بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده کشاورزی

گروه :باغبانی و گیاه پزشکی

پایان‌نامه کارشناسی ارشد

بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گردو (*Juglans regia* L.) منطقه شهرستان آزادشهر با استفاده از نشانگر مولکولی ریزماهواره

فاطمه شاملو

استاد راهنما :

دکتر مهدی رضایی

اساتید مشاور

دکتر عباس بیابانی

مهندس علیرضا خان‌احمدی

بهمن ماه ۱۳۹۳

قدردانی و تشکر

سپاس و ستایش مر خدای را جل جلاله که آثار قدرت او بر چهره روز روشن، تابان است و انوار حکمت او در دل شب تار، درفشان. آفریدگاری که خویشتن را به ما شناساند و درهای علم را بر ما گشود و عمری و فرصتی عطا فرمود تا بدان، بنده ضعیف خویش را در طریق علم و معرفت بیازماید.

با تقدیر و تشکر شایسته از استاد فرهیخته و فرزانه جناب آقای دکتر مهدی رضایی، استاد راهنمای ارجمندم که با نکته های دلاویز و گفته های بلند ، صحیفه های سخن را علم پرور نمودند و همواره راهنما و راه گشای نگارنده در اتمام و کمال پایان نامه بوده اند. همچنین با امتنان بیکران از مساعدت های بی شائبه ی، استاتید مشاورم ، جناب آقای دکتر عباس بیابیانی و جناب آقای مهندس علیرضا خان احمدی و نیز تقدیر و درود فراوان خدمت مادر بسیار عزیز، دلسوز و فداکارم که پیوسته جرعه نوش جام تعلیم و تربیت ، فضیلت و انسانیت آنها بوده ام و همواره چراغ وجودشان روشنگر راه من در سختی ها و مشکلات بوده است و با تشکر خالصانه خدمت دوستان گران مایه ام و همه کسانی که به نوعی مرا در به انجام رساندن این مهم صمیمانه و مشفقانه یاری نموده اند.

فاطمه شاملو

بهمن ماه ۹۳

تعهد نامه

اینجانب **فاطمه شاملو** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته مهندسی کشاورزی – علوم باغبانی دانشکده کشاورزی بسطام دانشگاه شاهرود نویسنده پایان‌نامه: بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گردو (*Juglans regia* L) منطقه شهرستان آزادشهر با استفاده از نشانگر مولکولی ریز ماهواره تحت راهنمائی دکتر مهدی رضایی متعهد می شوم .

- تحقیقات در این پایان‌نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهش‌های محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می‌گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان‌نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافت‌های آن‌ها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان‌نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

تاریخ :۱۳۹۳/۱۱/۱۳

امضای دانشجو : فاطمه شاملو

مالکیت نتایج و حق نشر

کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه‌های رایانه‌ای ، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه شاهرود می باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود .

استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان‌نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی‌باشد.

چکیده:

در این پژوهش با هدف بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گردو در شهرستان آزادشهر، ۱۰۲ ژنوتیپ گردو از چهار منطقه (سیدآباد، رودبار، وامنان و کاشیدار) با ۳۰ ویژگی مرفولوژیکی (طول میوه، قطر میوه، طول برگ و...) ارزیابی مقدماتی شدند. نتایج آنالیز تشریحی صفات نشان داد که ژنوتیپ‌های این منطقه از لحاظ درصد مغز میوه، وزن مغز و میوه، رنگ مغز و آسان جدا شدن مغز از میوه تنوع بالایی دارند. ژنوتیپ Ka17 و Va31 دارای بیش‌ترین میانگین وزن میوه (۱۹/۷۹ گرم)، ژنوتیپ Va31 دارای بیش‌ترین وزن مغز (۹/۴ گرم) و ژنوتیپ ROOD4 و Va34 برای صفت آسان جدا شدن مغز از میوه (خیلی آسان) و مطلوب بودن طعم میوه شاخص بودند. در آنالیز خوشه‌بندی بر اساس داده‌های مرفولوژیکی، ژنوتیپ‌ها در ناحیه ۱۲/۵ از۲۵ به چهار دسته تقسیم شدند. توده‌های جغرافیایی در این خوشه‌بندی تا حد زیادی در دسته‌های جداگانه قرار گرفتند. بعد از بررسی تنوع مرفولوژیکی توده‌های مورد پژوهش ۳۹ ژنوتیپ از بین ژنوتیپ‌ها به عنوان ژنوتیپ‌های برتر انتخاب شدند و تنوع ژنتیکی آن‌ها با استفاده از ده نشانگر ریزماهواره بررسی گردید. این نشانگرها در مجموع توانستد ۷۴ آلل پلی‌مورفیسم را با اندازه‌های بین ۱۰۴ تا ۲۶۷ جفت‌باز شناسایی کنند. تعداد آلل‌ها در هر جایگاه ژنی از ۳ تا۱۱ آلل با میانگین۷/۴ آلل متغیر بود. کم‌ترین تعداد آلل مشاهده شده مربوط به مکان ژنی WGA005 (۳ آلل) و بیش‌ترین تعداد آلل مشاهده شده مربوط به مکان ژنی WGA054 (۱۱آلل) بود. تعداد آلل‌های موثر در مکان‌های ژنی در محدوده ۲/۰۲۶ تا ۸/۹۷۴ با میانگین ۵/۰۸ بود. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای توده‌ها؛ توده‌های مورد بررسی را به دو گروه تقسیم کرد که گروه اول شامل توده سیدآباد و گروه دوم شامل توده‌های رودبار، وامنان و کاشیدار بودند. از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های گردو هفت گروه حاصل شد. تمام ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده از منطقه سیدآباد در گروه یک قرار گرفتند و مابقی ژنوتیپ‌ها در سایر گروه‌ها پراکنده شدند.

نتایج این تحقیق نشان داد که تنوع ژنتیکی خوبی در ژنوتیپ‌های گردوی این منطقه وجود دارد که می‌تواند به‌عنوان مواد اصلاحی در اختیار به‌نژادگران قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: تنوع‌ژنتیکی، ریزماهواره، صفات مرفورلوژیکی، گردو

فهرست

فصل اول-مقدمه ۱
۱-۱- مقدمه ۲
۱-۲- اهداف پژوهش حاضر ۳
فصل دوم-کلیات ۵
۲-۱-گیاهشناسی ۶
۲-۲- تنوّع ژنتیکی ۷
۲-۳- انواع نشانگرها ۸
۲-۳-۱- نشانگرهای مرفولوژیکی ۸
۲-۳-۲- نشانگرهای پروتئینی ۹
۲-۳-۳- نشانگرهای مولکولی DNA ۱۰
۲-۴- خصوصیات یک نشانگر خوب ۱۰
۲-۵- نشانگرها بر پایه DNA ۱۱
۲-۵-۱- نشانگرهای ریز ماهواره ۱۲
۲-۵-۱-۱- مزایای ریزماهواره‌ها ۱۳
۲-۵-۱-۲- معایب ریز ماهوره‌ها ۱۳
فصل سوم-بررسی منابع ۱۵
فصل چهارم-مواد و روش‌ها ۲۱
۴-۱- عملیات میدانی: ۲۲
۴-۱-۱- محل و روش نمونه‌برداری: ۲۲
۴-۲-آنالیز داده‌ها ۲۵

۴-۲-۱-آنالیز داده‌های صفات مرفولوژیک: ۲۵
۴-۲-۲- آنالیز داده‌های ژنوتیپ: ۲۵
۴-۳- مراحل استخراج DNA ۲۶
۴-۳-۱- نمونه‌گیری: ۲۶
۴-۳-۲- استخراج DNA: ۲۶
۴-۴- تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده ۲۶
۴-۴-۱- روش اسپکترفتومتری ۲۶
۴-۴-۲- روش الکتروفورز بر روی ژل‌آگارز ۲۷
۴-۵- واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR) و اجزای آن ۲۸
۴-۵-۱- آغازگرها ۲۸
۴-۵-۲- کیت PCR ۲۹
۴-۶- بهینه‌سازی واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR) ۲۹
۴-۶-۱- چرخه حرارتیPCR ۳۰
۴-۷- الکتروفورز عمودی ۳۰
۴-۷-۱- آماده سازی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۳۰
۴-۷-۲- بارگیری فرآورده‌های PCR جایگاه‌های ریزماهواره ۳۲
۴-۷-۳- رنگ‌آمیزی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۳۲
۴-۸- خواندن آلل‌ها در جایگاه‌های ریزماهواره ۳۳
۴-۹- تجزیه و تحلیل مشاهدات و داده‌ها ۳۴
۴-۹-۱- خواندن آلل‌ها در جایگاه‌های ریزماهواره ۳۴
۴-۹-۲-تعداد آلل واقعی و موثر ۳۵

۴-۹-۳- هتروزیگوتی یا تنوع ژنی ۳۵
۴-۹-۴- شاخص اطلاعاتی شانون(I) ۳۶
فصل پنجم-نتایج و بحث ۳۷
۵-۱-۱- خصوصیات صفات کمی ژنوتیپ توده‌های گردو ۳۸
۵-۱-۲-خصوصیات صفات کیفی ژنوتیپ‌های گردو ۴۰
۵-۲- روابط بین صفات ۴۱
۵-۳- تجزیه کلاستر بر اساس صفات مرفولوژیکی ۴۵
۵-۴- معرفی ژنوتیپ‌های برتر ۴۹
۵-۵- نتایج ژنتیک ۴۹
۵-۷- تجزیه و تحلیل آماری ۵۱
۵-۷-۱-چندشکلی ۵۱
۵-۷-۲- تنوع ژنتیکی ۵۲
۵-۷-۳- تنوع ژنتیکی درون توده‌های ۵۳
۵-۷-۴- فواصل ژنتیکی بین جمعیت‌ها ۵۴
۵-۷-۵- ضریب عدم تشابه و واریانس ژنتیکی بین جمعیت‌ها ۵۷
۵-۷-۶- تجزیه کلاستر ۶۰
۵-۹- نتیجه‌گیری کلی ۶۶
۵-۹- پیشنهادات ۶۷
فهرست منابع ۶۹
ضمائم ۷۷
الف- محلول‌های استخراج DNA ۷۸

الف-۱- محلول نیم مولار EDTA (PH=۸) ۷۸
الف- ۳ محلول NaCl اشباع ۶ مولار ۷۸
ب- محلول‌های تهیه ژل ۷۹
ب-۱ تهیه ژل آگارز یک و دو درصد..... ۷۹
ب- ۲ تهیه بافر TBE 10x..... ۷۹
ج-محلولهای رنگ‌آمیزی ۷۹
ج-۱-نکاتی در مورد محلول‌های رنگ‌آمیزی..... ۸۰
Abstract..... ۸۱

فهرست جداول

جدول ۴-۱- مشخصات جغرافیایی و اقلیمی و کد هر یک از مناطق جمع‌آوری نمونه شهرستان آزادشهر ۲۴

جدول ۴-۲- صفات کمی و کیفی مورد بررسی در ۱۰۲ ژنوتیپ گردو ۲۴

جدول۴- ۳- اطلاعات مربوط به آغازگرهای ریزماهوراه مورد استفاده ۲۹

جدول ۴-۴-شرایط بهینه‌سازی برای PCR آغازگرهای ریزماهواره ۳۰

جدول۴-۵- برنامه حرارتی برای تکثیر جایگاه‌های ریزماهواره..... ۳۰

جدول ۴-۶-مراحل رنگ‌آمیزی ژل پلی‌آکریل‌آمید با روش سریع نیترات نقره..... ۳۳

جدول ۵-۱- متوسط،کمترین، بیشترین و انحراف معیار صفات کمی اندازه‌گیری شده ۱۰۲ ژنوتیپ گردوی مورد بررسی در منطقه آزادشهر. ۳۹

جدول ۵-۲- متوسط،کمترین، بیشترین و انحراف معیار برخی صفات کیفی..... ۱۰۲ ژنوتیپ مورد بررسی در منطقه آزادشهر. ۴۱

جدول ۵-۳- ضرایب همبستگی صفات کمی در ۱۰۲ ژنوتیپ گردو شهرستان آزادشهر ۴۳

جدول ۵-۴- ضرایب همبستگی صفات کیفی در ۱۰۲ ژنوتیپ گردو شهرستان آزادشهر ۴۴

جدول ۵-۵- میانگین صفات و انحراف معیار صفات کمی در کلاسترهای مختلف توده-های گردوهای شهرستان آزادشهر ۴۸

جدول ۵-۶- برخی از خصوصیات پومولوژیکی چند ژنوتیپ برتر..... ۴۹

جدول۵-۱- تجزیه و تحلیل جایگاه‌های ریزماهواره مورد مطالعه در ۱۰ نشانگر در ژنوتیپ‌های گردوی منطقه آزادشهر ۵۰

جدول ۵-۲- فراوانی آلل‌ها در مکان‌های ژنی ریزماهواره مورد بررسی ۵۲
جدول ۵-۳- شاخص‌های ژنتیکی مورد بررسی در مکان‌های ژنی ریزماهواره..... ۵۲
جدول ۵-۴- مقادیر هتروزیگوتی جایگاه‌های ریزماهوراه ۵۳
جدول ۵-۵- میزان هموزیگوتی، هتروزیگوتی، تعداد آلل مشاهده شده و مؤثر و شاخص شانون توده‌های ژنوتیپ گردوهای منطقه آزادشهر بر اساس ۱۰ مکان ژنی..... ۵۴
جدول۵-۶- فواصل بین تودههای گردو شهرستان آزادشهر براساس ضریب تشابه نی(۱۹۷۸)..... ۵۵
جدول ۵-۷- مقادیر ماتریس عدم تشابه دایس بین ۳۹ نمونه ژنوتیپهای گردو حاصل از دادههای SSR ۵۸
جدول ۵-۸: مقادیر ویژه محاسبه شده برای PCOOA براساس ماتریس عدم تشابه..۶۵
الف– ۲ بافر لیزکننده ۷۸
الف-۴ طرز تهیه TE 10x ۷۸
ب – ۲ اجزاء بافر TBE 10x..... ۷۹
مراحل رنگ‌آمیزی ژل پلی‌آکریل‌آمید با روش سریع نیترات نقره ۷۹

فهرست اشکال و نمودارها

شکل۴-۱- نقشه موقعیت کلی مکان‌های جمع‌آوری ژنوتیپ‌های گردو شهرستان آزادشهر در ایران ۲۳

شکل ۴-۲- نقشه مکان‌های جمع‌آوری ژنوتیپ‌های گردو شهرستان آزادشهر ۲۳

شکل۵-۱- دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر ۱۰۲ ژنوتیپ گردو بر اساس ۳۰ صفت مرفولوژیکی، جمعآوری شده از مناطق وامنان (Va)، کاشیدار (Ka)، رودبار (Rood) و سیدآباد (SID) شهرستان آزادشهر ۴۷

شکل ۵-۱– نمونه‌های DNA استخراج شده ۵۰

شکل۵-۲ باندهای تکثیر شده حاصل از نشانگر WGA071 ..... ۵۰

شکل۵-۳ باندهای تکثیر شده حاصل از نشانگر WGA202 ..... ۵۰

شکل ۵-۴- دندروگرام بین تودههای گردو منطقه آزادشهر بر اساس ضریب تشابه نی(۱۹۷۸) و روش UPGMA با ۱۰ نشانگر SSR ۶۱

شکل ۵-۵- نمودار UPGMA بر اساس ضریب عدم تشابه دایس محاسبه شده از دادههای ۱۰ نشانگر SSR از ژنوتیپهای گردو ۶۲

شکل ۵-۷- مقایسه نمودار درختی داده های ژنوتیپی و فنوتیپی برتر شهرستان آزادشهر ۶۴

شکل ۵-۸- تجزیه دوبعدی ۳۹ نمونه ژنوتیپهای گردو بر اساس عدم تشابه دایس بدست آمده از ۱۰ جفت آغازگر ریزماهواره ۶۵

فصل اول

مقدمه

۱-۱- مقدمه

گردو با نام علمی *Juglans regia* L از خانواده‌ی Juglandaceae است. منشأ طبیعی گردو، مناطق کوهستانی آسیای مرکزی و ازجمله جنگل‌های شمال ایران است (رادنیا، ۱۳۷۵).

درخت گردو یکی از گونه‌های مهم درختان میوه، هم از نظر تولید میوه خوراکی (میوه‌های خشک) هم از نظر چوب دارای اهمیت می‌باشد (جلیلی مرندی.۱۳۸۴ و Caglarirmak *et al*., 2003). گردو یکی از محصولات آجیلی و خشکباری مهم در ایران به شمار می‌رود. ایران با تولیدی بالغ بر ۴۸۵ هزار تن گردو در سال، پس از کشور چین، دومین تولید کننده بزرگ گردو در دنیا محسوب می‌شود (FAO, 2011). همان‌گونه که از نام انگلیسی گردو ایرانی (Persian Walnut) بر می‌آید ایران به‌عنوان خاستگاه اولیه گردو در دنیا شناخته می‌شود (Ebrahimi *et al*., 2009) که خود سبب ایجاد تنوع ژنتیکی در این سرزمین شده است (Rezai *et al*., 2008). همچنین باغات سنتی گردو در ایران به عنوان یک منبع ژنتیکی غنی مطرح می‌باشند، از آنجایی که اکثر در باغ‌های گردو سنتی کشور از طریق بذر تکثیر شده‌اند، لذا تنوع‌ژنتیکی فراوانی در این توده عظیم درختان به چشم می‌خورد (Arzani, 2003). تکثیر جنسی گردو در سالیان متمادی، سبب به وجودآمدن تنوع ژنتیکی زیادی در صفات عمومی درخت و ویژگی‌های کمی و کیفی میوه شده است (Rezai *et al*., 2008). با وجود این تنوع ژنتیکی، در حال حاضر یکی از بزرگ‌ترین مشکلات احداث باغات گردو در کشور، عدم وجود پیوندک خوب می‌باشد (Rezai *et al*., 2008).

آمریکا سالانه حدود ۴۱۸ هزار تن گردو تولید می‌کند که حدود ۵۰ درصد آن را صادر می‌کند (Vanhanen and Savage, 2006). این در حالی است که سهم صادرات جهانی گردو ایران، بسیار ناچیز و در حدود ٪۰/۰۷ است (FAO, 2011). یکی از دلایل مهم عدم توفیق ایران در امر صادرات گردو، عدم یکنواختی محصول به دلیل نداشتن رقم و همچنین نامطلوب بودن کیفیت میوه و مغز آن

می‌باشد که قدرت رقابت با کشورهای بزرگ صادر کننده این محصول را کاهش می‌دهد (سلیمانی، ۱۳۸۸). امروزه با گزینش ارقام برتر گردو و اجرای برنامه‌های اصلاحی مانند دورگ‌گیری و گزینش، می‌توان خصوصیات میوه و مغز ژنوتیپ‌ها را بهبود بخشید و بازده اقتصادی این درخت را افزایش داد.

با توجه به ژرم‌پلاسم غنی و متنوع گردو در کشور، اولین قدم در برنامه‌های اصلاحی آن شناسایی وگزینش ژنوتیپ‌های امیدبخش و برتر گردو است (Arzani *et al*., 2008). در مسیر شناسایی و گزینش این ژنوتیپ‌ها، درختان بومی بیشتر مد نظر پژوهشگران اصلاحی می‌باشد چرا که علاوه بر سازگاری، تنوع زیادی در بین آن‌ها یافت می‌شود (Aslantas, 2006). این امر در مورد گردو که یک محصول بسیار ارزشمند در کشور محسوب می‌شود نیز صادق است.

۱-۲- اهداف پژوهش حاضر

وجود تنوع‌ژنتیکی در کارهای اصلاحی به عنوان یک‌برتری تلقی می‌شود (قنادها و همکاران، ۱۳۸۲) . طبق بررسی ما تحقیقات در مورد میزان تنوع ژنتیکی گردو شهرستان آزادشهر وجود ندارد. با توجه به بالا بودن کیفیت میوه‌های گردوهای شهرستان آزادشهر و مشاهده میوه‌هایی سفید مغز و با مقاومت نسبی در مقابل آفت‌هایی مانند کرم سیب تصمیم به بررسی تنوع ژنتیکی آن گرفته شد تا امکان شناسایی بهتر گردوهای این منطقه برای اهداف اصلاحی گردو فراهم گردد. تا در صورت اثبات وجود تنوع مرفولوژیکی کافی در صفات درخت و مغز، از نتایج آن بتوان در برنامه‌های اصلاحی آینده گردو استفاده نمود.

فصل دوم

کلیات

۲-۱-گیاهشناسی

گردوی معمولی درختی خزان‌دار و یک‌پایه است. ارتفاع آن می‌تواند بین ۱۰ تا ۲۵ متر باشد. مغز ساقه‌های درخت گردو لایه‌لایه، دارای تنه‌ای صاف با پوستی فلسی و شیاردار است. برگ‌های گردو مرکب شانه‌ای است. گل‌های نر آن به صورت جانبی در شاخه‌های یک‌ساله و روی گل‌آذین سنبله دم-گربه‌ای (شاتون[1]) و گل‌های ماده در نوک شاخه‌های سال جاری در گروه‌های ۱ الی ۳ تایی و در برخی ارقام به صورت جانبی در شاخه‌های سال جاری حاصل می‌شوند. گرده‌افشانی گردو توسط باد انجام می‌گیرد و حشرات در آن نقشی ندارند. عمل گرده‌افشانی و تلقیح در اوایل بهار انجام می‌شود. میوه-های گردو از نوع فندقه بوده که در آن فرابر میوه چوبی شده و توسط پوست سبز که منشأ برگ دارد احاطه می‌شود. مهم‌ترین گردوی موجود در دنیا معروف به گردوی ایرانی (*Juglans regia* L) است. گردوهای جوان و تازه به بار نشسته حالت نا هم‌رسی از نوع نرپیش‌رسی نشان می‌دهند. اما با بالغ شدن درخت، گل‌های نر بیشتری تشکیل می‌شود و تطابق زمانی بین مرحله گرده‌افشانی و آماده بودن گل‌های ماده به وجود می‌آید. البته برخی از ارقام گردو ماده پیش‌رس هستند و توصیه می‌شود برای کاهش پدیده ناهمرسی، ارقام نرپیش‌رس همراه با ارقام ماده پیش‌رس کشت شوند. درخت گردو در طول تابستان و زمستان نسبت به گرما و سرمای بیش از حد حساس می‌باشد. در طول خواب زمستانی، گردو می‌تواند دمای ۱۱- درجه سانتی‌گراد تحمل کند. اما سرمای دیررس بهاره و سرمای زودرس پاییزه به شاخه‌های گردو آسیب می‌رساند. گردو به یک دوره فصل رشد طولانی نیاز دارد و از میوه‌های مناطق معتدل گرم به شمار می‌آید. جوانه‌های گردو به ۱۵۰۰- ۷۰۰ ساعت سرمای زیر ۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نیاز دارند تا استراحت زمستانی آن‌ها به اتمام برسد. درخت گردو از ۶-۵ سال شروع به محصول‌دهی می‌کند و در ۱۵-۱۰ سالگی به حداکثر باروری می‌رسد.طول عمر گردو زیاد بوده و گاهی به ۳۰۰-۲۰۰ سال می‌رسد. شکل شلجمی و جامی برای گردو مناسب بوده و بعد از به بار نشستن، نیاز به هرس ندارد. فاصله‌ی کشت مناسب گردو ۱۲-۱۰ متر می‌باشد (جلیلی مرندی،۱۳۸۴).

1-Chaton

افزایش گردو از طریق کشت بذر و پیوند زدن انجام می‌شود (خوشخوی و همکاران، ۱۳۸۳) نوع پیوندهای استفاده شده وصله‌ای و برخی دیگر پیوند شکمی را مناسب می‌دانند (مرندی و همکاران، ۱۳۸۲). از یک باغ مناسب می‌توان تا ۴ تن در هکتار محصول به دست آورد. مهم‌ترین ارقام گردوی ایرانی عبارتند از : کاغذی، نوک‌کلاغی و ضیاءآباد قزوین (خوشخوی و همکاران، ۱۳۸۳).

۲-۲- تنوّع ژنتیکی[1]

تنوع ژنتیکی جزء بنیادی تنوّع زیستی است و در افراد داخل یک جمعیّت و یا جمعیّت‌های مختلف یک گونه بیانگر وضعیت تکاملی آن گونه است. به طور کلّی زیاد بودن تنوّع ژنتیکی در یک گونه امکان انجام برنامه‌های اصلاحی در آن گونه را بیشتر می‌کند (موسوی و همکاران، ۱۳۸۹).

منابع تنوّع ژنتیکی عبارتند از:

توده‌های وحشی جمع‌آوری شده از طبیعت، توده‌های موجود در مجموعه‌های ژرم پلاسم (بانک ژن و باغ گیاهشناسی)، ارقام اوّلیه بومی و نژادهای سرزمینی قدیمی و ارقام رایج مورد استفاده است

بنابراین وارد کردن یا اهلی کردن جمعیّت منتخب برخوردار از کارایی بالا از میان انبوه توده-های طبیعی یک گونه می‌تواند، پیشرفت مهم و قابل توجّهی در دست‌یابی به ارقام مورد نیاز صنایع بدون صرف وقت و هزینه اضافی برای بکارگیری روش‌های اصلاحی باشد (Pank, 2007).

انواع تنوّع ژنتیکی در گیاهان:

تنوّع فنوتیپی (ظاهری)، تنوّع کروموزومی (کاریوتیپ)، تنوّع پروتئینی (آنزیم‌ها) وتنوّع در سطح DNA (چندشکلی توالی‌های DNA) است.

1 - Genetic diversity

از بین تنوّع ژنتیکی‌های ذکر شده نشانگرهای DNA از اهمیت بالایی برخوردارند (بابائیان جلودار، ۱۳۸۷)

۲-۳- انواع نشانگرها[1]

نشانگرهای ژنتیکی به سه گروه تقسیم‌بندی می‌شوند:

۲-۳-۱- نشانگرهای مرفولوژیکی

روش‌های کلاسیک اندازه‌گیری تنوّع در میان گروه‌های مختلف گیاهی مبتنی بر خصوصّیات ظاهری بوده که طی آن گیاهان مورد مطالعه بر مبنای یک سری تفاوت‌های قابل بروز در صفات قابل رؤیت امتیازبندی می‌شوند (Newbury and Ford, 1997). نشانگرهای مرفولوژیک[2] اولین نشانگرهایی بودند که برای ارزیابی تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفتند. این نشانگرها در واقع نتیجه جهش‌های قابل رؤیت در ریخت ظاهری موجود هستند و در صورتی می‌توانند به عنوان نشانگر ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرند که بیان آنها در طیف وسیعی از محیط‌های مختلف تکرارپذیر باشد (Dvorak *et al.*, 1998). این نشانگرها شامل دامنه‌ی وسیعی از ژن‌های کنترل‌کننده صفات فنوتیپی هستند و از زمان‌های بسیار دور یعنی از زمانی که محل ژن‌ها بر روی کروموزوم مشخص شد، مورد استفاده قرار می‌گرفتند. این نوع نشانگرها دارای معایب زیادی از جمله موارد زیر هستند:

اغلب دارای توارث غالب و مغلوب بوده و اثرات اپیستازی دارند؛

تحت تأثیر شرایط محیطی و مرحله رشد موجود قرار می‌گیرند؛

فراوانی و تنوّع کمی دارند؛

1 - Markers

۲- ریخت‌شناسی

گاهی برای مشاهده و ثبت آن‌ها باید منتظر ظهور آن‌ها ماند. این کار در مورد گیاهان چندساله بسیار دشوار است؛

اساس ژنتیک بسیاری از نشانگرهای مرفولوژیک هنوز مشخص نشده است (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶). تاکنون تحقیقات زیادی برای ارزیابی تنوّع ژنتیکی با استفاده از صفات مرفولوژیکی در گردو انجام شده است. در اصلاح گیاهان، بررسی تنوّع ژنتیکی پایه برنامه‌های اصلاحی محسوب می‌شود. برای اصلاحگر تشخیص روابط ژنتیکی در بین ژنوتیپ‌ها وابسته به اطلاعات فنوتیپی است (Solouki *et al.*, 2008).

۲-۳-۲- نشانگرهای پروتئینی

ژن‌هایی که پروتئین‌ها را کد می‌کنند قابل استخراج و بررسی هستند. به عنوان مثال ایزوآنزیم‌ها و پروتئین‌های ذخیره‌ای به طور گسترده در بررسی تنوّع ژنتیکی و طبقه‌بندی گیاهان زراعی به کار رفته‌اند (Makeret and Moller, 1959). معمول‌ترین نوع نشانگرهای پروتئینی آیزوزایم-ها هستند که فرم‌های مختلف یک آنزیم را نشان می‌دهند. نشانگرهای پروتئینی تغییرات را در سطح ردیف و عمل ژن به صورت نشانگرهای هم‌بارز نشان می‌دهند. از معایب این نشانگرها محدود بودن آن‌هاست. هم‌چنین این نوع نشانگرها تحت تأثیر تغییرات پس از ترجمه هستند و تظاهر کمی برخی از آنزیم‌ها و پروتئین‌ها تحت تأثیر مرحله رشد گیاه قرار می‌گیرد (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶). این محدودیت در تعداد نشانگرهای آیزوزایم از عمده‌ترین معایب آن‌هاست و موجب کاهش کارایی آن‌ها می‌شود. از نکات منفی دیگر این نشانگرها، محدودیّت تنوّع ژنتیک قابل ثبت در آیزوزایم‌هاست. به عبارت دیگر آیزوزایم‌ها نه تنها کم هستند، بلکه چندشکلی و تفاوت قابل ثبت نیز در آنها چندان زیاد نیست. پیچیدگی فنوتیپ‌های الکتروفورزی آیزوزایم‌ها نیز که گاهی مشاهده شده است، از دیگر معایب

این قبیل نشانگرهاست. این پیچیدگی که به دلیل دخیل بودن آنزیم‌های مرکب از چند پلی‌پپتید مستقل در ترکیب برخی از آیزوزایم‌هاست، امتیازبندی را دشوار می‌کند.

۲-۳-۳- نشانگرهای مولکولی DNA

نشانگرهای مولکولی فراوان و در هر موجود زنده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرند. اگرچه پتانسیل نشانگرهای مولکولی برای اصلاح‌کنندگان از حدود ۷۵ سال پیش شناخته شده بود، ولی کاربرد آن‌ها تا حدود ۳۰ سال پیش به دلیل نبود نشانگرهای مناسب بسیار محدود بوده است. گسترش نشانگرهای DNA موجب به کارگیری روش‌های بسیاری برای غلبه بر مشکلات اصلاحی و ژنتیکی موجودات شده است. در سال‌های گذشته، از نشانگرهای DNA برای مطالعات پایه‌ای و کاربردی در انسان، حیوان و گیاه استفاده شده است (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶). نشانگرهای DNA به تعداد نامحدودی یافت شده و به مرحله نموی یا اندام خاص بستگی ندارند، چون مولکول DNA در تمام بافت‌ها یکسان است. بعلاوه، مزیّت دیگر نشانگرهای DNA این است که می‌توان آنها را بطور مستقیم برای کاربردهای بعدی بیولوژیکی مولکولی استفاده کرد (سلطانلو و همکاران، ۱۳۸۸). نشانگرهای مولکولی DNA به دو گروه مبتنی بر PCR و غیرمبتنی بر PCR تقسیم می‌شوند (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶).

۲-۴- خصوصیات یک نشانگر خوب

هم‌بارز بودن (ژنوتیپ های هموزایگوت وهتروزایگوت از یکدیگر قابل تشخیص اند)

تظاهر درمراحل اولیه زندگی

نداشتن تاثیر بر روی دیگر آلل‌های موجود در جایگاه‌های ژنی نشانگر که بر مرفولوژی موجود موثر هستند (نداشتن اپیستازی)

عدم تاثیر متقابل با نشانگرهای دیگری که می‌توانند هم‌زمان در یک جمعیت در حال تفرق مورد استفاده قرار گیرند

پیوستگی با ژن‌های مورد نظر

توارث‌پذیری کامل

آسان بودن اندازه‌گیری (فصیحی‌هرندی و همکاران، ۱۳۷۴)

۲-۵- نشانگرها بر پایه DNA

نشانگرهای زیادی برای بررسی تنوع ژنتیکی وجود دارد به عنوان نمونه نشانگرهای RAPD, AFLP و SSR می‌توان چندشکلی را در سطح DNA شناسایی کرد.

با تجزیه DNA می‌توان به تنوع بیشتری دست یافت. پروتئین‌هایی که در پروفیل‌های آلوزایم با الکتروفورز مشخص شده‌اند به وسیله ژن‌ها کد گردیده‌اند. این ژن‌ها به صورت پراکنده در سراسر ژنوم واقع شده‌اند. در اواخر سال ۱۹۶۰ تعدادی آنزیم برشی در باکتری کشف گردید. این آنزیم‌ها قادر بودند که DNA بیگانه را در توالی مشخص شناسایی و در نقطه خاصی قطع نمایند (Weaver and Hederic., 1989). از اوایل دهه ۸۰ میلادی نشانگرهای جدیدی پیشنهاد و معرفی شدند و در طی یک دهه تکامل شگرفی داشتند. انواع مختلفی از این نشانگرها با تفاوت‌های بسیار از لحاظ تکنیکی و روش تولید، نحوه کاربرد، امتیازبندی، تجزیه و تحلیل و تفسیر نتایج به سرعت ابداع و معرفی گردیده‌اند (قره‌یاضی، ۱۳۷۵).

۲-۵-۱- نشانگرهای ریز ماهواره[1]

در ژنوم حیوانات و گیاهان و نیز میکروارگانیزم‌ها توالی‌های کوتاه شامل واحدهای تکی، دوتایی، سه‌تایی، پنج‌تایی و یا شش‌تایی است که به صورت متوالی یا پراکنده در سراسر ژنوم تکرار می‌شوند. این توالی‌های کوتاه تکراری ریزماهواره می‌باشند. بطوری که در هر ۱۰ کیلو جفت‌باز از توالی حداقل یک توالی ریزماهواره‌ای دیده می‌شود. ریزماهوره‌ها در طول کل ژنوم پراکنده می‌باشند و معمولاً قابل رونویسی هستند (Chawla, 2000).

اصطلاح ریزماهواره ابتدا توسط لیت و لوتی[2] در سال ۱۹۸۹ به کار برده شد. ردیف‌های ریزماهواره ناپایدارند و با کاهش و افزایش واحدهای تکرار شونده دچار تغییرات فراوان در طول می‌شوند. ریزماهواره نخستین بار در ژنتیک انسانی برای تشخیص برخی از بیماری‌هایی که با تغییر تعداد واحدهای تکرار شونده ریزماهواره همراه بودند، استفاده شدند. تنوع در تکرار ریزماهواره‌ها که به کمک PCR و الکتروفورز قابل آشکار سازی هستند موجب شده است که ریزماهواره به عنوان ابزار مولکولی با پتانسیل بسیار زیاد برای تشخیص‌های مولکولی در آزمایشگاه‌ها استفاده شود. امروزه نشانگرهای ریزماهواره‌ای به وفور در مطالعات مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. ریزماهواره‌ها با توجه به سیستم چندآللی و چندشکلی بسیار زیادی که دارند از نشانگرهای امیدبخش برای آینده محسوب می‌شوند. گرچه شناسایی و تعیین ردیف بازی ریزماهواره‌ها پیچیده و پرهزینه است، ولی به مرور زمان و با تلاش و همکاری آزمایشگاه‌های مختلف در گوشه و کنار جهان، دیر یا زود تعداد زیادی از ریزماهواره‌ها شناسایی و جایگاه ژنی آن‌ها تعیین خواهد شد. به نظر می‌رسد ریزماهواره‌ها گزینه مناسب برای نشانه‌دار نمودن ژن‌ها[3] و انتخاب به کمک نشانگرها باشد. البته تردیدهایی برای استفاده از این نشانگر

1- Microsatellite
2-Litt and Luty
3- Gene tagging

در رده‌بندی و مطالعات فیلوژنیک به ویژه در سطوح بالاتر از گونه وجود دارد که احتمال استفاده از آن‌ها را در این قبیل مطالعات ضعیف می‌کند (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶).

۲-۵-۱-۱- مزایای ریزماهواره‌ها

کاربرد آن‌ها و تفسیر نتایج نسبتاً ساده است، سیستم چندآللی (تا ۱۱ آلل) از ویژگی‌های بارز این نوع نشانگر است، ریزماهواره‌ها بسیار متنوع هستند، هم‌بارز هستند و به وفور در ژنوم یوکاریوت‌ها یافت می‌شوند (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶).

۲-۵-۱-۲- معایب ریز ماهواره‌ها

شناسایی ریزماهواره‌ها، تعیین ردیف بازی آن‌ها، طراحی و ساخت آغازگرها و تهیه نقشه ژنتیکی ریزماهواره‌ها که مقدمه کاربرد این نشانگرهاست، بسیار پیچیده و مستلزم صرف و وقت و هزینه بسیار زیاد است.

تنوع تعداد ریزماهواره‌های شناخته شده در برخی از موجودات استفاده از آن‌ها را در مکان‌یابی ژن‌ها محدود کرده است (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶).

فصل سوم

بررسی منابع

تنوع مبنای همه گزینش‌ها در اصلا . ست. انتخاب بر مبنای ژنوتیپ نیازمند تنوع است. با افزایش تنوع ژنتیکی در یک جامعه دامنه انتخاب وسیع‌تر می‌شود تنوع فنوتیپی موجود در ژنوتیپ‌های مختلف تحت تأثیر دو عامل مح ر ژنتیک قرار دارد و بدیهی است آن دسته از تنوع‌هایی که منشأ ژنتیک داشته باشند از نظر اصلاح نباتات حائز اهمیت بیشتری بوده و در صورت بهره‌گیری از آن‌ها امکان انتخاب ژنوتیپ‌های مورد نظر برای اهدافی خاص فراهم می‌شود و بهنژادگر می‌تواند از خزانه ژنی یا ژرم‌پلاسم قابل دستیابی حداکثر استفاده نماید. ایران با دربرگیری بخش زیادی از ناحیه آسیای میانه به عنوان مرکز تنوع و پیدایش بسیاری از گونه‌های زراعی- باغی به‌ویژه گونه گردوی ایرانی، صاحب امتیاز خاصی در این زمینه می‌باشد (Forde, 1975). شناسایی، حفاظت و استفاده از منابع ژنتیکی به‌عنوان یکی از ارزشمندترین ثروت‌های ملی هر کشور از اهمیت خاصی برخوردار است. ایران به عنوان یکی از منابع غنی ذخایر ژنتیکی گردو در جهان به حساب می‌آید. بررسی تنوع ژنتیکی موجود در این ذخایر ژنتیکی جهت شناسایی و معرفی ژنوتیپ‌های برتر اولین گام در هر برنامه مرتبط با حفاظت و توسعه پایدار کشت گونه‌های گیاهی است (کریمی و همکاران، ۱۳۸۸ و Rezaee *et al*., 2008).

هدف‌های اصلاح گردو بررسی صفات مهم مانند دگرگرده‌افشانی، زمان برداشت، میزان نیاز سرمایی و جوانه‌زنی بذور، ارزیابی ویژگی‌های رشدی و نموی ژنوتیپ‌های انتخاب شده در مناطق مختلف و معرفی رقم‌های جدید و قرار دادن آن‌ها در اختیار باغداران می‌باشد (McGranahan *et al*., 1998) .یکی از اهداف مهم در اصلاح گردو رسیدن به عملکرد منظم همراه با کیفیت بالا جهت رقابت

در بازارهای جهانی می‌باشد. دست‌یابی به این هدف مستلزم استفاده از تنوع ژنتیکی ذخایر توارثی جهت شناسایی و معرفی ارقام و ژنوتیپ‌های برتر گردو است که این موضوع اولین گام در هر برنامه مرتبط با حفاظت و توسعه پایدار کشت گونه‌های گیاهی‌است (Forde,1975).

تحقیقات مختلفی در ایران و دنیا، به منظور بررسی تنوع مرفولوژیک ژنوتیپ‌های گردو انجام گرفته است. در یک کار پژوهشی در کشور اسلوونی ۲۱۵ ژنوتیپ گردو بر اساس صفات رویشی، فنولوژیکی، میوه‌کاری و حساسیت به باکتری بلایت و آنتراکنوز بررسی شدند و ۲۴ ژنوتیب برتر آن انتخاب و در مناطق آب‌وهوایی مختلف کشت و مورد بررسی قرار گرفتند و ژنوتیپ‌های برتر معرفی شدند(Solar and Stampar, 2004). همچنین در یک کار پژوهشی در منطقه هیماچال پرادش در کشور هندوستان ۵۸ ژنوتیپ گردو را بر اساس صفات مرفولوژیک بررسی کردند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که وزن میوه و مغز به ترتیب بین ۲۰/۵۵-۶/۴ و ۷/۱-۱/۵ گرم و درصد مغز ۶۲/۵-۱۲ درصد متغیر است و همچنین همبستگی بین برخی از صفات دانه را تعیین کردند (Sharma and Sharma, 2001). در ایران نیز در چندین بررسی از این تکنیک برای ارزیابی تنوع استفاده گردیده است. ابراهیمی و همکاران (۱۳۸۸) ۶۰۸ ژنوتیپ گردو را در شهرستان نی‌ریز در استان فارس بر اساس صفات فنولوژیکی و صفات پومولوژیکی مورد پژوهش قرار دادند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که همبستگی مثبت و معنی‌داری بین وزن دانه، وزن مغز و همچنین بین زمان باز شدن برگ و زمان برداشت محصول وجود دارد. همچنین ۴۴ ژنوتیپ برتر مشخص و با ده نشانگر SSR مورد ارزیابی بیشتر قرار گرفتند. احتشام‌نیا و همکاران (۱۳۸۸) در منطقه استان گلستان ۹۶ ژنوتیپ گردو را مورد مطالعه قرار دادند. در این پژوهش ۳۲ صفت شامل صفات برگ، صفات فنولوژیکی و صفات پومولوژیکی مورد بررسی قرار گرفتند و نتایج حاصل از آن نشان داد که توده‌های مورد بررسی دارای تنوع بالایی بوده و گزینش باید از نظر صفات مورد نظر صورت گیرد. همچنین حق‌جویان و همکاران (۱۳۸۴) در بررسی تنوع ژنتیکی گردوهای مناطق مختلف کشور با استفاده از نشانگرهای مرفولوژیک

۱۳۸ ژنوتیپ گردوی تویسرکان و ۴ کلکسیون کرج، شاهرود، ارومیه و مشهد را از نظر ۱۶ صفت مرفولوژیک مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج مطالعات این بررسی نشان داد که بیش‌ترین تشابه بین ژنوتیپ تویسرکان و ژنوتیپ ۷۸ و ۸۴ مشهد و به ترتیب با نام‌های $K_{21/1}$ و $k_{21/2}$ وجود دارد. ایشان درصد مغز و متوسط وزن مغز تک میوه را در ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی به ترتیب ۶۴-۲۴ درصد و ۱/۴۲-۱۴/۱ گرم گزارش کردند. ارزانی و همکاران (۱۳۸۷) به منظور ارزیابی ژنوتیپ‌های برتر گردو در منطقه تفت استان یزد، تعداد ۵۸ درخت را بر مبنای خصوصیات ظاهری انتخاب و صفاتی همچون تاریخ برگ‌دهی، تاریخ حداکثر پذیرش کلاله، تاریخ برداشت، وزن میوه و وزن مغز که دارای توارث-پذیری بالا بودند مورد ارزیابی قرار دادند. بر اساس گزارش ایشان، دامنه تغییرات وزن میوه، وزن مغز، درصد مغز و ضخامت پوست در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به ترتیب ۱۵/۲-۶ گرم، ۹/۱ -۲/۶ گرم، ۷۹/۶ – ۳۸/۴ درصد و ۱/۴- ۰/۴ میلی‌متر بود. همچنین ژنوتیپ‌های AA33, AA35, AA115، BA150و AA110 به عنوان ژنوتیپ‌های برتر گردو در منطقه تفت معرفی شدند که وزن مغز و درصد مغز در آن‌ها به ترتیب بین ۹/۱ گرم و ۷۹/۶ – ۴۶/۳ درصد بود.

مطالعه تنوع ژنتیکی گردو در مناطق مختلف جهان به وسیله نشانگرهای مختلف صورت گرفته است. وسته[1] و همکاران (۲۰۰۲) تعداد ۳۰ نشانگر هسته‌ای ریزماهواره‌ای را در گردوی سیاه شناسایی کردند و از آن‌ها برای مطالعات ژنتیک توده، نقشه‌های ژنومی و تعیین ژنوتیپ هم‌گروه‌ها بر اساس DNA، مطالعه جریان ژنی و اصلاح درختان استفاده کردند. پوله جیونی[2] و همکاران (۲۰۰۴) از نشانگرهای مولکولی هم‌بارز ریزماهواره و نشانگرهای بارز RAPD و ISSR برای شناسایی گونه‌ها و هیبریدهای درون گونه ای جنس Juglans استفاده کردند. در مجموع ۱۳ آغازگر ISSR، ۱۷ آغازگر RAPD و ۱۰ جفت آغازگر ریزماهواره توسعه یافته از *Juglans nigra* قادر به تکثیر محصولات PCR در گونه‌ها و هیبریدهای بین‌گونه‌ای شدند. این نشانگرها به ترتیب ۱۶۲، ۱۸۸ و ۱۱۳ باند ایجاد کردند

1 - Woeste
2 - Pollegioni

و کل نمونه‌ها را به سه گروه: ۸۱ ژنوتیپ *Juglans nigra* L ، ۴۹ ژنوتیپ *Juglans regia* L و ۸ ژنوتیپ بین‌گونه‌ای تقسیم نمودند. فورونی[1] و همکاران (۲۰۰۵) از نشانگرهای ریزماهواره برای شناسایی گردوی ایرانی و ارزیابی همبستگی بین ارقام و بیوتیپ گردو (رقم سورنتو) استفاده کردند. در این مطالعه با استفاده از ۲۳ جفت نشانگر ریزماهواره ۱۰ نهال سورنتو و ۶ هم‌گروه پیوندی با ۶ رقم گردو مورد مقایسه قرار گرفتند و در ۶ جفت از ۲۳ جفت آغازگر مورد مطالعه ۳۳ آلل را شناسایی کردند. تعداد آلل‌ها در مکان‌های ژنی از ۳ تا ۷ آلل (میانگین ۵/۵) و اندازه باندها ۱۲۶-۱۲۰ جفت باز بود. دو جایگاه ژنی WGA005 و WGA027 جایگاه‌های بسیار مفیدی در تمایز واریته‌های گردو بودند. در پژوهشی دیگر فورونی و همکاران (۲۰۰۷) که از ۱۲ نشانگر ریز ماهواره برای شناسایی ۴۸ ژنوتیپ گردوی ایرانی استفاده کردند. توده‌های مورد مطالعه ۱۶ گردوی سورنتو پرورش یافته در کاسرتا (۱۰ گیاه بذری و ۶ گیاه پیوندی) و ۲۶ کلون پیوندی در شبه جزیره سورنتو بودند. تمامی آغازگرها صد در صد چندشکلی نشان دادند و توانستند ۸-۳ آلل را به ازای هر مکان ژنی شناسایی کنند. در این مطالعه بهترین و مفیدترین آغازگرها را WGA009 و WGA071 و تعدادکل آلل‌ها را ۶۶ عدد گزارش کردند. در این پژوهش بیش‌ترین محتوای اطلاعات چندشکلی مربوط به مکان ژنی WGA05 و معادل ۰/۷۱۷ بود.

کریمی و همکاران (۱۳۸۸) به بررسی تنوع ژنتیکی ۴۷ ژنوتیپ گردو از ۷ توده طبیعی گردوی غرب کشور پرداختند و با استفاده از ۱۱ مکان ژنی ریزماهواره، در مجموع ۵۴ آلل را شناسایی نمودند. سه مکان ژنی WGA276، WGA32 و WGA009 بیش‌ترین محتوای اطلاعات چندشکلی را به خود اختصاص دادند. بیش‌ترین میانگین هتروزیگوتی مشاهده شده و محتوای اطلاعات چندشکلی درون توده‌ها مربوط به توده لرستان و به ترتیب معادل ۰/۹۸۴ و ۰/۶۴۹ بوده و کم‌ترین میزان هتروزیگوتی

1 - Foroni

مشاهده شده به توده کردستان و معادل ۰/۸۴۰۶ بود. همچنین تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ‌های مورد بررسی کاملاً از تنوع جغرافیایی پیروی کردند. محسنی (۱۳۸۶) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره و مرفولوژیکی به بررسی تنوع ژنتیکی ۶۶ ژنوتیپ گردوی استان کرمان پرداختند. میانگین هموزیگوتی مشاهده شده برای ۱۷ مکان ژنی ریزماهواره برابر ۰/۷۷ بود. محتوای چندشکلی در تمام جایگاه‌ها بالای ۰/۵ بود و بیش‌ترین این مقدار را جایگاه‌های WGA118 و WGA071 داشتند (به ترتیب ۰/۸۲ و ۰/۸۱). میانگین تعداد آلل‌ها در کل جایگاه‌ها ۸/۶۵ بود. نتایج تقسیم‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از داده‌های مولکولی با دسته‌بندی آن‌ها بر اساس موقعیت جغرافیایی به نسبت متفاوت بود. بین فاصله جغرافیایی و ژنتیکی توده‌ها نیز همبستگی مشاهده نشد. احتشام‌نیا و همکاران (۱۳۸۸) با استفاده از ۱۱ نشانگر ریزماهواره به بررسی تنوع ژنتیکی ۹۶ ژنوتیپ از پنج توده طبیعی گردوی ایرانی در استان گلستان پرداختند. نشانگرهای ریزماهواره درمجموع توانستند ۷۷ آلل را با اندازه‌ای بین ۱۷۶ تا ۲۷۵ جفت باز شناسایی کنند. تعداد آلل‌ها در هر جایگاه ژنی از ۲ تا۱۱ آلل با میانگین ۷ آلل متغیر بود. حداقل تعداد آلل مشاهده شده مربوط به مکان ژنی WGA027 (۳ آلل) و حداکثر تعداد آلل مشاهده شده مربوط به مکان ژنی WGA202 (۱۱ آلل) بود. تعداد آلل‌های موثر در مکان‌های ژنی در محدوده ۲.۰۲۶ تا ۸.۹۷۴ با میانگین ۵.۰۸ بود. بیش‌ترین مقدار تنوع براساس شاخص اطلاعاتی شانون مربوط به توده گالیکش و کلاله بود.

فصل چهارم

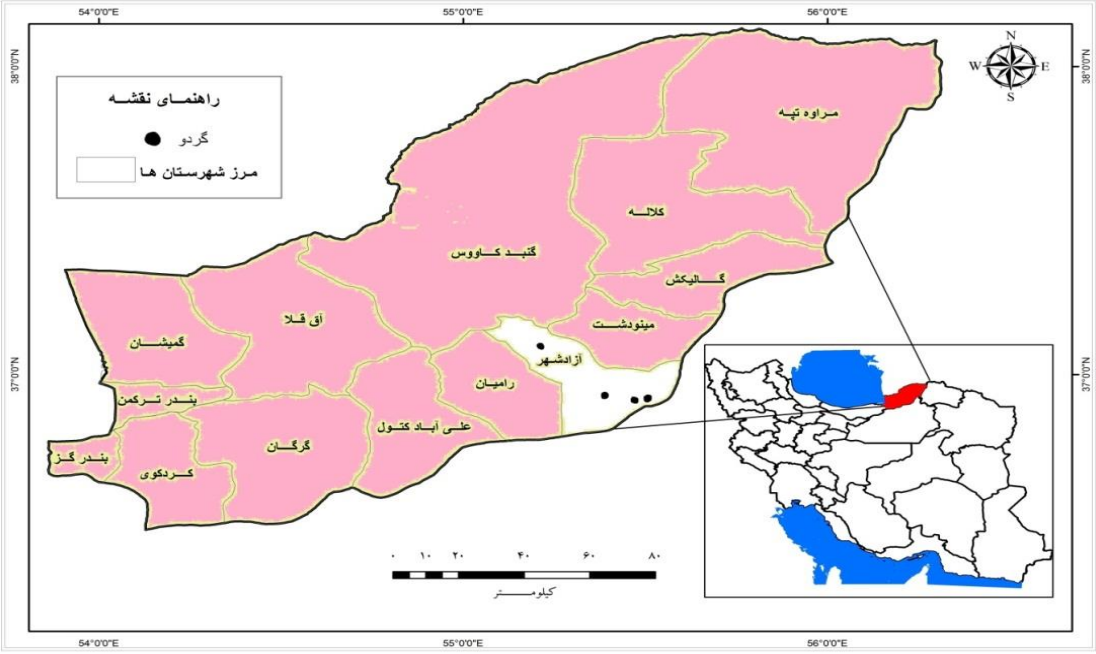
مواد و روش‌ها

۴-۱- عملیات میدانی:

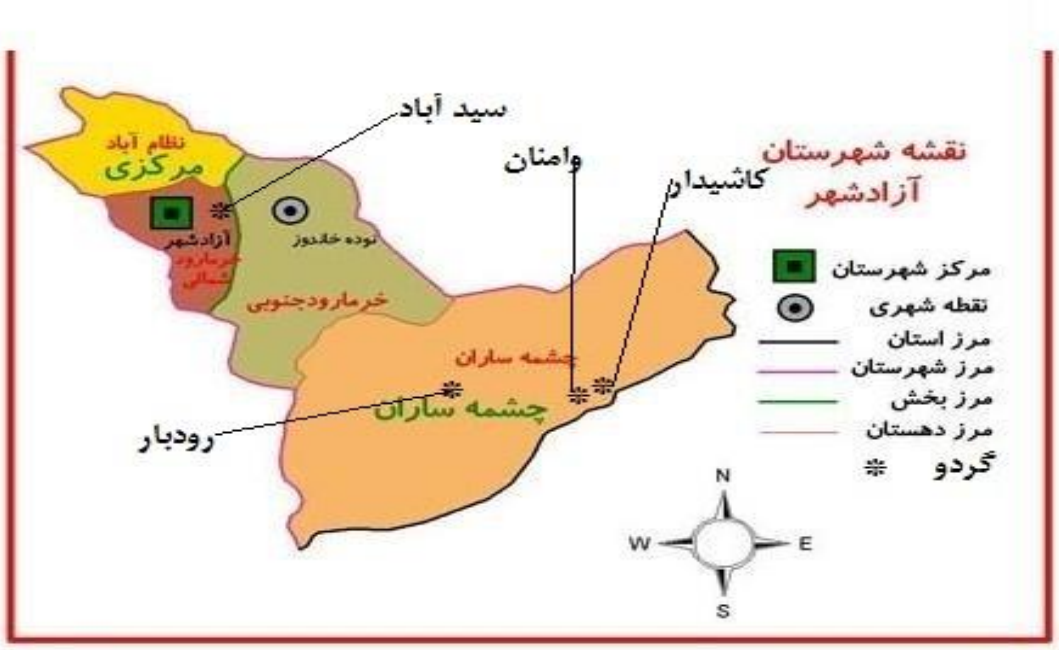
۴-۱-۱- محل و روش نمونه‌برداری:

این پژوهش در سال ۱۳۹۲ در شهرستان آزادشهر (با طول "۳۳ '۰۸ °۵۵ شرقی و عرض "۳۱ '۰۸ °۳۷ شمالی) واقع در استان گلستان انجام شد. از آنجا که در شهرستان آزادشهر پراکنش متفاوتی از نظر توده‌های گردو وجود دارد، بسته به تراکم گردو در روستاهای این شهرستان و میزان دسترسی به آن‌ها، مناطق مورد نظر مشخص گردید و در مجموع چهار توده گردوی بومی از ارتفاعات مختلف شهرستان انتخاب گردید. طبق نتایج تحقیقات مال‌ولتی[1] و همکاران (۱۹۹۳) در این پژوهش نیز برای تعیین توده‌ها، درختانی که حداقل ۱۵ کیلومتر با هم فاصله داشتند به عنوان یک توده در نظر گرفته شده و درختان به طور تصادفی برای نمونه‌برداری انتخاب شدند. بسته به تراکم درختان در هر منطقه، از هر توده ۱۵ تا ۴۰ درخت انتخاب و پلاک‌کوبی شدند و در مجموع ۱۰۲ ژنوتیپ انتخابی از چهار توده مورد بررسی قرار گرفت. مناطق انتخابی شامل روستاهای وامنان، کاشیدار، رودبار و سیدآباد بودند (شکل ۴-۲ و جدول ۴-۱). ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از ۱ تا ۱۰۲ شماره‌گذاری شدند. شیوه نام-گذاری ژنوتیپ‌ها بر اساس کد محل نمونه‌گیری و شماره درخت که به عنوان نمونه انتخاب شده بودند انجام پذیرفت (جدول۴-۱). در مورد هر ژنوتیپ ۳۰ صفت مرفولوژیکی با استفاده از توصیف‌نامه بین‌المللی IPGRI[2] با اندکی تغییرات اندازه‌گیری شد (جدول ۴-۲). برای اندازه‌گیری صفات مربوط به میوه و برگ از هر درخت ۸- ۱۰ عدد میوه گردو و ۵ تا ۸ عدد برگ به صورت تصادفی جمع‌آوری و در پاکت‌های جداگانه قرار داده شدند و برای اندازه‌گیری صفات به آزمایشگاه انتقال داده شدند. اندازه-گیری صفات مغز یک ماه بعد از برداشت پس از نگهداری میوه‌ها در دمای اتاق انجام شد.

1 - Malvolti
2 - International Plant Genetic Resources Institute



شکل۴-۱- نقشه موقعیت کلی مکان‌های جمع‌آوری ژنوتیپ‌های گردو شهرستان آزادشهر در ایران



شکل ۴-۲- نقشه مکان‌های جمع‌آوری ژنوتیپ‌های گردو شهرستان آزادشهر

جدول ۴-۱- مشخصات جغرافیایی و اقلیمی و کد هر یک از مناطق جمع‌آوری نمونه شهرستان آزادشهر

مشخصات توده	کد محل	تعداد نمونه	عرض جغرافیایی	طول جغرافیایی	دامنه ارتفاع (متر)
رودبار	ROOD	۱۴	۵۴ ٬ ۳۶ شمالی	۱۹ ٬ ۵۵ شرقی	۱۳۵۸
سیدآباد	SID	۱۸	۰۶ ٬ ۳۷ شمالی	۱۵ ٬ ۵۵ شرقی	۱۹۴
کاشیدار	KA	۲۸	۵۹ ٬ ۳۶ شمالی	۳۳ ٬ ۵۵ شرقی	۱۳۲۸
وامنان	VA	۴۲	۰۰ ٬ ۳۶ شمالی	۳۳ ٬ ۵۵ شرقی	۱۳۷۲

جدول ۴-۲- صفات کمی و کیفی مورد بررسی در ۱۰۲ ژنوتیپ گردو

شماره	صفت	علامت اختصاری	نحوه اندازه گیری
۱	طول برگ	A	سانتی‌متر
۲	طول بزرگ‌ترین برگچه	ALel	سانتی‌متر
۳	عرض بزرگ‌ترین برگچه	ELW	سانتی‌متر
۴	تعداد برگچه	NuL	تعداد
۵	شکل برگ	LSh	(۱- بیضوی باریک ۲- بیضوی ۳- بیضوی پهن)
۶	اطراف برگ	Lma	(۱- صاف ۲- دندانه‌ای ۳- ارّه‌ای)
۷	رنگ برگ	Lco	(۳- سبز روشن ۵- سبز ۷- سبزتیره)
۸	رنگ تنه	Sco	(۳- سبز ۵- قهوه ای ۷- سیاه)
۹	سال‌آوری	AB	۳- کم ۵- متوسط ۷- زیاد
۱۰	شکل میوه	NSh	۱ تا ۹ (۱- گرد، ۹- قلبی شکل)
۱۱	قطر میوه	Ndi	میلی‌متر
۱۲	طول میوه	NL	میلی‌متر
۱۳	بافت پوسته	Sht	۱ تا ۹ (۱- خیلی‌صاف، ۹- خیلی‌خشن)
۱۴	روزنه انتهای میوه	shs	میلی‌متر
۱۵	ضخامت پوسته	shthi	میلی‌متر
۱۶	وزن پوسته	Insh w	گرم
۱۷	متوسط وزن مغز	KW	گرم
۱۸	طعم مغز	Kfl	۱-مطلوب، ۲- نامطلوب
۱۹	پر بودن مغز	KF	۱-ضعیف، ۵- متوسط، ۷- کاملاً پر
۲۰	گوشتی بودن مغز	KPu	۱-ضعیف، ۵- متوسط، ۷- گوشتی کامل
۲۱	آسان جدا شدن مغز از میوه	Eco	۱ تا ۹ (۱- خیلی‌آسان، ۹- خیلی‌مشکل)
۲۲	چروکیدگی مغز	ksh	۱- نوک چروکیده، ۲- کمتر از ۵۰٪ چروکیدگی، ۳- بیشتر از

۲۳	عملکرد	y	کیلوگرم
۲۴	عادت رشد	GH	۱- عمودی ۲- نیمه عمودی ۳- شلجمی
۲۵	حساسیت به عوامل زنده (کرم BSS		۰ تا ۹(۰ – مقاوم، ۹ - خیلی حساس)
۲۶	وزن میوه	w	گرم
۲۷	ضخامت مغز	Th	میلی‌متر
۲۸	رنگ مغز	kco	۱-کاملاً روشن، ۲-روشن، ۳- کهربایی‌روشن، ۴ کهربایی
۲۹	نمونه جمع‌آوری شده	COS	۱ تا ۸ (۱- وحشی ۲- باغ ۳-کنار جاده ۴- حیاط ۸- دیگر
۳۰	درصد مغز	kp	درصد(وزن مغز به کل میوه)

۴-۲-آنالیز داده‌ها

۴-۲-۱-آنالیز داده‌های صفات مرفولوژیک:

داده‌های صفات رویشی، برگ و میوه در نرم افزار Excel ثبت و سپس برای محاسبه شاخص‌های آماری (انحراف معیار، متوسط، ضریب تغییرات صفات)، ضرایب همبستگی و رسم خوشه-بندی از نرم‌افزار SPSS استفاده شد. ضرایب همبستگی صفات کمی و صفات کیفی به ترتیب از روش پیرسون[1] و اسپیرمن[2] استفاده شد و تجزیه کلاستر با روش وارد[3] انجام گرفت.

۴-۲-۲- آنالیز داده‌های ژنوتیپ:

پس از آلل‌خوانی و تفسیر الگوی باندی و نتایج در هر جایگاه بدست می‌آید سپس داده‌ها در نرم‌افزار Exel ثبت شد.آنالیز داده‌ها توسط افزار Pop Gene V 32 (Yeh *et al*., 1999) انجام گردید.

آنالیز خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها وتجزیه به مؤلفه‌های اصلی جهت بدست آوردن تصویر پراکنش و فاصله نمونه‌ها از هم با استفاده از نرم افزار DARwin 5.0 انجام شد.

1-Pearson
2-Spearman
3- Ward Method

۴-۳- مراحل استخراج DNA

۴-۳-۱- نمونه‌گیری:

نمونه‌گیری از برگ‌های تازه در اوایل اردیبهشت ماه ۱۳۹۳ انجام گرفت. از هر درخت ۶-۴ برگ تازه جمع‌آوری و در پاکت‌های مربوط به هر نمونه و در بین یخ‌های خرد شده در داخل فلاسک قرار داده شد و برای استخراج DNA به آزمایشگاه منتقل شدند.

۴-۳-۲- استخراج DNA:

برای استخراج DNA از روش نمکی بهینه‌شده[1] (Miller *et al*., 1998) استفاده شد. جهت استخراج DNA از برگ‌های تازه و جوان استفاده شد. بعد از اینکه برگ‌ها با استفاده از ازت مایع پودر شدند از یک بافر لیزکننده برای لیزکردن و یا از بین بردن دیواره هسته استفاده شد. سپس حذف پروتئین‌ها توسط محلول اشباع نمک وکلروفرم انجام گرفت. در نهایت رشته‌های DNA پس از اضافه کردن اتانول مطلق با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد رؤیت و با لوله پاستور جدا شد. DNA استخراج شده توسط این روش برای آزمایشات بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۴-۴- تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده

پس از پایان مراحل کار استخراج DNA، کمیت و کیفیت DNA استخراجی تعیین شد. برای تعیین مقدار DNA استخراج شده روش‌های اسپکترفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگارز استفاده شد.

۴-۴-۱- روش اسپکترفتومتری

تعیین کمیت DNA استخراج شده نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکترفتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر از اشعه ماوراءبنفش و برای محاسبه مقدار خلوص DNA از مقدار جذب نوری در طول

1-Modified Salting Out

موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و اندازه‌گیری نسبت A_{260}/A_{280} که برآوردی از نسبت DNA به پروتئین‌های نمونه است استفاده گردید. به این ترتیب که ۱۰ میکرولیتر از نمونه DNA در ۹۹۰ میکرولیتر بافر۱ TE رقیق و میزان جذب نوری آن در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت غلظت DNA از رابطه زیر بدست آمد.

۵۰ × ضریب رقت × جذب نوری۲ در ۲۶۰ نانومتر= غلظت DNA دو رشته ای (میکروگرم بر میکرو لیتر) ضریب رقت معمولاً ۱۰۰ برابر است.

بهترین مقدار برای نسبت (A_{260}/A_{280}) بین ۱/۸ تا ۲ می‌باشد. در صورتی که کمتر از این مقدار باشد نشان دهنده آلودگی پروتئینی یا فنلی است و نسبت‌های بیشتر از ۲ نشان دهنده آلودگی RNA می‌باشد (طباطبایی یزدی و همکاران، ۱۳۸۶). نمونه‌های DNA استخراج شده به کمک دستگاه اسپکترفتومتر (Biocrom libra s22) بررسی گردید و در تمامی موارد کیفیت نمونه‌ها مطلوب بود. غلظت DNA استخراجی از ۱۶۰۰-۵۵۰ نانوگرم در میکرولیتر متغیر بود و در نهایت جهت PCR نمونه‌هایی با غلظت ۱۰۰ نانوگرم تهیه شد.

۴-۴-۲- روش الکتروفورز بر روی ژل‌آگارز

برای تعیین کیفیت DNA استخراج شده از این روش استفاده می‌شود. در این روش نمونه-های DNA با غلظت‌های متفاوت همراه با یک DNA معین و استاندارد (DNA فاژλ) بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز شدند. ژل مربوطه به وسیله اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شده و تحت نور ماوراءبنفش بررسی شده و شدت باندهای مربوط به نمونه‌ها با باند مربوط به DNA استاندارد مقایسه می‌شود. از آنجایی که مقدار DNA در هر یک از باندهای استاندارد معلوم است، مقدار DNA هر نمونه را می‌توان از طریق مقایسه شدت فلورسنت نمونه با باندهای DNA استاندارد بررسی کرد. وجود باند-

1-Teris-EDTA=TE

2-Optical Density (OD)=Absorbance(A)

های کاملاً تیز[1] و فاقد کشیدگی[2] حاکی از بهترین کیفیت است. وجود کشیدگی در فاصله بین چاهک و باند، حاکی از وجود آلودگی پروتئینی یا باقی ماندن نمک در نمونه‌ها می‌باشد که البته این کشیدگی‌ها کمی متفاوت از هم است. وجود یک باند اضافی در پایین ژل و فاصله زیاد از باند اصلی، حاکی از وجود RNA در نمونه‌ها می‌باشد. جهت بررسی نمونه‌ها، ژل در زیر لامپ UV قرار گرفت.

۴-۵- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) و اجزای آن

در این پژوهش برای تکثیرDNA از دستگاه ترموسایکلر[3] مدل (iCycer) BIORAD ساخت شرکت کشور آمریکا با بلوک ۹۶تایی و مسترکیت PCR از شرکت سیناکلون، جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد

۴-۵-۱- آغازگرها

آغازگرهای مورد استفاده از تحقیق دانگل[4] و همکاران (۲۰۰۵) و وسته[5] و همکاران (۲۰۰۲) انتخاب شدند (جدول۴-۳). معیار انتخاب آغازگرها برای این پژوهش، به ترتیب میزان چندشکلی(PIC)، میزان هتروزیگوتی، تعداد آلل‌های مشاهده شده در سایر مطالعات بود. پس انتخاب آغازگرهای مربوط به شرکت تکاپوزیست سفارش داده شدند آغازگرهای مورد بررسی به صورت لئوفیلیز دریافت گردیدند و پس از حل‌کردن و رقیق ساختن در غلظت ۱۰۰ نانوگرم با آب دوبار تقطیر[6] (آب فاقد یون) دستورالعمل مربوط، به عنوان ذخیره اصلی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

1 -Sharp
2- Smear
3- Thermocycler
4 - Dangl
5 - Woeste
6 - Deionized water

۴-۵-۲- کیت PCR

کیت PCR شامل مستر و آب دوبار تقطیر از شرکت سیناکلون سفارش داده شدند. این کیت حاوی Master mix با ترکیب Taq DNA Polymerase با غلظت ۰/۰۴ واحد بر میکرولیتر بافر PCR ، $MgCl_2$با غلظت ۳ میلی‌مولار، $dNTP_S$ ، هر کدام با غلظت ۰/۰۴ میلی‌مولار و آب دوبارتقطیر بود. پس از اضافه کردن کلیه مواد و رساندن نمونه به حجم نهایی مورد نظر، میکروتیوپ‌های حاوی نمونه به مدت چند ثانیه (۲ ثانیه) تا۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. کلیه مراحل آماده‌سازی مواد مورد استفاده در واکنش بر روی یخ خشک انجام گرفت.

جدول۴- ۳- اطلاعات مربوط به آغازگرهای ریزماهوراه مورد استفاده

	آغازگر	توالی	تعداد آلل	دامنه اندازه آلل ها	دما	منبع
۱	WGA001	ATTGGAAGGGAAGGGAAATG CGCGCACATACGTAAATCAC	۳	181–195	56	Dangel et al. 2005
۲	WGA005	CAGTTTGTCCCACACCTCCT AACCCATGGTGAGAGTGAGC	۷	240–266	48	(Foroni et al.2005)
۳	WGA009	CATCAAAGCAAGCAATGGG CCATTGCTCTGTGATTGGG	۶	236–248	52	Dangel et al. 2005
۴	WGA032	CTCGGTAAGCCACACCAATT ACGGGCAGTGTATGCATGTA	۴	120–196	52	Woeste et al. 2002
۵	WGA054	CTAGGCTTCCCTAGCCGTG GGCTCCTCTCGATCTCGAC	۱۲	218	46	Wang et al. 2002
۶	WGA069	TTAGTTAGCAAACCCACCCG AGATGCACAGACCAACCCTC	۶	162–182	50	Woeste et al. 2002
۷	WGA071	ACCCGAGAGATTTCTGGGAT GGACCCAGCTCCTCTTCTCT	۸	136–210	50	Woeste et al. 2002
۸	WGA089	ACCCATCTTTCACGTGTGTG TGCCTAATTAGCAATTTCCA	۵	212–222	56	Dangel et al. 2005
۹	WGA202	CCCATCTACCGTTGCACTTT GCTGGTGGTTCTATCATGGG	۴	260–276	50	Dangel et al. 2005
۱۰	WGA276	CTCACTTTCTCGGCTCTTCC GGTCTTATGTGGGCAGTCGT	۶	168–194	54	Dangel et al. 2005

۴-۶- بهینه‌سازی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

بهینه‌سازی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بر اساس دو عامل دمای اتصال و غلظت DNA بود. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تمامی نمونه‌ها در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر انجام گرفت. مقدار و غلظت مواد شرکت کننده در واکنش در جدول۴-۴ نشان داده شده است.

جدول ۴-۴-شرایط بهینه‌سازی برای *PCR* آغازگرهای ریزماهواره

اجزاء واکنش	غلظت مواد	مقدار مواد
مستر	1X	۶ میکرولیتر
هریک از آغازگرها(RgF)	۰/۵ پیکومول	۱/۲۵ میکرولیتر
DNA الگو	۱۰۰ نانوگرم	۱ میکرولیتر
آب دیونیزه	-	۳ میکرولیتر
حجم نهایی	-	۱۲/۵میکرولیتر

۴-۶-۱- چرخه حرارتیPCR

در این پژوهش پس از آزمایش دماها و برنامه‌های مختلف، برنامه حرارتی مناسب برای آغازگرهای مورد مطالعه به‌دست آمد که برای تمامی آغازگرها، برنامه حرارتی یکسان استفاده شد و تنها تفاوت بین آن‌ها در دمای اتصال بود. برنامه حرارتی ترموسایکلر برای تکثیر جایگاه‌های مورد نظر در جدول۴-۵ نشان داده شده است.

جدول۴-۵- برنامه حرارتی برای تکثیر جایگاه‌های ریزماهواره

مرحله	دما(^{0}C)	زمان(دقیقه)	تعداد چرخه
واسرشته‌سازی اولیه	۹۵	۵	۱
واسرشته‌سازی	۹۵	۱	
اتصال آغازگرها	۴۶-۵۶	۱	۳۵
تکثیر	۷۲	۲	
تکثیر نهایی	۷۲	۱۰	۱

۴-۷- الکتروفورز عمودی

۴-۷-۱- آماده سازی ژل پلی‌آکریل‌آمید

در این پژوهش از دستگاه الکتروفورز (مدل Clevear VS20) ساخت کشور دانمارک، از نوع عمودی دوطرفه که ابعاد ژل آن ۱۸× ۱۸ سانتی‌متر و ضخامت ژل‌ها دو میلی‌متر بود استفاده شد.

برای تفکیک و نمایش آلل‌های جایگاه‌های ریزماهواره‌ای از ژل پلی آکریل‌آمید با غلظت ٪۶ استفاده شد که اجزای تشکیل دهنده و مقدار هریک از آن‌ها برای ۳۵ سی‌سی از محلول این ژل در این بخش آورده شده است.

۱- ۵/۲۵ سی سی محلول پلی‌آکریل‌آمید ۴۰٪ که در آن نسبت ۱۹ به ۱، آکریل‌آمید با بیس آکریل-آمید رعایت شده است (بیس آکریل‌آمید اتصالات عرضی را در آکریل‌آمید پلی‌مریزه به وجود می‌آورد).

۲- ۳/۵ سی‌سی محلول TBE 10x (در تانک آلکتروفورز از TBE،0/5x استفاده شد).

۳- ۹۰۰ میکرولیتر محلول آمونیوم پرسولفات (APS) ۱۰ درصد [۰/۱ گرم $(NH_4)_2 SO_4$ در یک میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر]، این ماده رادیکال‌آزاد مورد نیاز برای پلی‌مریزاسیون را در اختیار می-گذارد. (این ماده بهتر است هر بار تازه تهیه و استفاده شود).

۴- ۵۰ میکرولیتر محلول تمد[1] (به عنوان کاتالیزور).

برای آماده‌سازی قالب مخصوص ژل، ابتدا صفحات شیشه‌ای و نوارهای فضاساز[2] را با آب شسته و خشک می‌کنیم. سپس نوارها را روغن زده، بین شیشه‌های الکتروفورز را با دقت تنظیم می-نماییم. پایین شیشه را با خمیر (خمیربازی) خوب می‌گیریم تا درزی نداشته باشد. سپس این شیشه‌ها درون دستگاه محکم و دقیق نصب می‌شوند تا هنگام ریختن ژل نشت نداشته باشد. پس از آماده کردن محلول ژل را در زیر هود، دستگاه را با زوایه ۴۵ درجه نگه داشته و به آرامی از یک گوشه محلول توسط بشری کوچک بین دو شیشه ریخته می‌شود و درحین ریختن سعی شود در ژل حباب ایجاد نگردد. شانه مخصوص ایجاد چاهک که قبلاً تمیز شده، سریعاً در فاصله دو شیشه، داخل ژل قرار

1-Temed
2-Spacer

داده می‌شود. با تنظیم صحیح این شانه چاهک‌هایی با عمق و ابعاد مناسب در ژل ایجاد می‌گردد که فرآورده‌های واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در آن بارگذاری[1] می‌شود. حدود ۳۰ دقیقه بعد ژل کاملاً می-بندد و آماده انجام الکتروفورز می‌باشد. درون چاهک‌ها را با بافر 0/5x TBE شستیم تا آکلریل‌آمید پلی‌مریزه نشده، درچاهک‌ها باقی نماند.

۴-۷-۲- بارگیری فرآورده‌های PCR جایگاه‌های ریزماهواره

پس از نصب ستون ژل در دستگاه الکتروفورز عمودی، تانک با بافر TBE، ۰/۵x پر گردید. در این حالت دستگاه الکتروفورز آماده بارگیری است. داخل هر چاهک مقدار ۲ میکرولیتر از محصول PCR به همراه ۰/۹ میکرولیتر محلول رنگ (dye 1x) ریخته شد. در مطالعه حاضر از دو شانه با قابلیت ایجاد ۲۳ و ۱۶ چاهک استفاده گردید که از این تعداد، یک چاهک در هر ژل، مخصوص بار-کردن نشانگر استاندارد بود. پس از این مراحل، دستگاه روشن شده و برای ولتاژ ثابت ۱۴۰ ولت با شدت جریان متغیر تنظیم گردید. نمونه‌ها با این شرایط حدود ۳/۵ تا ۴/۵ ساعت الکتروفورز شدند. پس از پایان الکتروفورز ستون شیشه‌ای را از دستگاه جدا کرده و دو صفحه شیشه‌ای به آرامی از هم جدا گردید. ژل برای رنگ‌آمیزی با نیترات نقره به داخل محلول‌های مخصوص منتقل شد.

۴-۷-۳- رنگ‌آمیزی ژل پلی‌آکریل‌آمید

نمایان‌سازی باندها با روش موسوم به روش سریع رنگ‌آمیزی نقره[2] (طهمورث‌پور، ۱۳۸۸) انجام شد. برای رنگ‌آمیزی سه نوع محلول تهیه شد. مراحل و روش استفاده طبق جدول ۴-۶ می‌باشد.

1 -Load
2 -Rapid Marker DNA

جدول ۴-۶-مراحل رنگ‌آمیزی ژل پلی‌آکریل‌آمید با روش سریع نیترات نقره

	مرحله	طرز تهیه محلول	زمان(دقیقه)
۱	تثبیت (Fixation)	۱ سی‌سی الکل مطلق+ ۱۰۰ میکرولیتر اسیداستیک+آب مقطر=۱۰۰	۵
۲	شستشو	با آب دوبار تقطیر	۲
۳	رنگ‌آمیزی (Staining)	۰/۱ گرم نیترات نقره+ آب مقطر=۱۰۰ سی‌سی حجم کل	۱۰
۴	شستشو	با آب دوبار تقطیر	۲
۵	ظاهر کردن (Developing)	۱/۵ گرم سود+ ۵۰۰ میکرولیتر فرمآلدئید+آب مقطر=۱۰۰ سی‌سی حجم کل	تا ظاهر شدن باندها (۱۵-۱۰ دقیقه)
۶	شستشو	با آب دوبار تقطیر	۲

۴-۸- خواندن آلل‌ها در جایگاه‌های ریزماهواره

به دلیل وجود اشتباهات DNA پلی‌مراز در طول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، تقریباً همیشه باندهای غیر اختصاصی در روی ژل وجود دارد که شدت و تعداد این باندها بسته به نشانگر، غلظت اجزای واکنش و برنامه PCR و غیره متفاوت است. با دانستن محدوده آللی می‌توان با اطمینان بیشتری در مورد آلل‌های اختصاصی تصمیم گرفت (رضوی‌نیا، ۱۳۸۴). باندخوانی به روش دستی انجام گرفت. بدین منظور، مهاجرت باندهای مورد نظر و باند نشانگر استاندارد[1] از کف چاهک به کمک خط-کش اندازه‌گیری شد و با در نظر گرفتن رابطه خطی بین این اندازه‌ها، اندازه واقعی براساس جفت باز برای چاهک‌ها بدست آمد. ریزماهواره‌ها نشانگرهای هم‌بارز هستند، هموزیگوت و هتروزیگوت بودن هر فرد نیز به ترتیب با توجه به مشاهده یک یا دو باند اختصاصی در هر جایگاه، برای هر فرد به راحتی معین شد. ژنوتیپ‌های هر فرد نیز با توجه به نوع آلل‌ها تعیین و سپس فراوانی‌های ژنوتیپی محاسبه گردید. فراوانی ژنی و ژنوتیپی، متوسط هتروزیگوت و شاخص شانون از روی تعداد ژنوتیپ‌ها در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به دست آمد. برای این منظور بعد از تشکیل فایل اطلاعات ژنوتیپ‌های

1 - Size Marker DNA

مشاهده شده و اندازه آلل بر حسب جفت‌باز در نرم افزار Excel، فایل فوق در نرم‌افزار PopGene V1.31 (Yeh *et al*., 1999) مورد آنالیز قرار گرفت.

۴-۹- تجزیه و تحلیل مشاهدات و داده‌ها

۴-۹-۱- خواندن آلل‌ها در جایگاه‌های ریزماهواره

به دلیل وجود اشتباهات DNAپلی‌مراز در طول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، تقریباً همیشه باندهای غیر اختصاصی در روی ژل وجود دارد که شدت و تعداد این باندها بسته به نشانگر، غلظت اجزای واکنش و برنامه PCR , و غیره متفاوت است. با دانستن محدوده آللی می‌توان با اطمینان بیشتری در مورد آلل‌های اختصاصی تصمیم گرفت (رضوی‌نیا، ۱۳۸۴). باندخوانی به روش دستی انجام گرفت. بدین منظور، مهاجرت باندهای مورد نظر و باند نشانگر استاندارد از کف چاهک به کمک خط-کش اندازه‌گیری شد و با در نظر گرفتن رابطه خطی بین این اندازه‌ها، اندازه واقعی براساس جفت باز برای چاهک‌ها بدست آمد. ریزماهوراه‌ها نشانگرهای هم‌بارز هستند، هموزیگوت و هتروزیگوت بودن هر فرد نیز به ترتیب با توجه به مشاهده یک یا دو باند اختصاصی در هر جایگاه برای هر فرد معین شد. ژنوتیپ‌های هر فرد نیز با توجه به نوع آلل‌ها تعیین و سپس فراوانی‌های ژنوتیپی محاسبه گردید. فراوانی ژنی و ژنوتیپی، متوسط هتروزیگوت، شاخص شانون و میزان اطلاعات چندشکلی، از روی تعداد ژنوتیپ‌ها در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به دست آمد. برای این منظور بعد از تشکیل فایل اطلاعات ژنوتیپ‌های مشاهده شده و اندازه آلل بر حسب جفت‌باز در نرم افزار Excel ثبت شد فایل فوق در نرم‌افزار PopGene V1.31 (یه[1] و همکاران، ۱۹۹۹) مورد آنالیز قرار گرفت.

1 -Yeh

۴-۹-۲-تعداد آلل واقعی[1] و موثر[2]

در این معیار، تعداد آلل‌های مشاهده شده برای یک جایگاه مدنظر است. این معیار به شدت تحت تأثیر اندازه نمونه بوده، به همین جهت امکان وجود دارد که در آزمایش‌های گوناگون با تعداد نمونه-های متفاوت تعداد آلل‌های واقعی مختلفی برای یک جایگاه معین به‌دست آید. معیار دیگری که منعکس کننده تعداد آلل‌ها است، تعداد آلل موثر می‌باشد. این معیار بیانگر تعداد آلل‌هایی است که هتروزیگوتی یکسان ایجاد می‌کنند. تعداد آلل‌های موثر در هر جایگاه را به صورت زیر محاسبه می-کنند(هدریک[3]، ۱۹۹۹).

(۱-۴)

$$N_e=\frac{1}{\sum P_i^2}$$

که در آن N_e تعداد آلل‌های مؤثر و P_i فراونی i امین آلل می‌باشد. این معیار را بیشتر به دلیل حساسیت کم آن به اندازه نمونه مورد استفاده قرار می‌دهند.

۴-۹-۳- هتروزیگوتی یا تنوع ژنی

میزان هتروزیگوتی در یک جمعیت، معمول‌ترین معیار تنوع ژنتیکی است که به دو صورت هتروزیگوتی مشاهده شده و هتروزیگوتی مورد انتظار (هاردی- واینبرگی) گزارش می‌شود (نی[4]، ۱۹۷۸). تنوع‌ژنی را به صورت احتمال این که دو آلل برداشته شده به طور تصادفی از یک جمعیت، متفاوت باشند تعریف کرده است که برای یک جایگاه از فرمول زیر بدست می‌آید:

(۲-۴)

$$H_e=1-\sum_i p_i^2$$

1 -The number of actual alleles
2 - The number of effective alleles
3 - Hedric
4 - Nei

به‌طوری که H_e هتروزیگوتی و P_i فراوانی i امین آلل است.

میانگین هتروزیگوتی در چند جایگاه برابر است با:

(۳-۴)

$$H=\sum_{k=1}^{r} {h_k}/{r}$$

که در آن H میانگین هتروزیگوتی وr تعداد جایگاه‌های مورد بررسی و h_k میزان هتروزیگوتی برای k امین جایگاه می‌باشد (نئی، ۱۹۷۸).

۴-۹-۴- شاخص اطلاعاتی شانون[1](I)

برخلاف هتروزیگوتی که برای هر تعداد آلل حد نهایی یک دارد، حداکثر مقدار I برابر با Ln(n) می-باشد. با وجود آنکه تفسیر بیولوژیکی این معیار مشخص نیست، ممکن است برای اندازه‌گیری تنوع جایگاه‌های بسیار متغیر مفید باشد (رجایی‌اربابی، ۱۳۸۴). هرچه شاخص شانون به صفر نزدیک شود، تنوع کم و هرچه یک آغازگر شاخص شانون بیشتری را نمایش دهد استفاده از این نشانگر برای آن نژاد (تعیین تنوع) مناسب‌تر است. تنوع را می‌توان به صورت زیر و تحت عنوان شاخص اطلاعاتی شانون نیز تعیین نمود.

(۴-۴)

$$I= - \sum_i p_i^{ln_{p_i}}$$

(۵-۴)

$$p_i = \frac{n_i}{N}$$

که در آن I شاخص شانون و P_i فراوانی نسبی i امین آلل در یک جایگاه معین n_i، تعداد آلل‌های دیده شده در جمعیت iام و N: تعداد کل آلل می‌باشد.

1-Shannon' s Information Index

فصل پنجم

نتایج و بحث

۵-۱-۱- خصوصیات صفات کمی ژنوتیپ توده‌های گردو

میانگین وزن میوه و وزن مغز به ترتیب ۱۰/۸ و ۴/۸۷ گرم بود. بیش‌ترین وزن میوه به میزان ۱۹/۷۹گرم در ژنوتیپ‌های Ka17 و Va31 و کم‌ترین وزن میوه به میزان ۶/۱۰ گرم در ژنوتیپ Va19 مشاهده گردید. بیش‌ترین وزن مغز ۹/۴۰ گرم در ژنوتیپ Va31 و کم‌ترین میزان وزن مغز ۲/۲۹ گرم در ژنوتیپ Ka12 مشاهده شد. میانگین درصد مغز گردوهای مورد پژوهش ۳۷/۱۳ درصد و بیش‌ترین میزان درصد مغز ۶۰/۳۴ درصد در ژنوتیپSID1 و کم‌ترین میزان درصد مغز ۲۰/۳۶ درصد در ژنوتیپ ROOD7 مشاهده شد (جدول ۵-۱). براساس اندازه‌گیری‌های انجام شده میانگین طول میوه، قطر میوه و ضخامت مغز به ترتیب ۳۵/۲۱، ۳۰/۲۵ و ۹/۰۹ بدست آمد. بیش‌ترین طول میوه در بین ژنوتیپ‌ها مربوط به ژنوتیپ ROOD13 با طول ۴۵/۷۲ میلی‌متر و کم‌ترین طول میوه مربوط به ژنوتیپ Va12 با طول ۲۰/۱۹ میلی‌متر بود. بیش‌ترین قطرمیوه مربوط به ژنوتیپ ROOD2 با عرض ۳۶/۸۰ میلی متر و کم‌ترین عرض میوه مربوط به ژنوتیپ Va19 با عرض ۲۳/۹۰ میلی‌متر بود. بیش-ترین ضخامت مغز مربوط به ژنوتیپ SID1 با ضخامت ۱۲/۸۱ میلی‌متر و کم‌ترین ضخامت مغز مربوط به ژنوتیپ Ka18 با ضخامت ۴/۸۳ میلی‌متر بود. روزنه میوه یکی از صفات مهم در نگهداری و انبارداری محصول گردو می‌باشد. کم‌ترین اندازه روزنه مربوط به ژنوتیپ Ka18 (۱/۹۴ میلی‌متر) و بیشترین روزنه مربوط به ژنوتیپ Va23 (۹۸/ ۴میلی‌متر) بود (جدول ۵-۱). گردوهای دارای روزنه باز ضمن آلودگی قارچ‌ها در زمان انبارداری مورد حمله حشرات قرار گرفته و در زمان کاشت دانه نیز درخزانه به علت ورود آب زیاد به درون دانه مورد خسارت قارچ‌ها و کپک‌زدگی قرار می‌گیرند. روزنه موجود درهنگام شکستن پوست سخت به آسانی دانه را به دو نیم تقسیم کرده یا مغزشان به سختی خارج می‌شود (Forde and McGranaham, 1993) . هرچه میزان ضخامت پوست در گردوها بیشتر

باشد روزنه انتهای میوه بسته‌تر است به طوری‌که روزنه موجود درگردوهای پوست کاغذی بزرگ‌تر از گردوهای پوست ضخیم می‌باشد (McGranahan and Leslie, 1990) .

در بین ۱۰۲ ژنوتیپ مورد بررسی، بالاترین وزن میوه ۱۹/۷۹ گرم مربوط به ژنوتیپ‌های Ka17 و Va31 که بیشتر از مقدار گزارش شده (۱۵/۲۵گرم) توسط ارزانی و همکاران (۲۰۰۸) می‌باشد. همچنین تزموریس[1] و همکاران (۲۰۰۱) بیش‌ترین مقدار را برای این صفت ۱۱/۰۹گرم گزارش کردند. اما وزن میوه کمتر از مقدار گزارش شده (۱۶/۲گرم) توسط رضایی و همکاران (۲۰۰۸) بود. بیش‌ترین میانگین وزن مغز نیز ۹/۴۰ گرم بود که بیشتر از مقدار گزارش شده توسط یاریلگاک[2] و همکاران (۲۰۰۱) و تزموریس و همکاران (۲۰۰۱) (به ترتیب ۷/۸۸ گرم ۶/۳۲ گرم) می‌باشد. اما بیش‌ترین درصد مغز (۶۰/۳۴درصد) بالاتر از مقدار گزارش شده (۵۹/۲۷ درصد) توسط یاریلگاک و همکاران (۲۰۰۱) بود.

جدول ۵-۱- متوسط،کم‌ترین،بیش‌ترین و انحراف معیار صفات کمی اندازه‌گیری شده ۱۰۲ ژنوتیپ گردوی مورد بررسی در منطقه آزادشهر.

شماره	صفات اندازه گیری شده	متوسط	کم‌ترین	بیش‌ترین	واریانس	انحراف معیار
۱	طول برگ	۳۸/۵۳	۱۳/۷	۵۶/۰۰	۴۱/۳۴	۶/۴۳
۲	طول بزرگ‌ترین برگ	۱۸/۰۳	۱۱	۲۹	۱۲/۴۷	۳/۵۳
۳	وزن پوسته	۵/۹۳	۳	۱۲	۲/۵۴	۱/۵۹
۴	طول میوه با پوست سبز	۱۳/۰۶	۹	۱۶	۱/۳۶	۱/۱۶
۵	عرض بزرگ‌ترین برگچه	۱۰/۱۳	۵/۵	۱۸	۴/۷۸	۲/۱۹
۶	ضخامت پوسته	۲/۰۶	۱/۱۷	۳/۸۳	۰/۲۴	۰/۴۹
۷	تعداد برگچه	۶/۷	۳	۹	۱/۹۸	۱/۴۱
۸	درصد مغز	۳۷/۱۳	۲۰/۳۶	۶۰/۳۴	۶۰/۱۹	۷/۷۵
۹	طول میوه	۳۵/۲۱	۲۰/۱۹	۴۵/۷۲	۱۲/۳۵	۳/۵۱
۱۰	قطر میوه	۳۰/۲۵	۲۳/۹	۳۶/۸	۸/۳۹	۲/۸۹
۱۱	ضخامت مغز	۹/۰۹	۴/۸۳	۱۲/۸۱	۲/۴۹	۱/۵۸
۱۲	وزن مغز	۴/۸۷	۲/۲۹	۹/۴	۱/۴۰	۱/۱۸
۱۳	عملکرد	۵/۶۹	۳	۷	۱/۳۹	۱/۱۸

1 - Tsmouris
2- Yarilgac

۱۴	وزن میوه	۱۰/۸۲	۶/۱	۱۹/۷۹	۵/۱۴	۲/۲۷
۱۵	روزنه	۳/۱۱	۱/۹۴	۴/۹۸	۰/۳۸	۰/۶۲

۵-۱-۲-خصوصیات صفات کیفی ژنوتیپ‌های گردو

نتایج بررسی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه نشان داد که عادت رشد نیمه عمودی و گسترده بیشتر از عادت رشد عمودی است. به طوری که ۴۶/۰۸ درصد عادت رشد نیمه عمودی و ۴۵/۱۰ درصد عادت رشد گسترده داشتند و ۸/۸۲ درصد از ژنوتیپ‌ها عادت رشد عمودی داشتند. همچنین نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که ۶۸/۶۳ درصد ژنوتیپ‌ها دارای سال‌آوری شدید بودند. میزان واریانس و انحراف معیار صفات شکل میوه و جدا شدن پوست از میوه از مابقی صفات بالاتر بود که می‌تواند نشان‌دهنده تنوع بیشتر این صفات در ژنوتیپ‌های مورد بررسی باشد. رنگ مغز یکی از صفت‌های مهم در بازارپسندی بوده که مقدار میانگین بدست آمده در این صفت ۳ و انحراف معیار آن ۰/۹۴که نشان می‌دهد اکثر ژنوتیپ‌ها دارای رنگ کهربایی روشن بوده‌اند. رنگ مغز مورد نظر ایرانی‌ها رنگ مغز روشن می‌باشد ولی مردم آمریکا رنگ مغز کهربایی را بیشتر دوست دارند (McGranahan *et al.*, 1998). بررسی شاخص شکل گرد بودن میوه نشان داد که ۲۲/۴۵ درصد از ژنوتیپ‌ها دارای شکل میوه کروی و ۲۲/۵۵ درصد از ژنوتیپ‌ها شکل میوه ذوزنقه کشیده دارند. همچنین نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که ۴۲/۰۲ درصد از ژنوتیپ‌ها دارای بافت پوست متوسط هستند. ژنوتیپ‌های مورد مطالعه هیچ‌کدام دارای بافت پوست خیلی صاف نبودند. سهولت جدا شدن مغز از دانه در ژنوتیپ‌ها ۳۷/۲۵ درصد متوسط و ۲۶/۴۷ درصد خیلی آسان بود.

جدول ۵-۲- متوسط،کم‌ترین،بیش‌ترین و انحراف معیار برخی صفات کیفی ۱۰۲ ژنوتیپ مورد بررسی در منطقه آزادشهر.

شماره	صفات اندازه گیری شده	متوسط	کم‌ترین	بیش‌ترین	واریانس	انحراف معیار
۱	شکل میوه	۴/۹۴	۱	۹	۵/۹۲	۲/۴۳۳
۲	گوشتی بودن مغز	۶/۷	۵	۷	۰/۵۰۷	۰/۷۱۱
۳	طعم مغز	۱/۴۷	۱	۲	۰/۲۵۲	۰/۵۰۱
۴	شکل برگ	۲/۵	۱	۳	۰/۳۳	۰/۵۷۵
۵	رنگ برگ	۴/۹۴	۳	۹	۲/۴۹۲	۱/۵۷۸
۶	سال‌آوری	۶/۰۱	۳	۷	۲/۴۳	۱/۵۶
۷	بافت پوسته	۵/۰۵	۳	۹	۲/۸۸	۱/۶۹۹
۸	پر بودن مغز	۶/۷	۵	۷	۰/۵۰۷	۰/۷۱۱
۹	آسان جدا شدن مغز از میوه	۳/۹۱	۱	۹	۷/۵۲۷	۲/۷۴۳
۱۰	چروکیدگی مغز	۱/۳	۱	۷	۱	۱/۰۰۰
۱۱	عادت رشد	۲/۳۶	۱	۳	۰/۴۱۲	۰/۶۴۱
۱۲	نمونه جمع‌آوری شده	۲/۸۲	۲	۴	۰/۶۴۲	۰/۸۰۱
۱۳	رنگ مغز	۲/۱۶	۱	۴	۰/۸۹۳	۰/۹۴۴
۱۴	پر بودن مغز	۶/۷	۵	۷	۰/۵۰	۰/۷۱
۱۵	حساسیت به کرم سیب	۲/۷۷	۰.۰۰	۹	۷/۷۲	۲/۷۸

۵-۲- روابط بین صفات

نتایج همبستگی صفات کمی و کیفی مورد بررسی که بعضی از آن‌ها معنی‌دار هستند در جدول ۵-۳و ۵-۴ ارائه شده است. بعضی از صفات مانند وزن میوه با وزن مغز و وزن میوه با طول میوه با پوست سبز همبستگی بالایی داشتند. میزان همبستگی این صفات به حدی است که به ما اجازه می‌دهد تا از طریق اندازه‌گیری هرکدام به تغییرات صفت همبسته پی ببریم، بنابراین از این طریق می‌توان با صرف زمان و هزینه کمتر به طور غیر مستقیم اندازه‌گیری یک صفت انجام گیرد (Forde,1975). بین وزن میوه با قطر میوه، وزن مغز و وزن پوسته همبستگی بالا و مثبت وجود دارد. طول بزرگ‌ترین برگچه و عرض بزرگ‌ترین برگچه همبستگی متوسط و مثبتی با هم داشتند. همچنین همبستگی مثبت و معنی‌دار در سطح ٪۵ بین وزن مغز با قطر میوه، طول میوه، روزنه و وزن پوسته

وجود دارد. قطر میوه با مقدار روزنه همبستگی متوسط و مثبتی دارد. به‌علاوه همبستگی مثبت و معنی‌دار در سطح ٪۵ بین ضخامت مغز با قطر میوه، وزن مغز و میوه وجود دارد. بین قطر میوه و طول میوه همبستگی مثبت و معنی‌دار درسطح ٪۵ وجود داشت که با نتایج ارزانی و همکاران (۲۰۰۸) مطابقت دارد. بین سال‌آوری و رنگ مغز همبستگی متوسط و منفی وجود دارد. بین شکل میوه با آسان جدا شدن مغز از میوه و بافت پوست همبستگی وجود نداشت که با نتایج اسکندری و همکاران (۲۰۰۵) مطابقت دارد. همچنین بین وزن میوه با وزن مغز همبستگی بالا و معنی‌دار وجود داشت که با نتایج اسکندری و همکاران (۲۰۰۵) مطابقت دارد. میزان همبستگی بین بعضی از پارامترها مثبت ولی پایین بود که با توجه به جدول ۵-۳و ۵-۴ معنی‌دار نبودند. بین طول بزرگ‌ترین برگچه و عرض بزرگ‌ترین برگ‌چه با حساسیت به عوامل زنده (کرم سیب) همبستگی متوسط و مثبت وجود دارد. بین وزن میوه و وزن مغز همبستگی بالا و مثبت وجود دارد. بین وزن پوسته و وزن میوه همبستگی بسیار بالا و مثبتی وجود دارد. در این پژوهش بین وزن میوه و قطر میوه همبستگی بالا و مثبت مشاهده شد که این نتایج با نتایج شارما و شارما (۲۰۰۱) مطابقت دارد. بین سال‌آوری و رنگ مغز همبستگی متوسط و منفی وجود دارد. بین شکل دانه، آسان جدا شدن مغز از دانه و بافت پوست و آسان جدا شدن مغز از دانه همبستگی وجود ندارد که با نتایج اسکندری و همکاران (۲۰۰۵) مطابقت دارد.

جدول ۵-۳- ضرایب همبستگی صفات کمی در ۱۰۲ ژنوتیپ گردو شهرستان آزادشهر

علامت اختصاری*	Al	ALeL	ELW	NuL	Ndi	NL	Shs	Shthi	Inshw	KW	Y	LG	W	TH	BSS
Al	۱														
ALeL	۰/۵۷۰**	۱													
ELW	۰/۴۰۹**	۰/۷۴۷**	۱												
NuL	۰/۱۱۲	-۰/۳۵۱**	-۰/۴۴۱**	۱											
Ndi	۰/۳۴۰**	۰/۳۸۵**	۰/۴۲۸**	-۰/۱۴۳	۱										
NL	۰/۰۳۹	۰/۰۷۶	۰/۱۲۷	-۰/۱۴۷	۰/۳۵۹**	۱									
Shs	-۰/۰۴۲	۰/۲۵۵**	۰/۲۶۷**	-۰/۲۱۰*	۰/۳۲۸**	۰/۱۶۸	۱								
Shthi	-۰/۲۵۲*	-۰/۱۸۶	-۰/۰۷۴	۰/۰۱۸	-۰/۸۲	۰/۹۱	-۰/۰۷۱	۱							
Inshw	۰/۰۲۲	۰/۲۴۸*	۰/۲۷۳**	-۰/۲۰۵*	۰/۴۹۳**	۰/۳۴۱**	۰/۲۴۱*	۰/۲۹۲**	۱						
KW	۰/۱۷۷	۰/۲۳۲*	۰/۳۴۵**	-۰/۰۶۲	۰/۵۸۲**	./۲۹۳**	۰/۲۵۴**	-۰/۰۹۹	۰/۳۶۹**	۱					
Y	-۰/۲۷۱**	-۰/۱۶۸	-۰/۱۱۴	۰/۰۰۳	-۰/۰۸۳	۰/۳۱۹**	-۰/۰۸۶	۰/۱۹۲	۰/۱۵۲	-۰/۱۰۵	۱				
LG	۰/۰۹۰	۰/۳۲۸**	۰/۳۴۱**	-۰/۱۵۱	۰/۴۵۹**	۰/۳۲۱**	۰/۳۸۶**	-۰/۰۴۳	۰/۴۱۹**	۰/۴۶۴**	۰/۳۰۷**	۱			
W	۰/۱۰۴	۰/۲۷۷**	۰/۳۳۵**	-۰/۱۶۹	۰/۶۰۵**	۰/۳۸۸**	۰/۲۹۴**	۰/۱۸۴	۰/۸۵۹**	۰/۷۵۸**	۰/۵۸	۰/۵۴۱**	۱		
TH	۰/۱۰	-۰/۰۶۰	۰/۰۶۲	۰/۰۸۶	۰/۲۷۴**	۰/۰۶۹	۰/۰۹۲	-۰/۲۹۴**	-۰/۰۵۴	۰/۵۴۷**	-۰/۲۰۰*	۰/۱۱۰	۰/۲۳۸*	۱	
BSS	./۴۶۸**	./۴۲۵**	۰/۴۰۵**	۰/۰۴۳	۰/۲۸۲**	-۰./۱۹۶*	۰/۰۹۲	-۰/۲۴۴*	-۰/۱۰۱	۰/۱۳۹	-۰/۲۰۰*	۰/۱۴۹	۰/۰۰۶	۰/۰۶۵	۱

* و **: معنی‌دار به ترتیب در سطوح احتمال٪۵ و٪۱.ضرایب بدون علامت غیرمعنی‌دار هستند

*علامت اختصاری صفات در جدول ۴-۲ آورده شده است.

جدول ۵-۴- ضرایب همبستگی صفات کیفی در ۱۰۲ ژنوتیپ گردو شهرستان آزادشهر

علامت	LSh	LCO	Ab	NSh	Sht	kf	kpu	ECO	KSh	kco	Kfl	COS	GH
LSh	۱												
LCO	۰/۱۲۶	۱											
Ab	-۰/۲۵۰*	۰/۱۰۸	۱										
NSh	-۰/۱۰۶	-۰/۰۲۱	۰/۲۵۸**	۱									
Sht	-۰/۱۳۶	۰/۰۴۱	۰/۱۷۰	۰/۲۶۹**	۱								
kf	۰/۱۲۸	۰/۱۲۶	۰/۱۰۶	۰/۰۶۸	-۰/۰۲۶	۱							
kpu	۰/۱۲۸	۰/۱۲۶	۰/۱۰۶	۰/۰۶۸	-۰/۰۲۶	۱**	۱						
ECO	۰/۰۷۲	۰/۰۲۱	۰/۱۱۹	۰/۰۹۴	۰/۱۶۳	-۰/۱۲۶	-۰/۱۲۶	۱					
KSh	-۰/۰۸۲	-۰/۰۷۷	-۰/۱۳۳	-۰/۰۵۵	-۰/۰۰۷	-۰/۴۵۲**	-۰/۴۵۲**	-۰/۰۴۴	۱	.			
kco	۰/۲۰۶*	۰/۰۲۸	-۰/۴۸۴**	-۰/۱۸۲	-۰/۰۴۵	-۰/۱۸۸	-۰/۱۸۸	۰/۰۱۳	۰/۰۷۲	۱			
Kfl	-۰/۰۷۲	-۰/۲۰*	۰/۱۹۳	۰/۱۲۹	-۰/۰۸۶	۰/۰۰۳	۰/۰۰۳	-۰/۰۱۶	-۰/۰۹۱	-۰/۰۵۹	۱		
COS	-۰/۰۳۹	-۰/۱۹۱	-۰/۲۹۰**	-۰/۱۴۵	-۰/۰۶۸	-۰/۱۲۰	-۰/۱۲۰	۰/۰۵۳	۰/۱۱۲	۰/۱۵۱	۰/۱۲۱	۱	
GH	-۰/۰۸۹	۰/۰۶۵	۰/۰۸۸	۰/۱۳۳	۰/۰۶۱	-۰/۰۶۹	-۰/۰۶۹	۰/۰۱۰	۰/۱۳۹	-۰/۰۳۷	۰/۰۵۹	-۰/۰۲۹	۱

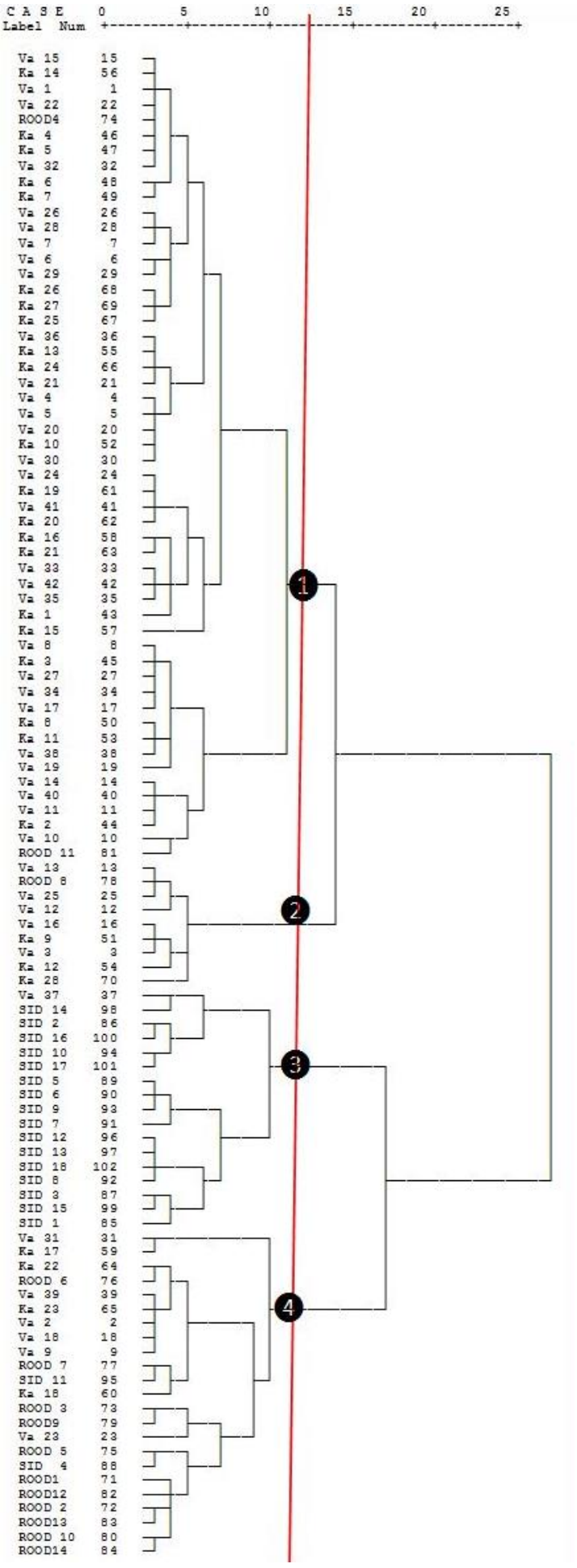
* و **: معنی‌دار به ترتیب در سطوح احتمال٪۵ و٪۱.ضرایب بدون علامت غیرمعنی‌دار هستند

*علامت اختصاری صفات در جدول ۴-۲ آورده شده است.

۵-۳- تجزیه کلاستر بر اساس صفات مرفولوژیکی

گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس صفات مختلف می‌تواند روشی موثر در مشخص شدن رابطه ژنوتیپ‌ها و تعیین فاصله خویشاوندی آن‌ها باشد. همان‌طور که در تجزیه کلاستر توده‌های ژنوتیپ‌های گردو مشاهده می‌شود، در فاصله ۱۲/۵ از ۲۵، توده‌های مورد مطالعه در چهار خوشه گروه‌بندی شدند. همان‌طور که در شکل ۵-۱ مشاهده می‌شود بیشتر ژنوتیپ‌ها در خوشه یک قرار گرفتند که به جز ژنوتیب ROOD4 و ROOD11 تمام آنها از مناطق کاشیدار و وامنان بودند. همان‌طور که در شکل ۴-۲ مشخص است این دو منطقه از نظر مسافت جغرافیایی نزدیک‌ترین توده‌ها به هم بوده‌اند و از لحاظ ارتفاع از سطح دریا نیز تفاوت چندانی با یکدیگر ندارند (جدول۴-۱). ژنوتیپ‌های گردو این مناطق بیشتر از باغ و کنار جاده نمونه‌گیری شده بودند. ژنوتیپ های این گروه به دو زیر بخش تقسیم شدند. با بررسی نتایج حاصل از صفات مشخص گردید که ژنوتیپ‌های گردو در زیر بخش اول خوشه ۱ با توجه به پرسش‌هایی که از کشاورزان محلی در مورد اپیدمی بودن آفت کرم سیب انجام شده بود، درختان این منطقه بیش‌ترین مقاومت به کرم سیب را داشتند و ژنوتیپ‌های موجود در زیر بخش ۲ خوشه ۱ در صفات شکل میوه و طعم میانگین بیشتر از میانگین کل ژنوتیپ‌ها و در صفت طول میوه، قطر میوه، عرض بزرگ‌ترین برگچه، طول بزرگ‌ترین برگچه، طول برگ و رنگ مغز میانگین کم‌تر از میانگین کل ژنوتیپ‌ها داشتند. ژنوتیپ های خوشه ۲ نیز همانند خوشه یک مربوط به مناطق وامنان و کاشیدار بودند (شکل۵-۱). درصد مغز این ژنوتیپ ها از حد متوسط کل ژنوتیپ ها کمتر بود. در خوشه سوم همه ژنوتیپ‌ها به جز Va27 مربوط به توده روستای سیدآباد بودند (شکل۵-۱). این ژنوتیپ‌ها در صفت طول برگ دارای بیش‌ترین میانگین (۴۴/۹۳ سانتی‌متر) بودند. روستای سیدآباد مسافت جغرافیایی بیشتری با روستاهای دیگر دارد (شکل ۴-۱) و از لحاظ ارتفاع از سطح دریا تفاوت قابل توجهی با سایر مناطق دارد (جدول ۴-۱). در خوشه ۴ بیشتر ژنوتیپ‌های منطقه رودبار به همراه تعدادی از ژنوتیپ های وامنان و کاشیدار و یک ژنوتیپ SID4 از منطقه سیدآباد قرار گرفتند

(شکل۵-۱). منطقه رودبار به لحاظ جغرافیای ما بین مناطق سیدآباد با وامنان و کاشیدار قرار دارد (شکل ۴-۱) و از لحاظ ارتفاع از سطح دریا مشابه مناطق وامنان و کاشیدار است (جدول ۴-۲). یک خوشه سه زیر بخش دارد که ژنوتیپ‌های زیر بخش یک برای صفت وزن میوه، وزن مغز، طول میوه، قطر میوه، درصد مغز و وزن پوسته میانگین بیش‌تر از میانگین کل ژنوتیپ‌ها را داشتند. ژنوتیپ‌های Ka17 و Va31 دارای بیش‌ترین وزن میوه بودند به‌تنهایی در این زیر بخش قرار گرفتند (شکل۵-۱). ژنوتیپ‌های موجود در زیر بخش دوم این خوشه در صفت عرض بزرگ‌ترین برگچه و طول بزرگ‌ترین برگچه بیش‌ترین میانگین از میانگین کل ژنوتیپ‌ها و در صفت درصد مغز، ضخامت مغز، آسان جدا شدن مغز از میوه و عادت رشد کم‌ترین میانگین از میانگین کل ژنوتیپ‌ها را به خود اختصاص دادند.



شکل۵-۱- دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر ۱۰۲ ژنوتیپ گردو بر اساس ۳۰ صفت مرفولوژیکی، جمع‌آوری شده از مناطق وامنان (*Va*)، کاشیدار (*Ka*)، رودبار (*Rood*) و سیدآباد (*SID*) شهرستان

جدول ۵-۵- میانگین صفات و انحراف معیار صفات کمی در کلاسترهای مختلف توده‌های گردوهای شهرستان آزادشهر

خوشه ها	توده های هر کلاستر	طول برگ	طول بزرگ‌ترین برگ	عرض بزرگ‌ترین برگچه	تعداد برگچه	قطر میوه	طول میوه	روزنه	ضخامت پوسته	وزن پوسته	وزن مغز	طول میوه با پوست سبز	وزن میوه	ضخامت مغز	عملکرد
۱	Va 1,Va 4,Va 5,Va 6,Va 7,Va 14,Va 20,Va 21,Va 22,Va 24,Va 26,Va 28,Va 29,Va 30,Va 32,Va 33,Va 35,Va 36,Va 41,Va 42,Ka 1,Ka 4,Ka 5,Ka 6,Ka 7,Ka 10,Ka 13,Ka 15,Ka 16,Ka 19,Ka 20,Ka 21,Ka 24,Ka 25,Ka 26,Ka 27,ROOD 4	۳۶/۷۵	۱۷/۵	۹/۷۰	۶/۵۱	۲۹/۷۵	۳۶/۴۲	۲/۹۸	۲/۱۷	۶/۰۸	۵/۰۳	۱۳/۰۳	۱۱/۱۴	۹/۶۱	۶/۰۵
		۳/۷۱	۲/۲۷	۱/۳۳	۱/۱۹	۲/۲۴	۱/۱۹	۰/۴۰	۰/۵۳	۱/۱۶	۰/۸۰	۰/۸۴	۱/۶۶	۱/۲۳	۱/۰۱
		(۳۸/۵۳)	(۱۸/۰۳)	(۱۰/۱۳)	(۶/۷۰)	(۳۰/۲۵)	(۳۵/۲۱)	(۳/۱۱)	(۲/۰۶)	(۵/۹۳)	(۴/۸۷)	(۱۳/۰۷)	(۱۰/۸۲)	(۹/۰۹)	(۵/۶۹)
۲	ROOD 11,Va 8,Va 10,Va 11,Va 14,Va 17,Va 19,Va27,Va 34,Va 38,Va 40,Ka 2,Ka 3,Ka 8,Ka 11	۳۲/۵۶	۱۴/۰۸	۷/۸۱	۷/۰۶۶	۲۷/۶۵	۳۱/۱۲	۳/۰۵	۲/۱۱	۴/۵۵	۳/۷۶	۱۱/۸۹	۸/۵۲	۸/۲۹	۵/۸۹
		۴/۷۹	۲/۴۰	۱/۱۸	۱/۳۹	۱/۷۵	۲/۹۵	۰/۵۳	۰/۲۷	۰/۹۷	۰/۵۴	۰/۵۵	۱/۳۱	۱/۲۴	۰/۷۲
		(۳۸/۵۳)	(۱۸/۰۳)	(۱۰/۱۳)	(۶.۷۰)	(۳۰/۲۵)	(۳۵/۲۱)	(۳/۱۱)	(۲/۰۶)	(۵/۹۳)	(۴/۸۷)	(۱۳/۰۷)	(۱۰/۸۲)	(۹/۰۹)	(۵/۶۹)
۳	Va 3,Va 12,Va 13,Va 16,Va 25,Ka 9,Ka 12,Ka28 ROOD 8	۳۶/۴۱	۱۶/۶۶	۸/۹۶	۷	۲۸/۹۹	۳۴/۴۸	۲/۸۹	۲/۳۸	۵/۷۶	۳/۸۹	۱۲/۳۳	۹/۶۶	۷/۴۹	۶/۱۱
		۳/۶۱	۲/۶۹	۱/۴۲	۱	۳/۷۰	۶/۲۱	۰/۵۹	۰/۶۰	۱/۰۲	۱/۱۷	۰/۷۶	۰/۸۴	۰/۹۴	۱/۰۵
		(۳۸/۵۳)	(۱۸/۰۳)	(۱۰/۱۳)	(۶/۷۰)	(۳۰/۲۵)	(۳۵/۲۱)	(۳/۱۱)	(۲/۰۶)	(۵/۹۳)	(۴/۸۷)	(۱۳/۰۷)	(۱۰/۸۲)	(۹/۰۹)	(۵/۶۹)
۴	Va 37,SID 2,SID 10,SID 14,SID 16,SID 17	۴۴/۱۱	۲۰/۸	۱۱/۰۶	۷/۶۶	۳۱/۵۸	۳۲/۰۶	۲/۸۳	۱/۸۳	۴/۹۴	۴/۶	۱۱/۸۳	۹/۵۹	۹/۸۸	۴
		۴/۳۴	۳/۳۸	۲/۲۶	۱/۲۶	۱/۴۶	۳/۰۹	۰/۶۵	۰/۴۹	۲/۱۸	۱/۲۷	۰/۸۱	۲/۱۳	۱/۴۲	۰/۹۳
		(۳۸/۵۳)	(۱۸/۰۳)	(۱۰/۱۳)	(۶/۷۰)	(۳۰/۲۵)	(۳۵/۲۱)	(۳/۱۱)	(۲/۰۶)	(۵/۹۳)	(۴/۸۷)	(۱۳/۰۷)	(۱۰/۸۲)	(۹/۰۹)	(۵/۶۹)
۵	SID 1,SID 3,SID 5,SID 6,SID 7,SID 8,SID 9,SID 12,SID 13,SID 15,SID 18	۴۴/۹۳	۱۹/۶۲	۱۱.۰۰	۷	۳۲/۷۶	۳۴/۲۹	۳/۱۲	۱/۸۴	۵/۵۲	۵/۷۲	۱۲/۹۷	۱۱/۳۰	۹/۸۳	۴/۴۵
		۴/۳۴	۳/۳۸	۲/۳۶	۱/۲۶	۱/۴۶	۳/۰۹	۰/۶۵	۰/۴۹	۲/۱۸	۱/۲۷	۰/۸۱	۲/۱۳	۱/۴۲	
		(۳۸/۵۳)	(۱۸/۰۳)	(۱۰/۱۳)	(۶/۷۰)	(۳۰/۲۵)	(۳۵/۲۱)	(۳/۱۱)	(۲/۰۶)	(۵/۹۳)	(۴/۸۷)	(۱۳.۰۷)	(۱۰/۸۲)	(۹/۰۹)	(۵/۶۹)
۶	Va 31,Ka 17	۳۶/۷۵	۱۶/۷۵	۱۰	۶	۱۳/۳۶	۴۱/۲۲	۳/۹۷	۲/۶۳	۱۱/۲۵	۸/۵۳	۱۵/۱۳	۱۹/۷۹	۹/۵۱	۶
		۱/۰۶	۳/۱۸	۰/۷۰	۱/۴۱	۰	۰	۰	.	۱/۲۲	۱.۲۲	۰/۶۰۸	۰	۱/۲۳	۱/۴۱
		(۳۸/۵۳)	(۱۸/۰۳)	(۱۰/۱۳)	(۶/۷۰)	(۳۰/۲۵)	(۳۵/۲۱)	(۳/۱۱)	(۲/۰۶)	(۵/۹۳)	(۴/۸۷)	(۱۳/۰۷)	(۱۰/۸۲)	(۹/۰۹)	(۵/۶۹)
۷	Va 9,Va 2,Va 18,Va 39,Ka 18,Ka 22,Ka 23,SID 11,ROOD 6,ROOD 7	۳۹/۷۳	۲۱/۱	۱۱/۴۵	۵/۴	۳۱/۰۴	۳۴/۱۷	۳/۱۲	۲/۰۴	۶/۹۴	۴/۱۹	۱۳/۶۶	۱۱/۱۳	۷/۳۱	۵/۸
		۴.۵۱	۱.۸۹۷	۱.۲۷	۰/۸۴	۱.۴۹	۲.۳۳	۰/۸۰	۰/۲۲	۱.۱۸	۰/۸۲	۰/۵۶	۱.۲۲	۱/۲۸	۱/۰۳
		(۳۸/۵۳)	(۱۸/۰۳)	(۱۰/۱۳)	(۶/۷۰)	(۳۰/۲۵)	(۳۵/۲۱)	(۳/۱۱))	(۲/۰۶)	(۵/۹۳)	(۴/۸۷)	(۱۳/۰۷)	(۱۰/۸۲)	(۹/۰۹)	(۵/۶۹)
۸	Va 23,ROOD 1,ROOD 2,ROOD 3,ROOD 5,ROOD 9,ROOD 10,ROOD 12,ROOD 13,ROOD 14,SID 4	۴۲/۵۶	۲۱/۸۱	۱۲/۷۶	۴/۶	۳۲/۵	۳۷/۴۷	۳/۸۳	۱/۶۷	۶/۴۳	۵/۵۷	۱۴/۶۷	۱۱/۸۸	۹/۷۴	۶/۲۷
		۱/۱۵	۳/۶۸	۲/۹۴	۲/۰۱	۱/۹۴	۳/۶۲	۰/۸۱	۰/۳۲	۱/۰۸	۰/۹۹	۱/۰۲	۱/۵۸	۲/۰۳	۱
		(۳۸/۵۳)	(۱۸/۰۳)	(۱۰/۱۳)	(۶/۷۰)	(۳۰/۲۵)	(۳۵/۲۱)	(۳/۱۱)	(۲/۰۶)	(۵/۹۳)	(۴/۸۷)	(۱۳/۰۷)	(۱۰/۸۲)	(۹/۰۹)	(۵/۶۹)

اعداد داخل هر پرانتز نمایانگر میانگین کل هر صفت برای تمام توده‌ها می‌باشد

۵-۴- معرفی ژنوتیپ‌های برتر

از ۱۰۲ ژنوتیپی که مورد پژوهش قرار گرفت پس از اندازه‌گیری صفت‌های مورد مطالعه و تجزیه و تحلیل آن‌ها ژنوتیپ‌هایی که نسبت به دیگر ژنونیپ‌ها در صفت‌های باغی برتری داشتند به عنوان ژنوتیپ‌های برتر انتخاب شدند در میان ژنوتیپ‌های مورد بررسی ژنوتیپ Ka17 وVa31 با داشتن وزن بالای میوه، ژنوتیپ Va31 با داشتن بالاترین وزن مغز، ژنوتیپ SID1 با بالاترین درصد مغز به لحاظ ارزش پومولوژیکی ژنوتیپ‌های برتری بودند که ویژگی‌های آن‌ها در جدول ۵-۶ آورده شده است.

۵-۵- نتایج ژنتیک

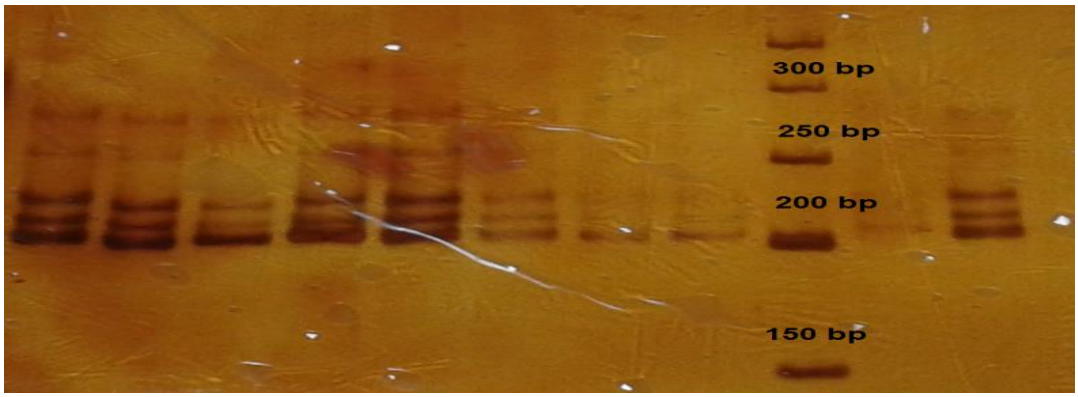
از ۱۰۲ ژنوتیپ مورد بررسی ۳۹ ژنوتیپ که از لحاظ صفات میوه (درصد مغز، وزن میوه، ضخامت پوسته و ...) برتر بودند برای بررسی انتخاب شدند.

جدول ۵-۶- برخی از خصوصیات پومولوژیکی چند ژنوتیپ برتر

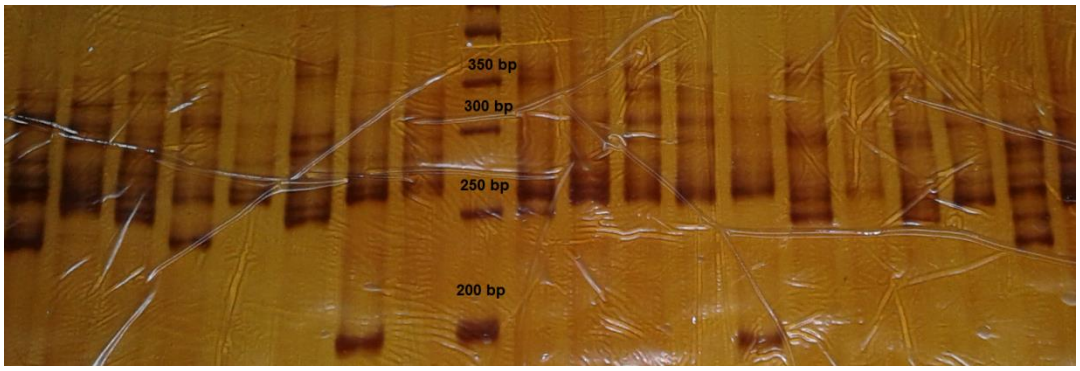
ژنوتیپ (کد)	درصد مغز	وزن میوه (گرم)	وزن مغز (گرم)	ضخامت مغز (میلی متر)	ضخامت پوسته (میلی متر)	رنگ مغز	آسان جدا شدن مغز از میوه	روزنه‌انتهای میوه (میلی متر)	وزن پوسته (گرم)
Ka 17	٪۳۸/۷۵	۱۹/۷۹	۷/۶۷	۱۰/۳۹	۲/۶۳	روشن	خیلی مشکل	۳/۹۷	۱۲/۱۲
Va 31	٪۴۷/۴۹	۱۹/۷۹	۹/۴	۸/۶۴	۲/۶۳	روشن	خیلی مشکل	۳/۹۷	۱۰/۳۹
SID 1	٪۶۰/۳۴	۱۱/۵۵	۸/۷۵	۱۲/۸۱	۱/۷۱	کهربایی	خیلی آسان	۲/۹۵	۲/۸
ROOD 13	٪۵۰	۱۵/۲۴	۷/۶۲	۹/۸۸	۱/۹۳	روشن	خیلی آسان	۳/۸۸	۷/۶۴
Va34	٪۲۹/۲۲۰	۸/۶۵	۴/۲۸	۸/۸۶	۱/۸۵	روشن	خیلی آسان	۲/۶۶	۴/۲۸
ROOD4	٪۳۵/۵۱	۹/۶۳	۴/۰۶	۸/۰۶	۱/۹۸	کهربایی روشن	خیلی آسان	۲/۹۸	۵/۶

شکل ۵-۱– نمونه‌های *DNA* استخراج شده

برای بررسی تنوع ژنتیکی ۳۹ ژنوتیپ از چهار توده گردو از ۱۰ مکان ژنی ریزماهواره استفاده شد. پس از آلل‌خوانی و تفسیر الگوی باندی، نتایج در هر جایگاه بدست آمد (شکل ۵-۲ و۵-۳). تعداد ، نوع دامنه و اندازه آلل‌های حاصل از آغازگرهای مورد مطالعه در جدول ۵-۱ آورده شده است.



شکل۵-۲ باندهای تکثیر شده حاصل از نشانگر *WGA071*



شکل۵-۳ باندهای تکثیر شده حاصل از نشانگر *WGA202*

جدول۵-۱- تجزیه و تحلیل جایگاه‌های ریزماهواره مورد مطالعه در ۱۰ نشانگر در ژنوتیپ‌های گردوی منطقه آزادشهر

نام آغازگر	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد)	تعداد آلل	دامنه آللی (جفت‌باز)	هتروزیگوتی مشاهده شده	هموزیگوتی مشاهده شده

WGA001	۵۶	۵	۱۸۰-۲۰۰	۰/۵۲۶	۰/۴۷۳
WGA005	۴۸	۳	۲۳۶-۲۵۲	۰/۷۱۰	۰/۲۸۹
WGA009	۵۲	۸	۲۳۴-۲۶۷	۰/۵۵۵	۰/۴۴۴
WGA032	۵۲	۹	۱۶۵-۱۹۱	۰/۶۱۷	۰/۳۸۲
WGA054	۴۶	۱۱	۱۰۴-۱۴۴	۰/۷۴۲	۰/۲۵۷
WGA069	۵۰	۷	۱۶۲-۱۸۲	۰/۵۱۲	۰/۴۸۷
WGA071	۵۰	۸	۱۶۶-۲۲۲	۰/۸۲۰	۰/۱۷۹
WGA089	۵۶	۶	۲۱۴-۲۴۰	۰/۵۶۴	۰/۴۳۵
WGA202	۵۰	۸	۲۳۸-۲۶۵	۰/۵۳۸	۰/۴۶۱
WGA276	۵۴	۹	۱۶۹ -۱۹۳	۰/۹۳۵	۰/۰۶۴

۵-۷- تجزیه و تحلیل آماری

۵-۷-۱-چندشکلی

مطابق با تعریفی که برای چندشکلی یک جایگاه ارائه شد، تمامی جایگاه‌های مورد بررسی چندشکل بودند. چراکه فراوانی شایع‌ترین آلل در آن‌ها کمتر از ۰/۹۹ بود (ولی‌زاده و مقدم، ۱۳۸۶) و در کل ژنوتیپ‌ها برای مجموع جایگاه‌ها ۷۴ آلل با دامنه آللی ۱۰۴ تا ۲۶۷ جفت‌باز مشاهده شد. اندازه و فراوانی آللی جایگاه‌های مورد مطالعه در جدول ۵-۲ و ۵-۳ آورده شده است.

معیار دیگری که برای تعیین میزان چندشکلی جایگاه‌ها استفاده می‌شود، تعداد آلل واقعی و تعداد آلل مؤثر می‌باشد جدول ۵-۳ این معیار را همراه شاخص اطلاعاتی شانون برای جایگاه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد.

جدول ۵-۲- فراوانی آلل‌ها در مکان‌های ژنی ریزماهواره مورد بررسی

نام آغازگر	WG A001	WG A005	WG A009	WG A032	WG A054	WG A069	WG A071	WG A089	WG A202	WG A276
آلل										
Allele A	۰/۲۳۶	۰/۶۴۴	۰/۰۲۷	۰/۱۱۷	۰/۱۴۲	۰/۰۲۵	۰/۲۱۷	۰/۴۶۱	۰/۰۷۶	۰/۰۴۸
Allele B	۰/۲۳۶	۰/۰۹۲	۰/۰۴۱	۰/۱۶۱	۰/۱۴۲	۰/۱۶۶	۰/۱۰۲	۰/۰۶۴	۰/۰۵۱	۰/۰۳۲
Allele C	۰/۴۶۰	۰/۲۶۳	۰/۱۸۰	۰/۱۹۱	۰/۰۸۵	۰/۴۲۳	۰/۱۲۸	۰/۰۸۹	۰/۰۵۱	۰/۰۱۶
Allele D	۰/۰۳۹		۰/۰۶۹	۰/۱۷۶	۰/۰۸۵	۰/۱۷۹	۰/۰۸۹	۰/۲۴۳	۰/۰۷۶	۰/۴۱۹
Allele E	۰/۰۲۶		۰/۱۱۱	۰/۰۲۹	۰/۰۵۷	۰/۰۸۹	۰/۰۸۹	۰/۰۵۱	۰/۰۲۵	۰/۰۱۶
Allele F			۰/۰۵۵	۰/۰۵۸	۰/۰۸۵	۰/۰۲۵	۰/۲۹۴	۰/۰۸۹	۰/۵۳۸	۰/۰۸۰
Allele G			۰/۱۳۸	۰/۰۸۸	۰/۱۷۱	۰/۰۸۹	۰/۰۱۲		۰/۰۲۵	۰/۱۶۱
Allele H			۰/۳۷۵	۰/۰۴۴	۰/۱۰۰		۰/۰۶۴		۰/۱۵۳	۰/۱۷۷
Allele I				۰/۱۳۲	۰/۰۵۷					۰/۰۴۸
Allele J					۰/۰۴۲					
Allele K					۰/۰۲۸					

جدول ۵-۳- شاخص‌های ژنتیکی مورد بررسی در مکان‌های ژنی ریزماهواره

آغازگر	تعداد آلل‌های مشاهده شده	تعداد آلل‌های مؤثر	شاخص شانون
WGA001	۵	۳/۰۶۲	۱/۲۶۲
WGA005	۳	۲/۰۲۶	۰/۸۵۴
WGA009	۸	۴/۶۴۵	۱/۷۷۲
WGA032	۹	۷/۱۸۰	۲/۰۵۸
WGA054	۱۱	۸/۹۷۴	۲/۲۸۴
WGA069	۷	۳/۹۰۰	۱/۵۹۱
WGA071	۸	۵/۵۰۰	۱/۸۵۳
WGA089	۶	۳/۳۸۷	۱/۴۶۲
WGA202	۸	۳/۰۱۱	۱/۵۰۸
WGA276	۹	۴/۰۶۳	۱/۷۰۵
میانگین	۷/۴	۴/۵۷۳	۱/۶۳۵

۵-۷-۲- تنوع ژنتیکی

تنوع درون توده‌ای با معیارهایی همچون هتروزیگوتی مشاهده شده، هتروزیگوتی مورد انتظار، مورد بررسی قرار گرفت. تعیین این مقادیر برای هر جایگاه در جمعیت با استفاده از نرم‌افزار PopGene انجام پذیرفت که نتایج آن در جدول ۵-۴ آورده شده است.

دامنه هتروزیگوتی مشاهده شده بین ۰/۵۱۲ تا ۰/۹۳۵ بود که بیش‌ترین مقدار در جایگاه WGA276 و کم‌ترین آن در جایگاه WGA069 مشاهده شد.

جدول ۵-۴- مقادیر هتروزیگوتی جایگاه‌های ریزماهواره

نشانگر	هموزیگوتی مشاهده شده	هتروزیگوتی مشاهده شده	هموزیگوتی مورد انتظار	هتروزیگوتی مورد انتظار
WGA001	۰/۴۷۳	۰/۵۲۶	۰/۳۱۷	۰/۶۸۲
WGA005	۰/۲۸۹	۰/۷۱۰	۰/۴۸۶	۰/۵۱۳
WGA009	۰/۴۴۴	۰/۵۵۵	۰/۲۰۴	۰/۷۹۵
WGA032	۰/۳۸۲	۰/۶۱۷	۰/۱۲۶	۰/۸۷۳
WGA054	۰/۲۵۷	۰/۷۴۲	۰/۰۹۸	۰/۱۲۶
WGA069	۰/۴۸۷	۰/۵۱۲	۰/۲۴۶	۰/۷۵۳
WGA071	۰/۱۷۹	۰/۸۲۰	۰/۱۷۱	۰/۸۲۸
WGA089	۰/۴۳۵	۰/۵۶۴	۰/۲۸۶	۰/۷۱۴
WGA202	۰/۴۶۱	۰/۵۳۸	۰/۳۲۳	۰/۶۷۶
WGA276	۰/۶۴۰	۰/۹۳۵	۰/۲۳۳	۰/۷۶۶
میانگین	۰/۳۴۷	۰/۶۵۲	۰/۲۹۹	۰/۶۷۳
انحراف معیار	۰/۴۴۴	۰/۱۴۴	۰/۱۱۲	۰/۱۱۲

۵-۷-۳- تنوع ژنتیکی درون توده‌ای

توده‌های مورد بررسی از نظر تعداد آلل‌های مشاهده شده و تعداد آلل‌های موثر اختلاف قابل توجهی را نشان ندادند. دامنه آلل‌های مشاهده شده در هر توده برای کلیه مکان‌های ژنی ۴ تا ۵/۹ با میانگین ۴/۹۲۵ بود. که بیش‌ترین آن در توده وامنان و کم‌ترین آن در توده رودبار مشاهده شد. دامنه آلل‌های موثر در هر توده از ۳/۲۴۵ تا ۴/۰۶ با میانگین ۳/۵۱۲ بود. که بیش‌ترین آن در توده وامنان و کم‌ترین آن در توده سیدآباد مشاهده شد. میانگین هموزیگوتی مشاهده شده ۰/۳۳۹ و دامنه آن

از۰/۲۵۳تا ۰/۴۵۸ در بین توده‌های مورد بررسی که بیش‌ترین آن در توده وامنان و کم‌ترین آن در توده رودبار مشاهده شد. میزان شاخص شانون، که نشان دهنده تنوع درون جمعیتی است، در توده-های گردو مورد بررسی به جزء وامنان تقریباً با هم یکسان بودند (جدول۵-۵).

جدول ۵-۵- میزان هموزیگوتی، هتروزیگوتی، تعداد آلل مشاهده شده و مؤثر و شاخص شانون توده‌های ژنوتیپ گردو-های منطقه آزادشهر بر اساس ۱۰ مکان ژنی

توده	تعداد نمونه	هموزیگوتی مشاهده شده	هتروزیگوتی مشاهده شده	تعداد آلل‌های مشاهده شده	تعداد آلل‌های مؤثر	شاخص شانون
سیدآباد	۱۱	۰/۴۵۸	۰/۵۴۲	۴/۷	۳/۲۴	۱/۲۴
رودبار	۵	۰/۲۵۳	۰/۷۴۶	۴	۳/۳۶	۱/۲۰
کاشیدار	۱۱	۰/۳۵۵	۰/۶۴۴	۵/۱	۳/۳۸	۱/۲۸
وامنان	۱۲	۰/۲۹۱	۰/۷۰۸	۵/۹	۴/۰۶	۱/۵۰
میانگین	--	۰/۳۳۹	۰/۶۶۰	۴/۹۲	۳/۵۱	۱/۳۱

۵-۷-۴- فواصل ژنتیکی بین جمعیت‌ها

نتایج بدست آمده در مطالعه تنوع ژنتیکی درون توده‌ای و فاصله ژنتیکی، در حقیقت ابزارهایی برای ارائه تصویری از تنوع ژنتیکی می‌باشند. درنتیجه تنوع ژنتیکی عدد مطلقی نیست و نتایج مختلف از تنوع با معیارهای متفاوت می‌تواند در مجموع تصویری نسبتاً دقیق و قابل اعتماد از آن را بیان کند.

دامنه فواصل ژنتیکی از ۰/۲۱تا ۰/۵۱ برای توده‌ها متغیر بود. کم‌ترین فاصله ژنتیکی بین توده‌های وامنان و کاشیدار (۰/۲۱۶) مشاهده شد. بیش‌ترین فاصله ژنتیکی بین توده‌های کاشیدار و سیدآباد (۰/۵۱) مشاهده شد (جدول۵-۶).

جدول۵-۶- فواصل بین توده‌های گردو شهرستان آزادشهر براساس ضریب تشابه نی(۱۹۷۸)

توده	سیدآباد	رودبار	وامنان	کاشیدار
سیدآباد	*****			
رودبار	۰/۵۰۷۱	*****		
وامنان	۰/۳۵۰۴	۰/۲۱۸۵	*****	
کاشیدار	۰/۵۱۰۹	۰/۲۳۴۷	۰/۲۱۴۶	*****

در این پژوهش ثابت کردیم که نشانگرهای SSR توسعه یافته در گردوی سیاه (*Juglans regia* L) می‌تواند برای شناسایی تنوع و همبستگی ژنتیکی موجود در توده‌های گردوی ایرانی مؤثر واقع شود. از ده مکان ژنی تکثیر شده برای بررسی تنوع ژنتیکی در ۳۹ ژنوتیپ از چهار توده گردوی ایرانی در شهرستان آزادشهر استفاده شد که در مجموع توانستند ۷۴ آلل پلی مورفیسم با دامنه ۱۱-۳ آلل(اندازه‌ای ۱۰۴ تا ۲۶۷ جفت‌باز) در هر مکان ژنی را شناسایی کنند. کم‌ترین تعداد آلل مشاهده شده مربوط به مکان ژنی WGA005 (۳ آلل) و بیش‌ترین تعداد آلل مشاهده شده مربوط به مکان ژنی WGA054 (۱۱ آلل) بود.

دامنه اندازه آللی حاصل از این پژوهش در نشانگرهای WGA001 (۲۰۰-۱۸۰)، WGA009 (۲۶۷-۲۳۴) و WGA071 (۲۲۲-۱۶۶) با مطالعه احتشام‌نیا و همکاران (۱۳۸۸) در بررسی تنوع ژنتیکی برخی توده‌های گردوی بومی استان گلستان با همین نشانگرها در یک محدوه اندازه آللی مطابقت داشت. همچنین دامنه اندازه آللی در نشانگرهای WGA069 (۲۲۱-۱۶۲) و WGA276 (۱۹۳-۱۶۹) با مطالعه فورونی[1] و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی گردوی ایرانی رقم سورنتو با همین نشانگرها در یک محدوده اندازه آللی مطابقت داشت. پس از مقایسه تعداد و دامنه اندازه آلل‌های WGA069 مشخص شد که اندازه‌های آللی ۲۰۲، ۲۰۹ ، ۲۱۳، ۲۱۹ و ۲۲۱ اندازه‌های آللی جدیدی برای این جایگاه بوده و اولین گزارش برای این جایگاه در گردوی ایرانی می‌باشند. دامنه

1- Foroni

اندازه آللی در نشانگرهای WGA032 (۱۹۱-۱۶۵) و WGA202 (۲۶۵-۱۹۷) با مطالعه ابراهیمی و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی گردوی ایرانی برای این جایگاه ۸ آلل با دامنه اندازه آللی ۲۷۵- ۲۳۸جفت‌باز گزارش نمودند که دامنه آللی حاصل در این پژوهش نیز در این محدوده قرار دارد. پس از مقایسه تعداد و دامنه اندازه آلل‌های WGA202 مشخص شد که اندازه‌های آللی۱۹۷ و ۲۳۵ اندازه‌ی آللی جدیدی برای این جایگاه بوده و اولین گزارش برای این جایگاه می‌باشد. دامنه اندازه آللی WGA005 بین ۲۵۲-۲۳۶ جفت‌باز بدست آمد. ابراهیمی و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی گردوی ایرانی رقم سورنتو برای این جایگاه ۷ آلل با دامنه اندازه آللی ۲۶۶-۲۴۰جفت‌باز گزارش نمودند. دامنه آللی حاصل در این پژوهش نیز در این محدوده می‌باشد. دامنه اندازه آللی WGA054 بین ۱۴۴-۱۰۴ جفت‌باز بدست آمد. وسته[1] وهمکاران (۲۰۰۲) در مطالعه ۳۰ نشانگر هسته‌ای ریزماهواره‌ای را در گردوی سیاه برای این جایگاه ۱۲ آلل در متوسط اندازه آللی ۲۱۸ جفت‌باز گزارش نمودند. اندازه‌های آللی بدست آمده در این پژوهش اندازه آللی جدیدی برای این جایگاه بوده و اولین گزارش برای این جایگاه می‌باشد. دامنه اندازه آللی WGA089 بین ۲۴۳-۲۱۴جفت‌باز بود. وانگ[2] و همکاران (۲۰۰۸) در بررسی تنوع ژنتیکی گردوهای مرکز و جنوب‌غربی چین برای این جایگاه ۹ آلل با دامنه ۲۴۰-۲۱۴ جفت‌باز گزارش نمودند که دامنه آللی حاصل در این پژوهش نیز در این محدوده قرار دارد. پس از مقایسه تعداد و دامنه اندازه آلل‌های حاصل مشخص شد که اندازه‌ی آللی ۲۴۳ اندازه‌ی آللی جدیدی برای این جایگاه بوده و اولین گزارش برای این جایگاه می‌باشد.

دانگل[3] و همکاران (۲۰۰۵) از ۱۴ نشانگر SSR برای شناسایی ۴۷ ژنوتیپ گردوی ایرانی و یک پایه هیبرید استفاده کردند و به ازای هر مکان ژنی ۸-۳ آلل را شناسایی کردند. فورونی[4] و

1- Woeste
2 - Wang
3 - Dangl
4 -Foroni

همکاران (۲۰۰۶) با استفاده از ۹ نشانگر SSR توانستند ۸-۴ آلل به ازای هر مکان ژنی را در ارقام گردوی اروپایی شناسایی کنند. همچنین در مطالعه‌ای دیگر فورونی و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از ۱۲ نشانگر SSR توانستند ۸-۳ آلل به ازای هر مکان ژنی را در ژنوتیپ‌های گردوهای کاپانیای ایتالیا شناسایی کنند. کریمی و همکاران (۱۳۸۸) با استفاده از ۱۱ نشانگر SSR توانستند ۹-۲ آلل به ازای هر مکان ژنی در ژنوتیپ‌های گردوی ایرانی در استان همدان شناسایی کنند. بیشتر بودن تعداد آلل-های مشاهده شده در هر مکان ژنی در این پژوهش می‌تواند به دلیل تنوع بالاتر توده‌ها و ژنوتیپ‌های گردوی موجود در این منطقه باشد که این خود می‌تواند ناشی از طبیعی بودن توده‌های مورد پژوهش و وجود والدهای متنوع در این توده‌ها باشد که طی سالیان متمادی منجر به ایجاد تلاقی‌های تصادفی و ایجاد تنوع شده است. در مطالعه‌ای که احتشام‌نیا و همکاران (۱۳۸۸) با استفاده از ۱۱ نشانگر SSR ۷۷ آلل در مجموع ۵ توده بومی گردوهای استان گلستان شناسایی شد که این مطالعه نیز بالا بودن تنوع ژنتیکی را در استان گلستان اثبات کردند.

۵-۷-۵- ضریب عدم تشابه و واریانس ژنتیکی بین جمعیت‌ها

عدم ضریب تشابه دایس در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی با میانگین ۰/۶۴۲ در محدوده بین ۰/۲ تا ۰/۹۵ قرار گرفت. ژنوتیپ‌های ka11 با Va21 دارای کم‌ترین عدم تشابه (۰/۲) بودند. بیش‌ترین ضریب عدم تشابه ژنتیکی (۰/۹۵) بین ژنوتیپ‌های Sid13 با Va4، Sid2 با Va9، Sid1 با Va4 و Sid6 با Va9 مشاهده شد(جدول۵-۷).

جدول ۵-۷- مقادیر ماتریس عدم تشابه دایس بین ۳۹ نمونه ژنوتیپ‌های گردو حاصل از داده‌های *SSR*

کد	ردیف	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸
Rood9	۱																		
Va4	۲	۰/۶																	
Va20	۳	۰/۳۵	۰/۶۵																
Ka6	۴	۰/۵۵	۰/۷۵	۰/۶۵															
Va12	۵	۰/۷	۰/۷۵	۰/۴۵	۰/۷														
Va31	۶	۰/۶	۰/۸	۰/۳۵	۰/۶	۰/۴													
Rood14	۷	۰/۵	۰/۸	۰/۷۵	۰/۴۵	۰/۷	۰/۵۵												
Va9	۸	۰/۸	۰/۶	۰/۹	۰/۶۵	۰/۷۵	۰/۸	۰/۶											
Va23	۹	۰/۵	۰/۶۵	۰/۵	۰/۶	۰/۸	۰/۶۵	۰/۵	۰/۶۵										
Rood13	۱۰	۰/۸	۰/۸	۰/۷۵	۰/۴۵	۰/۸	۰/۷	۰/۶	۰/۷۵	۰/۵									
Va21	۱۱	۰/۶	۰/۹	۰/۵	۰/۴	۰/۶۵	۰/۴۵	۰/۵	۰/۶۵	۰/۳۵	۰/۶								
Ka11	۱۲	۰/۵۵	۰/۹	۰/۵	۰/۴	۰/۶۵	۰/۵۵	۰/۴۵	۰.۷	۰/۴	۰/۶	**۰/۲**							
Ka7	۱۳	۰/۷	۰/۷	۰/۶	۰/۳	۰/۷	۰/۵۵	۰/۴۵	۰/۵۵	۰/۵	۰/۵۵	۰/۳	۰.۳۵						
Ka10	۱۴	۰/۷۵	۰/۸۵	۰/۷	۰/۵	۰/۷۵	۰/۶	۰/۵۵	۰/۶۵	۰/۵	۰/۶	۰/۴۵	۰/۵۵	۰/۴					
Ka19	۱۵	۰/۷	۰/۸	۰/۷	۰/۵۵	۰/۷۵	۰/۷	۰/۶	۰/۶	۰/۵۵	۰/۵	۰/۴۵	۰/۵۵	۰/۴	۰/۳۵				
ka15	۱۶	۰/۷	۰/۶	۰/۸۵	۰/۷	۰/۸۵	۰/۸۵	۰/۷	۰/۴۵	۰/۵۵	۰/۵۵	۰/۶۵	۰/۷	۰/۵	۰/۶۵	۰/۵			
ka13	۱۷	۰/۷۵	۰/۶	۰/۹	۰/۴۵	۰/۷۵	۰/۸	۰/۵	۰/۳۵	۰/۷	۰/۶	۰/۵۵	۰/۶	۰/۳	۰/۶	۰/۳۵	۰/۳		
ka21	۱۸	۰/۷۵	۰/۶۵	۰/۷	۰/۶	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۶	۰/۵	۰/۵۵	۰/۳۵	۰/۶	۰/۵۵	۰/۴	۰/۶	۰/۴	۰/۳۵	۰/۴	
Va30	۱۹	۰/۸۵	۰/۸	۰/۸	۰/۵۵	۰/۵	۰/۷	۰/۶۵	۰/۶	۰/۵۵	۰/۴۵	۰/۶	۰/۶۵	۰/۶۵	۰/۶	۰/۵۵	۰/۵۵	۰/۶	۰/۶
ka27	۲۰	۰/۶۵	۰/۷۵	۰/۵۵	۰/۴۵	۰/۷۵	۰/۶	۰/۶	۰/۵۵	۰/۳	۰/۵	۰/۳	۰/۳۵	۰/۴۵	۰/۶	۰/۵۵	۰/۶۵	۰/۶	۰/۵۵
ka17	۲۱	۰/۶۵	۰/۶۵	۰/۶۵	۰/۵	۰/۷۵	۰/۴۵	۰/۴۵	۰/۶	۰/۴	۰/۶	۰/۴۵	۰/۵۵	۰/۵	۰/۵۵	۰/۷	۰/۷	۰/۶۵	۰/۷
Rood8	۲۲	۰.۸۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۵	۰/۸	۰/۵	۰/۵	۰/۸	۰/۶	۰/۵۵	۰/۵	۰/۵	۰/۴۵	۰/۵۵	۰/۷	۰/۷۵	۰/۷	۰/۶۵
Va42	۲۳	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۶۵	۰/۸	۰/۷	۰/۶	۰/۸۵	۰/۶	۰/۸۵	۰/۶۵	۰/۶۵	۰/۶	۰/۷۵	۰/۸۵	۰/۷۵	۰/۷	۰/۸
Va24	۲۴	۰/۷	۰/۸۵	۰/۷۵	۰/۵۵	۰/۸	۰/۶۵	۰/۷	۰/۸۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷	۰/۷۵	۰/۶۵	۰.۵۵	۰/۷	۰/۸۵	۰/۸	۰/۸
Rood2	۲۵	۰/۷	۰/۸	۰/۸	۰/۴۵	۰/۷۵	۰/۷	۰/۵	۰/۷۵	۰/۶۵	۰/۶۵	۰/۵۵	۰/۵۵	۰/۵	۰/۶	۰/۷	۰/۷۵	۰/۶۵	۰/۷۵
Ka20	۲۶	۰/۶۵	۰/۹	۰/۸	۰/۶	۰/۸۵	۰/۷	۰/۵۵	۰/۸	۰/۷	۰/۶	۰/۷	۰/۷	۰/۶۵	۰/۷	۰/۷۵	۰/۶۵	۰/۷	۰/۷
Sid12	۲۷	۰/۶۵	۰/۸۵	۰/۷	۰/۷۵	۰/۸۵	۰/۸	۰/۷	۰/۸۵	۰/۷۵	۰/۸	۰/۸	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷	۰/۸	۰/۷۵	۰/۸	۰/۷۵
Va33	۲۸	۰/۹	۰/۶	۰/۸۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۸	۰/۷	۰/۶	۰/۸۵	۰/۸۵	۰/۸	۰/۸	۰/۶۵	۰/۸	۰/۷	۰/۷۵	۰/۶	۰/۶
Va22	۲۹	۰/۷۵	۰/۹	۰/۷۵	۰/۶	۰/۸۵	۰/۶	۰/۶	۰/۹	۰/۷	۰/۷	۰.۵۵	۰/۶	۰/۵۵	۰/۶۵	۰/۷	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۶۵
Sid14	۳۰	۰/۷۵	۰/۹	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۶۵	۰/۷	۰/۹	۰/۸	۰/۸	۰/۸	۰/۸	۰/۷۵	۰/۷	۰/۷۵	۰/۸	۰/۸	۰/۸
Sid3	۳۱	۰/۹	۰/۷	۰/۹	۰/۷	۰/۸۵	۰/۸	۰/۷۵	۰/۶۵	۰/۸۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۶۵	۰/۶۵	۰/۵۵	۰/۶۵	۰/۵۵	۰/۵۵
Sid16	۳۲	۰/۸۵	۰/۷۵	۰/۹	۰/۷۵	۰/۸۵	۰/۸	۰/۶۵	۰/۶۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۶۵	۰/۶۵	۰/۶	۰/۷۵	۰/۶۵	۰/۵	۰/۵۵	۰/۴۵
Sid13	۳۳	۰/۶۵	**۰/۹۵**	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۸	۰/۶۵	۰/۵۵	۰/۹	۰/۷۵	۰/۷	۰/۸	۰.۷۵	۰/۸	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۸	۰/۷۵
Sid15	۳۴	۰/۸۵	۰/۶۵	۰/۸	۰/۷۵	۰/۸	۰/۸	۰/۸۵	۰/۷۵	۰/۸	۰/۷۵	۰/۸	۰/۷۵	۰/۶۵	۰/۸	۰/۶۵	۰/۵۵	۰/۵۵	۰/۵
Sid5	۳۵	۰/۹	۰/۷	۰/۷۵	۰/۸۵	۰/۸	۰/۸	۰/۹	۰/۷	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۸۵	۰/۸۵	۰/۶۵	۰/۸	۰/۷	۰/۵۵	۰/۶۵	۰/۵
Sid2	۳۶	۰/۸	۰/۹	۰/۶۵	۰/۷	۰/۸	۰/۶	۰/۸	۰/۹۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۶۵	۰/۷	۰/۷۵	۰/۸	۰/۸	۰/۸۵	۰/۷۵
Sid1	۳۷	۰.۸۵	**۰/۹۵**	۰/۷۵	۰/۷	۰/۷۵	۰/۵	۰/۶	۰/۹	۰.۷۵	۰/۷۵	۰/۶۵	۰/۶	۰/۶۵	۰/۷	۰.۷۵	۰/۸	۰/۷۵	۰/۸
Sid6	۳۸	۰/۸	۰/۹	۰/۷۵	۰/۷	۰/۸	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۹۵	۰/۷۵	۰/۸	۰/۷۵	۰/۷	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۸	۰/۸۵	۰/۸	۰/۸
Sid11	۳۹	۰/۹	۰/۷۵	۰/۸	۰/۹	۰/۸۵	۰/۷۵	۰/۸۵	۰/۷	۰/۸	۰/۸۵	۰/۸۵	۰/۷	۰/۷۵	۰/۸۵	۰/۷۵	۰/۶	۰/۷	۰/۵۵

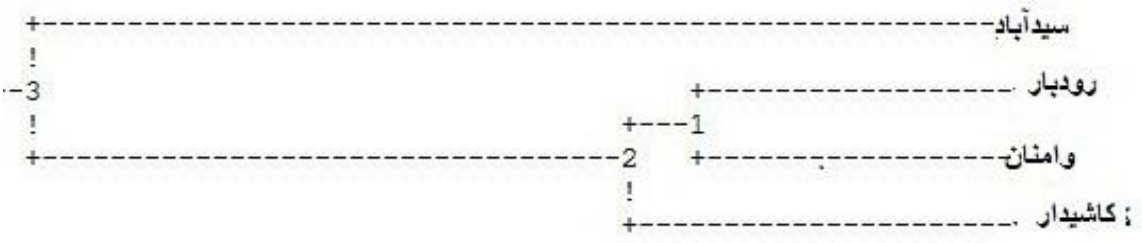
ادامه جدول ۵-۷- مقادیر ماتریس عدم تشابه دایس بین ۳۹ نمونه ژنوتیپ‌های گردو حاصل از داده‌های *SSR*

		۱۹	۲۰	۲۱	۲۲	۲۳	۲۴	۲۵	۲۶	۲۷	۲۸	۲۹	۳۰	۳۱	۳۲	۳۳	۳۴	۳۵	۳۶	۳۷	۳۸	۳۹
Va30	۱۹																					
ka27	۲۰	/۴۵																				
ka17	۲۱	۰/۶	۰/۳																			
Rood8	۲۲	۰/۷	۰/۴۵	/۳۵																		
Va42	۲۳	۰/۸	۰/۷	۰/۶	۰/۵																	
Va24	۲۴	۰/۸۵	۰/۸	۰/۷	۰/۶	۰/۵۵																
Rood2	۲۵	۰/۷۵	۰/۶۵	۰/۷	۰/۵	۰/۶	۰/۴															
Ka20	۲۶	۰/۸	۰/۸	۰/۷۵	۰.۵۵	۰/۶۵	۰/۶	۰/۵														
Sid12	۲۷	۰/۷۵	۰/۸	۰.۸۵	۰/۷۵	۰/۶۵	۰/۵	۰/۵۵	۰/۵													
Va33	۲۸	۰/۸۵	۰/۸۵	۰/۸	۰/۷۵	۰/۶	۰/۷	۰/۷۵	۰/۸۵	۰/۷۵												
Va22	۲۹	۰/۸	۰/۷	۰/۷	۰/۵۵	۰/۵	۰/۶	۰/۶	۰/۶	۰۷/۷	۰/۶											
Sid14	۳۰	۰/۸	۰/۸۵	۰/۸۵	۰.۷۵	۰/۵۵	۰/۶	۰/۶۵	۰/۵	۰/۵۵	۰/۵۵	۰/۳										
Sid3	۳۱	۰/۸	۰/۸۵	۰.۸۵	۰/۶	۰/۶۵	۰/۵۵	۰/۶۵	۰.۵۵	۰/۷	۰/۵	۰/۶	۰/۶۵									
Sid16	۳۲	۰/۷	۰/۷۵	۰/۸	۰/۶۵	۰/۶۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷	۰/۷	۰.۵۵	۰/۴۵	۰/۶۵	۰/۴۵								
Sid13	۳۳	۰/۷۵	۰/۸۵	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۷	۰/۷	۰/۷۵	۰/۴۵	۰/۴	۰/۷	۰/۶	۰/۴	۰/۸	۰/۷							
Sid15	۳۴	۰/۸	۰/۸۵	۰/۸۵	۰/۸	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۸۵	۰/۶۵	۰/۶۵	۰/۴	۰.۵۵	۰/۵۵	۰/۴	۰/۵	۰/۵						
Sid5	۳۵	۰/۷۵	۰/۸	۰/۸۵	۰/۸	۰/۷۵	۰/۸	۰/۸۵	۰/۷۵	۰/۶۵	۰/۴۵	۰/۶	۰/۶۵	۰/۶۵	۰/۴۵	۰/۵۵	۰/۳					
Sid2	۳۶	۰/۹	۰/۸	۰/۸	۰/۷	۰/۶	۰/۶	۰/۶۵	۰/۶	۰/۷	۰/۸	۰/۴۵	۰/۴۵	۰/۶۵	۰/۸	۰/۵۵	۰/۵	۰/۶۵				
Sid1	۳۷	۰/۸	۰/۷	۰/۶	۰/۵	۰/۴۵	۰/۶۵	۰/۶۵	۰/۴۵	۰/۶	۰/۸	۰/۶۵	۰/۶۵	۰/۵۵	۰.۷	۰/۴۵	۰/۵۵	۰/۷	۰/۴۵			
Sid6	۳۸	۰/۷۵	۰/۷۵	۰/۸	۰.۷۵	۰/۶	۰/۸	۰/۸۵	۰/۶۵	۰/۶۵	۰/۶	۰/۴۵	۰/۴۵	۰/۷۵	۰/۷	۰/۴۵	۰/۴۵	۰/۴۵	۰/۴۵	۰/۵۵		
Sid11	۳۹	۰/۸۵	۰/۸۵	۰/۹	۰/۸	۰/۸۵	۰/۸۵	۰/۹	۰/۸	۰/۶۵	۰/۶	۰/۷۵	۰/۷	۰/۵۵	۰/۴	۰/۶	۰.۳۵	۰/۴۵	۰/۴۵	۰/۶۵	۰/۶۵	۰/۶۵

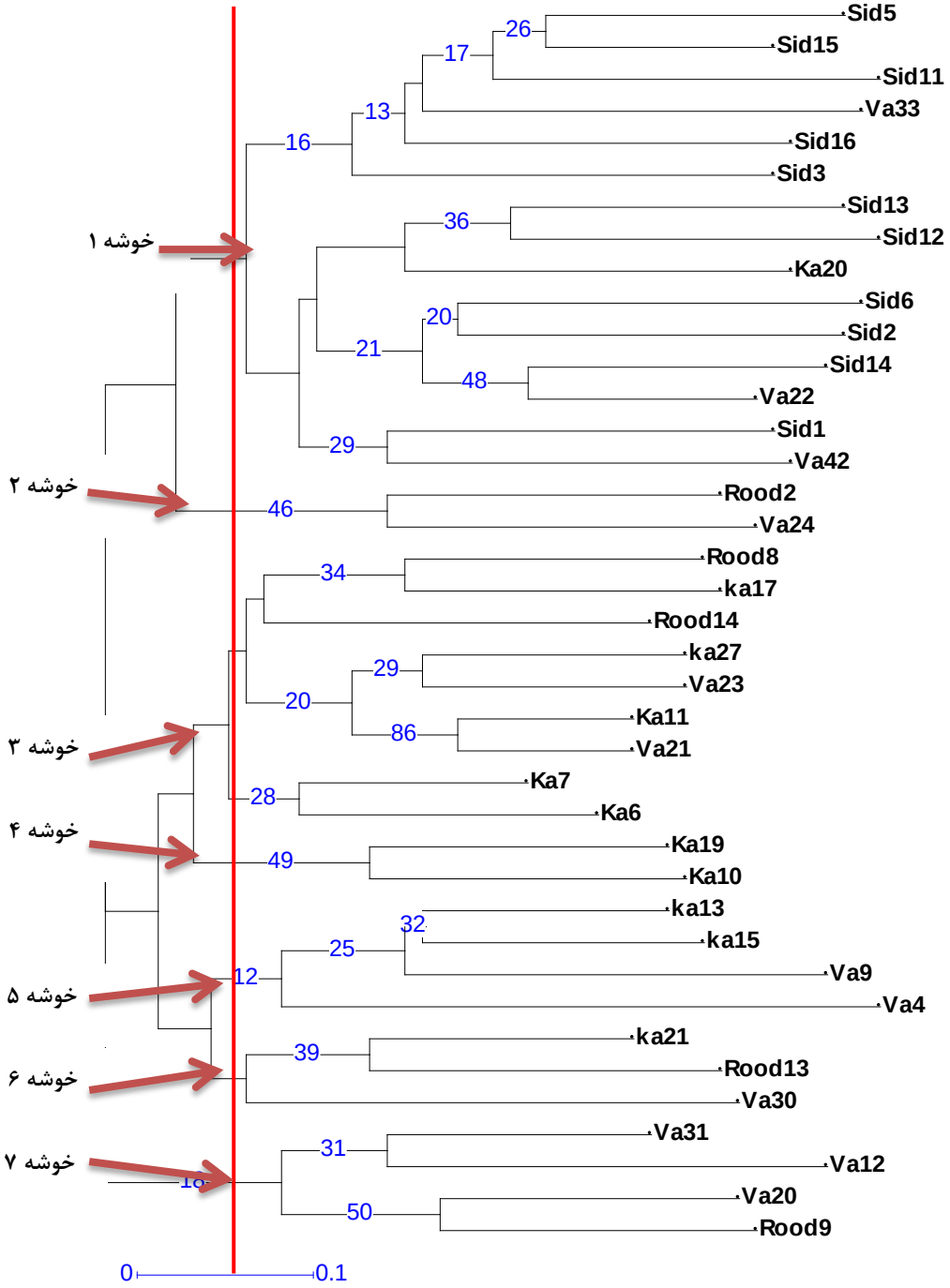
۵-۷-۶- تجزیه کلاستر

دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای اطلاعات ۱۰ نشانگر SSR در توده‌های گردوی ایرانی با استفاده از ضریب تشابه نی و به روش UPGMA در شکل ۵-۴ نشان داده شده است. توده‌های مورد بررسی به دو گروه تقسیم شده‌اند. گروه اول شامل توده سیدآباد می‌باشد که به صورت مجزا قرار گرفته است. گروه دوم شامل توده‌های رودبار، وامنان و کاشیدار می‌باشد. با توجه به نزدیکی جغرافیایی این مناطق، قرار گرفتن این سه توده در یک گروه قابل انتظار می‌باشد. توده سیدآباد از نظر جغرافیایی نسبت به دیگر توده‌ها در ارتفاعات کم‌تری (دامنه ارتفاع ۱۹۴ متر) نسبت به دیگر توده‌ها قرار دارند. توده‌های دیگر در ارتفاعات بالاتر از ۱۳۰۰ متری از سطح دریا قراردارند.

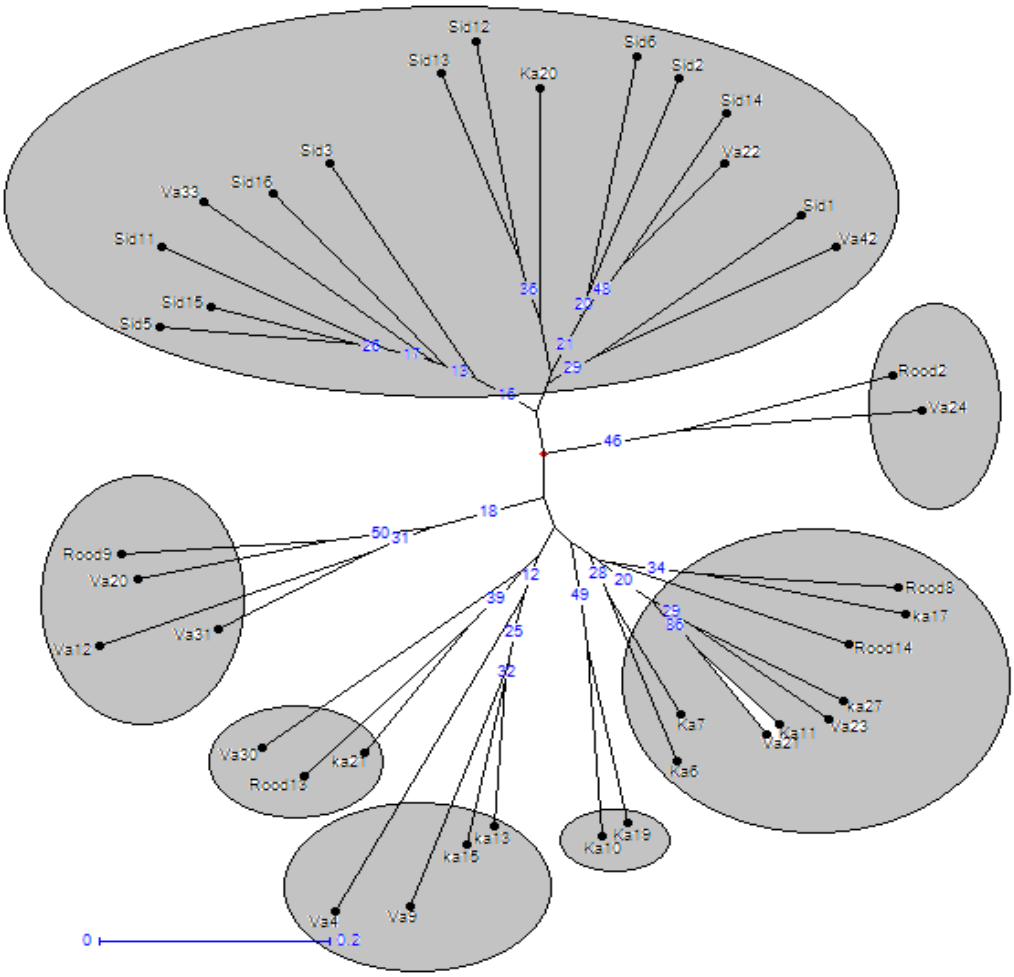
دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های گردوی مورد بررسی بر اساس عدم ضریب تشابه دایس و روش UPGMA در شکل ۵-۵ آمده است. ضریب کوفنتیکی بین دندروگرام و ماتریس عدم تشابه برابر ۰/۸۷۸ گردید. با قطع دندروگرام هفت گروه حاصل شد. در تقسیم‌بندی ژنوتیپ‌ها درختان یک توده در دسته‌های متفاوتی قرار گرفتند و نتیجه این بیانگر تنوع زیاد در بین توده‌های مختلف و درختان در یک توده است. در شاخه اول دندروگرام که بزرگ‌ترین شاخه بود ترکیبی از از توده سیدآباد (کل توده)، از توده وامنان (سه ژنوتیپ) و از توده کاشیدار (یک ژنوتیپ) بود. در شاخه دوم یک ژنوتیپ از توده رودبار و یک ژنوتیپ از توده وامنان قرار دارد. در شاخه سه دندروگرام دو ژنوتیپ از توده رودبار، پنج ژنوتیپ از توده کاشیدار و سه ژنوتیپ از توده وامنان قرار دارد. شاخه چهارم را دو ژنوتیپ از توده کاشیدار تشکیل دادند که نشان دهنده شباهت بالای این دو ژنوتیپ می-باشد. در شاخه پنجم دو ژنوتیپ از توده وامنان و دو ژنوتیپ از توده کاشیدار قرار گرفت. در شاخه ششم از هر یک از توده‌های کاشیدار، وامنان و رودبار یک ژنوتیپ قرار دارد. شاخه هفتم سه ژنوتیپ از توده وامنان و یک ژنوتیپ از توده رودبار قرار دارد.



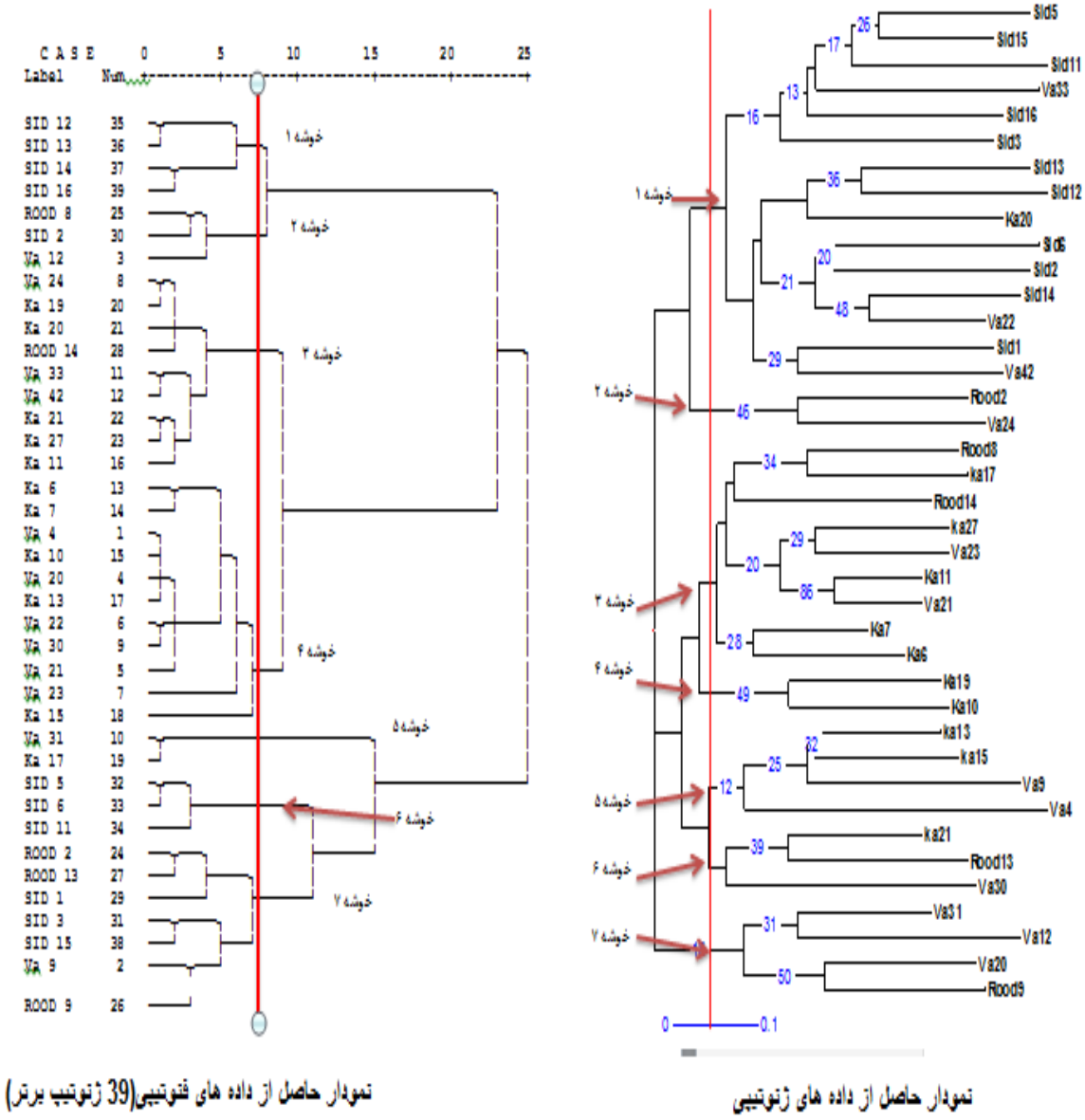
شکل ۵-۴- دندروگرام بین توده‌های گردو منطقه آزادشهر بر اساس ضریب تشابه نی(۱۹۷۸) و روش *UPGMA* با ۱۰ نشانگر *SSR*



شکل ۵-۵- نمودار *UPGMA* بر اساس ضریب عدم تشابه دایس محاسبه شده از داده‌های ۱۰ نشانگر *SSR* از ژنوتیپ-های گردو



شکل ۵-۶- دندروگرام درختی ۳۹ ژنوتیپ گردو محاسبه شده منطقه آزادشهر بر اساس ۱۰ نشانگر *SSR*

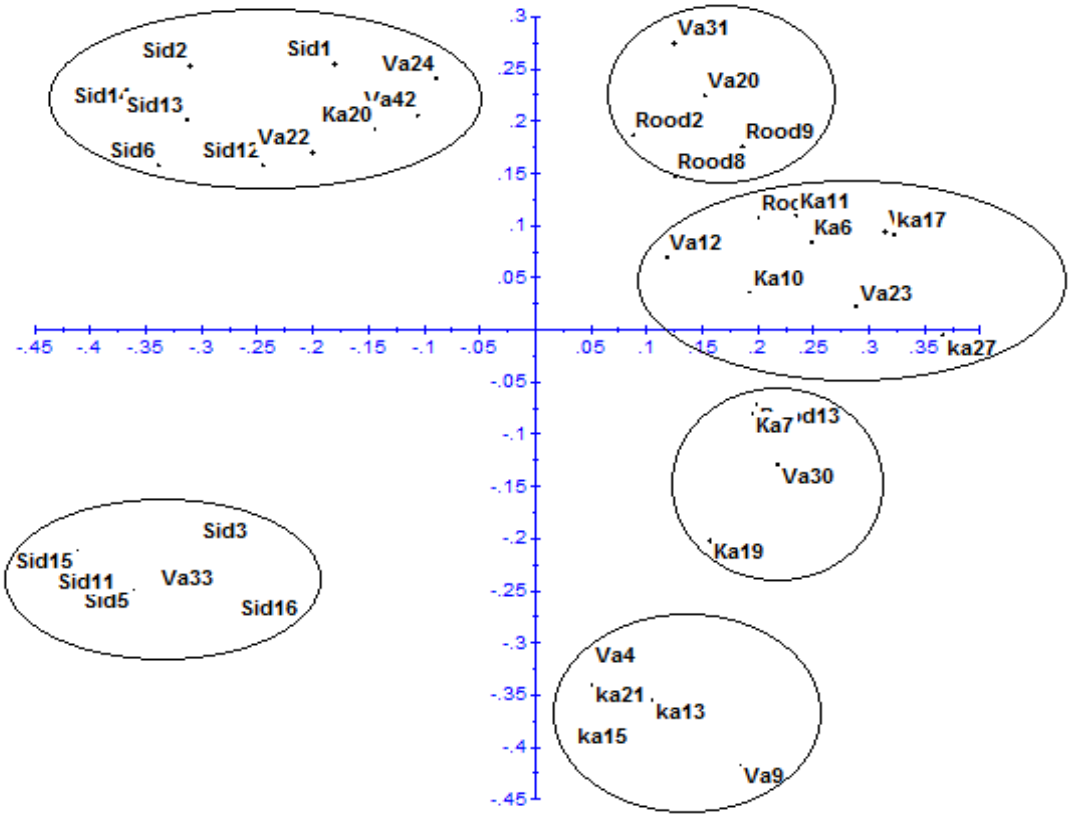


شکل ۵-۷- مقایسه نمودار درختی داده های ژنوتیپی و فنوتیپی برتر شهرستان آزادشهر

در مقایسه‌ای که بین دندروگرام فنوتیپی با دندروگرام حاصل از نتایج ژنوتیپی انجام شد ژنوتیپ‌های گردو در این دو دندروگرام در خوشه‌های متفاوتی قرار گرفتند این مقایسه نشان می‌دهد ژنوتیپ‌ها تنوع زیادی را نشان دادند (شکل ۵-۷).

جدول ۵-۸: مقادیر ویژه محاسبه شده برای $PCOOA$[1] براساس ماتریس عدم تشابه

محور ها	Eigenvalue	Inertia
۱	۰/۰۵۵۸	۱۷/۷۷
۲	۰/۰۴۴۲	۱۴/۰۷
۳	۰/۰۲۶۷	۸/۵۲
۴	۰/۰۲۰۵۹	۶/۵۶
۵	۰/۰۱۸۱۸	۵/۷۹



شکل ۵-۸- تجزیه دوبعدی ۳۹ نمونه ژنوتیپ‌های گردو بر اساس عدم تشابه دایس بدست آمده از ۱۰ جفت آغازگر ریزماهواره

[1] Factorial coordinates analaysis

آزمون تجزیه بعدی توانست تصویر بهتری از پراکنش ژنوتیپ‌ها را فراهم کند. لازم به ذکر است تجزیه به مؤلفه‌های اصلی باعث پردازش داده‌های حاصل از آنالیز آلل‌های حاصل از تکثیر PCR در چند محور و در نتیجه باعث افزایش وزن داده‌های آن در این محورها می‌شود. با توجه به اینکه در غیاب اطلاعات شجره‌ای مناسب، تفسیر و توجیه نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای ممکن است قابل تفسیر و توجیه با روابط ژنتیکی و شجره‌ای واقعی ژنوتیپ‌ها نباشد. لذا در چنین مواردی بسیاری از محققین استفاده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی را به عنوان روش مکمل برای تجزیه خوشه توصیه می-کنند. در تجزیه دوبعدی نیز ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده از منطقه سیدآباد جدا از سایر ژنوتیپ اما در دو گروه متفاوت قرار گرفتند. بقیه ژنوتیپ‌ها از مناطق مختلف در چهار دسته قرار گرفتند (جدول ۵-۸، شکل ۵-۸).

۵-۹- نتیجه‌گیری کلی

۱- در این پژوهش برای استخراج DNA از روش نمکی بهینه یافته استفاده شد نتایج خوبی دربر داشت (این روش برای اولین بار در محصولات باغی مورد استفاده قرار گرفت).

۲- نتایج نشان می‌دهد که در مجموع ژنوتیپ‌های مورد بررسی در منطقه آزادشهر دارای تنوع ژنتیکی بالایی به ویژه در صفات میوه هستند. در میان ژنوتیپ‌های مورد بررسی ژنوتیپ Ka17 و Va31 با داشتن وزن بالای میوه، ژنوتیپ Va31 با داشتن بالاترین وزن مغز، ژنوتیپ SID1 با بالاترین درصد مغز مناسب‌ترین جهت انتخاب مواد اصلاحی با عملکرد مناسب میوه می‌باشند.

۳- با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان نتیجه گرفت کارایی نشانگرهای مورد استفاده خوب بوده و می‌توان از این آغازگرها در مطالعات بعدی استفاده نمود.

۴- داده‌های حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد که جمعیت‌های تحت مطالعه از تنوع نسبتاً بالایی برخوردار هستند.

۵- نتایج بدست آمده از دندروگرام حاصل داده‌های فنوتیپی با دندروگرام حاصل داده‌های ژنوتیپی با هم متفاوت هستند.

۶- بیش‌ترین شباهت ژنتیکی بین ژنوتیپ Ka19 و Ka10 که به طور جداگانه در خوشه چهارم دندودگرام داده‌های حاصل از ژنوتیپ قرار گرفتند. و کم‌ترین شباهت ژنتیکی بین ژنوتیپ ROOD9 و Sid5 است.

۵-۹- پیشنهادات

۱- انتخاب و کشت ژنوتیپ‌های برتر در سایر مناطق و بررسی عملکرد و صفات میوه

۲- جمع‌آوری ژنوتیپ‌های برتر و مفید و ایجاد کلکسیون

۳- استفاده از ژنوتیپ‌های برتر در کارهای اصلاحی

۴- استفاده از سایر نشانگرها مانند AFLP، ISSR برای بررسی میزان تنوع ژنتیکی

۵- بررسی سایر صفات مهم مثل دیر برگ‌دهی، زمان باز شدن جوانه گل‌های نر و ماده ، مقاومت به بلایت

۶- با توجه به این‌که گردو دارای متابولیت‌های ثانویه‌ای است که استخراج DNA را مشکل می‌کند. از روش استخراج نمکی بهینه‌یافته به کار برده شده در این پژوهش در سایر مطالعات استفاده شود.

۷- با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان نتیجه گرفت کارایی نشانگرهای مولکولی مورد بررسی خوب بوده بخصوص نشانگر WGA054 که از این نشانگر در مطالعات گردو بیشتر استفاده شود.

۸- طبق نتایج بدست آمده برخی ازژنوتیپ‌های این منطقه (بخصوص اغلب ژنوتیپ‌های وامنان و کاشیدار) دارای مقاومت بالایی به آفت کرم سیب هستند که می‌توان از این ارقام در اصلاح نژاد گردو استفاده شود.

فهرست منابع

ابراهیمی ع. فتاحی مقدم م. زمانی ذ. و وحدتی ک ، (۱۳۸۸) "بررسی تنوع ژنتیکی ۶۰۸ ژنوتیپ بذری گردو (*Juglans regia* L) و انتخاب برخی ازژنوتیپ‌های دارای صفات برتر" مجله علوم باغبانی. شماره ۴ ، دوره ۴۰: ص۸۳-۹۴.

احتشام نیا ع. شریفانی م. وحدتی ک. و عرفانی مقدم و، (۱۳۸۸) "بررسی تنوع ژنتیکی برخی توده-های گردوی بومی استان گلستان با استفاده از نشانگر مولکولی ریزماهواره" **مجله پژوهش تولیدات‌گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان**.- جلد ۱۶ شماره ۴

ارزانی ک، (۱۳۸۲) "رویکرد اهمیت، محافظت، نگهداری و مدیریت نهال در باغات سنتی ایرانی"، اولین کنفرانس باغات سنتی ایران، ص ۵-۱،

بابائیان جلودار ن، کاکاوند م، قهرمانی ف و خادمیان ر، (۱۳۸۷) **"در ترجمه مارکرهای مولکولی در ژنتیک گیاهی و بیوتکنولوژی"** انتشارات دانشگاه مازندران، مازندران، ص ۳۰۱.

جلیلی‌مرندی ر، (۱۳۸۴) **"میوه‌کاری"** چاپ دوم، نشر جهاد دانشگاهی واحد آذربایجان‌غربی، آذربایجان‌غربی، ص ۲۵۱.

جلیلی‌مرندی ر، ناصری ل، (۱۳۸۲)، طرح تحقیقاتی: "اثر زمان، نوع پیوند و تأثیر برخی ترکیبات شیمیایی در جوش خوردن پیوند جوانه‌های گردو ایرانی" ، دانشگاه اورمیه. ص ۳۰.

حق‌جویان م ر. قره‌یاضی ب. صانعی شریعت‌پناهی م. و خلیقی ا، (۱۳۸۴) "ارزیابی تنوع ژنتیکی گردو در برخی از مناطق ایران با استفاده از صفات کمی"**پژوهش و سازندگی**، شماره ۶۹، ص ۳۰-۲۲.

خوشخوی م، شیبانی ب، روحانی ا و تفضلی ع، (۱۳۸۳) **"اصول باغبانی"** چاپ دوازدهم، انتشارات دانشگاه شیراز، ص ۵۹۶.

رادنیا ح، (۱۳۷۵) **"پایه درختان میوه"** انتشارات دانشکده کشاورزی کرج، ص ۶۳۷.

رجایی اربابی م، (۱۳۸۴)، پایانامه کارشناسی ارشد: "بررسی تنوع ژنتیکی در یک جمعیت بلدرچین ژاپنی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره‌ای"، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، ص ۹۵.

رضوی‌نیا م، (۱۳۸۴)، پایانامه کارشناسی ارشد: "بررسی تنوع ژنتیکی درون جمعیتی در یک گله اصلاحی افشاری با استفاده ۱۰ جایگاه میکروساتلایت"، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، ص ۱۱۱.

سلطانلو ح، نقوی م ر، و مرتضویان، م، (۱۳۸۸) **"نشانگرهای مولکولی در ژنتیک و بیوتکنولوژی گیاهی"** انتشارات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ص ۳۰۳.

سلیمانی ا. ربیعی و. حسنی د. و امیری م، (۱۳۸۸) *"اثر پایه و* رقم در ازدیاد گردوی ایرانی(*Juglans regia* L.) *با* استفاده از پیوند هیپوکوتیل " **مجله بذر و نهال،** شماره ۲۵، دوره ۲: ص ۹۳-۱۰۱.

طباطبایی‌یزدی م، زرینی غ، سپهری‌زاده ض، و قاسمیان ع، (۱۳۸۶) **"ترجمه مقدمه‌ای بر کلون-سازی ژن‌ها و آنالیز DNA"** ، براون ت ا، (مؤلف) انتشارات خانه زیست‌شناسی، تهران، ۴۶۷ص.

طهمورث‌پور م، (۱۳۸۸) "بررسی چندشکلی ژن‌های هورمون رشد (GH) وSTAT5A و ارتباط آن با افزایش وزن روزانه گوسفندبلوچی" طرح پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد، ص ۵۴.

فتاحی م، و فتاحی ب، (۱۳۸۹) **" مبانی گیاهان داروئی"** انتشارات جهاد دانشگاهی واحد تهران، ص ۴۸۴.

فصیحی‌هرندی ا. اشرفی ح. و عبدمیشانی س، (۱۳۷۴) "روش RAPD-PCR به عنوان در اصلاح نباتات" **پژوهش و سازندگی شماره،** ۲۹، ص ۵۶-۶۰.

قره‌یاضی ب، (۱۳۷۵)،"کاربرد نشانگرهای DNA در اصلاح نباتات"، مجموعه مقالات چهارمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران، ص ۱۳۴-۱۴۰.

قنادها م ر، زهراوی م، و وحدتی ک، (۱۳۸۲) **"اصلاح نباتات"**. انتشارات دیباگران تهران، تهران، ص ۳۴۴.

کریمی ر. ارشادی ا. و وحدتی ک، (۱۳۸۸) "بررسی تنوع ژنتیکی برخی توده‌های گردوی ایرانی (*Juglans regia* L) استان همدان با استفاده از نشانگر مولکولی SSR " **فن‌آوری تولیدات-گیاهی**، جلد ۲، شماره ۹.

محسنی س، (۱۳۸۶)، پایانامه ارشد: "بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های گردوی ایرانی در استان کرمان با استفاده از نشانگر ریزماهوراه"، دانشکده ابوریحان، دانشگاه تهران،

موسوی ز ع. طاهرنژاد ز. زمانی م، ج. و امام‌جمعه ع، ع. (۱۳۸۹). *"مطالعه تنوع زیر واحدهای گلوتنین در توده‌های Aegilpps tauschii با استفاده از روش EGAP-SDS"* مجله زراعت و اصلاح نباتات، جلد۶، شماره۱، ص ۷۳-۶۵.

نقوی م، ر، قره‌یاضی، ب و حسینی سالکده ق. (۱۳۸۶) **"نشانگرهای مولکولی"** انتشارات دانشگاه تهران، ص ۳۳۴.

وحدتی ک، (۱۳۸۸) ، "گزارشی از آخرین رهیافت‌های تحقیقاتی گردو در کشور" ششمین کنگره علوم باغبانی ایران، دانشگاه گیلان.

ولی‌زاده م، و مقدم م، (۱۳۸۶) **"در ترجمه آشنایی با ژنتیک کمی"**، *فالکوئر، د.س (مؤلف)* چاپ دوم، مرکز نشر دانشگاهی، ص۵۳۶.

Arzani K. Mansouri Ardakan H. and Vezvaei A. (**2008**) "Morphological variation among Persian walnut (*Juglans regia* L) genotypes from central Iran" **New Zealand Journal of Cropand Horticulteral Science**., **36,** pp **159-168**.

Aslantas R. (**2006**) "Identification of superior walnut (*Juglans regia* L.) genotypes in north-eastern Anatolia, Turkey" **New Zealand journal of Crop and Horticultural Science**., **34**, pp **231-237**.

Botstein D. White R. L. Skolnick M. and Davis R. W. (**1980**) "Construction of a genetic linkage map in man using resriction fragment length polymorphisms" **Am. J. Hum. Genet**., **32,** pp **314-331.**

Buchanan F. C. and Thue T. D. (**1998**) "Intrabreed polymorphic information coctent of microsatellites in cattle and sheep" **Can. J. Anim. Sci**., **78,** pp **425-428**.

Caglarirmak N. (**2003**) "Biochemical and physical properties of some walnutgenotypes (*Juglans regia* L)" ***Nahrung* (1)**., pp **28-32.**

Chawla H. S. (**2000**), "**Introduction to plant Biotechology",** USA. Scinence Publisher INC. pp. **236.**

Dangl G. S. Woeste K. Aradhya M. K. Koehmstedt A. Simon C. Potter D. Leslie C. and McGranahan G. H. (**2005**) "Characterization of 14 microsatellite markers for genetic analysis and cultivar identification of walnut" **Journal of the American Society for Horticultural Scien**., **130,** pp **348-354.**

Dvorak J. Lue M. C. Yang Z. L. and Zhang H. B. (**1998**) "The Structure of the Aegilops tauschii genepool and evolution of hexaploid wheat. Theor" **Appl. Genet**., **97,** pp **657-670.**

Ebrahimi A. Fatahi R and Zamani Z. (**2011**) "Analysis of genetic diversity among some Persian walnut genotypes (*Juglans regia* L) using morphological traits and SSRs markers" **Scientia Horticulturae**., **130,** pp **146–151.**

Eskandari S. Hassani D. and Abdi A. (**2005**) " Investigation on genetic diversity of Persian walnut andevaluation of promising genotypes" **Acta Horticulturae**., **705,** pp **159-163.**

FAO. (**2011**), " **FAO statistical yearbook. Agricultural production "**, Food and Agriculture Organization of the United Nations. http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx).

Forde H. I. (**1975**), "**Walnuts Pp. Janick, J. and Moore, J. N. (Eds.), Advances in Fruit Breeding**" Purdue University Press, *West Lafayette,* IN. pp. **439-455.**

Forde H. I. and McGranaham G. H. (**1993**) "A new walnut cultivar Malizia" **John Wiley and Sons, Inc, USA**., **311**, pp **46-49.**

Foroni I. Rao R. Woeste K. and Gallitelli M. (**2005**) "Characterization of *Juglans regia* L. With SSR markers and evaluation of genetic relationships among cultivars and the "Sorrento" landrace" **J.Hort. Sci. Biotechnol**., **80, 1,** pp **49-53.**

Foroni I. Rao R. and Woeste K. (**2006**) "Molecular characterization of *Juglans regia* L. Cultivar with SSR markers" **Acta Horticulturae**., **705,** pp **207-213.**

Foroni I. Woeste K. Monti L. M. and Rao R. (**2007**) "Identification of 'Sorrento' walnut using simple sequence repeats (SSRs**)**" **Genet Resour Crop Evol**., **54**, pp **1081-1094.**

Hassani D. Atefi J. Haghjooyan R. Dastjerdi R. Keshavarzi M. Mozaffari M. R. Soleimani A. Rahmanian A. R. Nematzadeh F. and Malmir A. (**2012a**) " 'Jamal' a new walnut cultivar for moderate cold areas of Iran" **Seed and Plant Improvement Journal**., pp **525-528**.

Hassani D. Atefi J. Haghjooyan R. Dastjerdi R. Keshavarzi M. Mozaffari M. R. Soleimani A. Rahmanian A. R. Nematzadeh F. and Malmir A. (**2012b**) " 'Damavand' a new Persian walnut cultivar as a pollinizer for Iranian walnut cultivars and genotypes" **Seed and Plant Improvement Journal**., Pp **529-531.**

Hedric P. W. (**1999**), "**Genetic of Populations**", Second edition. Jones and Bartlett Puplisher, Sudbury, Massachusett" pp. **55**3.

Litt M. and Luty J. A. (**1989**) "A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of dinucleotics repeat within the cardiac muscle actin gene" **American J. Human Genetics**., **44,** pp **397-401.**

McGranahan G. H. Charles A. Leslie C. A. Philips H. A. and Dandaker A. (**1998**), "**Walnut Propagation. In: D. Ramos (ed.), Walnut Production Manual**", University of California, DANRPubl, Davis, pp. **71-83.**

McGranahan G. and Leslie C. (**1990**) "Walnuts (Juglans) " **Acta Hort**., **290,** pp **907-951.**

Miller S. A. Dykes D. D. and Poleskay H. F. (**1988**) "A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleaed cells" J**. Nucleic Acids Res**., **16,** pp **1215-1219.**

Newbury H. J. and Ford Lloyd B. V. (**1997**) "Estimation of genetic divercity , In : Plant Genetic Conversation chapman and Hall " **Manted N. B. V. Ford – Lloyd and T . G. Hawkes,.** pp **193-206.**

Nei M. (**1978**) "Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals" **Genet**., **89,** pp **583-590.**

Pank F. (**2007**), "**Breeding of medicinal plant**. In : Oliver , K. and Quax W . J. (Eds) . Medicinal plant Biotecnology From Basic Research to Industrial Applications. WILEY – VCH Verlag Gmb H and Co . k Ga A, Weinheim, pp: **417-450**.

Pollegioni P. A. Major A. Bartoli S. Dussi F. and Malvolti M. E. (**2004**) "Application of del mp3 microsatellite and dominant molecular markers for the discrimination of species and interspecific hybrids in genus Juglans" **Acta Horticulturae**., **705**, pp **191-197.**

Rezaee R. Hassani Gh. Hassani D. and Vahdati K. (**2008**) "Morphobiological characteristics of some newly selected walnut genotypes from seedling collection of Kahriz-Orumia" **Iranian Journal of Horticultural Science and Technology**., **9, 3,** pp **205-214.**

Sharma O. C. and Sharma S. D. (**2001**) "Genetic Divergence in seedling trees of Persian walnut (*Juglans regia* L.) For various metric nut and kernel characters in Himachal Pradesh" **Scientia Horticulturae**., **88, 2,** pp **163-171**.

Solar A. and Stampar F. (**2004**) "Evaluation of Some Perspective Walnut Genotype in Slovenia" **Acta Horticulturae**., pp **705.**

SPSS. (**2002**), "**SPSS for Windows**", Release 16, Chicago, USA.

Solouki M. Mehdikhani, H. Zeinali H. and Emamjomeh A. A. (**2008**) "Study of genetic diversity in chamomile (*Matricaria chamomile*) based on Morphological traits and Moleculars" **Scientia Horticulture**., **117,** pp **281-287**.

Tsmouris G. Hatziantoniou S. and Demetzos C. (**2002**) "Lipid analy sis of Greek walnut oil (*Juglans regia* L.) " **Natur frosch**., **57,** pp **51- 56.**

Vanhanen L. P. and Savage G. P. (**2006**) "The use of peroxide value as measure of quality for walnut stored at five different temperatures using three different types of packaging" **Food chemistry**., **99,** pp **64-69**.

Wang H. Pei D. Gu R. Sh and Wang B. Q. (**2008**) "Genetic diversity and structure of walnut populations in central and southwestern china revealed by microsatellite markers" **J. AMER. SOC. HORT. SCI**., **133, 2,** pp **197–203**.

Weaver R. F. and Hederic P. W. (**1989**), "**Genetics**", WMW Brown Publishers, Dubuque, Iowa, pp. **220**.

Woeste K. Burns R. Rhodes O. and Michler C. (**2002**) "Thirty polymorphic nuclear microsatellite loci from black walnut" **J. Hered**., **93,** pp **5-60.**

Yeh F. C. Yang R. C. and Boyle. T. (**1999**), "PopGne**, version 1.31. Microsoft Windows based Frrrware for population genetic analis.**" Molecular Biology and Technology center, University of Alberta, Edmonton. AB. Canada, pp. **26**.

ضمائم

الف- محلول‌های استخراج DNA

الف-۱- محلول نیم مولار EDTA (PH=۸)

وزن مولکولی EDTA برابر با۳۷۲/۲۴ است. برای تهیه ۱۰۰ سی‌سی محلول نیم مولار، ۱۸/۶۱۲ گرم EDTA در ۸۰ سی‌سی آب مقطر حل گردید و PH با افزودن سود (NaOH) ۵۰٪ به ۸ سپس محلول به حجم ۱۰۰ سی‌سی رسانده شد.

الف– ۲ بافر لیزکننده

نام ماده	میزان مصرف	غلظت نهایی
Tris- Hcl	۱/۲۱ گرم	۱۰ میلی‌مولار
EDTA	۰/۷۴۴ گرم	۲ میلی‌مولار
NaCl	۲۳/۳۷ گرم	۴۰۰ میلی‌مولار
حجم نهایی	۱۰۰۰ سی‌سی	

الف- ۳ محلول NaCl اشباع ۶ مولار

وزن مولکولی Nacl، ۵۸/۴۴ است. برای تهیه ۱۰۰ سی‌سی محلول ۶ مولار، مقدار ۳۵/۰۶ گرم Nacl در ۱۰۰ سی‌سی آب مقطر دوبار تقطیر حل گردید.

الف-۴ طرز تهیه *TE 10x*

نام ماده	میزان مصرف	غلظت نهایی
Tris- HCl	۱/۲۱ گرم	۱۰ میلی‌مولار
EDTA	۳۷ میلی‌گرم	یک میلی‌مولار
آب مقطر	۱۰۰ سی‌سی	-

ب- محلول‌های تهیه ژل

ب-۱ تهیه ژل آگارز یک و دو درصد

برای این کار ابتدا ۱۰ سی‌سی از TBE 10x به حجم ۱۰۰ سی‌سی رسانده شد تا محلول TBE 1x تهیه شود، سپس برای تهیه ژل‌های یک و دو درصد به ترتیب مقادیر یک و دو گرم از ژل آگارز در ۱۰۰ سی‌سی TBE 10x حل شد (این کار با حرارت دادن انجام شد).

ب- ۲ تهیه بافر TBE 10x

برای تهیه ۱۰۰ سی‌سی بافر، مواد زیر در ۷۰ سی‌سی آب مقطر حل گردید و سپس به حجم ۱۰۰ سی‌سی رسانده شد.

ب – ۲ اجزاء بافر *TBE 10x*

نام ماده	میزان مصرف
Tris- Base	۱۰/۷۸ گرم
Boric-acid	۵/۵ گرم
EDTA	۴ میلی‌لیتر(PH=۸)
حجم نهایی	۱۰۰ سی‌سی

ج-محلول‌های رنگ‌آمیزی

مراحل رنگ‌آمیزی ژل پلی‌آکریل‌آمید با روش سریع نیترات نقره

	مرحله	طرز تهیه محلول	زمان(دقیقه)
۱	تثبیت (Fixation)	۱ سی‌سی الکل مطلق+ ۱۰۰ میکرولیتر اسیداستیک+آب مقطر=۱۰۰	۵
۲	شستشو	با آب دوبار تقطیر	۲
۳	رنگ‌آمیزی (Staining)	۰/۱ گرم نیترات نقره+ آب مقطر=۱۰۰ سی‌سی حجم کل	۱۰
۴	شستشو	با آب دوبار تقطیر	۲
۵	ظاهر کردن	۱/۵ گرم سود+ ۵۰۰ میکرولیتر فرمآلدئید+آب مقطر=۱۰۰ سی‌سی حجم	تا ظاهر شدن باندها

۶	شستشو	کل با آب دوبار تقطیر	(Developing) (۱۵-۱۰ دقیقه) ۲

ج-۱-نکاتی در مورد محلول‌های رنگ‌آمیزی

محلول شماره یک، برای ثابت کردن باندها بر روی ژل به کار می‌رود.

در محلول شماره دو، نیترات نقره به قطعات DNA متصل می‌شود

- به خاطر وجود نیترات نقره محلول شماره دو سمی است.

در محلول شماره سه نیترات با سدیم جدا شده و اکسید نقره به قطعات DNA می‌چسبد که در ژل به رنگ سیاه دیده می‌شود. سود مورد استفاده باید سرد باشد. فرمآلدئید برای آشکار کردن استفاده می‌شود و درست قبل از استفاده به سود اضافه می‌شود و سعی گردد کاملاً با سود مخلوط شود. اشتشمام بخارات فرم‌آلدئید برای بدن مضر است؛ لذا برای استفاده این ماده باید توجه کافی شود.

تشتک رنگ‌آمیزی را از قبل با پنبه آغشته به الکل کاملاً تمیز می‌شود. صفحات شیشه‌ای را از تانک جدا و با استفاده از فاصله‌گذارها، دو صفحه شیشه‌ای از یکدیگر جدا گردیدل از شیشه‌ای که به آن چسبیده بود با کمک محلول شماره یک جدا و در داخل تشتک قرار گرفت و مراحل طبق جدول بالا انجام شد. پس از ظهور باندها و شستن ژل با آب مقطر، می‌توان ژل را با لایه نازک نایلونی پوشاند و چندین روز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری کرد.

Abstract

In order to study genetic diversity of walnut genotypes in Azadshahr, Iran, at first 102 genotypes of four walnut populations (Sayed Abad, Roodbar, Vamian and Kashikar) was assessed with 30 morphological traits (fruit length, fruit diameter, length, etc.). The result of description, analysis showed that there are a high diversity among genotypes in some of fruit traits such as kernel percent, fresh and kernel weight of fruits, fruit color, easy kernel separation. The highest average fruit weight (19.79g), observed in Ka17 and Va31 genotypes and Va31 has a highest kernel also (4.9 g). Kernel separation of the fruit in ROOD4 and Va34 genotypes was very easy and they have desirability of fruit flavors index (favorable). The clustering analysis on the base of morphological data, genotypes in five distances of cluster divided into eight groups. The fruit and kernel weights have an importance role in of clustering. Geographical populations in this cluster were largely inserted in separate categories. On the base of morphological study, 39 genotypes were selected among the genotypes as superior genotypes and genetic diversity of them were investigated by using ten microsatellite markers. In all, this primer was produced 74 polymorphic allele which their sizes ranged between 104 to 267 bp. The number of alleles per locus range from 3 to 11 with the average of 7.4 alleles. The minimum and maximum number of alleles, 3 and 11 alleles, was observed in the WGA005 and WGA054 loci, respectively. The number of effective allele range of 2.026 to 8.974 with the average of 5.80. Dendrogram of population cluster analysis were divided studied populations in two groups. The first group was included Sayed Abad and the second was included Roodbar, Vamian and Kashikar . Cluster analysis of walnut genotypes was made of seven categories. All genotypes collected in the Sayed Abad region were inserted in a cluster and remaining genotypes dispersed in other groups. The result of this study shows that there is a high genetic diversity of walnut in Azadshahr region that can be used by breeders in walnut breeding programs.

Keywords: Genetic diversity, Microsatellaite, Morphological characters, Walnut

University of Shahrood

Faculty : Agriculture

Thesis M.Sc

Study of genetic diversity among Azad Shahr Walnuts genotypes (*Juglans regia* L) using of microsatellite markers.

Fateme shamloo

Supervisor:

Dr. Mehdy Rezaei

Advisor

Dr. Abas biabani

MSc. Alireza khanahmadi

February 2015