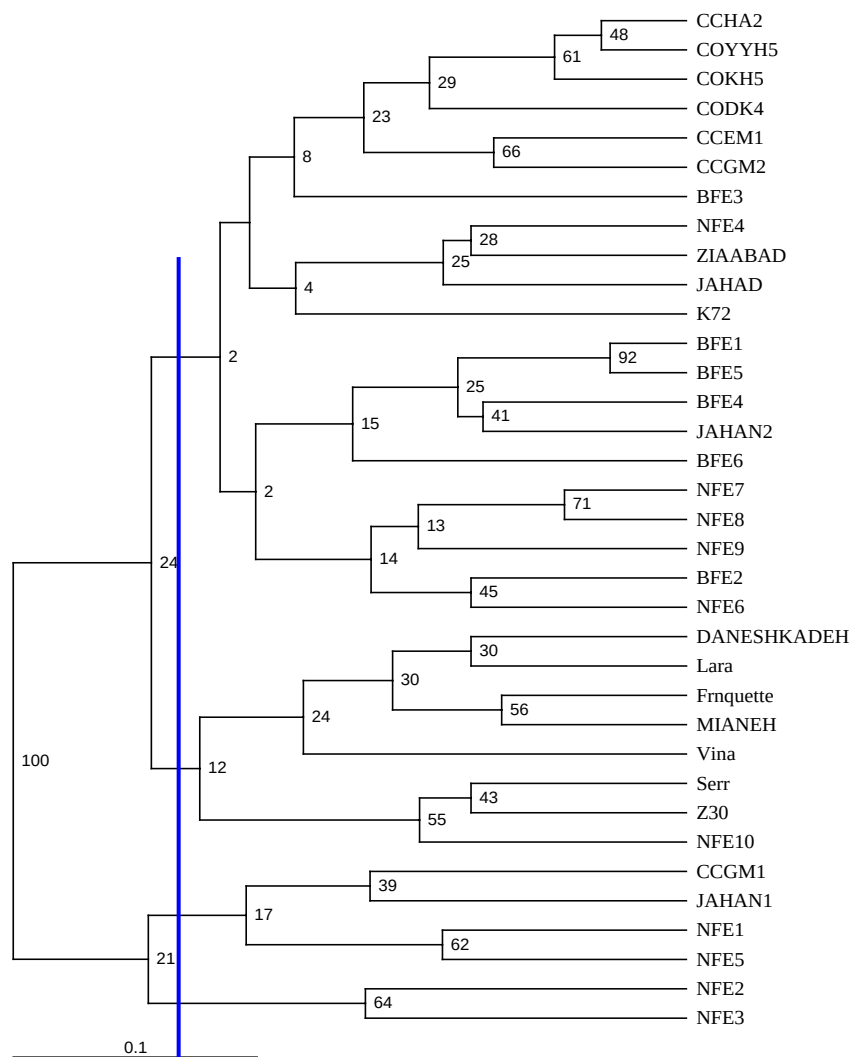
ژنوتیپ 'NFE4' و 'K72' از لحاظ صفات مورفولوژی مانند وزن دانه، وزن مغز و درصد مغز و سایر صفات شباهت بالایی نسبت به یکدیگر دارند که در تقسیم‌بندی مورفولوژی نیز در یک گروه قرار گرفتند. همچنین در این زیر گروه ژنوتیپ 'BFE3' از بوانات و تقریباً تمامی ژنوتیپ‌های شهرکرد به جزء ژنوتیپ 'CCGM1' قرار گرفتند. ژنوتیپ‌های شهرکرد از طول دانه و قطر بالایی نسبت به سایر ژنوتیپ‌های مورد بررسی برخوردار بوده و نتایج حاصل از بررسی‌های مورفولوژی و مولکولی به جزء در ژنوتیپ 'CCGM1' در سایر ژنوتیپ‌ها کاملاً مطابقت داشت.

ژنوتیپ 'CCGM1' دارای مشخصاتی از قبیل طول و قطر دانه بزرگ، بافت پوست و رنگ پوست متوسط، روزنه انتهایی کاملاً بسته، میزان وزن دانه و مغز به ترتیب ۱۷/۲ و ۸/۷ گرم می‌باشد که از تفاوت‌های اساسی این ژنوتیپ با سایر ژنوتیپ‌های شهرکرد می‌باشد. نتایج حاصله نشان می‌دهد که ژنوتیپ‌های شهرکرد

گردو در مناطق مختلف ایران بالا قابل توجه بوده و استفاده از آنها تولید ارقام برتر را تضمین می‌نماید. جدول ۸ گروه‌بندی بر اساس داده‌های مولکولی و صفات شاخص مورفولوژی مربوط به هر ژنوتیپ بوده که تنها برخی از صفات مورفولوژی با گروه‌بندی حاصل از داده‌های مولکولی تناسب داشتند.

نسبت به سایر ژنوتیپ‌های مورد بررسی شباهت بالایی داشته که این شباهت بالا ناشی از انتخاب و تکثیر ژنوتیپ‌های برتر توسط بذر در طی سالیان متمادی توسط باغداران خبره منطقه می‌باشد. در این گروه قرارگیری ژنوتیپ‌های شهرکرد به استثنای ژنوتیپ 'CCGM1' در یک گروه جداگانه نسبت به ژنوتیپ‌های نیریز می‌تواند نشان دهنده این امر باشد که به طور کلی تنوع ژرم پلاسما

شکل ۳- گروه‌بندی ۳۵ نمونه گردو با استفاده از ضریب تشابه دایس و روش UPGMA با استفاده از نرم افزار Bootstrap (نام کامل هر ژنوتیپ در جدول ۱ آمده است).



جدول ۸- صفات مهم خشک میوه در ژنوتیپ‌ها و ارقام بر اساس گروه بندی داده های مولکولی (شکل ۳)

گروه	قطر دانه	طول دانه	سختی پوست	روزنه انتهایی	راحتی جدا	وزن دانه	وزن مغز	رنگ مغز	درصد مغز به کل
۱*									
۲									
۳									
۴									

* ژنوتیپ‌های گروه ۱ تا ۴ بر اساس کلاستر داده‌های نشانگر SSR از شکل ۳ نشان داده شده است
+ نشان‌دهنده قوی بودن آن گروه در صفت مربوطه می‌باشد

نتیجه گیری کلی

به طور کلی در این تحقیق ۳۵ ژنوتیپ گردو از مناطق مختلف کشور و چهار رقم خارجی در چهار گروه کلی دسته‌بندی شدند. در گروه اول ژنوتیپ‌هایی از نیریز و دو ژنوتیپ از کرج و شهرکرد قرار گرفت. گروه دوم شامل ژنوتیپ‌های 'DANESHKADEH'، 'Z30' و 'NFE1' همراه با چهار رقم خارجی قرار گرفتند. به جز ارقام خارجی، تمامی این ژنوتیپ‌ها به صورت بذر تکثیر شده و از استان‌های مختلف ایران می‌باشند. بنابراین وجود تفاوت ژنتیکی در بین ژنوتیپ‌ها منطقی است. با این حال در یک گروه قرار گرفتن ژنوتیپ‌های ایرانی با ارقام خارجی دلیلی بر دارا بودن زمینه ژنتیکی نزدیک آنها با یکدیگر می‌باشد. البته دلایلی وجود دارد که منشاء احتمالی گونه *regia*، ایران و افغانستان بوده و سپس به سایر کشورها از جمله چین، روسیه و جنوب اروپا گسترش یافته است. با توجه به ضرایب ماتریس تشابه بیشترین میزان شباهت ژنتیکی بین دو ژنوتیپ 'BFE1' و 'BFE5' از بوانات معادل ۰/۹۲ و کمترین میزان شباهت ژنتیکی هم معادل ۰/۲۳ و بین دو ژنوتیپ 'NFE3' و 'CCHA2' به ترتیب از نیریز و شهرکرد بود. بیشترین شاخص تنوع بین مناطق مربوط آغازگر WGA202 (۰/۶) و کمترین آن

مربوط به آغازگر WGA376 (۰/۴۳) می‌باشد این مقدار Gst نشان دهنده تنوع بالاتر در بین مناطق مورد بررسی می‌باشد. نتایج این تحقیق ثابت نمود در ایران تنوع ژنتیکی بالایی برای گردو وجود دارد و از این نظر می‌توان ژرم پلاسم خوبی از آن را در کشور نگهداری کرد.

در این آزمایش میزان همبستگی بین داده‌های مورفولوژی و مولکولی پایین بوده که می‌توان نتیجه گرفت در کل صفات مورفولوژی تحت تاثیر عوامل متعددی قرار می‌گیرند که این عوامل در سطح DNA بی‌تاثیر هستند. مجموعه این عوامل سبب می‌شود که ارقامی که بر اساس داده‌های موجود در سطح DNA نزدیک به هم هستند از نظر خصوصیات مورفولوژیکی متفاوت باشند. بنابراین داده‌های مولکولی ممکن است همسویی مورد انتظار با خصوصیات مورفولوژیکی نداشته باشند، این امر با توجه به تاثیر پذیری صفات مورفولوژیکی از محیط دور از انتظار نیست لذا در برنامه‌های اصلاحی اگر گزینش فقط بر اساس صفات مورفولوژیکی باشد ممکن است نتیجه مطلوب نداشته باشد.

منابع

1. Atefi, J. (1993). Evaluation of walnut genotype in Iran. *Acta Hort.* 311: 25-33
2. Bassam, B., Caetano, J. and Gressho, P. (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* Pp: 680-683.
3. Bayazit, S., Kazan, K., Gulbitti, V., Evik, C., Ayanoglu, H. and Ergul, A. (2007). AFLP analysis of genetic diversity in low chill requiring walnut (*Juglans regia* L.) genotypes from Hatay, Turkey. *Scientia Horticulturae.* 111: 394-398
4. Fatahi, R., Ebadi, A., Bassil, N., Mehlenbacher, S. A. and Zamani, Z. 2003. Characterization of Iranian grape cultivars using microsatellite markers. *Vitis.* 42: 185-192.
5. Fjellstrom, R.G., Parfitt, D.E. and McGranahan, G.H. (1994). Genetic relationships and characterization of Persian walnut (*Juglans regia*) cultivars using restriction-fragment-length-polymorphisms (RFLPs). *J. Am. Soc. Hort.* 89:665-670
6. Foroni, I., Rao, R., Woeste, K. and Gattitelli, M., (2005). Characterisation of *Juglans regia* L. with SSR markers and evaluation of genetic relationships among cultivars and the 'Sorrento' landrace. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 80: 49-53
7. Froni, B., Malvoiti, M.E., Taurchini, D., Finesch, S. (2001) Izozyme and analysis of genetic diversity in natural European and Asiatic walnut (*juglans regia* L.). *Populations. Acta Hort.* 544
8. Gerald, S. D., Woeste, K., Mallikarjuna, K., Aradhya, K., Koehmstedt, A. and Simon, C. (2005). Characterization of 14 microsatellite markers for genetic analysis and cultivar identification of walnut. *J.Hort. Sci and Biotechnol.* 130:348-354.
9. Grauke, J.K., Mohamad, J.I., Avetu, S.R. and Thompson, T.E. (2003). Developing of microsatellite DNA markers in Pecan. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128:374-380
10. Kafkas, S., Ozkan, H. and Sutyemez, M. (2005). DNA polymorphism and assessment of genetic relationships in walnut genotypes based on AFLP and SAMPL markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 130: 585-590
11. Kumar, L. S. (1999). DNA markers in plant improvement. *Biotechnology Advances.* 17: 143-183
12. McGranahan, G. 2007. Molecular genetics of walnuts - A breeders perspective. *Acta Hort.* 738: 111-115
13. McGranahan, G., Leslie, C. (1990). Walnuts (*Juglans*). Pp. 907-951. In: Moore, J.N., Balington, J.R. (Eds.), *Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops.* Wageningen, the Netherlands.
14. McGranahan, G.H., Charles, A., Leslie, C.A., Philips, H.A. and Dandaker, A. (1998). Propagation. pp. 71-83. In: D. Ramos (ed.), *Walnut Production Manual*, University of California, DANR Publ., Davis.
15. Murry, M. and Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acid Reserch.* 8: 4321- 4325
16. Nei, M. (1978). Analysis of gene diversity in subdivided population. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70:3321-3323
17. Nicese, F.P., Hormasa, 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
18. Orel, G., Marchant, A.D., Mcleod, J.A and Richards, G.D. (2003). Characterization of 11 Juglandaceae genotypes based on morphology, cp DNA and RAPD. *Horticulture Science* 38: 1178- 1183.
19. Pavlicek, A., Hrda, S. Flegr, J. (1999). FreeTree-Freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of the genus *Frenkelia*. *Folia Biologica (Praha)* 45: 97-99
20. Ramos, D. (1998). *Walnut Production Manual*, University of California, DANR Publ., Davis
21. Shiran, B., N. Amirbakhtiar, S. Kiani, Sh. Mohammadi, B.E. Sayed-Tabatabaei and H. Moradi . (2007). Molecular characterization and genetic relationship among almond cultivars assessed by RAPD and SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 111: 280-292.
22. Weir, B.S., (1996). Interspecific differentiation. Pp: 385-403. In: D.M. Hillis et al. (Eds). *Molecular systematics*, 2nd edition. Sinauer Associates, Sunderland.
23. Woeste, K., Burns, R., Rhodes, O. and Michler, C. (2002). Thirty polymorphic nuclear microsatellite loci from black walnut. *J. Hered.* 93: 58-60.
24. Wright, S., (1951). The genetic structure of population. *Annals of European genetics.* 15: 323-354.

