



بررسی تنوع ژنتیکی برخی ژنوتیپ‌های گردوی ایرانی در باغات تجاری مشهد با نشانگر ISSR

شادی عطار¹ - غلامحسین داوری‌نژاد^{2*} - لیلا سمیعی³ - محمد مقدم⁴

تاریخ دریافت: 1395/10/05

تاریخ پذیرش: 1396/05/14

چکیده:

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی تعدادی ژنوتیپ‌های گردوی ایرانی (*Juglans regia L.*) موجود در باغ‌های استان خراسان رضوی از نشانگر مولکولی ISSR استفاده گردید. با این هدف 56 ژنوتیپ گردو از باغ‌های استقلال، گلستان، اندشت و امام رضا انتخاب، پلاک‌کوبی و مورد آزمایش واقع شدند. با استفاده از 9 آغازگر مورد استفاده، در مجموع 118 باند تولید شد که در محدوده 300 تا 3000 جفت باز بود و 29 باند چند شکل بودند. تعداد قطعات تکثیر شده برای هر آغازگر متفاوت بود، به طوری که آغازگر 844 تعداد 14 عدد و آغازگر 890 تعداد 8 عدد باند تکثیر شده داشت. متوسط قطعات تکثیر شده برای هر آغازگر 9/83 بود. در دندوگرام حاصل از خوشه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس ضریب تشابه دایس و روش UPGMA 10 کلاستر تشکیل شد. میزان تنوع ژنتیکی در جمعیت مورد مطالعه پایین بود که دلایل عمده آن دخالت‌های انسانی، انتخاب و تکثیر تعداد معدودی از ژنوتیپ‌های برتر و گاها خود کرده افشانی گردو می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: ارقام بومی، آغازگر، تشابه، جفت باز، کلاستر

مقدمه

روی محصولات باغی به خصوص درخت گردو انجام نشده است. بنابراین می‌توان با شناسایی خصوصیات ژنوتیپ‌ها و ارقام مختلف، ژن‌های مطلوب و مورد نیاز محققان اصلاح و به‌نژادی را در دسترس آن‌ها قرار داد. همچنین با بررسی خزانه ژنی موجود در منطقه اقدام به انتخاب ژنوتیپ‌های مقاوم، سازگار، پر محصول و با کیفیت میوه (ژنوتیپ‌های برتر) در شرایط آب و هوایی مورد آزمایش نمود و آنها را برای تکثیر و احداث باغ‌های جدید در اختیار باغداران قرار داد.

نشانگرهای مولکولی قسمت‌هایی از DNA هستند که در ژن‌های اصلی بر روی کروموزوم قرار گرفته و همراه با آنها به نسل بعد انتقال می‌یابند. نشانگرهای بین ریز ماهواره‌ای یا ISSR³ اولین بار در سال 1994 شناسایی شدند. علی‌رغم سابقه نه چندان طولانی آنها، به دلیل خصوصیات منحصر به فردشان همچون تکرار پذیری بالا، پراکندگی یکنواخت در سطح ژنوم، قدرت تفکیک بالا و سرعت و سهولت اجرا به طور گسترده‌ای در مطالعات ژنتیک گیاهی به کار گرفته شده‌اند (14 و 24).

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 (9 و 16)، آلوزایم (6)، ایزوزایم (7)، نشانگر RFLP (1)، نشانگر RAPD (15)، نشانگر AFLP (2) و

گردوی ایرانی (*Juglans regia L.*) متعلق به خانواده ژوگلانداسه² در عرض جغرافیایی 29 تا 39 درجه شمالی و طول جغرافیایی 45 تا 64 درجه شرقی و در مناطق شمال، غرب و مرکز کشور ایران بیشترین گسترش را دارد. منشأ طبیعی گردو، مناطق کوهستانی آسیای مرکزی و به ویژه جنگل‌های شمال ایران است. اکثر ژنوتیپ‌های موجود گردو بذری بوده و به روش جنسی تکثیر می‌شوند. بررسی ساختار ژنتیکی این ژنوتیپ‌ها جهت شناسایی، انتخاب و نگهداری ذخایر ژنی آنها حائز اهمیت می‌باشد (21).

شناسایی و جمع‌آوری ارقام بومی درختان میوه اولین گام در مسیر برنامه‌های اصلاحی به شمار می‌آید و عدم اطلاع متخصصان اصلاح از خصوصیات ژنتیکی گیاهان موجب می‌شود که کار به نژادی با کندی صورت گیرد. در کشور ما به دلیل نبود شناخت در مورد ژن‌های مطلوب و ژرم‌پلاسم گیاهی برنامه‌های اصلاحی در خور توجهی بر

1، 2 و 4- به ترتیب دانشجوی دکتری، استاد و دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(* نویسنده مسئول: Email: Davarynej@um.ac.ir)
3- استادیار گروه پژوهشی گیاهان زینتی، پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد

نشانگر ISSR (19) اشاره کرد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها و استخراج DNA ژنومی از برگ:

در این پژوهش 56 ژنوتیپ گردو طی سال‌های 1392 تا 1394 در چهار باغ منتخب استان خراسان رضوی مورد مطالعه قرار گرفتند. برای شروع طرح 42 درخت گردو در باغ استقلال (باغ شماره 1) واقع در روستای شلنگرد متعلق به بنیاد مستضعفان، 8 درخت در باغ گلستان (باغ شماره 2) واقع در 35 کیلومتری جاده مشهد چناران متعلق به شرکت شهید ایران، 3 درخت در باغ الندشت (باغ شماره 3) واقع در بلوار کوهسنگی و 3 درخت در باغ امام رضا (باغ شماره 4) واقع در بلوار توس که هر دو باغ متعلق به سازمان باغات استان قدس رضوی هستند، به طور کاملاً تصادفی انتخاب و پلاک‌کوبی شدند (جدول 1). در بهار 92 با شروع رشد درختان و باز شدن برگ‌ها اقدام به جمع‌آوری برگ‌های هر یک از ژنوتیپ‌ها شد. از هر ژنوتیپ حدود 200 میلی‌گرم برگ توزین شد و در فویل آلومینیومی بسته‌بندی شده و در فریزر -80 درجه سانتیگراد قرار داده شد. استخراج DNA با روش دوپیل اند دوپیل (5) انجام شد.

پس از استخراج DNA کیفیت نمونه‌ها توسط ژل آگارز 1 درصد و استفاده از روش الکتروفورز و کمیت آنها توسط دستگاه اسپکتوفوتومتر در طول موجهای 260 و 280 نانومتر تعیین شد.

تکثیر ریزماهورها و واکنش PCR

در ابتدا برای انجام این پژوهش 24 آغازگر نشانگر ISSR تهیه و پس از ارزیابی اولیه آنها بر روی 5 ژنوتیپ که به صورت تصادفی از میان ژنوتیپ‌ها جدا شده بودند 9 پرایمر با چندشکلی و تکرار پذیری بالا جهت بررسی‌های بیشتر انتخاب شدند، که مشخصات آنها در جدول 2 آمده است.

برای انجام واکنش PCR از کیت امپلیکون (کد 180301، ساخت کشور دانمارک) استفاده شد. واکنش PCR در حجم ده میکرولیتر و با استفاده از 5 میکرولیتر کیت، 2 میکرولیتر DNA رقیق شده (که غلظت باید بین 10 تا 15 نانوگرم باشد)، 2/7 میکرولیتر آب استریل و 0/3 میکرولیتر پرایمر (غلظت 10 پیکومول) انجام شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در دستگاه ترموسایکلر با واسرشت سازی اولیه DNA ژنومی در دمای 94 درجه سانتیگراد به مدت 5 دقیقه آغاز و با 35 چرخه شامل دمای 94 درجه سانتیگراد به مدت 25 ثانیه برای واسرشت سازی، اتصال پرایمرها به رشته الگو به مدت 25 ثانیه بسته به دمای پرایمر (دمای پرایمر از 47/6 تا 53/9 درجه سانتیگراد متغیر بود)، بسط رشته جدید به مدت 1 دقیقه در دمای 72 درجه سانتیگراد و گسترش نهایی به مدت 10 دقیقه در دمای 72 درجه سانتیگراد دنبال شد.

جی و همکاران (11) با بررسی تنوع ژنتیکی چند جمعیت گردو در شمال چین با نشانگر ISSR نشان دادند که جمعیت‌ها در تجزیه خوشه‌ای UPGMA در 8 خوشه و سه گروه قرار گرفتند. تیان و همکاران (20) با بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های بذری گردو با نشانگر ISSR در چهار منطقه چین آنها را به 5 شاخه تقسیم نمودند. جیا و همکاران (10) حدود 77 ژنوتیپ پکان (گردو گرمسیری) را با 77 آغازگر ISSR و 19 آغازگر SSR ارزیابی کردند و 94 باند تکثیر شده بین 140 تا 1950 bp را برای نشانگر ISSR مشاهده کردند. کریستوپولوس و همکاران (3) با استفاده از نشانگر مولکولی ریز ماهورها به بررسی تنوع ژرم‌پلاسم و ارتباط ژنتیکی ژنوتیپ‌های گردو بومی یونان و ارقام خارجی گردو پرداختند و مشاهده کردند که ارقام خارجی در یک گروه قرار می‌گیرند؛ اما ژنوتیپ‌های بومی در یک گروه مجزا قرار نگرفتند. پولیگونی و همکاران (18) با استفاده از نشانگرهای RAPD، ISSR، SSR ژنوتیپ‌های بذری و هیبریدهای بین گونه‌ای را در بین گونه گردوی سیاه و گردوی ایرانی تفکیک نمودند؛ تجزیه‌های سیتولوژیکی نشان داد که حالت تریپلوئیدی نیز در گونه‌های فوق مشاهده می‌شود. پوتر و همکاران (19) 48 ژنوتیپ گردو را در ایالت کالیفرنیا با 47 آغازگر ISSR مطالعه کردند و مشاهده کردند که 15 تا از ژنوتیپ‌ها فقط با یک آغازگر از سایرین مشخص می‌شوند. 31 ژنوتیپ با حداقل 2 آغازگر و 2 تای باقیمانده به 3 آغازگر برای تشخیص نیاز داشتند. فورونی و همکاران (8) از نشانگرهای ریزماهورها برای شناسایی گردوی ایرانی و ارزیابی همبستگی ژنتیکی بین ارقام و بیوتیپ گردوی سورنتو استفاده کردند. در این مطالعه با استفاده از 23 جفت نشانگر ریزماهورها 10 دانهال سورنتو و 6 هم‌گروه پیوندی سورنتو با 6 رقم گردو مورد مقایسه قرار گرفتند و در 6 جفت از 23 جفت آغازگر مورد مطالعه 33 آل را شناسایی کردند.

محمودی و همکاران (12) با بررسی تنوع تعدادی از ژنوتیپ‌های گردو ایرانی با نشانگر ISSR اشاره داشتند که این نشانگر جمعا 103 قطعه تولید نمود که 93 تای آن چند شکل بودند.

با توجه به اینکه گردو یک گیاه دگرگشن بوده و روش تکثیر عمده آن کشت بذر می‌باشد، بنابراین تصور می‌شود که تنوع ژنتیکی بسیار بالایی بین ژنوتیپ‌ها مشاهده شود و با توجه به اینکه تا کنون گزارش مدونی در مورد تنوع ژنتیکی گردو خصوصا با استفاده از نشانگرهای مولکولی در سطح استان خراسان رضوی انجام نشده است بهتر است مورد در باغ‌های گردو استان خراسان هم کنترل شود، لذا هدف از انجام پژوهش حاضر ارزیابی کارایی نشانگر ISSR برای مطالعات تنوع ژنتیکی گردو ایرانی و ارزیابی میزان تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گردو ایرانی موجود در تعدادی از باغ‌های استان خراسان رضوی می‌باشد.

تفکیک محصولات واکنش PCR با بارگذاری آنها بر روی ژل آگارز 2 درصد حاوی TBE 0/5 X در دستگاه الکتروفورز انجام شد. بعد از سپری شدن زمان لازم (اختلاف پتانسیل 85 ولت به مدت دو ساعت الکتروفورز) از ژل‌ها توسط دستگاه ژل داک عکس برداری شد.

جدول 1- ژنوتیپ‌های مورد مطالعه گردو و محل جمع آوری آنها

Table 1- The studied genotype and collection places

| محل جمع آوری Place | ژنوتیپ Genotype | محل جمع آوری Place | ژنوتیپ Genotype |
|--|---|--|--------------------|
| باغ استقلال - شرکت زراعت و باغداری مشهد باغ شماره 1 Esteghlal orchard. No 1 | Es 37 | باغ استقلال - شرکت زراعت و باغداری مشهد باغ شماره 1 Esteghlal orchard. No 1 | Es 6 |
| | Es 38 | | Es 7 |
| | Es 39 | | Es 8 |
| | Es 40 | | Es 9 |
| | Es 41 | | Es 10 |
| | Es 42 | | Es 11 |
| | Es 43 | | Es 12 |
| | Es 44 | | Es 13 |
| | Es 45 | | Es 14 |
| | Es 46 | | Es 15 |
| | Es 47 | | Es 16 |
| | Es 48 | | Es 17 |
| | Es 49 | | Es 18 |
| | Es 50 | | Es 20 |
| | باغ گلستان - شرکت شهدایران باغ شماره 2 Golestan orchard No 2 | | G 51 |
| G 53 | | Es 22 | |
| G 55 | | Es 23 | |
| G 56 | | Es 24 | |
| G 57 | | Es 25 | |
| G 58 | | Es 26 | |
| G 59 | | Es 27 | |
| G 60 | | Es 28 | |
| A 64 | | Es 29 | |
| باغ الوند - سازمان باغات آستان قدس رضوی باغ شماره 3 Alandasht orchard No 3 | A 65 | باغ الوند - سازمان باغات آستان قدس رضوی باغ شماره 3 Alandasht orchard No 3 | Es 32 |
| | A 66 | | Es 33 |
| | E 67 | | Es 34 |
| باغ امام رضا - سازمان باغات آستان قدس رضوی باغ شماره 4 Emam Reza orchard No 4 | E 68 | باغ امام رضا - سازمان باغات آستان قدس رضوی باغ شماره 4 Emam Reza orchard No 4 | Es 35 |
| | E 70 | | Es 36 |

(PIC) با استفاده از رابطه زیر به دست آمد، که f_i فراوانی نسبی آلل

تکثیر شده و $1 - f_i$ فراوانی نسبی آلل‌های تکثیر نشده است.

$$PIC = 2f_i(1 - f_i)$$

هتروزیگوسیتی متوسط هر پرایمر (H_{av}) از رابطه زیر محاسبه

شد که در آن f_i فراوانی نسبی آلل تکثیر شده و $1 - f_i$ فراوانی نسبی

آلل‌های تکثیر نشده و N تعداد مکان‌های ژنی یا لوکوس هر آغازگر است.

$$H_{av} = \sum [2f_i(1 - f_i)] / N$$

شاخص نشانگر (MI) با استفاده از معادله زیر بدست آمد، که

EMR نسبت چندگانه موثر بوده و بیانگر تعداد کل مکان‌های ژنی

چند شکل هر آغازگر است، و در رابطه نسبت چندگانه موثر np تعداد

مکان‌های چندشکل و n تعداد کل مکان‌های ژنی هر آغازگر میباشد.

$$MI = H_{av} \times EMR$$

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تصویر ژل‌های الکتروفورز حاصل از آغازگرهایی که باندهای

چندشکل با وضوح مناسب تولید کرده بودند به صورت دستی تجزیه

شد. سپس به حضور یا عدم حضور یک باند در هر نمونه، با استفاده از

اعداد صفر و یک امتیازدهی و در نهایت با استفاده از نرم افزار

NTedit به ماتریس تبدیل شد. شباهت ژنتیکی نمونه‌ها با استفاده از

نرم افزار NTSYSpc. روش SIMQUAL و ضریب تشابه DICE

محاسبه شد. دندوگرام با استفاده از تجزیه خوشه‌ای به روش

UPGMA ترسیم گردید. تجزیه به مختصات اصلی (PCO) با استفاده

از نرم افزار NTSYS انجام شد و گروه‌بندی نمونه‌ها در پلات دو

بعدی بررسی شد.

برای هر نشانگر در این آزمایش محتوی اطلاعات چند شکلی

که I_b میزان آگاهی بخش بودن هر باند یک پرایمر است که از رابطه زیر بدست می‌آید:

$$I_b = 1 - (2 \times [0/5 - p])$$

$EMR = np (np/n)$
 قدرت تفکیک (R_p) آغازگر بیانگر میزان کارایی هر نشانگر برای جداسازی و تفکیک نمونه‌ها می‌باشد از فرمول زیر بدست می‌آید:
 $R_p = \sum I_b$

جدول 2- مشخصات آغازگرهای ISSR مورد استفاده در بررسی ژنوتیپ‌های گردو ایرانی مورد مطالعه
 Table 2- Specifications of ISSR primers in study of persian walnut Genotypes

| نام آغازگر Primer | توالی Sequence | دمای اتصال بهینه (درجه سانتیگراد) Annaling temperature (c) |
|----------------------|-------------------------|--|
| UBC 825 | ACA CAC ACA CAC ACA CT | 48.5 |
| UBC 827 | ACA CAC ACA CAC ACA CG | 52.4 |
| UBC 830 | TGT GTG TGT GTG TGT GG | 51 |
| UBC 834 | AGA GAG AGA GAG AGA GYT | 50 |
| UBC 842 | GAG AGA GAG AGA GAG AYG | 53.9 |
| UBC 844 | CTC TCT CTC TCT CTC TRC | 52.4 |
| UBC 873 | -AGA CAG ACA GAC A | 48.2 |
| UBC 890 | VHV GTG TGT GTG TGT GT | 47.6 |
| UBC 891 | HVH TGT GTG TGT GTG TG | 47.6 |

نتایج و بحث

برای تعیین مقدار تنوع و فرسایش ژنتیکی در نظر گرفته شود. درصد چند شکلی را پولیگونی و همکاران (17) 62/5 درصد در ارقام مورد مطالعه ایتالیا و دوگان و همکاران (4) برای ارقام مورد مطالعه ترکیه 69/05 گزارش کردند. علاوه بر تعداد آل‌های شناسایی شده و درصد چند شکلی، محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) هر آغازگر نیز محاسبه شد که نتایج آن در جدول 3 آمده است. بیشترین مقدار PIC مربوط به آغازگر UBC830 برابر 0/45 و کمترین آن مربوط به آغازگر UBC844 معادل 0/08 بود.

میزان PIC یکی از شاخص‌های مهم جهت مقایسه نشانگرهای مختلف از نظر قدرت تمایز آنها به شمار می‌رود مقادیر بالای این معیار، دلالت بر چندشکلی زیاد در یک جایگاه نشانگری دارد که در تفکیک و تمایز افراد نقش به سزایی دارد. از این جهت نشانگرهای با PIC بالا برای تمایز ژنوتیپ‌های خویشاوندی نزدیک مفید هستند. بنابراین می‌توان آغازگر UBC830 را برای مطالعات بعدی به عنوان مناسب‌ترین آغازگر ISSR در زمینه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گردو پیشنهاد کرد. میزان PIC را کریستوپولوس و همکاران (3) بین 0/035 تا 0/499 ثبت کردند.

بیشترین مقدار شاخص نشانگر مربوط به آغازگر UBC830 (3/6) و کمترین مربوط به آغازگر UBC834 (0/03) به دست آمد. کریستوپولوس و همکاران (3) آغازگر UBC814 را در مطالعاتشان به عنوان آغازگری با بیشترین شاخص نشانگر معرفی کردند. توانایی آغازگر جهت متمایز کردن تعداد زیادی از ژنوتیپها با قدرت تفکیک نشان داده می‌شود. بیشترین قدرت تفکیک 3/89 در آغازگر

در این تحقیق تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گردو ایرانی در باغ‌های منتخب استان خراسان رضوی با استفاده از نشانگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا برای انجام این پژوهش، تعداد 24 پرایمر مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از ارزیابی اولیه آنها بر روی 5 ژنوتیپ که به صورت تصادفی از میان ژنوتیپ‌ها انتخاب شده بودند 9 پرایمر با چندشکلی و تکرار پذیری نسبتاً بالا جهت بررسی‌های بیشتر انتخاب شدند. شاخص‌های مورد ارزیابی در جدول 3 آمده است. در مجموع پرایمرها 118 باند قابل امتیازدهی تولید کردند که در محدوده 300 تا 3000 جفت باز بود. تیان و همکاران (20) با استفاده از 9 آغازگر ISSR 101 باند و دوگان و همکاران (4) با استفاده از 25 آغازگر ISSR 211 باند مشاهده کردند. محدوده سائز باندها در مطالعه جی و همکاران (11) 300 تا 1200 جفت باز، کریستوپولوس و همکاران (3) 200 تا 1480 بود. تعداد قطعات تکثیر شده برای هر آغازگر متفاوت بود به طوری که آغازگر UBC844 تعداد 14 عدد و آغازگر UBC890 تعداد 8 عدد باند تکثیر شده داشت، متوسط قطعات تکثیر شده برای هر آغازگر 9/83 بود. جی و همکاران (11) ضریب تکثیر متوسط آغازگرهای ISSR را 10/11، دوگان و همکاران (4) 8/44، کریستوپولوس و همکاران (3) 13/3 و پولیگونی و همکاران (17) 12/8 گزارش کردند.

درصد چند شکلی در آغازگرهای مختلف متفاوت بود. حداکثر چند شکلی ایجاد شده (80 درصد) مربوط به پرایمر UBC830 بود. به طور کلی، با توجه به اینکه درصد باندهای چندشکل سازگاری پایینی نسبت به هر تغییر محیطی نشان می‌دهد، می‌تواند به عنوان شاخصی

Ubc830 و کمترین قدرت تفکیک مربوط به Ubc834 (0/32) دهد هر آغازگر چه تعدادی از ژنوتیپ‌ها را می‌تواند شناسایی کند. مشاهده شد (جدول 3). قدرت تفکیک شاخصی است که نشان می‌دهد

جدول 3- دامنه اندازه مولکولی آلل‌ها، تعداد قطعات تولید شده، درصد و محتوای اطلاعات چندشکلی آغازگرهای ISSR منتخب
Table 3- Range of molecular size, number of fragments, percentage and content of polymorphism of ISSR primers

| نام آغازگر Primer | قدرت تفکیک (RP) | شاخص نشانگر (MI) | نسبت چندگانه موثر (EMR) | میانگین هتروزایگوسیتی (HAV) | محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) | تعداد پلی مورفیسیم | تعداد قطعات چند شکل | تعداد کل قطعات تکثیر شده | دامنه اندازه باند های مشاهده شده |
|----------------------|-----------------------|------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|--|--------------------------|------------------------------|-----------------------------|---|
| UBC 825 | 2.28 | 0.60 | 4 | 0.15 | 0.35 | 66.66 | 6 | 9 | 550-2500 |
| UBC 827 | 2.35 | 0.41 | 2.5 | 0.16 | 0.32 | 50 | 5 | 10 | 400-2800 |
| UBC 830 | 3.89 | 1.64 | 6.4 | 0.25 | 0.45 | 80 | 8 | 10 | 650-3000 |
| UBC 834 | 0.32 | 0.002 | 0.09 | 0.02 | 0.03 | 9.09 | 1 | 11 | 450-2400 |
| UBC 842 | 0.64 | 0.01 | 0.36 | 0.02 | 0.18 | 18.18 | 2 | 11 | 350-2200 |
| UBC 844 | 0.78 | 0.002 | 0.07 | 0.03 | 0.08 | 7.14 | 1 | 14 | 300-2500 |
| UBC 873 | 0.75 | 0.02 | 0.4 | 0.05 | 0.27 | 20 | 2 | 10 | 400-2700 |
| UBC 890 | 1.07 | 0.04 | 0.5 | 0.08 | 0.37 | 37.5 | 3 | 8 | 450-2200 |
| UBC 891 | 1.17 | 0.02 | 0.4 | 0.07 | 0.12 | 20 | 2 | 10 | 450-1800 |
| کل Total | | | | | | | 29 | 118 | |
| میانگین Average | | | | | | 25.71 | 2.41 | 9.83 | |

در گروه هشتم دوژنوتیپ متعلق به باغ شماره 2 جای گرفتند. در گروه نهم جمعا 20 ژنوتیپ قرار داشتند که 9 ژنوتیپ باغ شماره 1 در زیر گروه‌های مجزا قرار گرفتند، دو ژنوتیپ باغ شماره 1 با یک ژنوتیپ از باغ شماره 3 در یک زیر گروه، دو ژنوتیپ باغ شماره 1 با یک ژنوتیپ از باغ شماره 2 در یک زیر گروه و دو ژنوتیپ باغ شماره 3 با 3 ژنوتیپ باغ شماره 2 در یک زیر گروه مجزا جای گرفتند. در گروه دهم دوژنوتیپ باغ شماره 3 قرار گرفتند.

مارکر مولکولی ISSR تا حدودی توانست وجود تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های گردو را آشکار کند و ژنوتیپ‌ها را بر اساس محل باغ از یکدیگر تفکیک کند.

نمودار مربوط به تجزیه مولفه‌ها نیز در شکل 2 رسم شده است، که نتایج مربوط به این تجزیه تحلیل تا حد زیادی نتایج مربوط به تجزیه خوشه‌ای را تایید می‌کند و بیشتر ژنوتیپ‌هایی که در دندوگرام در یک گروه قرار داشتند در PCO نیز کنار هم قرار گرفتند که این خود تاییدی بر نتایج به دست آمده است.

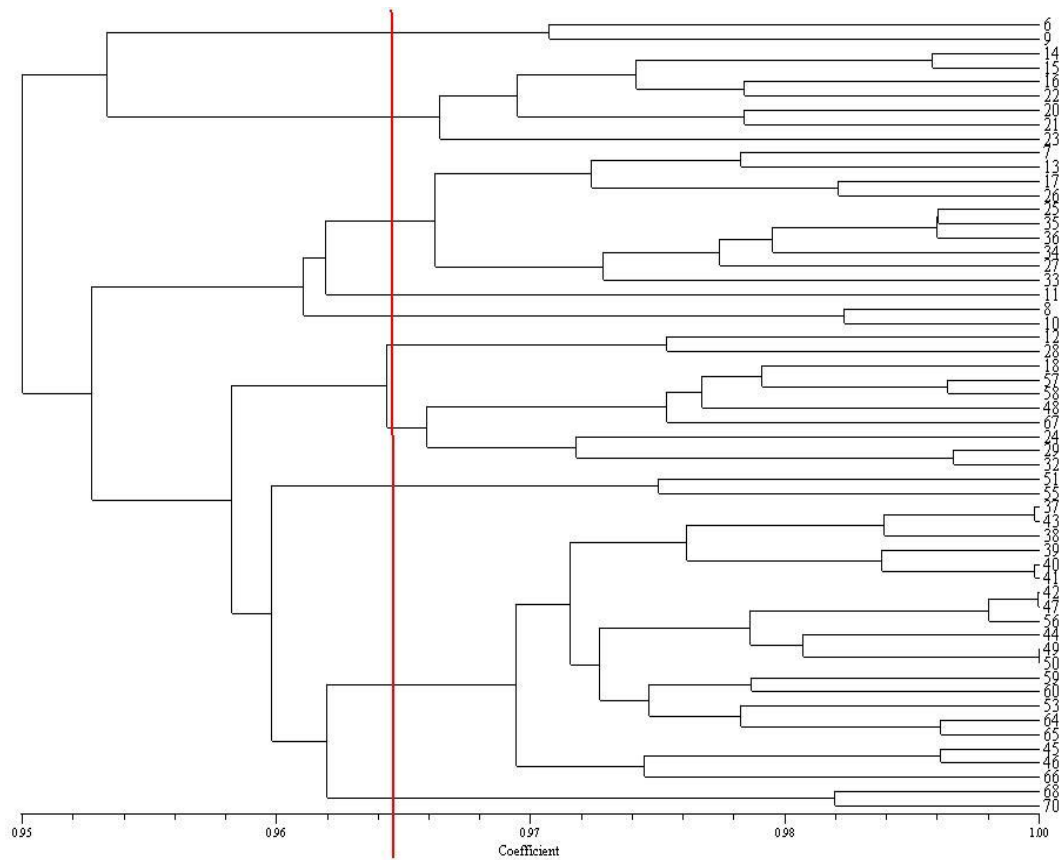
برای تعیین همبستگی بین ماتریس حاصل از دندوگرام و ماتریس تشابه دایس ضریب همبستگی کوفنیک محاسبه شد که مقدار آن برابر با 0/699 و میزان t منتل 15/67 بود که نشان دهنده همبستگی خوب بین ماتریس حاصل از دندوگرام و ماتریس تشابه دایس می‌باشد.

تجزیه و تحلیل خوشه‌ای داده‌های حاصل از نشانگر ISSR بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه دایس ژنوتیپ‌ها را در ضریب تشابه 0/96 به 10 گروه تقسیم‌بندی کرد (شکل 1).

پولیگونی و همکاران (17) با مطالعه 4 رقم گردو در ایتالیا و انجام تجزیه خوشه‌ای گزارش کرد که ارقام در دو خوشه اصلی قرار گرفتند.

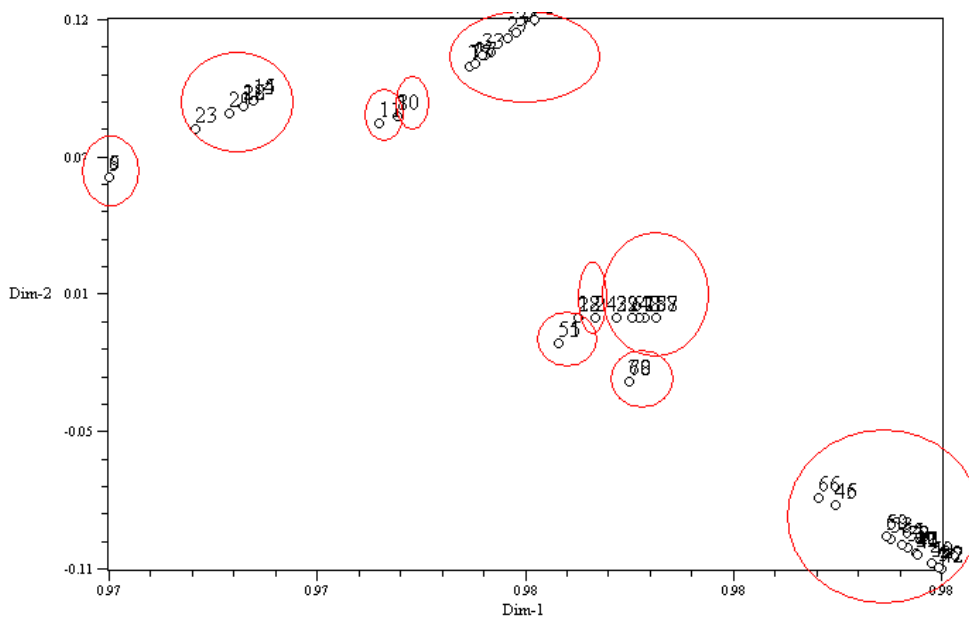
در 6 گروه اول فقط ژنوتیپ‌های باغ شماره 1 قرار گرفتند به طوری که در گروه اول 2 ژنوتیپ، در گروه دوم 7 ژنوتیپ، در گروه سوم 10 ژنوتیپ، در گروه چهارم فقط یک ژنوتیپ، در گروه پنجم 2 ژنوتیپ و در گروه ششم 2 ژنوتیپ دسته بندی شد.

در گروه هفتم، 5 ژنوتیپ از باغ شماره 1، 2 ژنوتیپ از باغ شماره 2 و 1 ژنوتیپ از باغ شماره 4 قرار گرفتند.



شکل 1 - دندروگرام و گروه‌های حاصل از روابط ژنتیکی 56 ژنوتیپ گردو با استفاده از نرم افزار NTSYSpc v2.02 بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه Dice روی داده‌های حاصل از 9 آغازگر برتر ISSR

Figure1: Cluster analysis of genetic relationships of 56 walnut genotypes using the NTSYSpc v2.02 software according to UPGMA method and Dice similarity coefficient on data from 9 ISSR primers



شکل 2- تجزیه به مولفه (PCO) داده حاصل از نشانگر ISSR
Figure 2: Component analysis (PCO) of ISSR molecular marker data

کمتر از حد مورد انتظار بود. بر اساس نتایج تجزیه خوشه‌ای (شکل 1) و تجزیه به مولفه‌ها (شکل 2) نیز می‌توان نتیجه گرفت که فواصل ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها با فاصله جغرافیایی موجود در باغ‌های گردو تا حدودی مطابقت داشت.

در جهت تکمیل این مطالعه، نویسنده پیشنهاد می‌کند که بهتر است ژنوتیپ‌های بیشتر و پرایمرهای بیشتری از مارکر ISSR نیز جهت صحت این ادعا که تنوع ژنتیکی پایین در این منطقه است، مورد ارزیابی قرار گیرد. همچنین می‌توان این مطالعه را با بررسی سایر مارکرهای مولکولی و مطالعه با وسعت بیشتری در سطح استان خراسان بزرگ گسترش داد.

به طور کلی با بررسی نتایج مطالعه حاضر و مقایسه با یافته‌های محققین گردو می‌توان گفت علی‌رغم اینکه میزان تنوع ژنتیکی گردو در بسیاری از مناطق بالاست اما گزارشاتی مبنی بر تنوع ژنتیکی پایین در جمعیت‌های گردو منتشر شده و متأسفانه در سال‌های اخیر این گزارشات سیر صعودی نیز داشته است. بر اساس نتایج حاصل از تحقیقات مختلف صورت گرفته در خصوص تنوع ژنتیکی پایین گردو، عوامل ذیل را می‌توان در این زمینه موثر دانست: بسیاری از ژنوتیپ‌ها در طول زمان و در اثر حوادث طبیعی مانند سرماهای شدید و ... از بین رفته‌اند، همین‌طور دخالت‌های انسان در جهت حذف جنگل‌ها به منظور ساخت و ساز و یا حذف درختانی که محصول آنان بازار پسند نیست و همین‌طور انتخاب و سپس تکثیر ژنوتیپ‌هایی که دارای صفات برتر هستند. مطالعات انجام شده در مورد شناسایی ژنوتیپ‌های برتر هر منطقه باعث می‌شود که این گزینش‌ها در آینده موجب حذف ژنوتیپ‌هایی شود که اگرچه بر اساس صفات مورفولوژیک مناسب نیستند اما صفات با ارزشی چون مقاومت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی دارند.

مورد دیگری که در این میان وجود دارد این است که با اینکه گردو تک پایه است و دارای دیپلوگامی و عدم همزمانی گل‌های نر و ماده می‌باشد، اما گزارش شده به دلیل اینکه گردو خود ناسازگار نیست با تغییرات محیطی و همزمانی رسیدن گل‌های نر و ماده، خود گرده افشانی در آن افزایش می‌یابد که این مورد نیز باعث کاهش تنوع ژنتیکی گردو در طول زمان خواهد شد.

از این حیث این نگرانی وجود دارد که اگر این روند کاهش تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های گردو رو به فزونی یابد، این محصول ارزشمند در زمره گونه‌های در معرض خطر قرار خواهد گرفت، که برای محقق نشدن این امر باید چاره‌ای اندیشید.

امید است تحقیق حاضر زمینه‌ای جهت شروع پژوهش‌های بیشتر در منطقه، حفظ و مدیریت ژرمپلاسم این محصول با ارزش و به حداکثر رساندن تنوع آن به منظور انجام برنامه‌های اصلاحی را در آینده فراهم نماید.

در این بین با بررسی نتایج، تنوع ژنتیکی نسبتاً پایینی در جمعیت مورد مطالعه گردو مشاهده می‌شود؛ با مطالعه یافته‌های سایر محققین گردو در دنیا مشخص می‌شود بر خلاف بسیاری از کشورها و مناطق گردو خیز دنیا که تنوع ژنتیکی بسیار زیادی بین ژنوتیپ‌های آنها وجود دارد، گزارشاتی نیز مبنی بر کاهش تنوع ژنتیکی گردو و شباهت فوق‌العاده ژنوتیپ‌ها و فرسایش ژنتیکی در جمعیت‌های گردو در بعضی مناطق وجود دارد. به طور مثال:

مالوتی و همکاران (13) با بررسی 11 جمعیت گردو با آلوزایم در ایتالیا تنوع ژنتیکی نسبتاً پایینی مشاهده کردند و توضیح دادند که با اینکه گردو تک پایه است و دیپلوگامی هم دارد، اما تغییر در شرایط محیطی باعث هم‌زمانی رسیدن دانه گرده و آمادگی پذیرش کلاله خواهد شد و خود گرده‌افشانی را افزایش و تنوع ژنتیکی را کاهش خواهد داد.

همچنین فورناری و همکاران (6) با بررسی تعدادی از ژنوتیپ‌های گردو توسط آلوزایم در آسیا و اروپا بیان نمودند که گونه گردو ایرانی خصوصاً در منطقه اروپا دچار فرسایش ژنتیکی شده و توصیه کردند که برای عدم کاهش تنوع باید مانع خود گرده‌افشانی و خویش آمیزی این گونه شده و دخالت‌های انسان را در تکثیر آن کاهش داد.

بایزیت و همکاران (7) با مطالعه تعدادی از ژنوتیپ‌های بومی گردو با نیاز سرمایی پایین از منطقه هاتای در ترکیه با مارکر AFLP اذعان داشتند که تنوع با اینکه از ژنوتیپ‌های موجود در طبیعت استفاده شد پایین است و این‌طور استنباط کردند که به دلیل اینکه وسعت کوچکی از منطقه مورد مطالعه قرار گرفته لذا شباهت زیادی بین ژنوتیپ‌ها مشاهده شد و در واقع در جمعیت مورد مطالعه تنوع ژنتیکی وجود ندارد.

ونگ و همکاران (23) با مطالعه بر روی 9 جمعیت گردو در مرکز و جنوب غربی چین به وسیله مارکر SSR تنوع ژنتیکی نسبتاً پایینی در آنها مشاهده کردند و بیان کردند فعالیت‌های بشر مانند جنگل‌زدایی، حذف ژنوتیپ‌ها و انتخاب ژنوتیپ‌های برتر در 100 سال گذشته، همچنین خود گرده افشانی که گاهی در گونه گردو ایرانی نیز مشاهده می‌شود باعث این امر شده است.

وحدتی و همکاران (22) نیز با بررسی تعدادی از ژنوتیپ‌های گردو در مناطق مختلف کرمان گزارش کردند که میزان هتروزیگوسیتی از حد مورد انتظار خیلی پایین‌تر بود که دلیل آن را خود گرده افشانی و دخالت‌های انسان دانسته‌اند.

نتیجه‌گیری کلی

مارکر مولکولی ISSR تا حدودی توانست وجود تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های گردو را آشکار کند، اما میزان این تنوع ژنتیکی پایین و

منابع

- 1- 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. HortScience 27 (1): 61-63
- 2- Bayazit S., Kaza, 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
- 3- Christopoulos M. rouskas D. tsantili E. Bebeli P.J. 2010. Germplasm diversity and genetic relationships among walnut (*Juglans regia* L.) cultivars and Greek local selections revealed by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. Scientia Horticulturae 125(4):584-592
- 4- Dogan Y, Kafkas S, Sütyemez M, Akca Y, Türemis N, 2014. Assessment and characterization of genetic relationships of walnut (*Juglans regia* L.) genotypes by three types of molecular markers. Scientia Horticulturae 168 (2014) 81–87
- 5- Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12, 13-15.
- 6- Fornari B., Canata F., Spada M. And Malvolti M. E. 1999. Aozyme analysis of genetic diversity differentiation in European and Asiatic walnut (*Juglans regia* L.) populations .Forest Genetics. 6(9): 115-127.
- 7- Fornari B., Malvolti M. E., Turchini D., Fineschi S., Beritognolo I., McCaglia E. And Cannata F. 2001. Isozym and organellar DNA analysis of genetic diversity in natural/naturalized European and Asiatic walnut (*Juglans regia*) populations. Acta Horticulturae. 544: 167-178
- 8- 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
- 9- Haghjooyan R. 2002. Investigation of Toysarkan walnut genetic diversity and 4 walnut population in Iran with morphological and molecular markers. P.hD Thesis. Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran (In persian)
- 10- Jia XD Wang T, Zhai M, Li YR, Guo ZR.2011. Genetic diversity and identification of Chinese-grown pecan using ISSR and SSR markers. Molecules. 2011 Dec 6;16(12):10078-92
- 11- Ji A., Wang Y., Wu G., Wu W., Yang H., Wang Q. 2014. Genetic Diversity and Population Structure of North China Mountain Walnut Revealed by ISSR. American Journal of Plant Sciences, 2014 (5): 3194-3202
- 12- Mahmoodi R., Rahmani F., Rezayi R. 2011. Investigation of Genetic Diversity Some Persian walnut Genotypes with ISSR Molecular Marker. Seventh Conference of Biotechnology Islamic Republic of Iran. (In Persian with English abstract)
- 13- Malvolti M. Paciucci M. Cannata F, Fineschi S.1993. Genetic variation in Italian population of Juglans Regia. L. Acta horticulture 311.
- 14- Moradi M.H., Rostamzadeh J., Rashidi A., Vahabi KH., Karimi F., Ahmadi M. 2006. Investigation of Genetic Diversity with ISSR Molecular Marker. Conference findings Agriculture and Natural Resources (West Country) - Iran, Sanandaj -2006 (In Persian with English abstract)
- 15- Niceses F. P., Hormaza J. I. and McGranahan G. H. 1998. Molecul characterization and genetic relatedness among walnut (*Juglans regia* L.) genotypes based on RAPD markers. Euphytica 101:199-206
- 16- Orel G., Marchant A. D., McLeod J. A. and Richards G. D. 2003. Characterisation of 11 Juglandaceae genotypes based on morphology cpDNA and RAPD. HortScience. 38(6):1178-1183.
- 17- Pollegioni P., Bartoli S., Cannata F., Malvoti ME, 2003. Genetic differentiation of four Italian walnut varieties by inter simple sequence repeat. Journal of Genetics and Breeding, 57(3) : 231 - 240
- 18- Pollegioni P., Major A., Bartoli S., Ducci F., Proietti R., and Malvolti M.E. 2005. Application of microsattelite and dominant molecular markers for the discrimination of species and interspecific hybrids in genus Juglans. Acta Horticulturae, 705:191-197.
- 19- 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.
- 20- Tian L., xiang A., Li-SI Z, Hai Rong W, Qing L. 2011. ISSR Analysis of Genetic Diversity among Seedling Walnut (*Juglans* spp.)Populations. Journal of Plant Genetic Resources 2011-04
- 21- Vahdati K. 2000 .Walnut situation in Iran. Nucis-Newsletter. 9: 32-33.
- 22- Vahdati K. Mohseni S. Karimi R, Barzehkar R. Amiri R.Mozaffari M. and Woeste K. 2014. Genetic diversity and gene flow of some Persian walnut populations in southeast of Iran revealed by SSR markers. Plant Systematics and Evolution
- 23- Wang H., Pei D., Gu R., Wang, B.2008. Genetic Diversity and Structure of Walnut Populations in Central and Southwestern China Revealed by Microsatellite Markers. Journal of the American Society for Horticultural Science. 133(2):197–203. 2008.
- 24- Wani N., Bhat A., Ahmad F., Akhter S., Razvi M., and Mir M. 2010. Molecular markers and their application in walnut improvment. International Journal of Current Research. 3:006-011



Study of Genetic Diversity of Some Persian walnut Genotypes in Mashhad Commercial Orchards by using ISSR Marker

Sh. Attar¹ - Gh. Davarynejad^{2*} - L. Samiee³ - M. Moghadam⁴

Received: 25-12-2016

Accepted: 05-08-2017

Introduction: Persian walnut (*Juglans regia* L.), belonging to the Juglandaceae family, has its natural origin in the mountainous regions of central Asia and especially northern forests of Iran. Most walnut genotypes are seedling and sexually reproduced. Conducting studies on the genetic structure of these genotypes to identify, select and maintain their genetic resources is important. Identifying and collecting local varieties of fruit trees is considered as the first step on the path of breeding programs and lack of information regarding plants genetic characteristics causes the breeding work to be done slowly. Various methods have been used for studying genetic diversity and determining the genetic relationship between European and Asian varieties of walnut and identifying commercial walnut varieties, among which we can mention: Morphologic indices, Alozyme, Isozym, RFLP, RAPD, AFLP and ISSR markers. ISSR molecular marker was used in order to investigate genetic diversity of some genotypes of Persian walnut (*Juglans regia* L.) in Mashhad orchards. .

Materials and Methods: To begin with, about 56 walnut trees from 4 orchards in Mashhad (Esteghlal (1), Golestan (2), Alandasht (3) and Emam Reza (4)) were selected and tagged from 2014 to 2016. In the spring of 2014 with the beginning of trees growth and opening of leaves, a number of leaves from each genotype were collected. After DNA extraction, the quality of samples by agarose gel (1 percentage) and electrophoresis method and quantity of them via spectrophotometer device at 260 and 280 nm wavelengths were determined. First, 24 primers of ISSR marker were prepared and after initial evaluation on 5 random genotypes, 9 primers with high polymorphism and repeatability were selected for further investigation. For PCR reaction, Amplicon kit (code 180 301, made in Denmark) was used. Gel electrophoresis images of primers that produced polymorphic bands with suitable resolution were analyzed manually. After scoring the bands, in which 0 used for showing the absence of a band and 1 showing the presence of a band in each sample, 1 and 0 numbers were changed to matrix by using NTedit software. Genetic similarities of samples were calculated by using NTSYSpc software, SIMQUAL method and DICE similarity coefficient. Dendrogram by cluster analysis was drawn by using UPGMA method. Principle coordinate analysis (PCO) was performed using the NTSYS software and grouping samples were evaluated in a two-dimensional plot.

Results and Discussion: Results showed that from 9 primers in total, 118 bands amplified were in 300 to 3000 base pairs, while 29 bands were polymorphic. The number of amplified fragment for each primer was different so that UBC 844 (14 bands) had the highest and UBC 890 (8 bands) had the lowest amplified bands. The average amplified fragments for each primer was 9.83. The percentage of polymorphic in various primers was different. Maximum polymorphism (80%) of the primers was observed in UBC830. In general, according to the percentage of polymorphic bands, low adjustment to any changes in the environment was indicated. This can be used as an indicator to determine the value of diversity and genetic erosion. In genotypes cluster analysis, clustering was performed based on Dice similarity coefficient and UPGMA method, and 10 clusters were formed. ISSR molecular marker somewhat revealed genetic diversity among walnuts genotypes, whereas the genetic diversity was lower than expected. In general, by reviewing the findings in other parts of the world about walnut genetic diversity and comparing them with the results of this study, despite existing high genetic diversity among walnuts in many areas, some reports of low genetic diversity among walnuts populations have been published and unfortunately in recent years these reports has made more attention. Based on the results of several studies reporting low genetic diversity among walnuts, the following factors can be effective in this problem: natural disasters, human impacts such as deforestation and selection and propagation of superior genotypes, and sometimes walnuts self-pollination. In this respect, there is concern that if this trend of decreasing genetic diversity in the walnut population continues, this invaluable crop will be in danger of

1, 2 and 4-Ph.D student, Professor and Asociated Professor of Horticultural Science, Ferdowsi University of Mashhad (*- Corresponding Author Email: Davarynej@um.ac.ir)

3- Assistant Professor, Department of Ornamental Plants, Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad

extinction. So we should think about a remedy. Finally, this investigation can be used as a start for conducting more researches in the region to maintain and manage this valuable crop germplasm and maximize genetic diversity for performing breeding programs in the future.

Keywords: Base pair, Cluster, Local varieties, Primer, Similarity