نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۸، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۳، ص. ۵۹۳-۵۸۴
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 28, No. 4, Winter 2015, P. 584-593
ISSN: 2008 - 4730

کاربرد نشانگرهای ریزماهواره جهت شناسایی و ثبت ارقام گردو

محسن مردی[۱]- مهرشاد زین العابدینی[۲*]- روح اله حق جویان[۳]- سید حسین جمالی[۴]- سید مجتبی خیام نکوئی[۵]- عبدالرضا کاوند[۶]- کریم احمدی[۷]- لیلا صادقی - علی اکبر لونی[۹]- طیبه کرمی[۱۰]- صغری خوشکام[۱۱]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۶/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۱۰

چکیده

یکی از معضلات مهم باغداران در خصوص احداث نهالستان‌ها و باغ‌ها، نامشخص بودن اصالت ژنتیکی ارقام کشت شده می‌باشد. در سال‌های اخیر تکنولوژی نشانگرهای DNA در گیاهان عالی به سمت استفاده از این نشانگرها در انگشت نگاری DNA سوق یافته است. در این تحقیق با استفاده از ۳۰ نشانگر مولکولی SSR، کلید شناسایی مولکولی در ۵ رقم از ۷ رقم گردوی ایرانی (*Juglansregia*) حاصل گردید. نتایج این تحقیق نشان داد، از مجموع ۳۰ نشانگر ریزماهواره گردو، ۵ نشانگر قادر به شناسایی کلیدهای اختصاصی ارقام گردو مورد مطالعه بودند. نشانگرهای WP-376 و - ABRII WM-6 در رقم‌های K72، Z30، Z53، Z60 و Z63 باندهای چند شکل اختصاصی ایجاد نمودند. وجود غیر یکنواختی ژنتیکی در بین درختان مورد مطالعه ارقام B21 و Z67 باعث عدم توصیه درختان مذکور به عنوان درختان مادری این ارقام گردید. کلید های مولکولی اختصاصی به وسیله تجزیه‌های مولکولی بر روی ۳۹ درخت مادری ایجاد گردید و نتایج این تحقیق در دو آزمایشگاه مستقل تایید شد. با استفاده از کلیدهای شناسایی مولکولی ارقام مورد مطالعه امکان تشخیص این ارقام در مرحله نونهالی به منظور تایید اصالت ژنتیکی آن‌ها میسر می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: گردو، ریزماهواره، انگشت نگاری، روش‌های مبتنی بر مدل، تجزیه خوشه‌ای

مقدمه

گردو با نام علمی (*Juglansregia*) از رده دولپه‌ای‌ها، تیره Fagales و خانواده Juglandaceae می‌باشد. گردوی سیاه (*Juglansnigra*) متعلق به شرق آمریکای شمالی و گردوی ایرانی یا معمولی (*Juglansregia*) بومی بالکان در جنوب شرقی اروپا، مرکز و جنوب غربی آسیا تا هیمالایا و جنوب غربی چین می‌باشد. گردو (2n = 32) درختی تک پایه است که گل‌های نر و ماده آن بر روی یک گیاه ایجاد می‌گردد. این درخت عمدتاً خودبارور و دگرسازگار است که البته دایکوگامی نیز در آن مشاهده شده است (۲). گردو از نظر چوب دارای اهمیت بسیار بالایی است. گریبانه‌های گردو به علت دارا بودن مقدار زیادی رنگ زرد – قهوه‌ای، منبع مهمی برای رنگ به شمار می‌رود. مغز گردو سرشار از روغن بوده و به صورت گسترده به صورت تازه و فرآوری مصرف می‌شود. با توجه به کاربردهای فراوان گردو در صنایع مختلف داروسازی، غذایی و صنایع چوب و نیز قدمت طولانی این گیاه ارزشمند در ایران، توجه به حفاظت و بهره‌برداری مناسب از منابع ژنتیکی و توسعه و ارتقا کمی و کیفی آن‌ها و نیز ثبت و حفظ حقوق مالکیت معنوی و مادی این گیاه مهم اقتصادی، امری ضروری بشمار می‌آید.

بر اساس آخرین گزارش سازمان خواربار جهانی، چین با بیش از ۱۶۵۵۵۰۸ هزار تن بیش‌ترین تولید گردو (با پوست) را به خود اختصاص داده است. بر اساس این گزارش ایران با حدود ۴۸۵۰۰۰ هزار تن به عنوان سومین کشور تولید کننده گردو در جهان معرفی شده است. آمریکا با صادرات ۵۹۶۲۵ تن (گردو بدون پوست) و به ارزش ۳۵۹۲۷۳ هزار دلار به عنوان اولین کشور صادر کننده گردو بدون پوست در جهان معرفی شده است. بر پایه این گزارش ایران در بین ۲۰ کشور صادر کننده گردو قرار نگرفته است.

۱، ۲ و ۵- به ترتیب دانشیار، استادیار و دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج
(*- نویسنده مسئول: Email: mzeinolabedini@abrii.ac.ir)
۳- موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج
۴ و ۶ و ۸- مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، کرج
۷- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج، ایران
۹، ۱۰ و ۱۱- معاونت تولیدات گیاهی وزارت جهاد کشاورزی، تهران

جدول۱- مشخصات نمونه های مورد مطالعه گردو

تکرار	نام رقم	شماره شناسه	تکرار	نام رقم	شماره شناسه
۱	B۲۱-۱	۱۱۰۳۵۱	۱۹	Z۵۳-۳	۱۱۰۳۰۷
۲	B۲۱-۲	۱۱۳۵۶۱	۲۰	Z۵۳-۴	۱۱۰۳۰۶
۳	B۲۱-۳	۱۱۰۳۵۲	۲۱	Z۵۳-۵	۱۱۳۵۸۸
۴	B۲۱-۴	۱۱۰۳۵۳	۲۲	Z۶۰-۱	۱۱۰۲۸۳
۵	K۷۲-۱	۱۱۳۵۶۳	۲۳	Z۶۰-۲	۱۱۰۲۸۲
۶	K۷۲-۲	۱۱۳۵۶۴	۲۴	Z۶۰-۳	۱۱۰۳۵۳
۷	K۷۲-۳	۱۱۳۵۶۲	۲۵	Z۶۳-۱	۱۱۳۵۵۶
۸	K۷۲-۴	۱۱۰۲۹۳	۲۶	Z۶۳-۲	۱۱۳۵۵۵
۹	K۷۲-۵	۱۱۰۲۹۴	۲۷	Z۶۳-۳	۱۱۳۵۵۷
۱۰	K۷۲-۶	۱۱۰۲۹۶	۲۸	Z۶۳-۴	۱۱۰۳۴۰
۱۱	Z۳۰-۱	۱۱۰۲۷۳	۲۹	Z۶۳-۵	۱۱۰۳۳۸
۱۲	Z۳۰-۲	۱۱۰۲۷۱	۳۰	Z۶۳-۶	۱۱۳۵۵۸
۱۳	Z۳۰-۳	۱۱۳۵۷۸	۳۱	Z۶۳-۷	۱۱۰۳۳۹
۱۴	Z۳۰-۴	۱۱۰۲۷۲	۳۲	Z۶۷-۱	۱۱۳۵۸۱
۱۵	Z۳۰-۵	۱۱۰۲۷۰	۳۳	Z۶۷-۲	۱۱۰۲۹۷
۱۶	Z۳۰-۶	۱۱۳۵۸۰	۳۴	Z۶۷-۳	۱۱۰۳۰۰
۱۷	Z۵۳-۱	۱۱۰۳۰۵	۳۵	Z۶۷-۴	۱۱۳۵۶۵
۱۸	Z۵۳-۲	۱۱۳۵۶۰	۳۶	Z۵۳-۳	۱۱۰۳۰۷

یکی از معضلات مهم باغداران در خصوص احداث نهالستان‌ها و باغ‌ها، نامشخص بودن اصالت ژنتیکی ارقام کشت شده می‌باشد، زیرا شناسائی ارقام باغی در سال‌های اولیه رشد و تا زمانی‌که درختان به بار ننشسته‌اند، امری دشوار است. در بسیاری از مواقع، باغداران چندین سال وقت و سرمایه خود را برای کشت یک رقم خاص صرف می‌کنند و این درحالی است که رقم کشت شده نمونه مورد نظر نبوده و به این ترتیب خسارت جبران ناپذیری به آن‌ها وارد می‌شود. از طرف دیگر، وجود باغ‌های قدیمی، عدم دسترسی به باغ‌های مادری استاندارد، عدم آشنائی کافی تولید کنندگان نهال و اشتباه در زمان حمل و نقل نهال‌ها و نیز رشد فزاینده نیاز به تولید نهال، از مهم‌ترین مشکلات پیش روی باغبانی کشور می‌باشد. تعیین منشاء ژنتیک ارقام نه تنها از جنبه‌های احداث باغ، بلکه از نظر شناسایی روابط خویشاوندی، برای دستیابی به ارقام جدید اقتصادی و مطابق با نیازهای روز اهمیت زیادی دارد. بنابراین طراحی هرگونه برنامه به نژادی و ایجاد باغ‌هایی با ارقام مورد نظر و گواهی شده مستلزم شناسایی ویژگی‌های اختصاصی هر رقم است. علی‌رغم این‌که اغلب محصولات باغبانی جزء مهم‌ترین محصولات صادراتی کشور به شمار می‌روند، اما هیچ‌گونه شناسنامه دقیقی برای تعیین اصالت ژنتیکی و حفظ حقوق مالکیت این ذخایر توارثی گرانبها در کشور وجود ندارد.

در گذشته، روش‌های شناسایی ارقام مبتنی بر خصوصیات مورفولوژیک برگ، میوه، هسته و مغز هسته استوار بود، ولی جز در موارد خاص، استفاده از صفات مورفولوژیک و بیوشیمیایی به تنهائی برای شناسایی ارقام کافی نمی‌باشد. در این ارتباط نینوت و آلتا از نشانگرهای ایزوزیم در شناسایی و تعیین روابط ژنتیکی ژنوتیپ‌های گردوی ایرانی استفاده نمودند (۱۵). ارزانی و همکاران نیز تنوع مورفولوژی ژنوتیپ‌های بومی ایران را با استفاده از صفات مورفولوژیک و به منظور شناسایی ژنوتیپ‌های امید بخش، مورد مطالعه قرار داده و این گیاهان را برای استفاده در برنامه‌های اصلاحی توصیه کردند (۱). امروزه تعیین اصالت ژنتیکی محصولات باغی، از سطح مورفولوژی و فنولوژی فراتر رفته و بوسیله روش‌های نوین بیوتکنولوژی در سطح ژنوتیپ گیاه (DNA) صورت می‌گیرد. در حال حاضر با به کارگیری هم‌زمان اطلاعات ژنوتیپی و فنوتیپی امکان تعیین دقیق هویت ارقام مهم باغی کشور میسر شده است. انگشت نگاری DNA[1]، در سال ۱۹۸۵ معرفی شد. مبنای انگشت نگاری DNA، وجود توالی‌های چند شکل مختلف در بین نمونه‌های مورد مطالعه می‌باشد. انجام انگشت نگاری DNA با استفاده از نشانگرهای مختلفی امکان‌پذیر است که با پیشرفت تکنولوژی در سال‌های اخیر، بر تعداد و کارآیی آن‌ها افزوده شده است.

در دو دهه اخیر روش‌های مولکولی مختلفی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و تعیین قرابت بین ارقام و توده‌های گردو به کار گرفته شده است. نیسه و همکاران از ۷۲ آغازگر RAPD برای توصیف و ارزیابی

1-DNA Fingerprinting

روابط ژنتیکی ۱۹ ژنوتیپ گردوی والدینی که به عنوان ارقام برتر در برنامه‌های اصلاحی بکار می‌رفتند، استفاده نمودند. بر اساس نتایج این تحقیق، برای هر یک از ارقام مورد مطالعه، کلیدهای انگشت نگاری متفاوتی ایجاد گردید. بنابراین نوارهای چند شکل این آغازگر، امکان تفکیک ژنوتیپ‌های مختلف را، حتی با وجودی روابط نزدیک خویشاوندی، میسر می‌سازد (۱۴). اورل و همکارانش (۱۶) با استفاده از خصوصیات مورفولوژیک، DNA کلروپلاستی و RAPD، ۸ گونه گردو و سه عضو دیگر این خانواده را مورد ارزیابی قرار دادند. بر اساس نتایج حاصل، گردوی آمریکایی گرمسیری/ نیمه گرمسیری با *J.nigra* و دو گونه جدید آسیایی در یک گروه قرار گرفتند. خویشاوندی نزدیک این گونه‌ها می‌تواند بیانگر سازگاری پیوند بین و درون آن‌ها باشد. بیازیت و همکارانش نیز با استفاده از نشانگرهای AFLP، ۲۲ ژنوتیپ گردو با نیاز سرمایی پایین نواحی جنوب شرقی مدیترانه را از نظر زمینه ژنتیکی مورد بررسی قرار دادند. با مشاهده چند شکلی اندک شناسایی شده در این آزمایش، پیشنهاد شد که با توجه به مراحل گزینش این ژنوتیپ‌ها بر اساس نیاز سرمایی پایین، تفاوت‌های ژنتیکی بین آن‌ها نیز اندک خواهد بود (۳) از نشانگرهای RFLP نیز در بررسی روابط ژنتیکی و توصیف ارقام گردوی ایرانی استفاده شده است. ۱۶ نشانگر RFLP از میان ۲۱ نشانگر بکار رفته در ۴۸ نمونه مورد مطالعه چند شکل بودند و تمامی نمونه‌ها در حداقل ۲۰ درصد مکان‌های ژنی مورد مطالعه هتروزیگوتی نشان دادند. کریستوژولوس و همکاران (۵) از نشانگرهای ISSR در ارزیابی تنوع ژنتیکی گردوی ایرانی موجود در جمعیت‌های طبیعی یونان و ارقام بین‌المللی موجود استفاده کردند. با بررسی ضرائب تشابه (۰/۱۳ تا ۰/۹۳) بین ۵۶ نمونه مورد مطالعه، می‌توان به وجود تنوع ژنتیکی بالا در این مواد گیاهی پی برد. در گروه‌بندی حاصل، ارقام بین المللی از ارقام یونانی تفکیک شدند، اما ارقام یونانی گروه‌بندی مشخصی را نشان ندادند. بیازیت و همکاران (۴) میزان تنوع ژنتیکی پایین در ۲۲ ژنوتیپ گردو با خصوصیات خاص (نیاز دوره سرمائی کوتاه) را با استفاده از نشانگرهای AFLP گزارش کردند. ووست و همکاران (۱۹) برای اولین بار ۳۰ نشانگرهای ریزماهواره یا SSR[1] را از گردوی سیاه جداسازی کرده و مشخصات آن‌ها را تعیین نمودند. نتایج ایشان نشان داد که از مجموع نشانگرهای جداسازی شده، تنها ۱۴ نشانگر در مطالعات تنوع ژنتیکی گردوی سیاه کارآیی داشتند. دنگل و همکاران (۷) از ۱۴ نشانگر ریزماهواره معرفی شده توسط ووست و همکاران در شناسایی و تفکیک ژنوتیپ‌های گردوی سیاه استفاده کردند. فورونی و همکاران (۱۱) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره گردو، وجود تنوع ژنتیکی بالارا در میان ژنوتیپ های بذری سورونتوی و کاسرتا ایتالیا گزارش نمودند. هم‌چنین این محقق با استفاده از ۱۲ نشانگر ریزماهواره، رقم سورنتو را مورد ارزیابی قرار داد و ۶۶ آلل متفاوت شناسایی نمود که ۱۶ آلل آن تنها در یک فرد شناسایی شد (۱۲). ابراهیمی و همکاران (۸) با استفاده از نشانگرهای SSR و برخی از خصوصیات مورفولوژیک، تنوع ژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های گردوی ایرانی را مورد مطالعه قرار دادند. بر اساس نتایج این مطالعه، تنوع ژنتیکی مفیدی برای بکارگیری در برنامه‌های اصلاحی این گیاه در ایران وجود دارد. هم‌چنین شناسایی کلکسیون ژرم پلاسم گردو و ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود در آن نیز با استفاده از نشانگرهای SSR مورد ارزیابی قرار گرفته است. در این تحقیق ۵۵ رقم متداول گردو در اسپانیا و آمریکا به کمک ۳۲ نشانگر ریزماهواره مورد بررسی قرار گرفت (۱۸). تشابه ژنتیکی ارزیابی شده به طور کامل ژنوتیپ‌های اسپانیایی و کالیفرنیایی گردو را از یکدیگر تفکیک کردند. کفکاس و همکاران (۱۳) تنوع ژنتیکی را در ۲۱ ژنوتیپ برتر گردو ترکیه با استفاده از نشانگرهای مولکولی AFLP[2] و SAMPL مورد بررسی قرار دادند. در نهایت تفکیک ژنوتیپ‌ها با استفاده از روش SAMPLE در قیاس با AFLP بهتر انجام گرفت. پولیگیونی و همکاران با استفاده از نشانگرهای SSR، ISSR[3] و RAPD[4] 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 (۱۷). البته در سال‌های اخیر از نشانگرهای SNP مبتنی بر PCR نیز در توصیف ارقام گردوی انگلیسی استفاده شده است. در این تحقیق از نشانگرهای ITS1 و ITS2 و توالی‌یابی قطعات حاصل استفاده شد که در مجموع ۲۴۴ نشانگر SNP و یک INDEL در ناحیه ۵، نشانگر ITS1 در تعیین این ارقام مورد استفاده قرار گرفت.

هدف این تحقیق تهیه کلیدهای شناسایی مولکولی مهم‌ترین ارقام گردو در ایران، با استفاده از نشانگرهای SSR بود. در این ارتباط، ابتدا درختان مادری مهم‌ترین ارقام گردو در کشور توسط بخش‌های ذی‌صلاح اجرایی و پژوهشی وزارت جهادکشاورزی شناسایی، تایید و معرفی گردیدند و در ادامه کلیدهای شناسایی مولکولی این ارقام حاصل شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

پیرو تصمیمات اتخاذ شده در جلسات هماهنگی کمیته نهال وزارت جهاد کشاورزی، انجام نمونه‌برداری پس از دریافت اطلاعات از موسسه ثبت و گواهی بذر، شامل اطلاعات دقیق نمونه‌ها و با

1-Microsatellite or Simple Sequence Repeats

2-Amplified Fragment Length Polymorphism
3-Inter Simple Sequence Repeat
4-Random Amplification of Polymorphic DNA

هماهنگی و حضور مجریان و همکاران و نمایندگان از موسسات و مراکز تحقیقاتی ذیربط و هم‌چنین معاونت تولیدات گیاهی وزارت جهاد کشاورزی انجام شد. در جدول ۱ مشخصات نمونه‌های مورد مطالعه شامل نام رقم، شماره رقم و محل جمع‌آوری درج شده است. نمونه‌های برگی جوان همراه با شاخه، بسته به نوع درخت به تعداد ۲۰-۵۰ برگ و یا حداقل ۵۰۰ میلی‌گرم انتخاب و در داخل نایلون فریزر و یا نایلون‌های مخصوص قرارداده شد و سپس در کنار یخ خشک سریعاً به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه‌ها بعد از تمیز نمودن (در صورت لزوم) و توزین به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در داخل تیوب‌های اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتر در فریزر ۸۰- نگهداری شد. روش دیگر بسته‌بندی نمونه‌ها در آلومینیوم فویل ضخیم بود که در این روش نمونه‌ها فضای کم‌تری در فریزر ۸۰- به خود اختصاص می‌دهند. مشخصات نمونه‌ها با ماژیک دائم روی و داخل فویل درج گردید.

تجزیه‌های مولکولی

استخراج DNA

استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA ساخت شرکت Core Bio و بر پایه دستورالعمل کیت انجام گردید. کیفیت و کمیت DNA با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد و اسپکتروفتومتر تعیین و غلظت نهایی DNA استخراج شده تا۲۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شد.

جدول ۲- مشخصات توالی آغازگرها SSRگردو مورد استفاده در شناسایی نشانگرهای مناسب برای انگشت نگاری

شماره	نام نشانگر	توالی جفت آغازگر ´۵-´۳	شماره	نام نشانگر	توالی جفت آغازگر ´۵-´۳
۱	ABRII-WM۶	F: CGTTTGAATTAGTGTGA R: TACGTTACCATCCGTAC	۱۶	WGA۱۱	F: CTCGACAGAAACAGCCACAA R: GGAGTTGTGTGCAGTGCG
۲	WP-۸۹	F: ACCCATCTTTCACGTGTGTG R: TGCCTAATTAGCAATTTCCA	۱۷	WGA۱۷	F: CTGTCACTTGATCACCGTGG R: GAGCTTCTACCAACGCCAAG
۳	WP۲۲۵	F: AATCCCTCTCCTGGGCAG R: TGTTCCACTGACCACTTCCA	۱۸	WGA۲۴	F: TCCCCCTGAAATCTTCTCCT R: TTCTCGTGGTGCTTGTTGAG
۴	WP۳۲۱	F: TCCAATCGAAACTCCAAAGG R: GTCCAAAGACGATGATGGA	۱۹	WGA۲۵	F: CCACTTTCGCTCTCGATTTC R: TTGCGCAGCCTCTATAAGGT
۵	WP۳۷۶	F: GCCCTCAAAGTGATGAACGT R: TCATCCATATTTACCCCTTTCG	۲۰	WGA۲۷	F: AACCCTACAACGCCTTGATG R: TGCTCAGGCTCCACTTCC
۶	WGA۲	F: GACGACGAAGGTGTACGGAT R: GTACGGCTCTCCTTGCAGTC	۲۱	WGA۳۲	F: CTCGGTAAGCCACACCAATT R: ACGGGCAGTGTATGCATGTA
۷	WGA۴	F: TGTTGCATTGACCCACTTGT R: TAAGCCAACATGGTATGCCA	۲۲	WGA۳۳	F: TGGTCTGCGAAGACACTGTC R: GGTTCGTCGTTTGTTGACCT
۸	WGA۶	F: CCATGAAACTTCATGCGTTG R: CATCCCAAGCGAAGGTTG	۲۳	WGA۴۲	F: GTGGGTTCGACCGTGAAC R: AACTTTGCACCACATCCACA
۹	WGA۷	F: CAAACAAAATCCGACCGC R: AAACCTCGATGAGCGAAGAA	۲۴	WGA۴۵	F: TCGTTACCACCAGCACAGAG R: GACATAGCGAGGGGCTAGG
۱۰	WGA۴۷	F: CCCCTTCAAATTAGGGCTTC R: AGCTCCAAACATTGGAAGGA	۲۵	WGA۶۵	F: CACCGTCTTATGCCATCCTT R: GTGCACTGTGGACGAAGAGA
۱۱	WGA۵۳	F: CTCCCTTCCGGTAAGACCTC R: GAGGCGCGACTAGGTTAGG	۲۶	WGA۶۹	F: TTAGTTAGCAAACCCACCCG R: AGATGCACAGACCAACCCTC
۱۲	WGA۵۴	F: CTAGGCTTCCCTAGCCGTG R: GGCTCCTCTCGATCTCGAC	۲۷	WGA۷۰	F: TGTAATTGGGGAATGTTGCA R: TGGGAGACACAATGATCGAA
۱۳	WGA۵۶	F: GTGAAGCTGCAATGAATTGG R: AAAGATGCAACAGACACCCC	۲۸	WGA۷۱	F: ACCCGAGAGATTTCTGGGAT R: GGACCCAGCTCCTCTTCTCT
۱۴	WGA۵۸	F: CCCTAGCCTGGCTTTTCTTT R: ATAGCCTCCACTGGTTGTGG	۲۹	WGA۷۲	F: AAACCACCTAAAACCCTGCA R: ACCCATCCATGATCTTCCAA
۱۵	WGA۶۰	F: CAAGCTTCCGTATTGGTGGT R: TATACCGCAAGCTCGCAAC	۳۰	WGA۷۳	F: AGATCAAGCCTCCACCACC R: TGCGGCTGAGACATATTGAG

جدول ۳- کد گزاری نمونه‌ها برای آلل های چند شکل یک مکان ژنی

Cultivars	Locus1			
	Allel1	Allel2	Allel3	Allel4
Ohadi	۰	۲	۳	۰۲۳
Sirizi	۱۱۱	۲	۳	۱۲۳
Seifoddini	۰	۰	۳	۰۰۳
Ebrahimi	۱	۲	۰	۱۲۰
UCB1	۰	۲	۰	۰۲۰
Integrima	۰	۰	۰	۰۰۰
Bane Baghi	۱	۰	۰	۱۰۰

تجزیه SSR

در این تحقیق مجموعاً از ۳۰ نشانگر ریزماهواره، ووست و همکاران (۱۹) و نشانگرهای جدید ریزماهواره جداسازی شده از گردوی ایرانی توسط پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی (منتشر نشده) استفاده شد که در نهایت پنج نشانگر مورد استفاده نهایی قرار گرفتند (جدول ۲).

تکثیر قطعات با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Biorad در حجم کلی ۱۵ میکرولیتر انجام شد. هر واکنش حاوی ۲ میکرولیتر دی ان ای ژنومی (۲۰ نانوگرم)، ۱/۵ میکرولیتر بافر پی سی آر (PCR) 10X، ۱/۵ میکرولیتر dNTPs (2mM) ۱/۵میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای F و R، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم تگ دی ان ای پلیمراز،۰/۶میکرولیتر کلریدمنیزیم۵۰ میلی مولار و ۷/۲ میکرولیتر آب دو بار تقطیر بود. چرخه‌های حرارتی شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه و مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل حرارتی شامل ۱۰ چرخه حرارتی تاچ داون (با کاهش ۰/۵ تا ۰/۸ درجه سانتی‌گراد در هر مرحله) و متعاقباً ۲۵ چرخه با دمای اتصال مشخص برای هر آغازگر انجام شد. محصولات حاصل از واکنش زنجیره پلیمراز در الکتروفورزعمودی ژل پلی آکریلآمید ۶ درصد و با کمک دستگاه (DNA Analyser 4300) تفکیک و ارزیابی شدند.

نحوه کدگذاری و تهیه بارکد اختصاصی هر نمونه

پس از پایان رنگ آمیزی و آشکار شدن نوارها، ژل مورد نظر اسکن گردیده و سپس بر روی عکس‌های اسکن شده کار امتیازدهی هر نمونه آغاز گردید. آلل‌ها چند شکل مکان (های) ژنی به شرح ذیل کدگذاری گردیدند. به طور مثال اگر یک نشانگر ریزماهواره دارای سه آلل چند شکل باشد، در صورت مشاهده آلل شماره یک در هر نمونه، کد یک و در صورت عدم مشاهده آلل شماره یک کد صفر- در صورت مشاهده آلل شماره دو در هر نمونه، کد دو و در صورت عدم مشاهده آلل شماره دو کد صفر- در صورت مشاهده آلل شماره سه در هر نمونه، کد سه و در صورت عدم مشاهده آلل شماره سه کد صفر در نظر گرفته می‌شود. با کنار هم قرار گرفتن کدهای مربوط به آلل‌های هر مکان ژنی، بار کد مکان ژنی مورد مطالعه برای هر نمونه بدست آمد (جدول ۳). با کنار هم قرار گرفتن بارکدهای مکان‌های ژنی مورد مطالعه در هر نمونه، بار کد نهایی برای آن حاصل گردید (جدول ۴). بررسی و تهیه کلیدهای شناسایی توسط نرم افزار Microsoft Office Excel 2010 و ارزیابی شاخص‌های تنوع ژنتیکی، تجزیه خوشه‌ای و ساختار جمعیت به کمک نرم افزارهای PowerMarker 3.25، SplitTree 4 و Structure 2.3 انجام گردید. هم‌چنین به منظور تایید نتایج حاصل از روش‌های مبتنی بر تجزیه خوشه‌ای و جهت اطلاع از وجود ساختار یا زیر جمعیت‌های احتمالی در ژرم پلاسم مورد مطالعه از روش مبتنی بر مدل Bayesian استفاده شد. با استفاده از نرم افزار Structure2.3 فرض K=۲ تا K= ۱۵ اجرا گردید (K نشان‌دهنده تعداد گروه‌ها) و سپس بر مبنای معیارهای lnP(D) و ΔK صحیح‌ترین گروه‌بندی مشخص شد. بر این اساس پایین‌ترین مقدار عددی lnP(D) و بیش‌ترین مقدار عددی ΔK نشان‌دهنده بهترین معیار برای دسته‌بندی جمعیت‌های مورد مطالعه بشمار می‌روند آزمون تکرارپذیری نشانگرهای معرفی شده توسط موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی در آزمایشگاه نشانگرهای مولکولی موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال انجام پذیرفت.

جدول ٤- کدگزاری برای آلل‌های چند شکل چند مکان ژنی

Cultivar	Barcode
Ohadi	۰۲۳-۰۰۳۰-۰۰۰
Sirizi	۱۲۳-۰۰۳۰-۰۰۰
Seifoddini	۰۰۳-۱۰۳۰-۰۰۰
Ebrahimi	۱۲۰-۱۰۳۰-۰۰۰
UCB1	۰۲۰-۱۰۰۰-۰۰۰
Integrima	۰۰۰-۱۰۰۰-۰۰۰
Bane Baghi	۱۰۰-۱۰۰۰-۰۰۰

نتایج و بحث

نتایج حاصل از۳۰ نشانگر بکار رفته توسط نرم افزارهای POPGENE و PowerMarker مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و در نهایت از ۵ نشانگر مولکولی SSR (جدول ۵)، کلید شناسایی مولکولی ۵ رقم گردو حاصل گردید که نتایج آن‌ها در شکل۱ نشان داده شده است.

جدول ۵- مشخصات توالی آغازگرها SSR گردو مورد استفاده در تهیه کلید انگشت نگاری

شماره	نام نشانگر	توالی جفت آغازگر ´۳-´۵
۱	ABRII-WM-6-F	CGTTTGAATTAGTGTGA
	ABRII-WM-6-R	TACGTTACCATCCGTAC
۲	WP-89-F	ACCCATCTTTCACGTGTGTG
	WP-89-R	TGCCTAATTAGCAATTTCCA
۳	WP-225-F	AATCCCTCTCCTGGGCAG
	WP-225-R	TGTTCCACTGACCACTTCCA
۴	WP-321-F	TCCAATCGAAACTCCAAAGG
	WP-321-R	GTCCAAAGACGATGATGGA
۵	WP-376-F	GCCCTCAAAGTGATGAACGT
	WP-376-R	TCATCCATATTTACCCCTTTCG

جدول ٦- کلید شناسایی مولکولی ۵ رقم مختلف گردو ایران

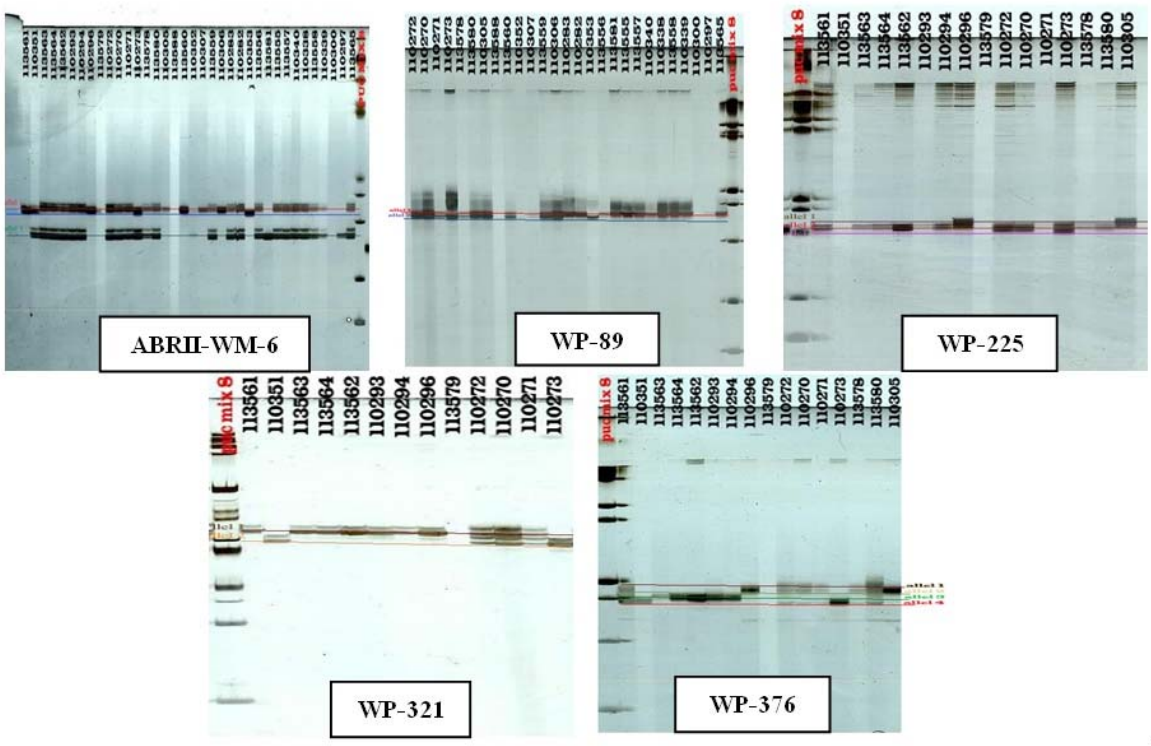
ژنوتیپ	شماره نمونه	ABRR-WM-6	WP-376	ABRII -WM-6-WP376
K۷۲	۱۱۳۵۶۳	۱۰۳	۰۰۳۰	۱۰۳-۰۰۳۰
Z۳۰	۱۱۳۵۸۰	۱۰۳	۱۲۰۰	۱۰۳-۱۲۰۰
Z۵۳	۱۱۰۳۰۵	۱۰۰*	۰۲۰۰	۱۰۰-۰۲۰۰
Z۶۰	۱۱۰۲۸۲	۱۰۳	۱۰۳۰	۱۰۳-۱۰۳۰
Z۶۳	۱۱۰۳۳۹	۱۰۳	۱۰۰۰	۱۰۳-۱۰۰۰

*-کلیدهای اختصاصی ارقام به رنگ نارنجی نشان داده شده است.

در کل تعداد ۱۴ آلل به وسیله این تعداد نشانگرها تکثیر گردید که در ارقام مورد بررسی از ۲ تا ۳ آلل متغیر و میانگین تعداد آللها ۲/۲ بود. نتایج انگشت نگاری DNA درختان مادری ارقام مورد مطالعه گردو با استفاده از نشانگرهای SSR در جدول ۶ نشان داده شده است.

در این جدول نشانگرهای اختصاصی ارقام مختلف گردو به همراه کلید شناسایی آن‌ها به اختصار نشان داده شده است. نشانگرهای WP-376 و ABRII -WM-6 در رقم‌های K72، Z30، Z53، Z60 و Z63 نوارهای چند شکل اختصاصی ایجاد نمودند. به طور مثال، کلید ترکیب آلل‌های ۱ و ۳ نشانگر ۶ و آلل ۳ نشانگر ۳۷۶ در رقم گردو K72 به عنوان کلید شناسایی این رقم شناسایی شده‌اند. سایر آلل‌های اختصاصی به همراه کلیدهای شناسایی ارقام مختلف در این جدول آورده شده است.

آزمون تکرارپذیری نشانگرهای معرفی شده توسط موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی در آزمایشگاه نشانگرهای مولکولی موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال انجام پذیرفت. از بین پنج نشانگر معرفی شده برای ارقام گردو ABRII-WM-6،WP-89 ، WP-225،WP-321، WP-376)، دو نشانگر ABRII-WM-6 و WP-376 انتخاب و در DNA چند نمونه از ۵ رقم تکثیر شدند. محصولات PCR بر روی ژل پلی اکریل آمید شش درصد الکتروفورز تفکیک و به روش نیترات نقره رنگ آمیزی شدند.

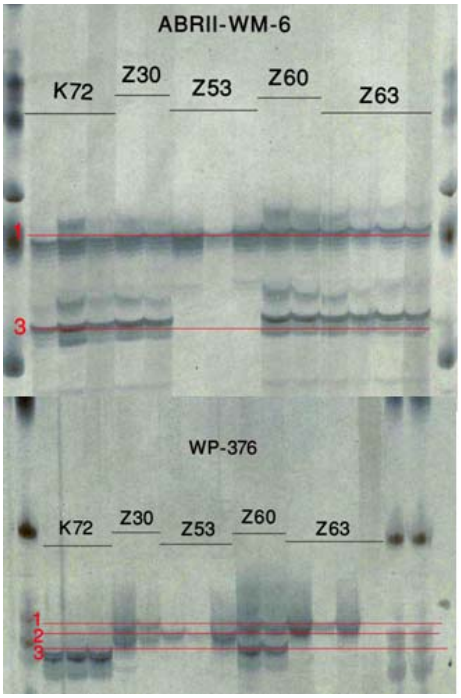


شکل۱- تکثیر قطعات و آلل‌های مورد مطالعه نشانگرهای SSR در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه گردو

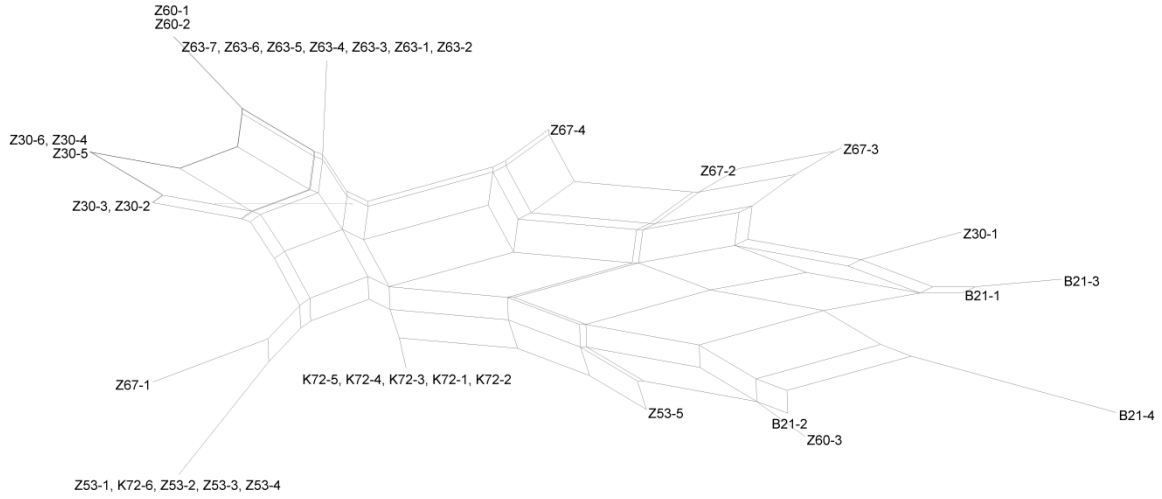
نمونه‌های انتخابی به همراه کد رقم و آلل‌ها در سه نشانگر تکرار شده در آزمایشگاه نشانگرهای مولکولی در جدول ۷ آمده است. پروفایل سه نشانگر انتخاب شده در ارقام گردو با آلل‌های ارائه شده توسط پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی مطابقت نشان داده و بیانگر تکرارپذیر بودن آلل‌ها می‌باشد (شکل۲).

جدول ۷- آزمون تکرارپذیری کلید های مولکولی مبتنی بر نشانگرهای ریزماهواره در گردو

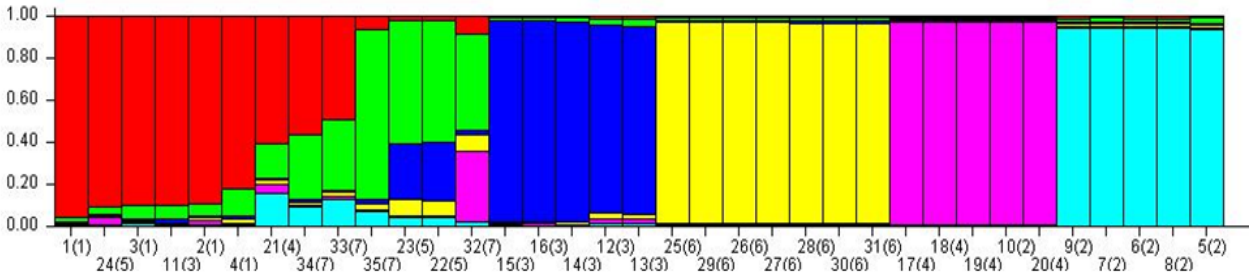
شماره	نام واریته	کد واریته	کد آلل درSSR	
			WP-376	ABRII-WM-6
۱	Kv۲	۱۱۳۵۶۴	۰۰۳۰	۱۰۳
۲	Kv۲	۱۱۳۵۶۲	۰۰۳۰	۱۰۳
۳	Kv۲	۱۱۰۲۹۳	۰۰۳۰	۱۰۳
۴	Z۳۰	۱۱۰۲۷۱	۱۲۰۰	۱۰۳
۵	Z۳۰	۱۱۳۵۸۰	۱۲۰۰	۱۰۳
۶	Z۵۳	۱۱۰۳۰۵	۰۲۰۰	۱۰۰
۷	Z۵۳	۱۱۰۳۰۷	۰۲۰۰	۱۰۰
۸	Z۵۳	۱۱۰۳۰۶	۰۲۰۰	۱۰۰
۹	Z۶۰	۱۱۰۲۸۳	۱۰۳۰	۱۰۳
۱۰	Z۶۰	۱۱۰۲۸۲	۱۰۳۰	۱۰۳
۱۱	Z۶۳	۱۱۳۵۵۵	۱۰۰۰	۱۰۳
۱۲	Z۶۳	۱۱۰۳۴۰	۱۰۰۰	۱۰۳
۱۳	Z۶۳	۱۱۳۵۵۸	۱۰۰۰	۱۰۳
۱۴	Z۶۳	۱۱۰۳۳۸	۱۰۰۰	۱۰۳



شکل۲- آزمون تکرارپذیری آلل‌های مورد مطالعه نشانگرهای SSR در ارقام مورد مطالعه گردو



شکل ۳- گروه بندی درختان مادری ارقام گردو با استفاده از داده های حاصل از ۵نشانگر SSRچند شکل



شکل٤- تجزیه ساختارارقام و ژنوتیپ‌های گردو با استفاده از روش مبتنی بر مدلBaysianبه کمک مکان‌های ژنومی نشانگرهای SSR

(اعداد زیر هر نوار رنگی شماره فرد و رقم مربوط به آن است)

مشاهده دندروگرام حاصل از نرم افزار SplitsTree 4، درختان مادری ارقام مورد مطالعه گردو با استفاده از ۵ نشانگر SSRچند شکل نشان داد، اکثر درختان مادری ارقام مختلف در گروه‌های مجزا طبقه بندی شدند (شکل۳).

در این مطالعه بر اساس معیارهای فوق، K= ۶ بهترین تعداد گروه بوده که این گروه‌ها با رنگ‌های مجزا مشخص شده است (شکل۴). هر فرد و کد مربوط به آن به وسیله یک ستون رنگی عمودی (معرف ضریب عضویت) نشان داده می‌شود که وجود بیش ازیک رنگ، معرف ساختار مختلط ژنتیکی آن فرد می‌باشد. در این حالت آن فرد به گروهی تعلق می‌گیرد که بیشترین پهنای رنگی آن خوشه را دارا باشد. در کل ژنوتیپ‌های داخل هر خوشه دارای احتمال عضویت بیش از ۰/۵ هستند و به احتمال بیش از ۵۰ درصد به خوشه خود تعلق دارند. بر طبق معیارهای lnP(D) و ΔK بهترین تعداد گروه k=۶ بدست آمد و این نتیجه با شبکه فیلوژنی در شکل۳ به روش Neighbor-net کاملاً منطبق است. قرار گرفتن برخی از تکرارهای ارقامی مانند K72-6، Z53-5 در خوشه‌های دیگر می‌تواند دلیل وجود نمونه‌های خارج از تیپ باشد. وجود این تفاوت، ممکن است به دلایل مختلف مانند اختلاط و جهش باشد که به منظور ایجاد نهال‌های یکنواخت در ارقام مذکور ضروری است، نمونه‌های مذکور به عنوان درخت مادری مورد استفاده قرار نگیرند.

در نتیجه بر اساس نتایج بدست آمده اختلافاتی از نظر الگوهای باندهای مشاهده شده نشانگرهای ریزماهواره در بعضی از درختان مادری ارقام K72، Z30 وZ60 مشاهده شد و به منظور جلوگیری از هرگونه احتمال اختلاط در میان نمونه‌های یک رقم ضروری است، نمونه‌های مذکور به عنوان درخت مادری مورد استفاده قرار نگیرند (ژنوتیپ های ۱۱۰۲۹۶،۱۱۰۲۷۳و۱۱۰۳۵۳). هم‌چنین وجود غیر یکنواختی ژنتیکی در بین درختان مورد مطالعه ارقام B21 و Z67 باعث عدم توصیه انتخاب درختان مذکور به عنوان درختان مادری این ارقام می‌گردد. این امر به این مفهوم است که با توجه به تفاوت مشاهده شده در تکرارهای هر رقم بهتر است تنها از مواردی استفاده شود که از صحت و یکنواختی ژنتیکی آن‌ها اطمینان حاصل شده است. با توجه به نتایج این تحقیق ضروری است، موسسات تحقیقاتی ذیربط و بخش‌های اجرایی وزارت جهادکشاورزی با استفاده از اطلاعات دقیق مورفولوژیک و منطقه‌ای و نیز خصوصیات بازارپسندی

و سایر عوامل موثر نسبت به انتخاب و معرفی درختان مادری صحیح از میان درختان مورد مطالعه اقدام نمایند.

با توجه به این‌که تجزیه‌های این تحقیق در دو آزمایشگاه مستقل انجام شده است و نتایج هردو آزمایشگاه تایید کننده نتایج یکدیگر بوده اند، لذا استفاده از کلیدهای شناسایی مولکولی ارقام مورد مطالعه، امکان تشخیص این ارقام را به منظور تایید اصالت ژنتیکی آن‌ها میسر می‌سازد. با استفاده از این کیت‌ها و دستورالعمل‌های ذیربط شناسایی دقیق ارقام مورد نظر در تمامی مراحل رشد و در مدت کوتاهی (۴۸ ساعت) قابل انجام است. ثبت جهانی ارقام مذکور توسط موسسات ذیربط در دست اقدام بوده و هم‌چنین امکان واگذاری این کیت‌ها به بخش‌های خصوصی به منظور ایجاد شبکه آزمایشگاهی تشخیص هویت گیاهان ایران فراهم گردیده است.

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق می توان بر یکی از معضلات مهم باغداران در خصوص احداث نهالستان‌ها و باغ‌ها، یعنی نامشخص بودن اصالت ژنتیکی ارقام و ژنوتیپ‌های کشت شده و نیز وجود ارقام و ژنوتیپ‌هایsynonyms و homonyms فائق آمد، زیرا شناسائی ارقام باغی درسال‌های اولیه رشد و تا زمانی‌که درختان به بار ننشسته‌اند، امری دشوار است. در نتیجه از این نتایج می‌توان دراحداث باغ‌های جدید با استفاده از ارقام شناخته شده، شناسایی روابط خویشاوندی بین ارقام و ژنوتیپ‌ها به منظور بکارگیری در برنامه‌های بهنژادی و دستیابی به ارقام جدید اقتصادی و مطابق با نیازهای روز و تهیه شناسنامه های دقیق به منظور تعیین اصالت ژنتیکی و حفظ حقوق مالکیت این ذخایر توارثی گرانبها در کشور استفاده نمود.

منابع

1-Arzani K., MansouriArdakan H., Vezvaei A., and Roozban M.R. 2008. Morphological variation among Persian walnut (*Juglansregia*) genotypes from central Iran. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 36(3), 159-168.

2- Atefi J. 1993. Evalution of walnut genotype in Iran. Acta Horticulturae, 311: 25-33.

3- Bayazit S., Kazan K., Gülbitti S., Cevik V., Ayanoğlu H., and Ergül A. 2007. AFLP analysis of genetic diversity in low chill requiring walnut (*Juglans regia* L.) genotypes from Hatay, Turkey. Scientia Horticulturae, 111(4), 394-398.

4- 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. ScientiaHorticulturae, 111: 394–398.

5- Christopoulos M.V., Rouskas D., Tsantili E., andBebeli P.J. 2010. Germplasm diversity and genetic relationships among walnut (*Juglansregia* L.) cultivars and Greek local selections revealed by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers.ScientiaHorticulturae, 125(4), 584-592.

6- Ciarmiello L.F., Piccirillo P., Pontecorvo G., De Luca A., Kafantaris I., and Woodrow P. 2011. A PCR based SNPs marker for specific characterization of English walnut (*Juglansregia* L.) cultivars. Molecular biology reports, 38(2), 1237-1249.

7- Dangl G.S., Woeste K., Ardhya M.K., Koehmstedt A., and Simon C. 2005. Characterization of 14 Microsatellite Markers for Genetic Analysis and Cultivar Identification of Walnut. Journal of the American Society for Horticultural Science, 130(3):348-354.

8- Ebrahimi A., Fatahi R., andZamani Z. 2011. Analysis of genetic diversity among some Persian walnut genotypes (*Juglans regia* L.) using morphological traits and SSRs markers. ScientiaHorticulturae, 130(1), 146-151.

9- FAOSTAT.2011. http://faostat.fao.org.

10- Fjellstrom R.G., Parfitt D.E., andMcGranahan G.H. 1994. Genetic relationships and characterization of Persian walnut (*Juglans regia* L.) cultivars using restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). Journal of the American Society for Horticultural Science, 119(4), 833-839.

11- Foroni I., Rao R., Woeste K., and Gattitelli M. 2005. Characterisation of Juglansregia L. with SSR markers and evaluation of genetic relationships among cultivars and the 'Sorrento' landrace.J. Hort. Sci. Biotechnol., 80: 49–53.

12- Foroni I., Woeste K., Monti L.M., and Rao R. 2007. Identification of 'Sorrento'walnut using simple sequence repeats (SSRs). Genetic Resources and Crop Evolution, 54(5), 1081-1094.

13- Kafkas S., Ozkan H., and Sutyemez M. 2005. DNA polymorphism and assessment of genetic relationships in walnut genotypes based on AFLP and SAMPL markers. Journal of the American Society for Horticultural Science, 130: 585–590.

14- Nicese F.P., Hormaza J.I., and McGranahan G.H. 1998. Molecular characterization and genetic relatedness among walnut (*Juglansregia* L.) genotypes based on RAPD markers. Euphytica, 101(2), 199-206.

15- Ninot A., and Aleta N. 2003. Identification and genetic relationship of Persian walnut genotypes using isozyme markers. Journal-American Pomological Society, 57, 106-114.

16- Orel G., Marchant A.D., McLeod J.A., and Richards G.D. 2003.Characterization of 11 Juglandaceae genotypes based on morphology, cpDNA, and RAPD. HortScience, 38(6), 1178-1183.

17- 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.

18- Ruiz-Garcia L., Lopez-Ortega G., Fuentes Denia A., andFrutos Tomas D. 2011. Identification of a walnut (*Juglans regia* L.) germplasm collection and evaluation of their genetic variability by microsatellite markers. Spanish Journal of AgriculturalResearch, 9(1), 179-192.

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