بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده کشاورزی
پایان نامه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی
محصولات باغبانی

تهیه کلیدهای شناسایی مولکولی ژنوتیپ های برتر گردو با استفاده از نشانگر های SSR

نگارنده: فاطمه داودی

استاد راهنما:
دکتر مهدی رضایی

اساتید مشاور:
دکتر حسین حکم آبادی
دکتر پرویز حیدری

تیر ۱۳۹۷

شماره: ۱۲۷۰/د
تاریخ: ۱۳۹۷/۴/۱۹

باسمه‌تعالی

دانشگاه صنعتی شاهرود

مدیریت تحصیلات تکمیلی

فرم شماره (۳) صورتجلسه نهایی دفاع از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد

با نام و یاد خداوند متعال، ارزیابی جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد خانم فاطمه داودی با شماره دانشجویی ۹۴۰۷۱۹۴ رشته باغبانی گرایش بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی محصولات باغبانی تحت عنوان تهیه کلیدهای شناسایی مولکولی ژنوتیپ های برتر گردو با استفاده از نشانگرهای SSR که در تاریخ ۱۳۹۷/۴/۵ با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه صنعتی شاهرود برگزار گردید به شرح ذیل اعلام می گردد:

قبول (با درجه: ~~عالی~~ خوب) ☑ **مردود ☐**

نوع تحقیق: نظری ☐ **عملی ☑**

عضو هیات داوران	نام ونام خانوادگی	مرتبهٔ علمی	امضاء
۱ـ استادراهنمای اول	دکتر مهدی رضایی	استادیار	
۲- استاد مشاور اول	دکتر پرویز حیدری	استادیار	غایب
۳- استاد مشاوردوم	دکتر حسین حکم آبادی	استادیار	غایب
۴- نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر احمد رجایی	استادیار	
۵- استاد ممتحن اول	دکتر زیبا قسیمی حق	استادیار	
۶-ـ استاد ممتحن دوم	دکتر امین ابراهیمی	استادیار	

نام و نام خانوادگی رئیس دانشکده: دکتر محمد رضا عامریان

تاریخ و امضاء و مهر دانشکده:

وزارت علوم تحقیقات و فناوری
دانشکده کشاورزی

تبصره: در صورتی که کسی مردود شود حداکثر یکبار دیگر (در مدت مجاز تحصیل) می تواند از پایان نامه خود دفاع نماید (دفاع مجدد نباید زودتر از ۴ ماه برگزار شود).

تقدیم به:

به پاس عاطفه سرشار و گرمای امیدبخش وجودشان که در این سردترین روزگاران بهترین پشتیبان است

به پاس قلب های بزرگشان که فریادرس است و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت می گراید

و

به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند

این مجموعه را به پدر و مادرعزیزم تقدیم می کنم که عالمانه به من آموختند تا چگونه در عرصه زندگی ایستادگی را تجربه نمایم.

تشکر و قدردانی :

با تشکر فراوان از سه گروه مقدس:

آنان که ناتوان شدند تا ما به توانایی برسیم.....

موهایشان سپید شد تا ما رو سفید شویم.....

عاشقانه سوختند تا گرمابخش وجود ما و روشنگر راهمان باشند....

پدرم

مادرم

استادم

تعهد نامه

اینجانب فاطمه داودی دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی و ژنتیک مولکولی محصولات باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه تهیه کلیدهای شناسایی مولکولی ژنوتیپ های برتر گردو با استفاده از نشانگر های SSR تحت راهنمایی دکتر مهدی رضایی متعهد می شوم.

- تحقیقات در این پایان نامه 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 صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام (دانشگاه صنعتی شاهرود) و یا (Shahrood University of Technology) به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایانامه تاثیر گذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصولی اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، 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

امضای دانشجو

مالکیت نتایج حق نشر

کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، کتاب، برنامه های رایانه ای، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد. این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.

استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.

چکیده

بررسی تنوع ژنتیکی، ایجاد کلید شناسایی و معرفی ژنوتیپ‌های برتر گردو در ایران از اهمیت زیادی برخوردار است. از سال ۱۳۸۰ بذر ژنوتیپ‌های منتخب گردو از مناطق مهم گردو کاری ایران در کلکسیون گردوی مرکز تحقیقات سمنان (شاهرود) کشت گردید. از این نهال‌ها ۲۱ ژنوتیپ برتر با ویژگی‌های پومولوژیکی مناسب انتخاب شدند و بر روی دانهال‌های بذری پیوند شدند. در این پژوهش علاوه بر معرفی ویژگی‌های مورفولوژیکی و پومولوژیکی این ژنوتیپ‌ها، تنوع ژنتیکی آن‌ها با ۱۰ آغازگر ISSR و ۶ آغازگر SSR مورد بررسی قرار گرفت. در صفت های مهم وزن میوه و وزن مغز بیشترین میزان به ترتیب ۱۷/۵۰ و ۱۰/۳ گرم در ژنوتیپ OR23 مشاهده شد. میانگین درصد مغز گردوهای برگزیده ۵۱/۱۷ درصد بود. بیشترین میزان درصدمغز (۶۲/۷ درصد) در ژنوتیپ T12 مشاهده گردید. ازلحاظ ضخامت پوست چوبی ژنوتیپ‌های K26، T1، OR26، R2G8 میوه‌هایی با پوست ضخیم داشتند که میزان بازارپسندی را کاهش می‌دهد. از ۱۰ آغازگر ISSR در ۲۱ ژنوتیپ برتر گردو ۱۱۲ باند ایجادشده که ۱۰۲ تا از آن‌ها چندشکلی را نشان دادند و برای آنالیز تنوع ژنتیکی استفاده شدند. بیشترین تعداد باند در آغازگرهای UBC.826 و UBC.888 با ۱۴ باند مشاهده شد. بیشترین قدرت تفکیک‌کنندگی به میزان ۷/۷۱ در آغازگر UBC.826 و پس از آن در آغازگر UBC.887 مشاهده شد. ضریب تشابه بین ژنوتیپ‌ها از ۰/۵۱ تا ۰/۸۸ متغیر بود. دندروگرام تنوع ژنتیکی ۲۱ ژنوتیپ گردو رابه دو گروه اصلی و سه گروه فرعی تقسیم کرد. که تا حدود زیادی با نتایج حاصل از گروه بندی آنالیز به مؤلفه‌های اصلی تطابق داشت. از ۶ آغازگر SSR بطور کل ۳۲ آلل ایجاد شد که آغازگر WGA009 با ۸ آلل بیشترین تعداد را به خود اختصاص داد. کلید شناسایی بر اساس مکان ژنی میکروساتلایت برای ۲۱ ژنوتیپ گردو ایجاد شد.

کلمات کلیدی: گردو، تنوع ژنتیکی، کلید شناسایی، دندروگرام، میکروساتلایت

فهرست مطالب

فصل اول مقدمه ---------- ۱
۱-۱- مقدمه ---------- ۲
۱-۲-اهداف پژوهش حاضر ---------- ۳
فصل دوم کلیات ---------- ۵
۲-۱ پیشینه تاریخی ---------- ۶
۲-۲ مورفولوژی درخت گردو: ---------- ۶
۲-۳ گیاه‌شناسی ---------- ۷
۲-۴ تولید گردو در سطح جهانی ---------- ۱۰
۲-۵ سطح زیر کشت گردو در ایران ---------- ۱۲
۲-۶ ترکیبات و موارد استفاده گردو در صنایع مختلف ---------- ۱۳
۲-۷ اهمیت مطالعه‌ی گردو: ---------- ۱۳
۲-۸ تنوع ژنتیکی: ---------- ۱۴
۲-۹ کاربرد نشانگرهای مولکولی در تعیین تنوع ژنتیکی و ایجاد کلید شناسایی و اصلاح ارقام ---------- ۱۵
۲-۱۰-کلید شناسایی ارقام ---------- ۱۵
۲-۱۱ تعریف نشانگر ---------- ۱۶
۲-۱۲ انواع نشانگرها ---------- ۱۷
۲-۱۲-۱ نشانگرهای مورفولوژیکی: ---------- ۱۷
۲-۱۲-۲- نشانگرهای پروتئینی ---------- ۱۸
۲-۱۲-۳ نشانگرهای مولکولی ---------- ۱۹
۲-۱۲-۴ شاخص‌های نشانگر برتر ---------- ۲۰
۲-۱۳ ریز ماهواره‌ها ---------- ۲۱
۲-۱۳-۱ مزایا و معایب ریز ماهواره‌ها ---------- ۲۲
فصل سوم بررسی منابع مورفولوژیکی و مولکولی گردو ---------- ۲۳
فصل چهارم مواد و روش‌ها ---------- ۳۳
۴-۱ محل و روش نمونه‌برداری ---------- ۳۴
۴-۳مراحل استخراج DNA ---------- ۳۸
۴-۳-۱ نمونه‌گیری: ---------- ۳۸
۴-۳-۲ استخراج DNA ---------- ۳۸
۴-۴ تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده ---------- ۳۸
۴-۴-۲ روش نانودراپ ---------- ۳۸
۴-۴-۳ روش الکتروفورز در ژلاگارز ---------- ۳۹
۴-۵ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و اجزای آن ---------- ۴۰
۴-۵-۱ آغازگرها ---------- ۴۱

۴-۵-۳ بهینهسازی واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR) ---------- ۴۲
۴-۵-۴ چرخه حرارتی PCR ---------- ۴۲
۴-۵-۵ الکتروفورز با ژل آگارز متافور ---------- ۴۳
۴-۶ آنالیز دادهها ---------- ۴۳
فصل پنجم نتایج و بحث ---------- ۴۵
۵-۱ صفات مورفولوژیکی ---------- ۴۶
۵-۱-۱خصوصیات صفات کمی میوه ژنوتیپ ها ---------- ۴۶
۵-۱-۳ خصوصیات صفات کیفی ژنوتیپ ها ---------- ۴۹
۵-۱-۴ روابط بین صفات با داده های کیفی ---------- ۵۳
۵-۱-۵ تجزیه کلاستر مورفولوژیکی ---------- ۵۶
۵-۱-۶ آنالیز بای پلات ---------- ۵۸
۵-۲ تنوع ژنتیکی با مارکر ISSR ---------- ۵۹
۵-۲-۱ تنوع ژنتیکی و میزان خویشاوندی ژنوتیپ ها بر اساس دادههای ISSR ---------- ۶۱
۵-۲-۲ دندروگرام تنوع ژنتیکی با مارکر ISSR ---------- ۶۲
۵-۲-۳ تجزیه به مؤلفههای اصلی ---------- ۶۳
۵-۳ آنالیز مارکر SSR ---------- ۶۵
۵-۴ کلید شناسایی ---------- ۶۸
۵-۵ احتمال تفکیک بهوسیله ماکروستلایت ها ---------- ۷۰
۵-۷ نمودار احتمال شناسایی ۲۱ ژنوتیپ برتر گردو با والدین تصادفی در ۶ مکان ژنی SSR ---------- ۷۱
۵-۸ کلید شناسایی بر اساس مکان ژنی میکروساتلایت ---------- ۷۲
۵-۹ نتیجهگیری ---------- ۷۴
منابع ---------- ۷۷

فهرست جداول

جدول ۴-۱ کد ژنوتیپ‌ها و محل جمع آوری ژنوتیپ‌های انتخاب شده گردو ---------- ۳۶
جدول ۴-۲ صفات کمی و کیفی مورد بررسی در ۲۱ ژنوتیپ گردو ---------- ۳۷
جدول۴- ۳ اطلاعات مربوط به آغازگرهای ریزماهواره SSR---------- ۴۱
جدول ۴-۴ مشخصات نشانگرهای ISSR مورداستفاده---------- ۴۲
جدول ۴-۵ شرایط بهینه سازی برای PCR آغازگرهای ریز ماهواره---------- ۴۲
جدول ۴-۶ برنامه حرارتی برای تکثیر جایگاههای ریز ماهواره---------- ۴۳
جدول ۵-۱ صفات کمی اندازه گیری شده در ۲۱ ژنوتیپ گردو ---------- ۴۸
جدول ۵-۲ همبستگی بین صفات با داده های کمی در بین ۲۱ ژنوتیپ گردو---------- ۵۰
جدول ۵-۳ صفات کیفی مهم در ۲۱ ژنوتیپ برتر انتخابی از کلکسیون شاهرود---------- ۵۲
جدول۵-۴ داده های کیفی ۲۱ ژنوتیپ گردو در کلکسیون مرکز تحقیقات شاهرود ---------- ۵۳
جدول ۵-۵ همبستگی بین صفات کیفی در ۲۱ ژنوتیپ گردو---------- ۵۵
جدول ۵-۶ چندشکلی ایجادشده حاصل از آغازگرهای ISSR در ژنوتیپ‌های برتر گردو در ایران -------- ۶۱
جدول ۵-۷ تجزیه به مؤلفه‌های اصلی برای مارکر ISSR در ۲۱ ژنوتیپ گردو ---------- ۶۴
جدول ۵-۸ صفات به‌دست‌آمده از آغازگرهای SSR در ۲۱ ژنوتیپ گردو ---------- ۶۷
جدول ۵-۹ مکان ژنی ژنوتیپ های برتر گردو بر اساس ۶ مکان ژنی میکروساتلایت ---------- ۶۹
جدول ۵-۱۰ احتمال و بالاترین سطح احتمال تفکیک در ۶ آغازگر SSR---------- ۷۰
جدول ۵-۱۱ تفکیک ۲۱ ژنوتیپ گردو بر اساس ۳ مکان ژنی SSR ---------- ۷۳

فهرست شکل ها

تصویر ۲-۱: برخی ارقام مهم بین‌المللی گردو شامل: رقم سر (Serr)، رقم فرانکوت (Franquette)، مایت (Mayette)، پاریزین (Parisienne)، سجنو (Sejnovo)، هارتلی (Hartly)، پاین (Payne)، اشلی (Ashley)، سان لند (Sunland)، چیکو (Chico)، وینا (Vina)، هاوارد (Howard)، پدرو (Pedro)، چاندلر (Chandler)، ته هاما (Tehama)---------- ۸
تصویر۴-۱: نقشه شهرستان شاهرود و شهرهای همسایه آن ---------- ۳۴
تصویر ۴-۲ مناطق جمع‌آوری ژنوتیپ های برتر در کلکسیون شاهرود ---------- ۳۵
تصویر۴-۳ غلظت DNA استخراج شده از نمونه T12 توسط نانودراپ---------- ۳۹
تصویر۴-۴: نمایش کیفیت نمونه های استخراجی بر روی ژل آگارز---------- ۴۰
شکل ۵-۱ کلاستر تنوع مورفولوژیکی ۲۱ ژنوتیپ برتر گردو با استفاده از صفات کمی و کیفی ---------- ۵۷
شکل ۵-۲ بای پلات ۲۱ ژنوتیپ برتر گردو و میزان نزدیکی ژنوتیپ ها ---------- ۵۸
شکل ۵-۳- الگوی باندی DNA تکثیرشده از ۲۱ ژنوتیپ برتر گردو با آغازگر UBC.826 بروی ژل آگاروز متافور ---------- ۶۰
شکل ۵-۵- تجزیه به محورهای اصلی (PCoA) حاصل از ماتریکس تشابه ژنتیکی ۲۱ ژنوتیپ برتر گردو-- ۶۳
شکل ۵-۴- دندروگرام تنوع ژنتیکی ۲۱ ژنوتیپ برتر گردو با استفاده از ۱۰ آغازگر ISSR ---------- ۶۴
شکل ۵-۵- الگوی باندی DNA تکثیرشده از ۲۱ ژنوتیپ برتر گردو با آغازگر WGA009 بروی ژل آگاروز متافور ---------- ۶۷

فهرست نمودار ها

نمودار۲-۱ میزان تولید گردو در سطح جهان (مجتهد، ۱۳۹۵) ---------- ۱۱
نمودار۲-۲ کشورهای برتر تولید کننده گردو (مجتهد، ۱۳۹۵) ---------- ۱۱
نمودار۲-۳ میزان تولید مهمترین محصولات باغبانی در ایران (مجتهد، ۱۳۹۵) ---------- ۱۲
نمودار ۵-۱ شناسایی آلل ها به کمک ۶ مکان ژنی ---------- ۷۱
نمودار ۵-۲ احتمال شناسایی ژنوتیپ ها با والدین تصادفی در ۶ مکان ژنی SSR ---------- ۷۱

فصل اول

مقدمه

۱-۱- مقدمه

جنس *Juglance* شامل ۲۱ گونه است که تنها دو گونه *J. nigra* (گردوی سیاه) و *J. rejia* (گردوی ایرانی) به‌طور گسترده کشت و کار می‌شوند. این گونه ها از نظر اقتصادی درزمینه تولید چوب و میوه خشک اهمیت بسیار بالایی دارند (Manning, 1978; Stanford *et al*., 2000). گردو عمدتاً خود بارور و خودسازگار است که البته دایکوگامی از نوع پروتاندری نیز در آن مشاهده می‌شود (Atefi *et al*., 1993). منشأ اولیه گردو شرق ترکیه بیان شده است، گردو از این منطقه به شمال ایران، افغانستان، پاکستان، کوه‌های نپال و آسیای مرکزی گسترش یافته است (Mc Granahan *et al*., 1998). علاوه بر این شمال و جنوب آمریکا به‌عنوان منبع پراکنش گونه خاصی از گردو معرفی گردیده است (Aradhya *et al*., 2010). گردوی ایرانی ازجمله گونه‌های مهم است که پژوهش‌ها نشان داده است که اهلی شدن این گونه از کشورهای ایران و افغانستان آغاز شده است (Bayazit *et al*., 2007).

طبق گزارش فائو ایران ۱۰ درصد گردوی جهان را تولید می‌کند اما تنها یک درصد از صادرات جهانی را به خود اختصاص داده است. این صادرات کم در ازای این تولید بالا نشان‌دهنده عدم مرغوبیت و کیفیت بالای مغز و نات[1] است. همچنین عدم بسته‌بندی مناسب جهت ورود در بازارهای جهانی یکی از دلایل مهم عدم توفیق ایران در امر صادرات گردو است. عدم یکنواخی محصول به دلیل نداشتن رقم مشخص و همچنین نامطلوب بودن کیفیت میوه و مغز آن قدرت رقابت با کشورهای بزرگ صادرکننده این محصول را کاهش می دهد (سلیمانی و همکاران، ۱۳۸۸). ایران با تولید ۰/۴ میلیون تن گردو خشک به‌عنوان سومین تولیدکننده مهم گردو بعد از کشورهای چین و ایالات متحده آمریکا است (FAO, 2016). در جهت افزایش تولید و صادرات گردو نیاز به ارقام جدید و ذخیره ارقام قدیمی در بانک‌های ژن جهت بهره‌وری بیشتر در برنامه‌های اصلاحی است (Francesca *et al*., 2010). با توجه به اینکه گردو در زمینه‌های صنایع غذایی، چوبی اهمیت بالایی دارد ولی نقش دارویی آن به دلیل

[1] Nut

ظرفیت بالای آنتی‌اکسیدانی و اسیدهای چرب مفید به عنوان غذای مغز انسان اهمیت زیادی دارد (Rahimpanah *et al*., 2010).

اکثر ژنوتیپ‌های موجود در ایران بذری بوده و به روش جنسی تکثیر می‌شوند. بررسی ساختار ژنتیکی این ژنوتیپ ها جهت شناسایی، انتخاب و نگهداری ذخایر ژنی آن‌ها حائز اهمیت است (Vahdati, 2006). توجه به حفاظت و بهره‌برداری مناسب از منابع ژنتیکی و توسعه و ارتقا کمی و کیفی آن و نیز ثبت و حفظ حقوق مالکیت معنوی و مادی این گیاه ارزشمند امری ضروری است (مردی و همکاران، ۱۳۹۳). ایران به‌عنوان یکی از منابع غنی ذخایر ژنتیکی گردو در جهان محسوب می‌شود. بررسی تنوع ژنتیکی در این ذخایر جهت شناسایی و معرفی ژنوتیپ های برتر اولین گام در هر برنامه مرتبط با حفاظت و توسعه پایدار است(Karimi *et al*., 2010) .

۱-۲-اهداف پژوهش حاضر

با توجه به وجود ذخایر ژنتیکی بالای گردو در ایران و جایگاه استان سمنان در تولید گردو، بررسی تنوع ژنتیکی میان و درون ژنوتیپ های برتر انتخابی ایران و منطقه شاهرود اهمیت بسزایی دارد. همچنین یکی از معضلات مهم باغداران در خصوص احداث باغات تجاری و نهالستان‌ها، نامشخص بودن اصالت ژنتیکی ارقام کشت شده است. شناسایی ارقام باغی در سال‌های اولیه رشد و تا زمانی که درختان ببار ننشسته‌اند امری دشوار است و گاهی همین موضوع باعث تحمیل خسارات جبران‌ناپذیری بر باغدار می‌شود. از سوی دیگر وجود باغ‌های قدیمی، عدم دسترسی به باغ‌های استاندارد مادری، عدم آشنایی کافی تولیدکنندگان نهال و رشد فزاینده نیاز به تولید نهال از مهم‌ترین مشکلات پیش روی باغبانی کشور است (مردی و همکاران، ۱۳۹۳).

بنابراین تعیین منشأ ژنتیکی ارقام نه‌تنها از جنبه‌های احداث باغ بلکه از نظر شناسایی روابط خویشاوندی برای شناسایی و جمع‌آوری ارقام بومی درختان میوه اولین گام در مسیر برنامه‌های

اصلاحی به شمار می‌آید و عدم اطلاع متخصصان اصـلاح از خصوصیات ژنتیکی گیاهان موجب می‌شود که کـار بـه نـژادی بـا کندی صورت گیرد. در کشور ما به دلیل نبود شناخت در مورد ژن‌های مطلوب و ژرم پلاسم گیاهی برنامه‌های اصلاحی درخور تـوجهی بـر روی محصولات باغی به‌خصوص درخت گـردو انجام نشده اسـت؛ بنابراین می‌توان با شناسایی خصوصیات ژنوتیپ‌ها و ارقـام مختلـف، ژن‌های مطلوب و مورد نیاز محققان اصلاح و بهنژادی را در دسترس آن‌ها قرار داد. همچنین با بررسی خزانه-ژنی موجود در منطقه اقدام به انتخاب ژنوتیپ‌های مقاوم، سـازگار، پـر محصـول و با کیفیت میـوه (ژنوتیپ‌های برتر) در شرایط آب و هوایی مورد آزمایش نمود و آن‌ها را برای تکثیر و احداث باغات جدید در اختیار باغداران قرار داد (عطار و همکاران، ۱۳۹۶). از دیگر اهداف پژوهش حاضر بررسی صفات مورفولوژیکی و پومولوژیکی در ۲۱ ژنوتیپ انتخابی است. از سوی دیگرشناسایی روابط ژنتیکی ژنوتیپ های منطقه شاهرود با دیگر ژنوتیپ ها و ایجاد کلید شناسایی برای هر ژنوتیپ است.

فصل دوم

کلیات

۲-۱ پیشینه تاریخی

طبق بررسی‌های دیرین‌شناسی گیاهی و گرده‌شناسی درروی کره‌ی زمین، گونه‌های مختلف گردو از زمان‌های بسیار قدیم به‌ویژه از دوران سوم زمین‌شناسی وجود داشته است. از دوران چهارم زمین‌شناسی به بعد آثار درخت گردو ازجمله گرده‌ی آن در کشورهای اروپای شرقی به‌دست آمده است. تاریخچه پرورش گردو به زمانه‌ای بسیار دور و نامعلوم برمی‌گردد، گفته می‌شود که گردو در باغ شاه سلیمان پرورش داده شده است. در ایران قدیم گردو در معامله پایاپای بکار برده می‌شد که از این طریق به کشورهای مصر، ایتالیا و حتی کشورهای اروپائی و دنیای جدید انتشار یافته است. پایه‌های وحشی گردوی ایرانی در منطقه کوه‌های کارپاتیان[1] در شرق اروپا، سرتاسر ترکیه، عراق، ایران، روسیه جنوبی و افغانستان تا شمال غربی هیمالیا یافت شده است؛ بنابراین می‌توان گفت منشأ گردو ایران و مناطق اطراف آن است که سپاه اسکندر در بازگشت خود آن را به اروپا برده است (خسروی، ۱۳۹۰).

۲-۲ مورفولوژی درخت گردو:

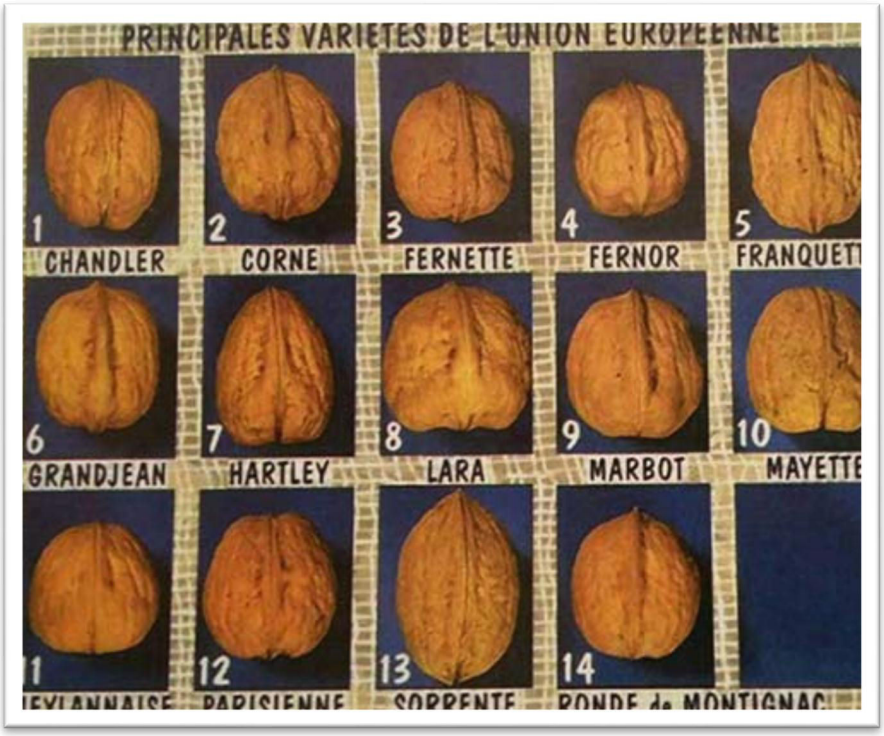
گردو درختی زیبا و سایه‌افکن بوده که عمری طولانی دارد و از گیاهان دولپه‌ای است که از برگ‌هایی مرکب و برگچه‌های فرد و بزرگ تشکیل شده است. گردو نیازمند مناطق معتدله با تابستان خنک است البته یک‌گونه‌ای از گردو بنام پکان در مناطق گرمسیری رشد می‌کند (Reid, 2010). گل‌های نر و ماده جدا از هم ولی روی یک درخت قرارگرفته‌اند که به اصلاح به آن تک‌پایه[2] می‌گویند (Mc Granahan *et al*., 1987). گل نر به صورت جانبی روی شاخه‌های یک‌ساله و به‌صورت منفرد و بدون دمگل روی گل‌آذین دم‌گربه‌ای[3] یا شاتون قرار می‌گیرد. هر گل نر دارای ۷ الی ۵۰ عدد پرچم است و گل ماده در انتهای شاخه سال جاری قرار می‌گیرد گل ماده دارای چهار کاسبرگ بوده که به اصلاح تترامر است. جوانه‌های گل گردو از نوع مختلط بوده یعنی پس از رشد گل و برگ تولید

[1] Carpatian mountains
[2] monoecious
[3] catkin

می‌کنند. برگ در این‌گونه از نوع شانه‌ای فرد بوده و متقابل است میوه در گردو از نوع فندقه ناشکوفا است و در بعضی از منابع میوه شفت نیز نامیده شده است (بدر زاده، ۱۳۸۶). سنبله گل‌های نر آن حالت آویخته دارد ولی گل‌های ماده آن دارای وضع قائم بر روی شاخه‌ها است. هر گل نر آن دارای پوششی مرکب از ۳ تا ۴ قطعه فلس مانند است که تعداد زیادی پرچم را از خارج فرا می‌گیرند در وسط پرچم‌ها نیز معمولاً اثر مادگی رشد نیافته دیده می‌شود. مجموعه گل‌های ماده درخت گردو هیچ وقت از ۲ تا ۴ تجاوز نمی‌کند. هر گل ماده آن دارای پوششی کوچک از خارج است این پوشش همراه با زوائد بزرگ و کوچک زیر گل (براکته و براکتئول) به تخمدان پیوسته است. گل‌های ماده، مادگی دو برچه‌ای دارند که مجموعاً تخمدانی یک‌خانه و به وضع تحتانی به وجود می‌آورند. قسمت آزاد مادگی نیز به دو کلاله پهن و دور از هم ختم می‌شود. میوه آن شفت مانند و دارای میان‌بر گوشتی و محتوی مواد تلخ است. میان‌بر گوشت‌دار میوه، فقط در گردوی تازه که همه قسمت‌های میوه را در بردارد، دیده می‌شود درون‌بر گردو، سخت و شکننده است و درون آن دانه مرکب از ۲ لپه حجیم با اندوخته فراوان از مواد روغنی، جای دارد. دوران بلوغ درخت گردو رابطه مستقیم با نوع نژاد، آب‌وهوا و مکان رشد آن دارد. این دوره بین ۳ تا ۲۰ سال به طول می‌انجامد و سپس دوران باردهی آغاز می‌گردد که در دهه پنجم و ششم عمر درخت به اوج خود می‌رسد (جلیلی مرندی، ۱۳۸۴).

۲-۳ گیاه‌شناسی

گردو با نام علمی Juglans از خانواده‌ی Juglandaceae است. نام علمی این جنس از کلمه لاتین Jovis-Glans به معنی فندق ژوپیتر گرفته شده است (خسروی، ۱۳۹۰). معروف‌ترین گونه‌های گردو، گردوی سیاه (*J. nigra*) متعلق به شرق آمریکا و گردوی ایرانی (*J. rejia*)که بومی بالکان در جنوب شرقی اروپا مرکزجنوب غربی آسیا تا هیمالیا و ایران است. (درویشیان، ۱۳۷۶).



تصویر ۲-۱: برخی ارقام مهم بین‌المللی گردو شامل: رقم سر (Serr)، رقم فرانکوت (Franquette)، مایت (Mayette)، پاریزین (Parisienne)، سجنو (Sejnovo)، هارتلی (Hartly)، پاین (Payne)، اشلی (Ashley)، سان لند (Sunland)، چیکو (Chico)، وینا (Vina)، هاوارد (Howard)، پدرو (Pedro)، چاندلر (Chandler)، ته هاما (Tehama)

گردوهایی که در نقاط گردو خیز ایران کاشته شده‌اند از گونه گردوی معمولی هستند. رقم‌های این گونه از نظر باغبانی هنوز کاملاً مشخص نشده‌اند. این گردوها در نقاط مختلف ایران با نام‌های گوناگون محلی نامیده می‌شوند. باوجود تفاوت‌های ظاهری، ممکن است برخی از انواع، رقم واحدی باشند ولی نام‌های گوناگون داشته باشند. همانطور که در تصویر ۲-۱ آمده است ارقام خارجی معروف گردو با کیفیت بالا نمایش داده شده است تعداد محدودی رقم نیز از طریق دورگ‌گیری به دست آمده و معرفی شده اند که می توان به رقم سر[1] اشاره کرد که از طریق تلاقی رقم پاین[2] با ژنوتیپ PI159568 به‌دست آمده است. هارتلی[3] در حال حاضر نیز یکی از مهم‌ترین واریته‌های کشت شده در ایالت کالیفرنیا است. عملکرد درخت بالغ هارتلی خیلی خوب است اما کمتر از چندلر بار می‌دهد، زیرا تنها ۵

[1] serr
[2] payne
[3] Hartly

تا ۱۱درصد باردهی جانبی دارد. مهم‌ترین ویژگی این رقم داشتن میوه‌های درشت با مغز سفید رنگ، طعم خوب و پیش‌رس است. شهرت رقم هارتلی به سبب مغز روشن، عدم حساسیت به بلایت و کرم سیب و عملکرد بالای آن است. چندلر[1] از تلاقی رقم پدرو[2] با ژنوتیپ uc56-224 به‌دست آمده است که دارای عملکرد بالایی بوده و گلدهی آن به صورت جانبی است به طوری که ۸۶ درصد جوانه‌های جانبی به گل تبدیل می‌شوند در بررسی‌های انجام شده در ایران این رقم بیشترین مقاومت را به سرمای زمستانه در بین ارقام و ژنوتیپ‌های بررسی شده نشان داده است گردوی چندلر دیررس بوده و به همین دلیل با پوست به بازار عرضه می‌شود (مجتهد، ۱۳۹۵). اما مهم‌ترین انواع گردو که در ایران کاشته می‌شوند عبارت‌اند از: گردوی کاغذی، سنگی، ماکویی، سوزنی، نوک کلاغی، ضیاآبادی، خوشه‌ای، سبزوار، آمیخته خراسان، مازندران (خوشخوی، ۱۳۸۳).

گردو نیاز به خاک با اسیدیته خنثی و زهکشی خوب دارد زیرا به شدت به غرقابی حساس است. گردو نیاز به فصل رشد طولانی دارد و اگر دمای هوا بیش از ۳۵ درجه سانتی‌گراد شود مغز گردو سیاه می‌شود. نیاز سرمایی گردو ۷۰۰ تا ۱۵۰۰ ساعت دمای زیر ۷ درجه سانتی‌گراد است. آبیاری درختان گردو نقش زیادی در کیفیت و رنگ میوه دارد حساس‌ترین مرحله نیاز آبی گردو زمان تشکیل میوه تا زمان پر شدن مغز میوه است اگر در این مرحله آب مورد نیاز درخت فراهم نشود چروکیدگی مغز، کاهش درصد پر شدن مغز و تولید میوه‌هایی با مغز تیره و کاهش کیفیت بازارپسندی قابل مشاهده است (جلیلی مرندی،۱۳۸۴).

گرده‌افشانی گردو به‌وسیله باد انجام می‌شود، باران و رطوبت زیاد عمل گرده‌افشانی را متوقف می‌کنند. گردو می‌تواند تحت اثر زنیا[3] و متازنیا[4] قرار بگیرد یعنی دانه گرده می‌تواند در کیفیت مغز گردو و میزان اسید چرب آن تأثیر داشته باشد. این پدیده در گرده‌افشانی گردوی ایرانی با گردوی سیاه نیز

[1] Chandler
[2] Pedro
[3] xenia
[4] metaxenia

ثابت شده است (راحمی، ۱۳۹۰). در ایران نیز ارقام گرده زا Z63 با نام جمال و Z30 با نام دماوند شناسایی شده است و در سطح وسیع و در باغات تجاری مورد استفاده قرار می‌گیرد (مجتهد، ۱۳۹۵). ازآنجاکه از اسم گردوی ایرانی هم برمی‌آید خاستگاه این گردو در ایران بوده و ایران قدیمی‌ترین درختان گردو را نیز در خود جای داده است. از گذشته تنها راه تکثیر گردو از طریق بذر بوده که این موضوع کیفیت مغز گردو را در سطح پایینی قرار داده است امروزه روش پیوند برای تکثیر بهترین رقم‌ها بکار گرفته می‌شود اما با توجه به اینکه در گردو روش پیوند مشکل بوده به دلیل خروج ماده‌ی ژوگلون از محل پیوند که نوعی فنل مرکب است و باعث عدم گیرایی پیوند می‌شود به همین دلیل عموماً از پیوند وصله‌ای و پیوند شکمی معکوس استفاده می‌کنند (گریگوریان، ۱۳۸۱).

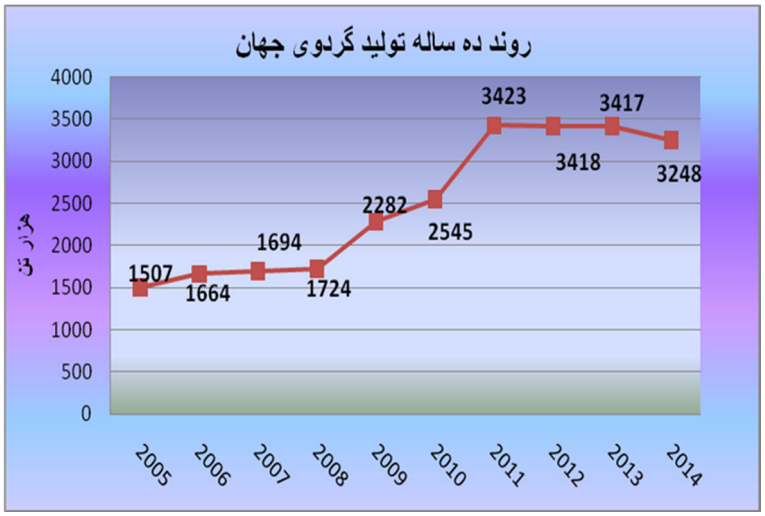
در حال حاضر یکی از مهمترین آفات گردو کرم خراط یا پروانه فری و کرم سیب است. کرم خراط به درختان ضعیف که غالبا با مشکلاتی چون کم آبی یا تغذیه نامناسب و ناکافی روبرو هستند خسارت بیشتری وارد می‌کند. مبارزه با آفات و بیماری ها در درختان گردو به علت بزرگ بودن این درختان مشکل است، زیرا سمپاشی تمام درخت به سختی انجام می‌گیرد. کاشت درختان پیوندی، استفاده از پایه های پاکوتاه کننده، تربیت و هرس و انتخاب ارقام با باردهی جانبی سبب کاهش اندازه درخت شده و سمپاشی و برداشت میوه را آسانتر می‌کند (مجتهد، ۱۳۹۵).

۲-۴ تولید گردو در سطح جهانی

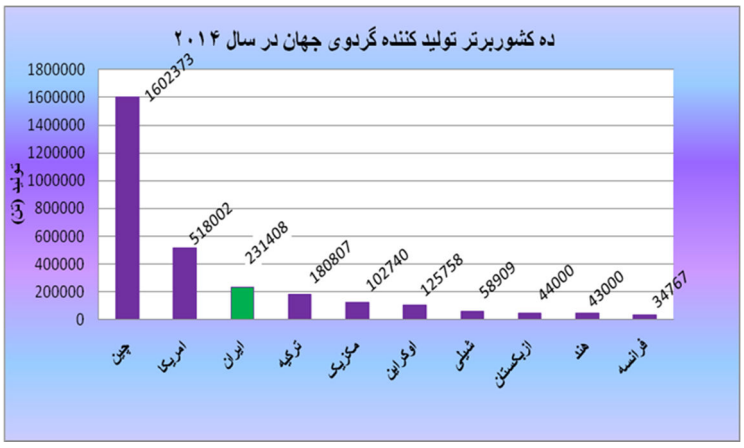
با توجه به نمودار ۲-۱ که تولید گردو در سطح جهانی را نشان میدهد در سال ۲۰۱۱ تولید یک جهش یک میلیون تنی داشته است. در سال ۲۰۱۰ تولید گردو در سطح جهانی ۲۵۴۵۰۰۰ تن بوده ولی در سال ۲۰۱۱ با افزایش چشمگیر ۳۴۲۳۰۰۰ تن روبرو بوده است اما در این نمودار روند نزولی تولید گردو در جهان دیده می‌شود بطوریکه در سال ۲۰۱۴ این مقدار به ۳۲۴۸۰۰۰ رسیده است که

در جهت متوقف کردن این سیر نزولی ایجاد ژنوتیپ های برتر و برنامه های مدیریت و پرورش در دست اقدام قرار گرفته است (مجتهد، ۱۳۹۵).

چین با جمعیت میلیاردی خود توانسته بالاترین میزان تولید گردو را در میان ۱۰ کشور اول تولید این محصول به خود اختصاص دهد (نمودار۲-۲). کشورهای آمریکا و ایران و ترکیه کشورهای دوم تا چهارم این نمودار قرار گرفته اند. ایران با تولید ۲۳۱۴۰۸ تن تولید فاصله‌ی نسبتا زیادی با تولید کنندگان اول و دوم دارد. کشور فرانسه با تولید ۳۴۷۶۷ تن آخرین کشور در میان ده کشور برتر جهان قرار گرفته است (مجتهد، ۱۳۹۵).



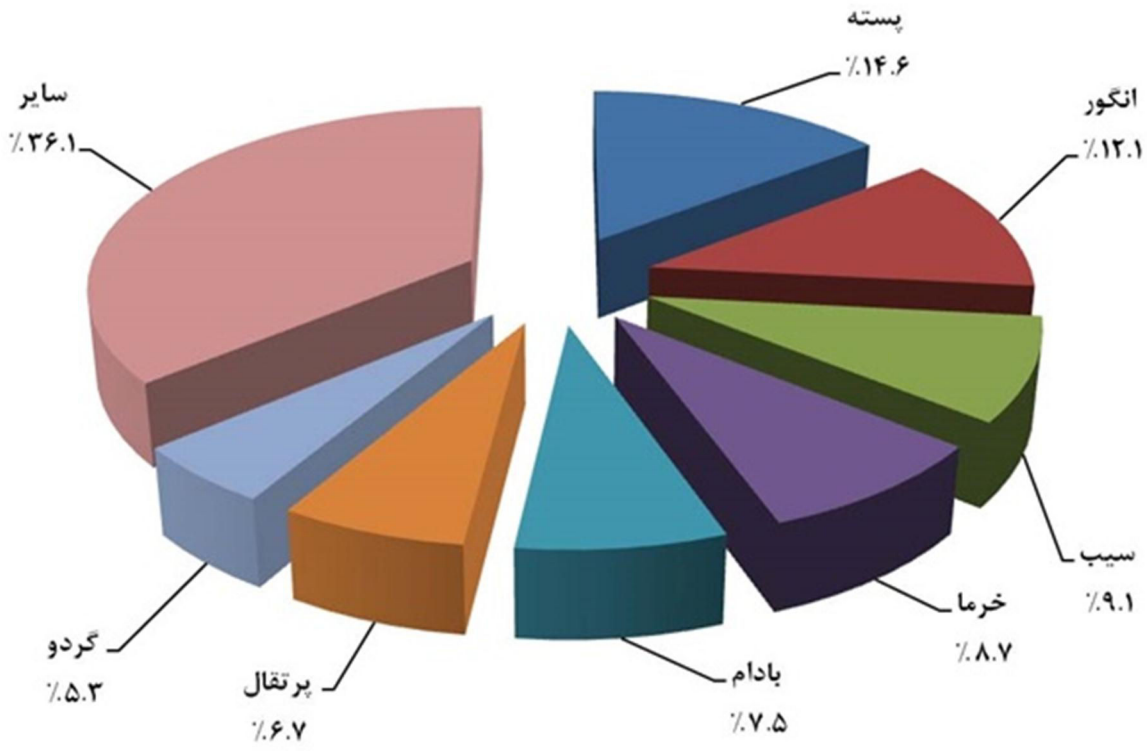
نمودار۲-۱ میزان تولید گردو در سطح جهان (مجتهد، ۱۳۹۵)



نمودار۲-۲ کشورهای برتر تولید کننده گردو (مجتهد، ۱۳۹۵)

۲-۵ سطح زیر کشت گردو در ایران

طبق گزارش مدیرکل دفتر میوه‌های سردسیری وزارت جهاد در سال ۹۴ ایران با تولید سالانه ۲۲۲ هزار تن گردو در جهان رتبه سوم تولید این محصول را دارد سطح زیر کشت گردو در کشورمان در حال حاضر حدود ۱۴۰ هزار هکتار است که ۱۱۰ هزار هکتار آن بارور و ۳۰ هزار هکتار آن غیر بارور است (آمارنامه جهاد کشاورزی، ۱۳۹۵). با توجه به نمودار ۲-۳ که میزان تولید مهمترین محصولات باغبانی را نمایش می‌دهد می‌توان جایگاه گردو را در میان ۶ محصول برتر با مقدار ۵/۳٪ مشاهده کرد.



نمودار۲-۳ میزان تولید مهمترین محصولات باغبانی در ایران (مجتهد، ۱۳۹۵)

عملکرد تولید گردو از هر هکتار در کشور حدود ۲ تن است درحالی‌که متوسط عملکرد هر هکتار گردو در جهان ۳ تن است. قسمت عمده گردوی تولیدی در کشور به مصرف داخل می‌رسد. بر اساس آخرین آمار گمرک در سال ۹۳ میزان صادرات گردو ایران در این سال حدود ۲ هزار تن بوده و

کشورهای مقصد آن امارات، عراق، ترکیه و ... است. استان همدان با تولید حدود ۳۶ تن در سال رتبه اول تولید این محصول را در کشور دارد و بعد ازآن استان‌های فارس و کردستان در رتبه دوم و سوم تولید این محصول قرار دارند (مجتهد، ۱۳۹۵).

۲-۶ ترکیبات و موارد استفاده گردو در صنایع مختلف

مغز گردو دارای چند اسید آلی، مقدر کمی اسانس، اگزالات آهک و ویتامین‌های A,B,C,D,E است. همچنین مغز گردو دارای مقدر کمی (۱۲٪) آرسنیک است. برگ درخت گردو دارای ۳ درصد اینوژیت، اسید الاژیک، اسید گالیک و اسانسی با بوی مخصوص و مقدری پارافین، تانن، مواد چرب و املاح معدنی مانند کلسیم، پتاسیم، منیزیوم، باریوم و همچنین کاروتن است. پوسته گوشت دار میوه سبز گردو دارای امولسیون، قند و اسیدهای آلی مانند اسیدسیتریک، اسید مالیک، فسفات‌ها و اگزالات کلسیم است. کیفیت فیزیکی، مکانیکی و تکنولوژیکی چوب گردو در درجه‌ی عالی است (مجتهد، ۱۳۹۵).

در روی چوب گردو گاهی غده‌ها و گره‌های بزرگ و کوچکی از مجموع گره‌های کوچک به وجود می-آید که به‌اصطلاح بروسن یالپ نامیده می‌شود و برش آن‌ها نقش و نگار زیبا به وجود می‌آورد که ارزش فراوانی در صنایع تزئیناتی چوب و دکوراسیون دارد. این قسمت از چوب گردو به‌قدری گران‌بهاست که حتی کیلویی خرید و فروش می‌شود. یکی دیگر از مصارف عمده‌ی چوب گردو تهیه‌ی فرش‌های چوبی (پارکت چوب گردو) است که در اروپا و در ایران بسیار متداول است. به‌ویژه به‌صورت پارکت موزاییک از آن استفاده می‌شود (مجتهد، ۱۳۹۵).

۲-۷ اهمیت مطالعه‌ی گردو:

درخت گردو یک درخت باارزش و سرمایه‌ای گران‌بها است بنابراین مطالعه و شناخت گردو می‌تواند ما را در جهت تکثیر و گسترش رقم‌های باکیفیت سوق دهد و از سوی دیگر می‌تواند به ما در

بهبود کیفیت درخت و افزایش باروری با ایجاد رقم‌های جدید کمک کند تا ما هم بتوانیم وارد عرصه صادرات جهانی شویم و رتبه خود را هم در بخش تولید و هم در بخش صادرات در بالاترین میزان قرار دهیم (مردی و همکاران، ۱۳۹۳).

۲-۸ تنوع ژنتیکی:

تنوع ژنتیکی جزء بنیادی تنوع زیستی است و در افراد داخل یک جمعیت و یا جمعیت‌های مختلف یک‌گونه بیانگر وضعیت تکاملی آن‌گونه است. به‌طورکلی زیاد بودن تنوع ژنتیکی در یک‌گونه امکان انجام برنامه‌های اصلاحی در آن‌گونه را بیشتر می‌کند (موسوی و همکاران، ۱۳۸۹).

تنوع ژنتیکی اساس اصلاح درختان است که از تنوع طبیعی ناشی شده است و از اجزای مهم پایداری نظام‌های بیولوژیکی است. ارزیابی تنوع ژنتیکی در گیاهان برای برنامه‌های اصلاح و حفاظت از ذخایر توارثی کاربرد حیاتی دارد همچنین از تنوع ژنتیکی در گونه‌های گیاهی برای انتخاب نژادهای والدینی در جهت حصول هیبریدهای مناسب و پیش‌بینی بنیه هیبرید به‌ویژه در محصولاتی که هیبرید آن‌ها ارزش تجاری بالایی دارد مهم است (Xiao *et al*., 1996). مطالعات مختلف حاکی از آن است که تولیدات غذایی جهان تا سال ۲۰۲۵ باید دو برابر شود تا جوابگوی نیازهای جمعیت رو به رشد باشد. با توجه به محدودیت اقلیمی برای توسعه زمین‌های زیر کشت این مقدار غذا باید از زمین‌های موجود و با استفاده از نهاده‌های کمتر به دست آید (بابا جانپور و همکاران، ۱۳۹۰). به‌طورکلی اولین مرحله در بهبود ژنتیکی گیاهان شناسایی ژرم پلاسم، بررسی تنوع ژنتیکی موجود در آن و نهایتاً تشخیص ژنوتیپ های برتر درزمانی کوتاه است (Delseny *et al*., 2001).

قبل از انجام هر کار اصلاحی شناخت تنوع ژنتیکی و پتانسیل ژنتیکی هرگونه گیاهی امری ضروری و لازم است و وجود تنوع ژنتیکی در کارهای اصلاحی به‌عنوان یک برتری تلقی می‌شود (احتشام نیا و همکاران، ۱۳۸۸). در شیوه سنتی، ارزیابی تنوع ژنتیکی بر اساس خصوصیات فنولوژیک و مورفولوژیک

صورت می‌گیرد این روش زمان‌بر بوده و به‌خصوص در مورد درختان میوه تعدادی از صفات تحت تأثیر تغییرات محیطی قرار می‌گیرد. روش‌های مولکولی فرصت جدیدی برای توصیف ژنتیکی ارقام و ژنوتیپ های گیاهی فراهم کرده است (مردی و همکاران، ۱۳۹۳). روش‌های مختلفی برای بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین قرابت ژنتیکی بین ارقام و توده‌های گردوی اروپایی و آسیایی و شناسایی ارقام تجاری گردو با استفاده از شاخص‌های مورفولوژیک و نشانگرهای مولکولی وجود دارد (عطار و همکاران، ۱۳۹۶).

۲-۹ کاربرد نشانگرهای مولکولی در تعیین تنوع ژنتیکی و ایجاد کلید شناسایی و اصلاح ارقام

روش‌های کلاسیک تخمین تنوع ژنتیکی بین گیاهان بر پایه خصوصیات ریختی استوار بوده ولی این خصوصیات تحت تأثیر فاکتورهای محیطی قرار می‌گیرند (Ford-Lloy and Painting 1996). امروزه با استفاده از نشانگرهای مولکولی، روش‌های شناسایی و تشخیص تنوع ژنتیکی، ابعاد جدیدتری یافته و دقیق‌تر شده است از طرفی دیگر این نشانگرها در شناسایی گونه‌ها و ارقام، تخمین تنوع زیستی و اصلاح ارقام کاربرد دارند (Williams *et al*., 1993).

ظهور تکنولوژی نشانگرهای DNA، به متخصصین و به نژاد گران گیاهی کمک کرد تا بر بسیاری از این مشکلات انتخاب فائق آیند. این نشانگرها بر پایه تفاوت در ترادف‌های نوکلئوتیدی عمل می‌کنند و امروزه استفاده از آن‌ها بسیار رایج شده است (Ebrahimi *et al*., 2011).

۲-۱۰-کلید شناسایی ارقام

شناسایی، حفاظت و استفاده از منابع ژنتیکی به‌عنوان یکی از ارزشمندترین ثروت‌های ملی هر کشور از اهمیت خاصی برخوردار است. گردوی ایرانی یکی از منابع ارزشمند گیاهی جهان و به‌ویژه ایران است، چراکه ایران با در برگیری بخش زیادی از ناحیه آسیای میانه به‌عنوان مرکز تنوع و

پیدایش بسیاری از گونه‌های زراعی- باغی به‌ویژه گونه گردوی ایرانی، صاحب‌امتیاز خاصی در این زمینه است (Forde *et al*., 1975).

وجود تنوع ژنتیکی بالا در میان ژنوتیپ ها و جمعیت‌ها و نامشخص بودن اصالت ژنتیکی ارقام کشت‌شده در منطقه شناسایی ژنوتیپ را دشوار کرده است. علی‌رغم اینکه اغلب محصولات باغبانی جز مهم‌ترین محصولات صادراتی هستند اما هیچ‌گونه شناسنامه دقیقی برای تعیین اصالت ژنتیکی در کشور وجود ندارد (مردی و همکاران، ۱۳۹۳). درگذشته روش شناسایی ارقام مبتنی بر خصوصیات مورفولوژیک برگ، میوه، هسته و مغز استوار بود ولی جز در موارد خاص استفاده از صفات مورفولوژیک و بیوشیمیایی به‌تنهایی برای شناسایی ارقام کافی نیست و نتایج واضح و روشنی را ایجاد نمی‌کند زیرا ویژگی‌های مورفولوژیکی تحت تأثیر شرایط محیطی مختلف تغییراتی را بروز می‌دهند (Kumar., 1999).

با کمک کلیدهای شناسایی، ارقام به‌راحتی شناسایی می شوند و در کارهای اصلاحی و برنامه‌های پرورش و ایجاد انواع ژنوتیپ برتر و جدید مشکلات به حداقل می‌رسند زیرا اولین گام در هر کار اصلاحی شناسایی ارقام است.

۲-۱۱ تعریف نشانگر

بر اساس تعریفی که استنزفلد[1] در ۱۹۸۶ ارائه داد، واژه نشانگر معمولاً برای نشانگر لوکاس به کار می‌رود. هر ژنی جایی در طول کروموزوم به نام لوکاس دارد. ژن‌ها می‌توانند از طریق جهش به چندین شکل متفاوت تبدیل شوند که آلل (شکل‌های آللی) نامیده می‌شوند. تمامی شکل‌های آللی یک ژن در یک جایگاه در کروموزوم‌های هومولوگ قرار می‌گیرند. هنگامی‌که شکل‌های آللی یک لوکاس یکسان باشند، گفته می‌شود که ژنوتیپ، هوموزایگوت (در این لوکاس) است، درحالی‌که شکل‌های آللی متفاوت، هتروزایگوت را ایجاد می‌نمایند. در موجودات دیپلویید، ژنوتیپ با دو شکل آللی

[1] stansfold

کروموزوم‌های هومولوگ ایجاد می‌گردد؛ بنابراین نشانگرهای مولکولی شامل تمامی نشانگرهای لوکاس‌های مربوط به DN می‌باشند که می‌توانند بیوشیمیایی یا مورفولوژیک نیز باشند (Weising *et al.*, 2012)

۲-۱۲ انواع نشانگرها

در سه دهه گذشته با به‌کارگیری روش‌های مولکولی راهبردهای متداول برای ارزیابی تنوع ژنتیکی به‌طور فزاینده‌ای کامل شده است امروزه با به‌کارگیری فناوری نشانگر مبتنی بر چندشکلی‌ها در سطح پروتئین‌ها و یا DNA تحقیقات و بررسی‌ها درزمینه بسیاری از شاخه‌های علمی مانند فیلوژنی، رده‌بندی، بوم‌شناسی، ژنتیک، اصلاح نبات و دام بسیار تسریع شده است (Weising *et al.*, 2012).

۲-۱۲-۱ نشانگرهای مورفولوژیکی:

نشانگرهای مورفولوژیک[۱] 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 به‌عنوان نشانگر ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرند که بیان آن‌ها در طیف وسیعی از محیط‌های مختلف تکرارپذیر باشد (Dvorak *et al.*, 1998). البته تشخیص این‌که آیا این تنوع ناشی از اثرات محیطی است یا تحت تأثیر تفاوت‌های ژنتیکی میان گونه‌های گیاهی قرار دارد تا حدودی دشوار است. آن دسته از صفات مورفولوژیکی که تنها به‌وسیله یک مکان ژنتیکی کنترل می‌شوند ممکن است به‌عنوان نشانگرهای ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرند، زیرا تظاهر این دسته از صفات حتی در شرایط محیطی متفاوت نیز نسبتاً ثابت است (Kumar, 1999). در ۲۰ تا ۳۰ سال گذشته، اغلب ژن‌ها و یا نشانگرهای مورد استفاده در مطالعه ژنتیک گیاهان عالی، تک ژن‌هایی بوده‌اند که روی صفات ظاهری مؤثر بودند. به‌عنوان مثال ژن‌هایی که باعث تولید ریشک در غلات، پاکوتاهی، نقص‌های کلروفیلی، رنگ گل و صافی و چروکیدگی سطح دانه نخودفرنگی می‌شوند ازجمله نشانگرهای

[۱]- ریخت‌شناسی

مورفولوژیکی محسوب می‌گردند. این نشانگرها اغلب معرف ژن‌های ساختاری‌اند و در تهیه نقشه‌های ژنتیکی در موش، مگس سرکه، گوجه‌فرنگی، گندم و غیره مورد استفاده قرارگرفته‌اند. این نشانگرها معمولاً به‌راحتی قابل مشاهده‌اند و کمک زیادی به مطالعات و تحقیقات پایه‌ای نموده‌اند. اگرچه نشانگرهای مورفولوژیکی ممکن است به‌عنوان معیارهایی در پیش‌بینی واکنش ژنتیکی به‌گزینش مفید باشند اما تحت تأثیر عوامل دیگری نیز قرار می‌گیرند (Pop *et al*., 2013).

ارزیابی این صفات معمولاً کم هزینه و آسان است اما عوامل متعدد نامطلوبی با نشانگرهای مورفولوژیکی مرتبط هستند. اولین عامل وابستگی بالای این صفات به شرایط محیطی است و در برخی موارد مانند رنگ گل، ارزیابی آن‌ها، در مراحل اولیه نمو غیرممکن است. اغلب شرایطی که گیاهان در آن رشد می‌کنند، می‌تواند تظاهر این نشانگرها را تحت تأثیر قرار داده و منجر به ارزیابی-های نادرست شود نهایتاً انجام آزمایش‌های اصلاحی به کمک این نشانگرها زمان‌بر بوده و نیازمند نیروی کار زیاد، جمعیت‌های بزرگ گیاهی و نیز فضای زیاد (زمین و یا گلخانه) به‌منظور پرورش آن‌ها است. در مجموع درصورتی‌که این صفات از توارث پذیری بالایی برخوردار باشند نشانگرهای مورفولوژیکی یکی از گزینه‌های مناسب در مطالعات تنوع ژنتیکی به شمار می‌آیند، زیرا توارث این صفات می‌تواند بدون نیاز به روش‌ها و تکنیک‌های پیشرفته مانند تکنیک‌های بیوشیمیایی و مولکولی ارزیابی شود(Pop *et al*., 2013).

۲-۱۲-۲- نشانگرهای پروتئینی

نشانگرهای پروتئینی محصول تظاهر ژن بوده و از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به موارد زیر اشاره کرد

الف) پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر

ب) آیزوزایم ها

آیزوزایم ها اشکال مولکولی مختلف یک آنزیم هستند که فعالیت کاتالیزوری مشابه داشته و تنها سرعت فعالیت، زمان و مکان فعالیت آن‌ها متفاوت است (Chawla, 2000). این نشانگرها تا دهه ۱۹۸۰ بیشتر مورد استفاده قرار می‌گرفتند. تنسلی و ریک[1] در سال ۱۹۸۰ اولین نقشه ژنتیکی را بر اساس آیزوزایم ها تهیه کردند. برای ارزیابی نشانگرهای مولکولی مبتنی برچند شکلی پروتئینی، رایج‌ترین روش مورد استفاده جداسازی پروتئین‌ها از راه الکتروفروز و سپس رنگ‌آمیزی یک زیرگروه معین است پروتئین‌های خاص با ماده‌ی فلورسنت نشان‌دار شده و سپس شناسایی و ارزیابی می‌شوند. آنزیم‌های هم‌ردیف (آلوزایم ها)، آنزیم‌هایی هستند که توسط ژن‌های راست نسخه (اورتولوگ) کد شده اما به دلیل تفاوت‌های آللی در یک یا تعداد بیشتری اسیدآمینه متفاوت هستند. برتری اصلی نشانگرهای آلوزایم توارث هم بارز آن‌ها و سادگی فنی و هزینه کم برای بررسی آن‌ها است. معایب نشانگرهای آلوزایم شامل تعداد محدود جایگاه‌های آلوزایمی در ژنوم و تنوع کم آلل ها است و همچنین نشانگرهای پروتئینی دارای چندشکلی کمی هستند و دربرگیرنده همه تغییرات ژنتیک در سطح DNA نبوده و نمی‌تواند نماینده کل ژنوم باشد (Stuber *et al.*, 1999). ازجمله کارهای آلوزایمی انجام‌شده آنالیز آلوزایمی بر روی تنوع ژنتیکی و پراکندگی گردوهای اروپایی و آسیایی در سال ۱۹۹۹ توسط فورناری[2] و همکاران است. در بررسی دیگر مالوولتی[3] در سال ۱۹۹۳ بر روی پراکندگی ژنتیکی در جمعیت گردوی ایتالیا انجام داد.

۲-۱۲-۳ نشانگرهای مولکولی

یکی از دقیق‌ترین راه‌ها برای بررسی‌های ژنتیکی استفاده از نشانگرها در سطح DNA است. نشانگرهای مولکولی یک ابزار دقیق و مفید می‌باشند که روش‌های مبتنی بر استفاده از آن‌ها، به‌عنوان مکمل روش‌های نسبی کلاسیک در سرعت بخشی به برنامه‌های ژنتیکی، افزایش دقت و صرفه‌جویی در نیروی کار و هزینه‌ها نقش چشمگیری دارند (سلیمانی و همکاران، ۱۳۸۸). نشانگرهای DNA

[1] Tanksley and Rick
[2] fornary
[3] malvolty

مهم‌ترین و کاربردی‌ترین گروه نشانگرها هستند. این گروه از نشانگرها دارای انواع مختلفی بوده و همواره درحال‌توسعه و تکامل می‌باشند. این نشانگرها تفاوت افراد را در سطح مولکول DNA نشان می‌دهند، دارای پوشش ژنومی کامل بوده و توالی‌های کد کننده و غیرکدکننده را دربر می‌گیرند. از آنجاکه این نشانگرها از اولین جستجوی اطلاعات ژنتیکی حاصل می‌شوند بسیار دقیق بوده و دارای فراوانی و چندشکلی زیادی هستند در یک تقسیم‌بندی کلی نشانگرهای DNA به دو گروه مبتنی بر PCR و غیر مبتنی برPCR تقسیم می‌شوند (Gupta *et al*.,1999).

از مهم‌ترین نشانگر غیر مبتنی می‌توان RFLP را نام برد. پلی مورفیسم طول قطعات تکثیرشده تکنیک جدیدی در انگشت‌نگاری DNA است که توسط زابیو و ووس[1] (۱۹۹۳) ابداع شده است. این روش مبتنی بر تکثیر قطعات برش یافته انتخابی حاصل از هضم کلی DNA ژنومی با PCR است. محصولات تکثیر که قبلاً نشان‌دار شده‌اند از طریق الکتروفورز از هم تفکیک می‌شوند. طول قطعات DNA حاصل بین ۶۰ تا ۵۰۰ جفت باز است. چندین نشانگر مولکولی مبتنی بر PCR برای جداسازی رقم و انگشت‌نگاری و برای مطالعه تنوع ژنتیکی و روابط ژنتیکی استفاده‌شده است. ازجمله این نشانگرها می‌توان به AFLP, RAPD, ISSR, SSR اشاره کرد. در این میان SSR ها بالاترین کاربرد را در انگشت‌نگاری ژنتیکی دارند زیرا دارای سطح بالایی از تنوع اللی و دارای خصوصیت هم بارز، مبتنی بر PCR، تکرارپذیر، قابل اتوماسیون می‌باشند که به آن‌ها اجازه می‌دهد که در هر آزمون اطلاعات بیشتری را نسبت به مارکر دیگر بیان کنند (Rafalski *et al*., 1996).

۲-۱۲-۴ شاخص‌های نشانگر برتر

یک نشانگر مناسب باید دارای ویژگی های ذیل باشد:

۱- دارا بودن میزان چندشکلی متوسط تا زیاد

[1] Zabeau and Vos

۲- توارث هم بارز (که امکان تمایز حالت‌های خاص (هموزیگوت) و ناخالص (هتروزیگوت) در موجودات دیپلوئید را فراهم می‌سازد)

۳- تعیین آلل ها به‌صورت کاملاً مشخص و روشن

۴- رخداد پی‌درپی در ژنوم

۵- توزیع یکنواخت در سرتاسر ژنوم

۶- رفتار خنثی ازنظر گزینشی (نبود اثرگذاری‌های چندگانه)

۷- دسترسی آسان (ازنظر خرید امکانات، تجهیزات و سرعت عملیات)

۸- ارزیابی آسان و سریع

۹- تکرارپذیری بالا

۱۰- تبادل آسان داده‌ها بین آزمایشگاه‌ها

۱۱- صرف هزینه کم به‌منظور ایجاد، بررسی و ارزیابی نشانگر (Weising *et al*., 2012)

۲-۱۳ ریز ماهواره‌ها

ریز ماهواره عبارت است از توالی کوتاهی از DNA به طول کمتر از ۶ نوکلئوتید که به‌صورت پشت سر هم قرار دارند. ریز ماهواره‌ها متشکل از موتیف های سه، چهار، پنج نوکلئوتیدی معمولاً فراوانی کمتری نسبت به تکرارهای تک و دو نوکلئوتیدی دارند به‌عنوان قاعده کلی تکرارهای سه نوکلئوتیدی نوع رایج ریز ماهواره‌ها می‌باشند که در اگزون ها یافت می‌شوند. روش‌های بسیاری ایجاد شده است که از ریز ماهواره‌ها به‌عنوان نشانگرهای مولکولی با یک یا چند روش بهره می‌برند. مهم‌ترین نوع آن‌ها تکثیر اختصاصی جایگاه ژنی از راه PCR ریز ماهواره‌های هسته‌ای و اندامکی با آغازگرهای دوسویه[1] می‌باشند (Weising *et al*., 2012) .

[1] Flanking primer

۲-۱۳-۱ مزایا و معایب ریز ماهواره‌ها

کاربرد ریز ماهواره ها و تفسیر نتایج آن‌ها نسبتاً ساده است. سیستم چند آللی از ویژگی‌های بارز این نوع نشانگر است بسیار متنوع و هم بارز هستند و به وفور در ژنوم یوکاریوت ها یافت می‌شوند (نقوی، ۱۳۸۶). از سوی دیگر شناسایی ریز ماهواره‌ها، تعیین ردیف بازی آن‌ها، طراحی و ساخت آغازگرها و تهیه نقشه ژنتیکی ریز ماهواره‌ها که مقدمه کاربرد این نشانگرهاست بسیار پیچیده و مستلزم صرف وقت و هزینه بسیار زیاد است (نقوی، ۱۳۸۶).

فصل سوم

بررسی منابع مورفولوژیکی و مولکولی

گردو

با توجه به ژرم پلاسم غنی و متنوع در کشور اولین قدم در برنامه‌های اصلاحی آن شناسایی و گزینش ژنوتیپ های امیدبخش و برتر گردو است (Arzani *et al*., 2008). ایران با دربرگیری بخش زیادی از ناحیه آسیای میانه به‌عنوان مرکز تنوع و پیدایش بسیاری از گونه‌های زراعی- باغی به‌ویژه گونه گردوی ایرانی، صاحب‌امتیاز خاصی در این زمینه است (Forde, 1975). همچنین بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی و ژنتیکی درختان جنگلی گردو در کشورمان به‌عنوان مطالعه پایه‌ای برای شناسایی منابع ژنتیکی بومی گردوی ایرانی و مدیریت و حفاظت آن‌ها برای استفاده در برنامه‌های اصلاحی این محصول بسیار دارای اهمیت است (جعفری صیادی، ۱۳۸۵). مطالعه خصوصیات مورفولوژیکی و پتانسیل ژرم پلاسم درختان میوه از دیدگاه انتخاب یا استفاده به‌عنوان والد در برنامه‌های اصلاحی حائز اهمیت ویژه‌ای است (Fattahi *et al*. 2010).

۳-۱ صفات مورفولوژیکی

تحقیقات مختلفی در ایران و دنیا، به منظور بررسی تنوع مرفولوژیک ژنوتیپ‌های گردو انجام گرفته است. حق‌جویان و همکاران (۱۳۸۴) در بررسی تنوع ژنتیکی گردوهای مناطق مختلف کشور با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیک ۱۳۸ ژنوتیپ گردوی تویسرکان و ۴ کلکسیون کرج، شاهرود، ارومیه و مشهد را از نظر ۱۶ صفت مورفولوژیک مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج 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 ۱۴/۱-۱/۴۲ گرم گزارش کردند. ابراهیمی و همکاران (۱۳۸۸) ۶۰۸ ژنوتیپ گردو را در شهرستان نی‌ریز در استان فارس بر اساس صفات فنولوژیکی و صفات پومولوژیکی مورد بررسی قراردادند. 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. احتشام نیا 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 موردنظر صورت گیرد. ارزانی و همکاران (۱۳۸۹) به‌منظور ارزیابی ژنوتیپ‌های برتر گردو در منطقه تفت استان یزد، تعداد ۵۸ درخت را بر مبنای خصوصیات ظاهری انتخاب و صفاتی همچون تاریخ برگ دهی، تاریخ حداکثر پذیرش دانه گرده بر روی کلاله، تاریخ برداشت، وزن میوه و وزن مغز مورد ارزیابی قراردادند. بر اساس گزارش ایشان، دامنه تغییرات وزن میوه، وزن مغز، درصد مغز و ضخامت پوست در ژنوتیپ‌های موردمطالعه به ترتیب ۱۵/۲-۶ گرم، ۹/۱-۲/۶ گرم، ۷۹/۶-۳۸/۴ درصد و ۱/۴-۰/۴ میلی-متر متغیر بود. همچنین ژنوتیپ‌های BA150, AA33, AA35, AA115 وAA110 به‌عنوان ژنوتیپ-های برتر گردو در منطقه تفت معرفی شدندکه وزن مغز و درصد مغز در آن‌ها به ترتیب بین ۱/۹ تا ۵/۴ گرم و۴۶/۳-۷۹/۶ درصد متغیر بود. شاملو و همکاران (۱۳۹۵) تنوع مورفولوژیکی ژنوتیپ های گردوی آزادشهر را مورد بررسی قراردادند. در این مطالعه ۱۰۲ ژنوتیپ گردو با ۳۰ خصوصیت مورفولوژیکی ارزیابی شدند. نتایج آنالیز آن‌ها نشان داد که ژنوتیپ های Ka17 و Va31 دارای بیشترین میانگین وزن میوه (۱۹/۷ گرم)، ژنوتیپ Va31 بیشترین وزن مغز (۹/۴ گرم) و ژنوتیپ های ROOD4 و Va34 برای صفت جدا شدن آسان مغز از میوه شاخص بودند و بیان گردید که این مناطق تنوع بالایی را ازلحاظ صفات برگ، صفات فنولوژیکی و صفات پومولوژیکی دارند. 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 در نهایت 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 شدند. 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).

۳-۲ مولکولی

با وجود اینکه بررسی‌های مورفولوژیک همچنان به‌عنوان مبنا و اولین مرحله در پتانسیل ژرم پلاسم و طبقه‌بندی آن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد اما اغلب نمی‌توانند برای شناسایی روابط ژنتیکی ارقام استفاده شوند. امروزه استفاده از نشانگرهای مولکولی برای انگشت‌نگاری ژنتیکی جایگاه ویژه‌ای پیدا کرده است و نشانگرهای مولکولی در آشکار نمودن تنوع ژنتیکی گیاهان به‌ویژه وقتی نشانگرهای فنوتیپی قادر به تشخیص آن نیستند، مفید است. نشانگرهای مولکولی نسبت به نشانگرهای مورفولوژیکی کاراتر و قابل‌اعتمادتر است و ازنظر تعداد، نامحدود و به‌طورمعمول کمتر تحت تأثیر شرایط رشدی قرار می‌گیرد (عطار و همکاران، ۱۳۹۶). مطالعه تنوع ژنتیکی گردو در مناطق مختلف جهان به‌وسیله نشانگرهای مختلف صورت گرفته است. محسنی (۱۳۸۶) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره و مورفولوژیکی به بررسی تنوع ژنتیکی ۶۶ ژنوتیپ گردوی استان کرمان پرداخت. میانگین هموزیگوتی مشاهده‌شده برای ۱۷ مکان ژنی ریزماهواره برابر ۰/۷۷ بود، محتوای چندشکلی در تمام جایگاه‌ها بالای ۰/۵ که بیش‌ترین آن درجایگاه‌های WGA118 و WGA071 مشاهده شد (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. احتشام نیا 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 تا ۱۱ آلل با میانگین ۷ آلل متغیر بود. حداقل تعداد آلل مشاهده‌شده مربوط به مکان ژنی WGA027 (۳ آلل) و حداکثر تعداد

آلل مشاهده شده مربوط به مکان ژنی WGA202 (۱۱ آلل) بود. تعداد آلل‌های مؤثر در مکان‌های ژنی در محدوده۲/۰۲۶ تا ۸/۹۷۴ با میانگین ۵/۰۸ بود. بیشترین مقدار تنوع بر اساس شاخص اطلاعاتی شانون مربوط به توده گالیکش و کلاله بود.

در پژوهشی که مردی و همکاران (۱۳۹۳) در زمینه کاربرد نشانگرهای ریز ماهواره جهت شناسایی و ثبت ارقام گردو انجام دادند، از ۵ نشانگر SSR از مجموع ۳۰ نشانگر در ۵ رقم گردوی ایرانی استفاده کردند.نشانگرهای WP-376 و ABRII و WM-6 در رقم های Z63-Z60-Z53-Z30-K72 باندهای چندشکلی اختصاصی را ایجاد کردند. وجود غیریکنواختی ژنتیکی در بین درختان مورد مطالعه باعث عدم توصیه درختان به عنوان والد مادری گردید.

طاهری و همکاران (۱۳۹۶) تجزیه‌ی برخی صفات فیزیولوژیک در گردوی ایرانی را با استفاده از نشانگرهای SSR انجام دادند. در این پژوهش به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی ۶۲ دانهال گردو از ۱۰ نشانگر SSR استفاده شد که درمجموع ۵۳ آلل ایجاد گردید. در این مطالعه همه‌ی مکان‌های SSR موردمطالعه انحراف‌های معنی‌داری را از تعادل هاردی – واینبرگ را نشان دادند.

عطار و همکاران (۱۳۹۶) مطالعه‌ای را درزمینه بررسی تنوع ژنتیکی گردوی ایرانی در باغات تجاری مشهد انجام دادند در این آزمایش از ۹ آغازگر ISSR بر روی ۵۶ ژنوتیپ استفاده شد. درمجموع ۱۱۸ باند ایجاد شد که ۲۹ عدد پلی مورفیک بودند. آغازگر UBC.844 با ۱۴ عدد بیشترین و آغازگر UBC.890 با ۸ عدد کمترین قطعات تکثیری را دارا بودند. نتایج این پژوهش نشان داد که میزان تنوع ژنتیکی در جمعیت مورد بررسی به دلیل دخالت‌های انسانی کم است. وسته[1] و همکاران (2002) تعداد ۳۰ نشانگر هسته‌ای ریز ماهواره‌ای 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.

[1] Woeste

پوله جیونی[1] و همکاران (2004) از نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR برای شناسایی گونه‌ها و هیبریدهای درون‌گونه‌ای جنس Juglans استفاده کردند. درمجموع ۱۳ آغازگر ISSR، ۱۷ آغازگر RAPD و ۱۰ جفت آغازگر ریز ماهواره توسعه‌یافته از J. nigra قادر به تکثیر محصولات PCR در گونه‌ها و هیبریدهای بین‌گونه‌ای شدند. این نشانگرها به ترتیب ۱۶۲، ۱۸۸ و ۱۱۳ باند ایجاد کردند و کل نمونه‌ها را به سه گروه: ۸۱ ژنوتیپ J. nigra، ۴۹ ژنوتیپ J. regia و ۸ ژنوتیپ بین‌گونه‌ای تقسیم کردند.

فورونی[2] و همکاران (2005) از نشانگرهای ریزماهواره برای شناسایی گردوی ایرانی و ارزیابی همبستگی بین ارقام و ژنوتیپ 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 پرورش‌یافته در کاسرتا (۱۰ گیاه بذری و ۶ گیاه پیوندی) و ۲۶ کلون پیوندی در شبه‌جزیره سورنتو بودند. تمامی آغازگرها ۱۰۰٪ 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 تعداد کل آلل‌ها را ۶۶ عدد گزارش کردند. در این پژوهش بیش‌ترین محتوای اطلاعات چندشکلی مربوط به مکان ژنی WGA05 و معادل ۰/۷۱۷ بود.

[1] Pollegioni
[2] Foroni

وانگ[1] و همکاران (۲۰۰۸) بررسی تنوع ژنتیکی و ساختمانی ۹ جمعیت گردو را در مرکز و جنوب غربی چین به‌وسیله میکرو ساتلایت‌ها انجام دادند. نتایج نشان داد هتروزیگوتی مورد انتظار در این جمعیت ۰/۳۸ تا ۰/۶۸ با میانگین ۰/۵۲درصد بوده است و نسبت اختلاف ژنتیکی در جمعیت نسبت به‌کل تنوع ژنتیکی ۱۸/۶درصد بوده است.

کریمی و همکاران(۲۰۱۰) به بررسی تنوع ژنتیکی ۴۷ ژنوتیپ گردو از ۷ توده طبیعی گردوی غرب کشور پرداختند و با استفاده از ۱۱ مکان ژنی ریزماهواره، درمجموع ۵۴ آلل را شناسایی کردند. سه مکان ژنی WGA276، WGA32 و WGA009 بیش‌ترین محتوای اطلاعات چندشکلی را به خود اختصاص دادند. بیشترین میانگین هتروزیگوتی مشاهده‌شده و محتوای اطلاعات چندشکلی درون توده‌ها مربوط به توده لرستان و به ترتیب معادل ۰/۹۸۴ و ۰/۶۴۹ و کم‌ترین میزان هتروزیگوتی مشاهده‌شده به توده کردستان و معادل ۰/۸۴۰۶ اختصاص داشت. همچنین تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ-های موردبررسی کاملاً از تنوع جغرافیایی پیروی کردند. مطالعه‌ای که ابراهیمی و همکاران(۲۰۱۱) در ژنوتیپ های گردوی ایرانی انجام دادند ۳۱ ژنوتیپ گردوی ایرانی به همراه ۴ رقم خارجی موردبررسی قرار دادند. در این مطالعه از ۹ نشانگر SSR استفاده شد که ۳۹ آلل با میانگین ۵/۱۰ آلل در هر آغازگر ایجاد شد. در بعد دیگر این مطالعه از صفات مورفولوژیکی برتر مانند وزن نات که در محدوده‌ی ۷/۵۲ تا ۱۷/۷۳، وزن تخم‌مرغی کل در محدوده ۴ تا ۹/۸۳، درصد مغز در محدوده ۳۸/۷۸ تا ۶۷/۰۵ استفاده شد. نتایج این تحقیق نشان داد ژنوتیپ های ایرانی تنوع بالایی را هم ازلحاظ مورفولوژیک و ازلحاظ ژنتیک دارا هستند.

محمودی و همکاران(۲۰۱۳) ۲۱ ژنوتیپ گردو را از ایستگاه تحقیقاتی ارومیه بر اساس صفات مهم پومولوژیک و مورفولوژیک جهت بررسی تنوع ژنتیکی با کمک ۹ نشانگر SSR بررسی کردند. در این بررسی ۳۴ آلل ایجاد شده بیشترین تعداد آلل مربوط به نشانگر WGA071 با حداکثر ۷ آلل و

[1] Wang

کمترین با تعداد ۲ آلل در نشانگرWGA202 مشاهده گردید. در این تحقیق ضریب تشابه جاکارد از ۰/۱۳ تا ۰/۷۶ متغیر بود. نتایج صفات مورفولوژیکی بررسی‌شده در این تحقیق نشان داد که تشابه ژنتیکی از ۰/۶ تا ۰/۹۹ بر پایه ضریب همبستگی بوده است و درکل تنوع زیادی در این ژنوتیپ ها مشاهده‌شده است.

مصطفی هاما صلیح[1] و همکاران (2013) مطالعه‌ای را بر روی ژنوتیپ های گردو منطقه سلیمانیه عراق انجام دادند. هدف این مطالعه شناسایی روابط ژنتیکی با استفاده از مارکر مولکولی SSR و RAPD بود.۱۲ ژنوتیپ گردو با استفاده از ۱۰ نشانگر RAPD و ۹ نشانگر SSR بررسی شدند نتایج نشان دادکه ۸۵ باند در RAPD ایجاد شد که تنها ۳۶ تا از آن‌ها پلی مورفیک بودند اما در آنالیز SSR ۲۶ باند ایجادشده که ۲۳ تا پلی مورفیسم را نشان دادند. در RAPD تشابه ژنتیکی از ۰/۴ تا ۰/۹۳ و در SSR ۰/۲۷ تا ۱/۰۰ محاسبه شد. ژنوتیپ های Wazi و kirmashan1 در هر دو مارکر نزدیک‌ترین روابط را نشان دادند و ژنوتیپ های Twana و Awesar دورترین ژنوتیپ ها بودند.

دوگان[2] و همکاران(2014) در آزمایشی روابط ژنتیکی گردو را با سه نوع نشانگر مولکولی بررسی کردند. در این تحقیق روابط ژنتیکی بین ۵۹ ژنوتیپ گردو از داخل ترکیه و ارقام بین‌المللی با استفاده از ۲۵ آغازگر RAPD و ۲۵ آغازگر ISSR و ۱۶ جفت آغازگر SSR بررسی شد. نتایج بیان کرد که SSR دارای بالاترین نرخ پلی مورفیسم (۹۹/۱درصد) بود، درحالی‌که ISSR و RAPD نتایج نسبتاً مشابه‌های را ایجاد کردند به ترتیب دارای پلی مورفیسم ۷۱/۱ و ۶۹ درصد بودند. طبق نتایج آزمون منتل میزان همبستگی بین ISSR و RAPD بالاترین مقدار ۰/۴۶ و کمترین بین SSR و ISSR به مقدار ۰/۳۲ بود.

[1] Mustafa hama salieh
[2] Dogan

پژوهش دیگری توسط چن[1] و همکاران (2014) بر روی شناسایی ارقام گردوهای اصلی رشد یافته در چین انجام شد. شناسایی مولکولی با استفاده از ۱۲ SSR مارکر و ۲۲ صفت نات بر روی ۳۵ گردو انجام شد. ۳۵ ژنوتیپ گردو بر اساس صفت نات در ۱۱ گروه دسته‌بندی شدند. نتایج نشان داد که هتروزیگوتی مشاهده‌شده به‌وضوح پایین‌تر از هتروزیگوتی مورد انتظار گردید.

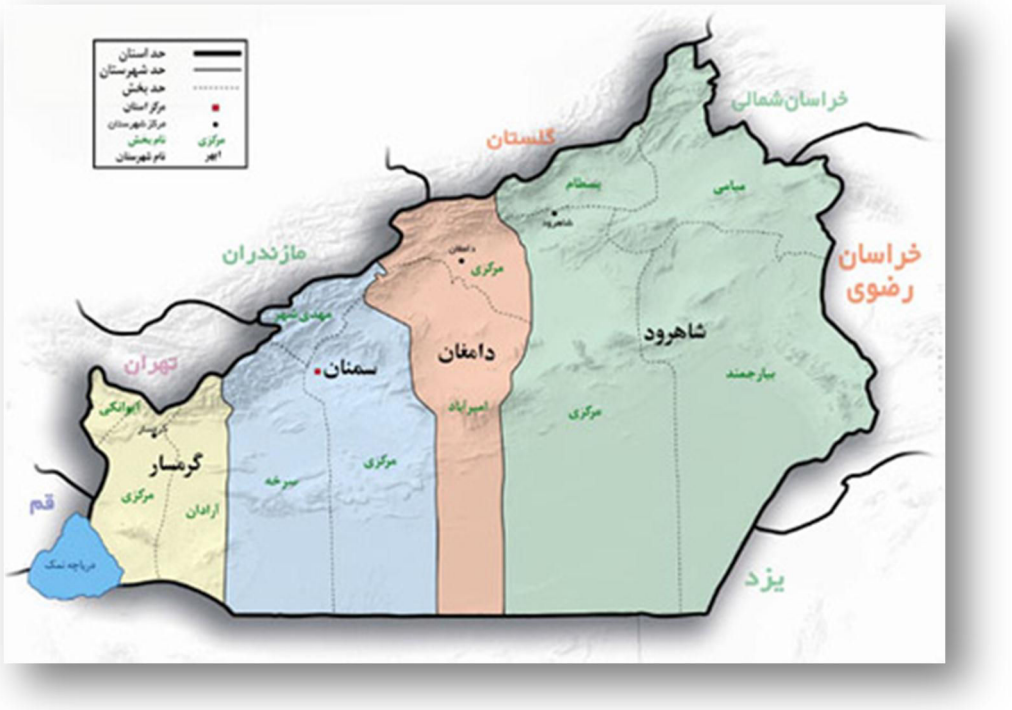
[1] Chen

فصل چهارم

مواد و روش ها

۴-۱ محل و روش نمونه‌برداری

این پژوهش در سال ۱۳۹۵ در شهرستان شاهرود (با طول ۵۴ درجه ۵۸ دقیقه شرقی و عرض ۳۶ درجه و ۲۵ دقیقه شمالی) واقع در استان سمنان انجام شد. شاهرود با ارتفاع ۱۳۸۰ متر از سطح دریا دارای آب‌وهوای سرد و خشک است. همانطور که در تصویر۴-۱ مشخص شده است شهرستان شاهرود با استان های شمالی مازندران، گلستان و همچنین از شرق با استان خراسان شمالی و رضوی همسایگی قرار دارد.

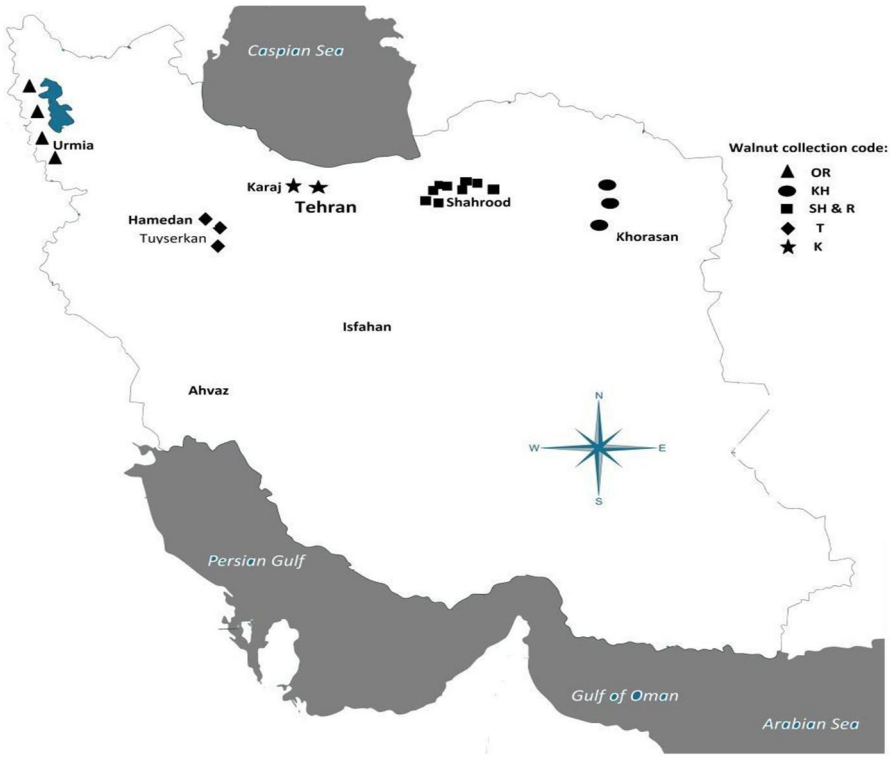


تصویر۴-۱: نقشه شهرستان شاهرود و شهرهای همسایه آن

۴-۲ مواد گیاهی

۴۰ ژنوتیپ انتخابی که از مناطق مهم گردو کاری ایران (تویسرکان، ارومیه، کرج و استان خراسان) جمع‌آوری‌شده (تصویر ۴-۲) ودر کلکسیون گردو مرکز تحقیقات شاهرود در سال ۱۳۸۰ کشت شدند.

این ژنوتیپ‌ها حاصل از بذور درختان مادری با ویژگی‌های برتر میوه کاری بودند. دانهال‌ها در شرایط کاملاً یکسانی ازنظر تغذیه و آبیاری پرورش یافتند و پس از باردهی از سال ۱۳۹۰ تا ۱۳۹۴ مورد بررسی قرار گرفتند و ۲۱ ژنوتیپ بر اساس خصوصیات پمولوژیکی و سازگاری به شرایط آب و هوایی شاهرود انتخاب گردید و بروی پایه‌های بذری پیوند شدند. ژنوتیپ های موردمطالعه از ۱ تا ۲۱ شماره‌گذاری شدند. شیوه نام‌گذاری ژنوتیپ ها بر اساس کد محل جمع‌آوری نمونه است (جدول ۴-۱). در مورد هر ژنوتیپ ۲۳ صفت مورفولوژیکی با استفاده از توصیف نامه IPGRI[1] 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 به‌طور تصادفی جمع‌آوری و در پاکت‌های جداگانه قرار داده شدند و برای اندازه‌گیری دقیق صفات به آزمایشگاه انتقال داده شدند. اندازه‌گیری صفات مغز یک ماه بعد از برداشت پس از نگهداری در دمای اتاق انجام شد.



تصویر ۴-۲ مناطق جمع‌آوری ژنوتیپ های برتر در کلکسیون شاهرود

[1] International Plant Genatic Resources Institute

جدول ۴-۱ کد ژنوتیپ‌ها و محل جمع آوری ژنوتیپ‌های انتخاب شده گردو

شماره ژنوتیپ	کد ژنوتیپ ها	محل جمع‌آوری
1	T9	تویسرکان
2	T12	
3	T1	
4	SH1	شاهرود
5	R2G8	
6	R2G5	
7	R2G4	
8	R2G3	
9	R2G1	
10	R1G7	
11	R1G6	
12	R1G2	
13	OR4	ارومیه
14	OR37	
15	OR26	
16	OR23	
17	KH4	خراسان
18	KH34	
19	KH31	
20	K28	کرج
21	K 26	

جدول ۴-۲ صفات کمی و کیفی مورد بررسی در ۲۱ ژنوتیپ گردو

شماره	صفت	علامت اختصاری	نحوه اندازه‌گیری
۱	شکل درخت	TSH	۱ تا ۳ (۱-راست، ۳- گسترده)
۲	قدرت رویشی	VP	۳ تا ۷ (۳- کم، ۷- زیاد)
۳	تیپ گلدهی	FT	۱ تا ۳ (۱- انتهایی جانبی، ۳- انتهایی)
۴	زمان برگ دهی	LBB	۳ تا ۵ (۳- متوسط، ۵- دیر)
۵	زمان شکفتن گل ماده	FFA	۱ تا ۳ (۱- زود، ۳- دیر)
۶	زمان شکفتن گل نر	MFA	۱ تا ۳ (۱- زود، ۳- دیر)
۷	دایکوگامی	DI	۱ تا ۳ (۱-پروتاندری، ۳-ناشناخته)
۸	زمان ریزش برگ	LF	۱ تا ۳ (۱- زود، ۳- دیر)
۹	زمان رسیدن میوه	FR	۳ تا ۷ (۳- زودرس، ۷- دیر رس)
۱۰	شکل میوه	FS	۱ تا ۹ (۱- گرد، ۹- قلبی شکل)
۱۱	عرض میوه	ND	سانتی متر
۱۲	طول میوه	NL	سانتی متر
۱۳	وزن میوه	NW	گرم
۱۴	حساسیت به آبیاری	IS	۱ تا ۴ (۱- خیلی کم، ۴- زیاد)
۱۵	حساسیت به سرما	CS	۱ تا ۴ (۱- خیلی کم، ۴- زیاد)
۱۶	وضعیت سطح پوست چوبی	NSS	۱ تا ۳ (۱- صاف، ۳- کمی چروکیده)
۱۷	متوسط وزن مغز	KW	گرم
۱۸	ضخامت پوست چوبی	SDI	۱ تا ۳ (۱- نازک، ۳- ضخیم)
۱۹	پر بودن مغز	KS	۱تا ۷ (۱-ضعیف، ۷- کاملا پر)
۲۰	آسان جدا شدن مغز از میوه	KF	۱ تا ۹ (۱- خیلی آسان، ۹- خیلی مشکل)
۲۱	رنگ مغز	KC	۱ تا ۴ (۱- روشن، ۴- تیره)
۲۲	درصد مغز	KP	درصد

Kernel fill percentage	درصد مغز	Kernel color	رنگ مغز	Ease of kernel removal	میزان چسبندگی پوست به مغز
Shell thickness	ضخامت پوست چوبی	Kernel weight	وزن مغز	Shell surface	سطح پوست چوبی
Fruit shape	شکل میوه	Nut weight	وزن میوه	Vegetative power	قدرت رویشی
Female flower abundance	گل های ماده	Nut diameter	عرض میوه	Irrigation sensitivity	حساسیت به آبیاری
Male flower abundance	گل های نر	Dichogami	دایکوگامی	Cold sensitivity	حساسیت به سرما
Leaf loss	ریزش برگ	Nut length	طول میوه	Fruit ripenin	رسیدن محصول
Flowering type	تیپ گلدهی	Tree shape	شکل درخت	Leaf bloom	برگدهی

۴-۳ مراحل استخراج DNA

۴-۳-۱ نمونه‌گیری:

جهت بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گردو انتخاب‌شده، ابتدا برگ‌های جوان از ژنوتیپ‌های گردو در فصل بهار جمع‌آوری و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و در فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد جهت حفظ و جلوگیری از تخریب نمونه‌ها ذخیره شدند.

۴-۳-۲ استخراج DNA

استخراج از برگ‌های جوان به روش CTAB باکمی تغییرات (Kafkas *et al*., 2005) انجام شد. در این روش ابتدا نمونه‌ها با نیتروژن مایع کوبیده و سپس بافر کاتیونی جهت تخریب دیواره غشا و آزادسازی DNA از هسته اضافه گردید. بعد از سانترفیوژ و جداسازی سوپرناتانت حجمی از ایزوپروپانول جهت رسوب‌دهی DNA اضافه گردید. در مرحله آخر نوکلئیک اسید ته‌نشین شده را با اتانول ۷۰ درصد شست‌وشو داده و بعد از خشک شدن DNA ۱۰۰ماکرولیتر از بافر TE به آن اضافه شد و برای آزمایش‌های بعدی در فریزر ۲۰- ذخیره گردید.

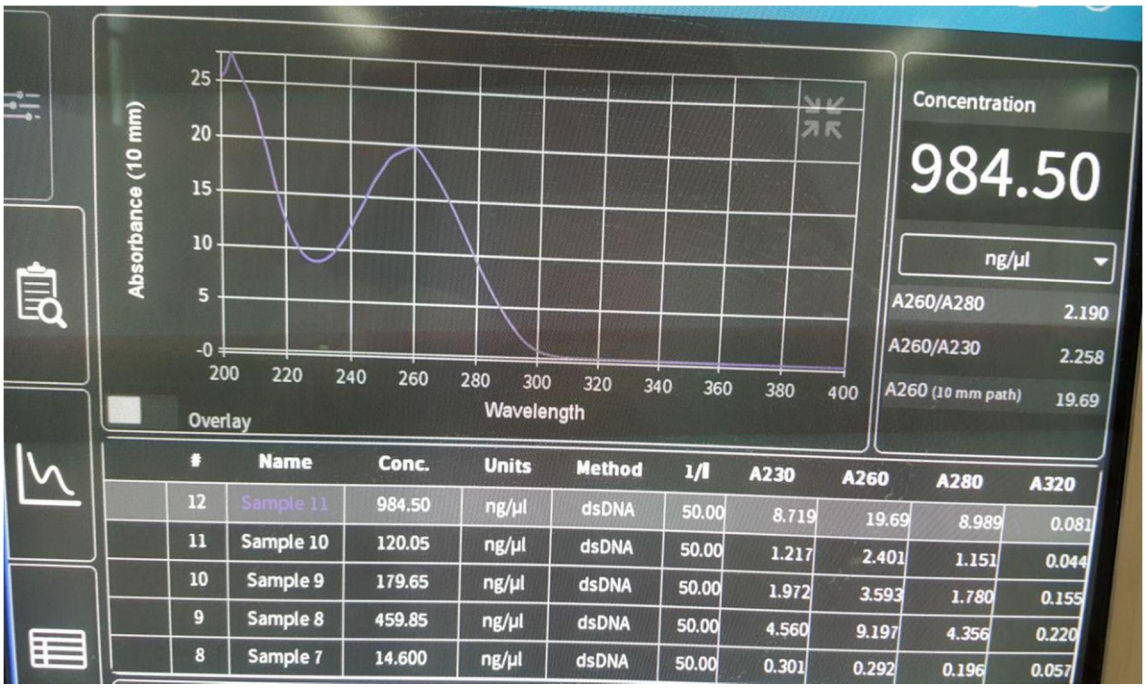
۴-۴ تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده

پس از پایان مراحل استخراج DNA، کمیت و کیفیت DNA استخراجی تعیین شد. برای تعیین مقدار DNA استخراج‌شده از روش‌های اسپکتوفتومتری، نانو دراپ و الکتروفورز ۰/۸٪ بر روی ژل‌آگارز استفاده شد.

۴-۴-۲ روش نانودراپ

نانودراپ مدل (IMPLEN N-60) دستگاهی کارا و امروزی است که جهت کیفیت‌سنجی DNA استخراجی که میزان آلودگی و غلظت DNA را بیان می‌کند استفاده می‌شود. برای استفاده از نانودراپ ابتدا کار بلانک با ۱ ماکرو لیتر آب مقطر انجام شد و سپس نمونه‌ها جهت سنجش میزان

غلظتشان به مقدار ۱ ماکرو لیتر بر روی عدسی نانودراپ ریخته شدند. غلظت نمونه‌ها از ۵۰۰ نانوگرم در میکرولیترتا ۱۰۰۰ نانوگرم در میکرولیتر بود که به‌عنوان غلظتی خوب تلقی گردید. با توجه به تصویر ۴-۳ که غلظت نمونه T12 را از جهت مقدار DNA نشان می‌دهد بیان کننده این است که استخراج به خوبی صورت گرفته و می‌توان مرحله بعدی را شروع کرد. اما درنهایت غلظت تمام نمونه‌ها به ۱۰۰ نانوگرم کاهش یافت تا در مسیر بعدی یعنی PCR کار به‌خوبی صورت گیرد.



#	Name	Conc.	Units	Method	1/l	A230	A260	A280	A320
12	Sample 11	984.50	ng/µl	dsDNA	50.00	8.719	19.69	8.989	0.081
11	Sample 10	120.05	ng/µl	dsDNA	50.00	1.217	2.401	1.151	0.044
10	Sample 9	179.65	ng/µl	dsDNA	50.00	1.972	3.593	1.780	0.155
9	Sample 8	459.85	ng/µl	dsDNA	50.00	4.560	9.197	4.356	0.220
8	Sample 7	14.600	ng/µl	dsDNA	50.00	0.301	0.292	0.196	0.057

تصویر۴-۳ غلظت DNA استخراج شده از نمونه T12 توسط نانودراپ

۴-۴-۳ روش الکتروفورز در ژل‌آگارز

برای تعیین کیفیت DNA استخراج‌شده از این روش استفاده شد. در این روش نمونه‌های DNA با غلظت‌های متفاوت همراه با یک DNA معین و استاندارد بر روی ژل آگارز ۰/۸٪ بارگذاری شدند. ژل مربوطه به‌وسیله اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و تحت نور ماوراءبنفش بررسی شد و شدت باندهای مربوط به نمونه‌ها با باند مربوط به DNA استاندارد مقایسه گردید. ازآنجایی‌که 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 باندهای کاملاً تیز و فاقد کشیدگی

حاکی از بهترین کیفیت است. وجود کشیدگی در فاصله بین چاهک و باند، حاکی از وجود آلودگی پروتئینی یا باقی ماندن نمک در نمونه‌ها است که البته این کشیدگی‌ها در پایین ژل و فاصله زیاد از باند اصلی، حاکی از وجود RNA در نمونه‌ها است. جهت بررسی نمونه‌ها، ژل در زیر لامپ UV قرار گرفت. کیفیت تعدادی از ژنوتیپ ها ازجمله R1G6, OR23, R2G1, OR37,T1, KH4, T9 در تصویر۴-۴ بر روی ژل آگارز مشخص شده است .

تصویر۴-۴: نمایش کیفیت نمونه های استخراجی بر روی ژل آگارز

۴-۵ واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و اجزای آن

این واکنش در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. در این پژوهش برای تکثیر DNA از دستگاه ترموسایکلر مدل BIORAD(T100) ساخت شرکت کشور آمریکا با بلوک ۹۶ تایی برای تیوپ‌های PCR به حجم ۰/۲ میلی‌لیتر استفاده شد. از کیت پی سی آر ساخته شده توسط شرکت ویراژن آکام استفاده شد که حاوی مستر میکس با ترکیب تگ دی ان آ پلیمراز با غلظت ۰/۰۴ واحد بر میکرو لیتر بافر PCR، MgCl2 با غلظت ۳ میلی‌مولار، dNTPS هرکدام با غلظت ۰/۰۴ میلی‌مولار و آب دیونیزه بود. پس از اضافه کردن کلیه مواد و رساندن نمونه به حجم نهایی مورد نظر، میکرو تیوپ‌های حاوی نمونه به مدت چند ثانیه (۲ ثانیه) با دوره ۱۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شدند. کلیه مراحل آماده سازی مواد مورداستفاده در واکنش بر روی یخ خشک انجام شد.

۴-۵-۱ آغازگرها

آغازگرهای مورداستفاده از تحقیق دانگل[1] و همکاران (۲۰۰۵) و وسته[2] و همکاران (۲۰۰۲) انتخاب شدند (جدول ۴-۳ و جدول ۴-۴). معیار انتخاب آغازگرها برای این پژوهش، به ترتیب میزان چندشکلی[3] (PIC)، میزان هتروزیگوستی، تعداد آلل‌های مشاهده‌شده بود. پس از انتخاب به شرکت تکاپو زیست سفارش داده شدند آغازگرهای موردبررسی به‌صورت فریز دریافت گردیدند و پس از حل کردن و رقیق ساختن در غلظت ۱۰۰ نانوگرم با بافر TE برای ماندگاری بیشتر و مطابق با دستورالعمل مربوط، به‌عنوان ذخیره اصلی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جدول۴- ۳ اطلاعات مربوط به آغازگرهای ریزماهواره SSR

	آغازگر	توالی	دما اتصال	منبع
۱	WGA001	ATTGGAAGGGAAGGGAAATG CGCGCACATACGTAAATCAC	56	Dangel *et al*. 2005
۲	WGA009	CATCAAAGCAAGCAATGGG CCATTGCTCTGTGATTGGG	52	Dangel *et al*. 2005
۳	WGA032	CTCGGTAAGCCACACCAATT ACGGGCAGTGTATGCATGTA	52	Woeste *et al*. 2002
۴	WGA054	CTAGGCTTCCCTAGCCGTG GGCTCCTCTCGATCTCGAC	46	Wang *et al*. 2002
۵	WGA089	ACCCATCTTTCACGTGTGTG TGCCTAATTAGCAATTTCCA	56	Dangel *et al*. 2005
۶	WGA276	CTCACTTTCTCGGCTCTTCC GGTCTTATGTGGGCAGTCGT	54	Dangel *et al*. 2005

[1] Dangel
[2] Woete
[3] Polymorphism content information

جدول ۴-۴ مشخصات نشانگرهای ISSR مورداستفاده

شماره	نام نشانگر	توالی جفت آغازگر	دمای اتصال
1	UBC.853	TCT CTC TCT CTC TCT CRT	50
2	UBC. 886	VDV CTC TCT CTC TCT CT	52
3	UBC.850	GTG TGT GTG TGT GTY C	52
4	UBC.890	VHV GTG TGT GTG TGT GT	54
5	UBC.887	DVD TCT CTC TCT CTC TC	50
6	UBC.826	ACA CAC ACA CAC ACA CC	54
7	S.14	AGA GAG AGA GAG AGA GT	48
8	UBC.884	HBH AGA GAG AGA GAG AG	48
9	UBC.480	GAG AGA GAG AGA GAG AYT	53
10	UBC.888	DBD CAC ACA CAC ACA CA	54

Y = (C,T), R = (A,G), B = (C,G,T), D = (A,G,T)

۴-۵-۳ 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 ۱۵ میکرو لیتر انجام گرفت. مقدار و غلظت مواد شرکت‌کننده در واکنش در جدول ۴-۵ نشان داده‌شده است.

۴-۵-۴ چرخه حرارتی PCR

جدول ۴-۵ شرایط بهینه‌سازی برای PCR آغازگرهای ریز ماهواره

اجزاء واکنش	غلظت مواد	میزان مورد نیاز
مستر	1x	۷/۵میکرو لیتر
هریک از آغازگرها SSR	۱۰ پیکومول	۰/۵میکرو لیتر
آغازگر ISSR	۱۰ پیکومول	۱ میکرو لیتر
DNA الگو	۱۰۰ نانوگرم	۱ میکرو لیتر
آب دیونیزه	-	۵/۵میکرو لیتر
حجم نهایی	-	۱۵ میکرو لیتر

در این پژوهش پس از آزمایش دماها و برنامه‌های مختلف، برنامه حرارتی مناسب برای آغازگرهای مورد مطالعه به دست آمد که برای تمامی آغازگرها، برنامه حرارتی یکسان استفاده شد و تنها تفاوت

بین آن‌ها در دمای اتصال بود. برنامه حرارتی ترموسایکلربرای تکثیر جایگاه‌های موردنظر در جدول ۴-۶ نشان داده‌شده است

جدول ۴-۶ برنامه حرارتی برای تکثیر جایگاه‌های ریز ماهواره

مرحله	دما (درجه سانتی گراد)	زمان (دقیقه)	تعداد چرخه
واسرشته سازی اولیه	۹۵	۵	۱
واسرشته سازی	۹۵	۱	
اتصال آغازگرها	۴۶-۵۶	۱	۳۵
تکثیر	۷۲	۲	
تکثیر نهایی	۷۲	۱۰	۱

۴-۵-۵ الکتروفورز با ژل آگارز متافور

پس از انجام پی سی آر و بدست آوردن نمونه های تکثیری ۲ گرم آگارز متافور را با ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر TBE حل کرده سپس به مقدار ۷ میکرو لیتر اتیدیوم بروماید اضافه شد و درنهایت به مدت ۲ ساعت با ولتاژ ۱۲۰ ولت در الکتروفورز قرار داده شد. پس‌ازآنکه باندها تفکیک شدند ژل‌ها جهت مشاهده باند ها و عکس برداری زیر اشعه UV قرار داده شدند.

۴-۶ آنالیز داده‌ها

داده‌های صفات رویشی، برگ و میوه در نرم‌افزار Excel ثبت و سپس برای محاسبه شاخص‌های آماری (انحراف معیار، متوسط، ضریب تغییرات صفات)، ضرایب همبستگی و رسم درخت از نرم‌افزار SPSS 17.0 استفاده شد. برای محاسبه ضرایب همبستگی از روش پیرسون[1] استفاده شد و تجزیه کلاستر با روش وارد[2] انجام شد. داده‌برداری از روی باندهای مشاهده‌شده باکیفیت برای هر ژنوتیپ به‌صورت داده‌های باینری یک (حضور باند) و صفر (عدم حضور باند) در نرم‌افزار Excel 2013 ثبت

[1] Pearson
[2] Ward method

گردید. برای هر آغازگر ISSR دامنه باندهای تکثیری، تعداد کل باند، تعداد باندهای چند شکل، درصد چندشکلی، میانگین باندهای دارای اطلاعات (AvIb) و قدرت تفکیک‌کنندگی (Rp) تعیین گردید. میانگین باندهای دارای اطلاعات، نشان‌دهنده رابطه بین وجود یک باند در ۵۰ درصد ژنوتیپ‌های تحت مطالعه است و قدرت تفکیک‌کنندگی از مجموع باندهای دارای اطلاعات (Ib) که توسط یک آغازگر تکثیر می‌شوند، به دست می‌آید (Prevost and Wilkinson, 1999). بر اساس داده های SSR و ISSR ماتریس تشابه ژنتیکی و دندروگرام تنوع ژنتیکی به ترتیب توسط روش جاکارد[1] و روش UPGMA با استفاده از نرم‌افزار Ntsys 2.0 (Rohlf, 1998) محاسبه شدند. آنالیز تجزیه به مؤلفه‌ها بر اساس ماتریس فاصله ژنتیکی و با نرم‌افزار GenAlex 6.2 صورت پذیرفت. برای هر آغازگر SSR تعداد باند، تعداد باند موثر، شاخص شانون، هتروزیگوتی مشاهده شده، هتروزیگوتی مورد انتظار و شاخص تثبیت اندازه گیری و شناسایی کلید ژنتیکی براساس نشانگرهای SSR انجام شد.

[1] Jaccard

فصل پنجم

نتایج و بحث

۵-۱ صفات مورفولوژیکی

۵-۱-۱خصوصیات صفات کمی میوه ژنوتیپ ها

میانگین طول میوه در ۲۱ ژنوتیپ موردمطالعه ۳/۷۲ سانتی متر بود طوریکه بیشترین مقدار آن (۴/۳ سانتی متر) در ژنوتیپ KH31 و کمترین مقدار آن در ژنوتیپ R1G7 (۳/۱ سانتی متر) بدست آمد. بیشترین عرض میوه ۳/۹ سانتی متر بود که در ژنوتیپ های R1G2 و R2G8 و KH31 و کمترین این صفت به مقدار ۳ سانتی متر در ژنوتیپ KH34 مشاهده شد میانگین عرض میوه در کل ۲۱ ژنوتیپ برابر با ۳/۴۶ سانتی متر بود. میانگین وزن میوه و وزن مغز به ترتیب برابر با ۱۴/۳۴ و ۷/۳۳ گرم بود (جدول ۵-۱). بیشترین میزان وزن میوه در ژنوتیپ OR23 با مقدار ۱۷/۵۰ گرم مشاهده شد که بیشتر از مقدار گزارش‌شده (۱۵/۲۵ گرم) توسط ارزانی و همکاران (۲۰۰۸) و کمتر از مقدار گزارش‌شده توسط شاملو و همکاران (۱۳۹۶) با مقدار ۱۹/۷۹ گرم و ابراهیمی و همکاران (۲۰۱۱) با مقدار (۱۷/۷ گرم) بود. تزموریس[1] و همکاران (۲۰۰۲) بیشترین مقدار را برای این صفت ۱۱/۰۹ گرم در گردوهای منطقه یونان گزارش کردند کمترین میزان وزن میوه (۱۲/۱۰ گرم) در ژنوتیپ R1G6 مشاهده گردید اما میانگین وزن میوه کمتر از مقدار گزارش‌شده (۱۶/۲ گرم) توسط رضایی و همکاران (۲۰۰۸) بود. بیشترین میزان وزن مغز (۱۰/۳ گرم) در ژنوتیپ OR23 و کمترین میزان وزن مغز (۵/۳ گرم) در ژنوتیپ KH31 مشاهده شد (جدول۵-۱). وزن مغز میوه در ژنوتیپ OR23 بیشتر از حداکثر وزن مغز گزارش‌شده توسط شاملو و همکاران (۱۳۹۵)، ابراهیمی و همکاران (۲۰۱۱)، یاریلگاک[2] و همکاران (۲۰۱۱) و تزموریس و همکاران (۲۰۰۲) (به ترتیب ۹/۴۸ و ۷/۸۸ و ۹/۸ ۶/۳۲ گرم) بود. میانگین درصد مغز که یکی از صفات مهم تجاری است برابر با ۵۱/۱۷ درصد بود که بیشترین این مقدار در ژنوتیپ های R1G2 و T12 با مقدار ۶۲/۷۰ درصد مشاهده شد (جدول ۵-۱) که بیشتر از

[1] Tsmouris
[2] Yarilag

مقدار گزارش‌شده توسط شاملو و همکاران (۱۳۹۵) (۶۰/۳۴ درصد) و یاریلگاک و همکاران (۲۰۰۱) (۵۹/۲۷ درصد) بود و کمترین مقداردر این صفت ۴۳/۴۰ در ژنوتیپ KH31 مشاهده شد (جدول ۵-۱). ژنوتیپ KH31 در صفات طول میوه و عرض میوه بیشترین و در صفت‌های وزن مغز و درصد مغز کمترین مقدار را از آن خودکرد. بیشترین میزان واریانس با مقدار ۳۰/۵۷ و انحراف معیار با مقدار ۵/۵۳ در درصد مغز میوه مشاهده شد (جدول ۵-۱). میزان واریانس نشان‌دهنده تنوع موجود در ژنوتیپ‌های مورد بررسی است که هر چه میزان واریانس بیشتر باشد، تنوع بیشتری از لحاظ آن صفت در میان ژنوتیپ ها وجود دارد کمترین میزان واریانس و انحراف معیار با مقدار عددی به ترتیب ۰/۰۷۱ و ۰/۲۷ در صفت عرض میوه مشاهده شده و این نشان‌دهنده آن است که اطلاعات اندازه‌گیری شده در این صفت به هم بسیار نزدیک بوده و عرض میوه در ژنوتیپ ها تنوع ندارد. صفات وزن مغز و وزن میوه در میان ژنوتیپ ها نیز تنوع بالایی را نشان دادند و در سایر پژوهش ها (Arzani *et al*. 2008; Wang *et al*., 2015) نیز مشاهده شد که صفاتی مربوط به میوه و مغز نسبت به دیگر صفات مانند صفات رویشی کمتر تحت تاثیر تغییرات آب و هوایی قرار می‌گیرند بنابراین معتبرتر نیز می‌باشند.

جدول ۵-۱ صفات کمی اندازه گیری شده در ۲۱ ژنوتیپ گردو

ژنوتیپ ها	طول میوه(cm)	عرض میوه(cm)	وزن میوه (gr)	وزن مغز (gr)	درصد مغز
T9	۳/۵	۳/۴	۱۳/۹	۷/۴	۵۳/۲
K26	۴/۲	۳/۶	۱۷/۳	۸/۶	۴۹/۷
K28	۴	۳/۶	۱۵/۸	۸/۳	۵۲/۵
T12	۳/۵	۳/۴	۱۳/۹	۷/۹	۶۲/۷
OR23	۴/۱	۳/۸	۱۷/۵	۱۰/۳	۵۸/۸
SH1	۳/۷	۳/۶	۱۳/۶	۷/۵	۵۵
T1	۳/۸	۳/۴	۱۴/۲	۷/۳	۴۸/۳
OR26	۳/۸	۳/۱	۱۶/۸	۷/۶	۴۵/۴
OR4	۳/۷	۳/۲	۱۴	۶/۳	۴۵
KH34	۳/۴	۳	۱۳/۳	۶/۴	۴۸
KH31	۴/۳	۳/۹	۱۵/۷	۵/۳	۴۳/۴
KH4	۳/۶	۳/۲	۱۵/۸	۷/۶	۴۸
OR37	۳/۳	۳/۱	۱۲/۵	۷/۳	۵۸/۴
R2G3	۳/۸	۳/۶	۱۳/۷	۶/۵	۵۰
R2G5	۳/۵	۳/۴	۱۳	۶/۸	۵۲
R2G8	۴	۳/۹	۱۷	۸/۵	۵۰
R2G4	۳/۶	۳/۵	۱۴/۲	۶/۹	۴۹
R1G6	۳/۶	۳/۴	۱۲/۱	۵/۸	۴۷/۹
R1G7	۳/۱	۳/۴	۱۴/۲	۶/۹	۴۸/۶
R1G2	۴/۱	۳/۹	۱۲/۶	۷/۹	۶۲/۷
R2G1	۳/۵	۳/۳	۱۳/۴	۶/۹	۴۶
کمترین	۳/۱	۳	۱۲/۱	۵/۳۰	۴۳/۴۰
بیشترین	۴/۳۰	۳/۹	۱۷/۵۰	۱۰/۳۰	۶۲/۷۰
میانگین	۳/۷۲	۳/۴۶	۱۴/۳۴	۷/۳۳	۵۱/۱۷
واریانس	۰/۰۹۷	۰/۰۷۱	۲/۸۷	۱/۱۷	۳۰/۵۷
STDEV	۰/۳۱	۰/۲۷	۱/۶۹	۱/۰۸	۵/۵۳

۵-۱-۲ روابط بین صفات کمی

ازلحاظ بررسی میزان همبستگی و معنی‌دار بودن آن در سطح یک درصد، صفات وزن مغز با درصد مغز دارای همبستگی ۰/۵۶ و صفت وزن میوه با وزن مغز دارای همبستگی ۰/۷۷ و طول میوه نسبت به عرض میوه دارای همبستگی ۰/۷۲ و معنی‌دار بودند. برخی صفات مانند وزن میوه با وزن مغز و وزن مغز با درصد مغز همبستگی بالایی داشتند که با نتایج شاملو و همکاران (۱۳۹۵) و ارزانی[1] و همکاران (۲۰۰۸) و شارما[2] و همکاران (۲۰۰۱) و اسکندری[3] و همکاران (۲۰۰۵) مطابقت دارد و بین صفات طول میوه با درصد مغز، وزن مغز، وزن میوه همبستگی معنی‌داری وجود ندارد که و با نتایج اسکندری و همکاران (۲۰۰۵) مطابقت ندارد. بین عرض میوه با درصد مغز، وزن مغز و وزن میوه همبستگی معنی‌داری مشاهده نشد (جدول۵-۲).

۵-۱-۳ خصوصیات صفات کیفی ژنوتیپ ها

مشخصات صفات اندازه‌گیری شده و میزان تنوع هر صفت در ژنوتیپ های مختلف در جدول (۵-۳) آمده است. باز شدن جوانه‌ها از اواخر اسفند شروع و تا اوایل اردیبهشت‌ماه ادامه دارد. در این مطالعه اکثر ژنوتیپ ها در فاصله زمانی متوسط از زمان تعیین‌شده شروع به برگ دهی کرده‌اند و ژنوتیپی به‌عنوان زود برگ‌ترین وجود نداشته و ژنوتیپ های R1G2, R2G4, SH1, OR23 که از مناطق شاهرود و ارومیه هستند جزء دیر برگ‌ترین ها هستند. یکی از اهداف مهم در گردو دستیابی به ارقامی است که‌برگ آن‌ها در بهار دیرتر ظاهر شود. ویژگی دیر برگی در این ژنوتیپ ها موردتوجه قرار می‌گیرد (ابراهیمی و همکاران، ۱۳۸۸) ارقام زود برگ ده در بهار بیشتر در معرض خطر بارندگی‌های بهاره در طول دوره گلدهی می‌باشند که این موضوع می‌تواند در گرده‌افشانی آن‌ها اختلال ایجاد کند و از طرفی به بیماری بلایت نیز حساس‌تر می‌شوند (Forde, 1975). ازلحاظ شکل میوه، بیشتر

[1] Arzani
[2] Sharma
[3] Eskandari

ژنوتیپ‌های انتخابی تخم‌مرغی شکل و برخی گرد نیز بودند. تنها ژنوتیپ OR4 دارای شکل میوه مستطیل کوتاه است و ژنوتیپ‌های OR26 و K26 دارای شکل میوه بیضوی بودند (جدول ۵-۳). ازنظر شکل برجستگی‌های روی پوسته میوه تنها ژنوتیپ R2G1 دارای سطح میوه برجسته‌تر بود و بقیه ژنوتیپ ها پوست میوه آن‌ها صاف و تاکمی برجسته (متوسط) بودند. میزان چسبندگی مغز به پوسته یکی از فاکتورهای کلیدی در بازارپسندی میوه گردو محسوب می‌شود که به غیراز ژنوتیپ K26 در مابقی ژنوتیپ ها مغز با چسبندگی بسیار کم و یا کم است (جدول ۵-۳).

جدول ۵-۲ همبستگی بین صفات با داده های کمی در بین ۲۱ ژنوتیپ گردو

	KP(درصد مغز)	KW(وزن مغز)	NW(وزن میوه)	FW(عرض میوه)	FL(طول میوه)
KP (درصد مغز)	۱				
KW (وزن مغز)	۰/۵۶**	۱			
NW (وزن میوه)	-۰/۰۴	۰/۷۷**	۱		
FW(عرض میوه)	۰/۲۶	۰/۳۱	۰/۱۵	۱	
FL(طول میوه)	-۰/۰۰۱	۰/۳۳	۰/۳۸	۰/۷۲**	۱
**همبستگی معنی داری در سطح ۰/۰۱ درصد					

به لحاظ صفت رنگ مغز بیشتر مردم ایران طرفدار رنگ‌های روشن هستند و آن‌را حاکی از کیفیت مطلوب می‌دانند (جدول۵-۳) درحالی‌که آمریکایی‌ها کهربایی را بیشتر می‌پسندند (McGranahan *et al.* 1998) در این بررسی ژنوتیپ‌های K26، K28, T12، OR4, OR26, OR23,و KH4 دارای رنگ روشن بودند مقدار میانگین به‌دست‌آمده در این صفت ۲/۲۴ بوده است و با واریانس ۰/۹۹ که نشان‌دهنده حضور تنوع در بین ژنوتیپ ها است. تیپ گلدهی با میانگین ۱/۲۴ بر اساس نحوه قرار گرفتن جوانه‌ها ارزیابی می‌شود و درمجموع ۲۱ ژنوتیپ ۳ تیپ جوانه‌زنی (انتهایی- انتهایی جانبی و جانبی) وجود داشت که بیشترین آن به نوع انتهایی جانبی مربوط می‌شود و انحراف معیار آن مقدار ۰/۴۴ است (جدول ۵-۴). زمان شکفتن گل‌های نر و ماده در اکثر ژنوتیپ ها بر اساس زمان‌بندی تعیین‌شده در سطح متوسط یا دیر شکوفا بوده‌اند که یک حسن تلقی می‌شود و از سرمای دیررس

بهاره محفوظ می‌مانند میانگین این دو صفت به ترتیب ۲/۳۳ و ۲/۱۰ است (جدول۵-۴). ضخامت پوست چوبی با میانگین ۱/۸۱ میلی متر و انحراف معیار ۰/۸۱ یک صفت تعیین‌کننده است (Forde and Mc Granaham, 1993). ضخامت پوست چوبی در گردوهای پوست‌کاغذی کمتر است و روزنه بازتری دارند (Mc Granaham and Leslie, 1990). ازلحاظ ضخامت پوسته تنها ژنوتیپ‌های K26 و T1 و OR26 و R2G8 میوه‌هایی باپوست ضخیم داشتند که میزان بازارپسندی را در این ژنوتیپ ها کاهش می‌دهد. در صفت شکل درخت کمترین حالت به شکل نیمه راست و بیشترین شکل مربوط به شکل گسترده درخت است. در میان تمامی صفات کیفی کمترین واریانس و انحراف معیار را صفت شکل درخت به خود اختصاص داده است (میانگین این صفت ۲/۸۶ بود). در صفت قدرت رویشی درخت کمترین حالت به حالت متوسط و بیشترین آن به حالت قدرت رویشی زیاد مربوط می‌شود. میانگین این صفت ۶/۴۳ بودکه در بین ۲۱ ژنوتیپ گردو بالاترین میانگین را به خود اختصاص داد. انحراف معیار این صفت ۰/۹۳بود (جدول ۵-۴). در صفت دایکوگامی تمامی ژنوتیپ ها حالت دایکوگامی از نوع پروتاندری را دارا بودند و هیچ حالت دیگری برای این صفت مشاهده نشد. به همین دلیل میانگین در این صفت ۱ شده و انحراف معیار و واریانس نیز صفر شده‌اند. زمان رسیدن محصول در ۲۱ ژنوتیپ متنوع بوده و انحراف معیار ۱/۵۴ را دارا است. در صفات حساسیت به سرما و حساسیت به آبیاری که ازجمله صفات مزرعه‌ای محسوب می‌شوند بیشتر ژنوتیپ ها به سرما حساس بودند اما نسبت به آبیاری حالت بی‌تفاوتی را نشان داده‌اند.

جدول ۵-۳ صفات کیفی مهم در ۲۱ ژنوتیپ برتر انتخابی از کلکسیون شاهرود

ژنوتیپ	شکل میوه	وضعیت سطح پوست چوبی	میزان چسبندگی پوست به مغز	ضخامت پوست چوبی	رنگ مغز
T9	گرد	صاف	آسان	متوسط	کهربایی
K26	بیضوی	متوسط	سخت	ضخیم	روشن
K28	تخم مرغی	متوسط	آسان	نازک	روشن
T12	گرد	صاف	متوسط	نازک	روشن
OR23	تخم مرغی	متوسط	آسان	نازک	روشن
SH1	تخم مرغی	صاف	آسان	نازک	خیلی روشن
T1	تخم مرغی	صاف	آسان	ضخیم	کهربایی
OR26	بیضوی	متوسط	متوسط	ضخیم	روشن
OR4	مستطیل کوتاه	متوسط	متوسط	ضخیم	روشن
KH34	تخم مرغی	متوسط	آسان	متوسط	تیره
KH31	تخم مرغی	متوسط	آسان	نازک	خیلی روشن
KH4	تخم مرغی	متوسط	متوسط	متوسط	روشن
OR37	تخم مرغی	صاف	متوسط	نازک	خیلی روشن
R2G3	تخم مرغی	صاف	متوسط	متوسط	کهربایی روشن
R2G5	تخم مرغی	صاف	آسان	نازک	کهربایی
R2G8	گرد	کمی چروکیده	آسان	ضخیم	کهربایی روشن
R2G4	تخم مرغی	متوسط	آسان	نازک	کهربایی
R1G6	تخم مرغی	صاف	آسان	متوسط	کهربایی
R1G7	تخم مرغی	صاف	آسان	متوسط	کهربایی روشن
R1G2	تخم مرغی	صاف	متوسط	متوسط	کهربایی روشن
R2G1	تخم مرغی	متوسط	آسان	نازک	کهربایی روشن

جدول۵-۴ داده های کیفی ۲۱ ژنوتیپ گردو در کلکسیون مرکز تحقیقات شاهرود

		کمترین	بیشترین	میانگین	انحراف معیار	واریانس
شکل درخت	TSH	۲	۳	۲/۸۶	۰/۳۶	۰/۱۳
قدرت رویشی	VP	۵	۷	۶/۴۳	۰/۹۳	۰/۸۶
تیپ گلدهی	FT	۱	۲	۱/۲۴	۰/۴۴	۰/۱۹
زمان شکفتن گل‌های ماده	FFA	۲	۳	۲/۳۳	۰/۴۸	۰/۲۳
زمان شکفتن گل‌های نر	MFA	۱	۳	۲/۱۰	۰/۵۴	۰/۲۹
دایکوگامی	Di	۱	۱	۱/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰
زمان رسیدن محصول	FR	۳	۷	۵/۴۸	۱/۵۴	۲/۳۶
زمان ریزش برک	LF	۱	۲	۱/۷۱	۰/۴۶	۰/۲۱
حساسیت به سرما	CS	۱	۴	۱/۵۷	۸	۰/۷۶
حساسیت به آبیاری	IS	۱	۴	۲/۱۴	۱/۰۶	۱/۱۳
شکل میوه	FS	۱	۸	۴/۰۰	۱/۷۳	۳/۰۰
وضعیت سطح پوست چوبی	NSS	۱	۳	۱/۵۷	۰/۶۰	۰/۳۶
ضخامت پوست چوبی	Sdi	۱	۳	۱/۸۱	۰/۸۱	۰/۶۶
وضعیت درشتی مغز	Ks	۱	۳	۲/۱۰	۰/۵۴	۰/۲۹
رنگ مغز	kC	۱	۴	۲/۲۴	۱/۰۰	۰/۹۹
آسان جدا شدن مغز از پوسته	KF	۳	۷	۳/۹۵	۱/۲۰	۱/۴۵
زمان برگ دهی	LBB	۳	۵	۳/۸۶	۱/۰۱	۱/۰۳

۵-۱-۴ روابط بین صفات با داده های کیفی

نتایج همبستگی صفات مورد بررسی که برخی از آن‌ها معنی‌دار هستند در (جدول ۵-۵) ارائه‌شده است در بین این صفات می‌توان به صفاتی همچون زمان شکوفایی گل ماده و نر، حساسیت به آبیاری، وضعیت سطح پوست چوبی، درشتی مغز، آسان جدا شدن مغز از پوست چوبی و زمان برگ دهی اشاره کرد. برخی صفات رویشی مثل قدرت رویشی و زمان باز شدن گل‌های ماده دارای همبستگی بسیار زیادی باهم هستند میزان همبستگی این صفات به حدی است که به ما اجازه می‌دهد تا از طریق

اندازه‌گیری هرکدام به تغییرات صفت همبسته پی ببریم، لذا از این طریق با صرف زمان و هزینه کمتر به‌طور غیرمستقیم اندازه‌گیری یک صفت انجام می‌گیرد (Forde, 1975). بین زمان باز شدن گل‌های نر و ماده و بین صفات مزرعه‌ای حساسیت به آبیاری و حساسیت به سرما نیز همبستگی مثبت و بالایی وجود دارد.

بین درشتی مغز و زمان شکوفایی گل ماده همبستگی مثبت وجود دارد، درحالی‌که با وضعیت سطح چوبی پوست علامت منفی را نشان می‌دهد. همبستگی بسیار بالایی را می‌توان در بین صفت زمان برگ دهی بازمان شکوفایی گل نر و ماده و درشتی مغز و آسان جدا شدن مغز مشاهده کرد. بین شکل میوه و جدا شدن مغز از نات و وضعیت سطح پوست چوبی همبستگی معنی‌داری را در سطح ۱ و ۵ درصد نمی‌توان مشاهده کرد که این نتیجه با نتایج شاملو و همکاران (۱۳۹۵) اسکندری و همکاران (۲۰۰۵) ابراهیمی و همکاران (۱۳۸۸) مطابقت دارد. میزان همبستگی بین برخی پارامترها مثبت ولی پایین بوده و با توجه به جدول معنی‌دار نمی‌باشند.

جدول ۵-۵ همبستگی بین صفات کیفی در ۲۱ ژنوتیپ گردو

	TSH شکل درخت	VP قدرت رویشی	FT تیپ گلده ای	FFA زمان شکفتن گل ماده	MFA زمان شکفتن گل نر	FR زمان رسیدن محصول	LF زمان ریزش برگ	CS حساسیت به سرما	IS حساسیت به ابیاری	FS شکل میوه	NSS سطح چوبی	Sdi ضخامت پوست	Ks درشتی مغز	Kc رنگ مغز	KF آسان جدا شدن	LBB برگ دهی
TSH	۱															
VP	۰/۳۴	۱														
FT	۰/۰۹ -	۰/۳۹ -	۱													
FFA	۰/۲۹	۰.۴۵*	۰/۰۸	۱												
MFA	۰/۳۳	۰.۵۰*	۰/۰۹ -	۰.۶۵**	۱											
FR	۰/۲۷	۰/۱۴	۰/۳۱	۰/۱۴	۰/۱۶	۱										
LF	۰/۰۴	۰/۰۷	۰/۱۱	۰/۲۲	۰/۱۱	۰/۱۹	۱									
CS	۰/۰۸	۰/۰۵	۰/۱۶ -	۰/۰۵	۰/۲۴	۰/۰۴	۰/۱۲	۱								
IS	۰/۰۸ -	۰/۰۹	۰/۱۸ -	-۰/۱۰	۰/۲۴	۰/۰۸	۰/۰۹	۰.۶۳**	۱							
FS	۰/۲۷ -	۰/۲۱ -	۰/۲۱ -	-۰/۱۸	۰/۳۳ -	۰/۱۸ -	-۰/۳۹	-۰/۳۶	۰/۱۵ -	۱						
NSS	-.۴۸**	۰/۰۶	۰/۱۶ -	-۰/۱۶	۰/۰۲ -	۰/۰۱	۰/۰۶	۰/۰۳	۰/۲۴	۰/۳۳	۱					
Sdi	-.۴۳*	۰/۰۴ -	۰/۲۸ -	-۰/۳۶	۰/۰۶ -	-۰/۲۳	-۰.۵۶**	۰/۰۱	۰/۰۸	۰.۵۳*	۰/۱۶	۱				
Ks	/۳۲۶ ۰	۰/۰۸ -	۰/۱۱	۰.۴۵*	۰/۰۴ -	۰/۱۸ -	۰/۱۳	-۰/۱۶	۰/۳۹ -	۰/۰۰	-.۴۴*	-۰/۳۰	۱			
kC	۰/۱۸ -	۰/۲۷ -	۰/۴۳	-۰/۱۷	۰/۰۵	۰/۱۴	۰/۱۴	۰/۰۲	۰/۰۷ -	-۰/۳۷	-۰/۲۹	۰/۰۵	۰/۰۴ -	۱/۰۰		
KF	۰/۰۹	۰/۱۴	-۰/۰۵	.۴۴*	.۴۶*	-۰/۲۰	-۰/۳۵	۰/۰۳	-۰/۰۸	۰/۲۵	-۰/۱۳	۰/۲۵	۰/۱۸	-۰/۱۴	۱	
LBB	۰/۳۵	۰/۳۴	-۰/۰۳	.۸۶**	.۵۸**	-۰/۰۵	۰/۱۲	-۰/۱۰	-۰/۳۱	-۰/۱۷	-۰/۳۵	-۰/۲۷	.۵۸**	-۰/۰۱	.۶۲**	۱

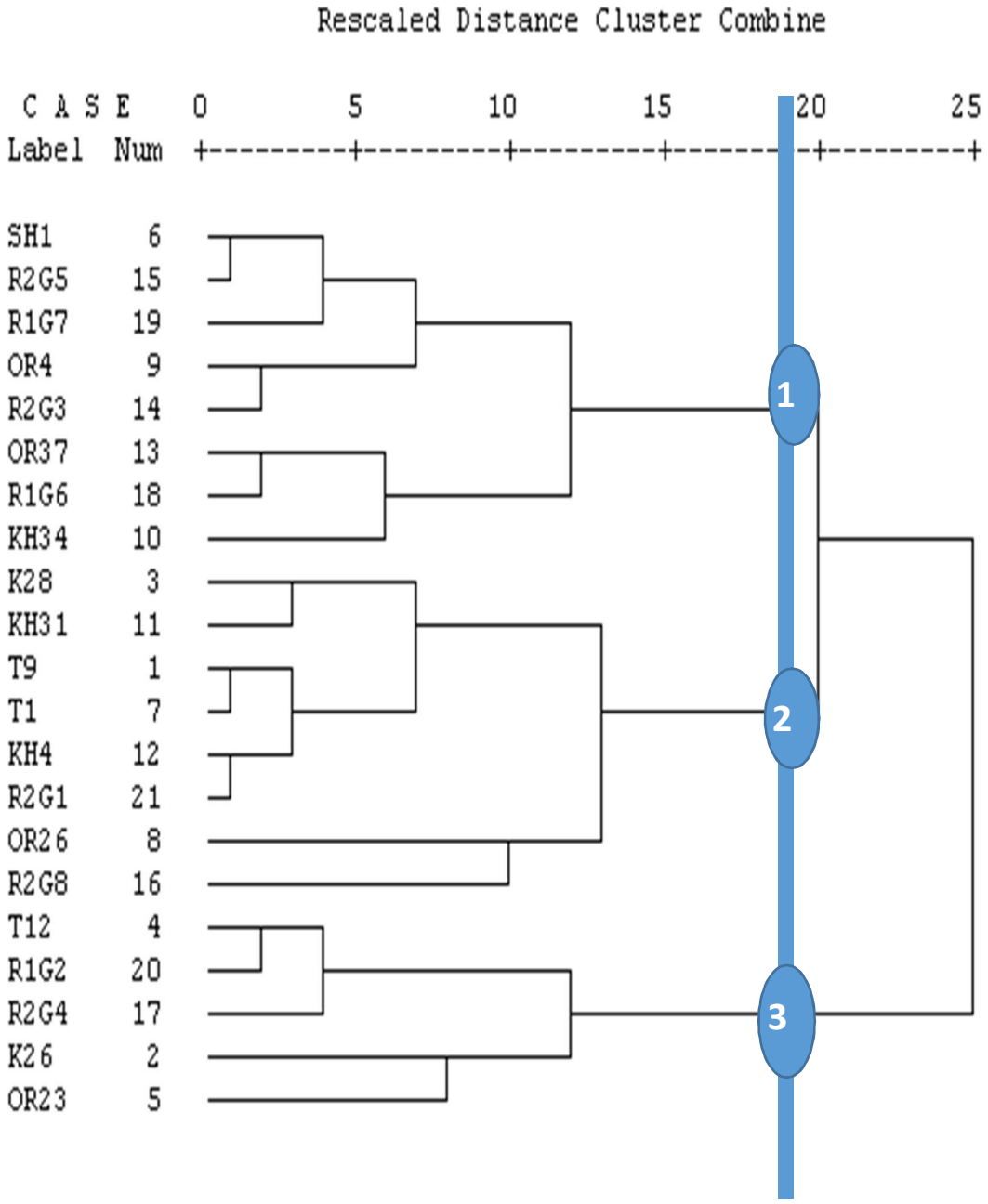
*معنی داری در سطح ۰/۰۵ درصد

**معنی داری در سطح ۰/۰۱ درصد

۵-۱-۵ تجزیه کلاستر مورفولوژیکی

گروه‌بندی ژنوتیپ ها بر اساس صفات مختلف می‌تواند روش مؤثری در مشخص شدن رابطه ژنوتیپ ها و تعیین فاصله خویشاوندی آن‌ها باشد. آنالیز کلاستر ۲۱ ژنوتیپ گردو بر اساس صفات مورفولوژی در شکل (۵-۱) ارائه شده است. **گروه اول:** این گروه در صفاتی همچون شکل میوه و وزن میوه و درصد مغز و در زمان‌های شکوفایی گل‌های نرو ماده و برگ دهی بسیار به هم نزدیک‌اند. در این گروه اغلب ژنوتیپ های شاهرود به همراه دو ژنوتیپ ارومیه و یک ژنوتیپ خراسان قرارگرفتند. همچنین در این خوشه ژنوتیپ OR4 با متفاوت‌ترین شکل میوه (مستطیلی کوتاه) نیز قرارگرفته است. این گروه نیز همانند گروه دوم هشت ژنوتیپ را در خود جای‌داده است. **گروه دوم:** در این گروه هشت ژنوتیپ قرارگرفته که به دو زیرگروه بزرگ و کوچک هم می‌توان تقسیم کرد در زیرگروه یک ژنوتیپ هایی از مناطق کرج، خراسان، همدان و شاهرود حضور دارند که برخلاف فاصله جغرافیایی زیاد ولی در یک گروه قرارگرفته‌اند که میتواند نشان دهنده ی انتقال ژنوتیپ ها به وسیله انسان باشد و در زیرگروه دوم تنها دو ژنوتیپ OR26 و R2G8 بافاصله‌ای نسبتاً دور از یکدیگر حضور دارند که از مناطق ارومیه و شاهرود محسوب می‌شوند. با بررسی صفاتی همچون برگ دهی و تیپ گلدهی مشخص‌شده که تمام ژنوتیپ ها در این صفات یکسان هستند و برگ دهی متوسط و تیپ گلدهی انتهایی جانبی را دارند. در آنالیز دیگر در صفات میوه همچون ضخامت پوست چوبی و شکل میوه و رنگ مغز نتایج نزدیک بهم داشته‌اند. در شکل میوه ژنوتیپ های T9 و R2G8 دارای شکل گرد بوده‌اند و ژنوتیپ OR26 دارای شکل لوزی است.**گروه سوم:** این گروه دارای ۵ ژنوتیپ است و کوچک‌ترین گروه طبقه‌بندی محسوب می‌شود. در این گروه ژنوتیپ ها از مناطق همدان، کرج، شاهرود و ارومیه حضور دارند. ژنوتیپ T12 و R1G2 فاصله‌ی نزدیکی دارند بطوریکه در اکثر صفت‌ها باهم یکسان هستند و در صفت درصد مغز هر دو به مقدار ۶۲/۷ درصد و زمان رسیدن محصول هردو میان‌رس هستند و این دو با ژنوتیپ R2G4 نزدیک‌اند که آن ها را در یک زیرگروه قرار داده است. درگروه سوم دو ژنوتیپ K26 و OR23 با

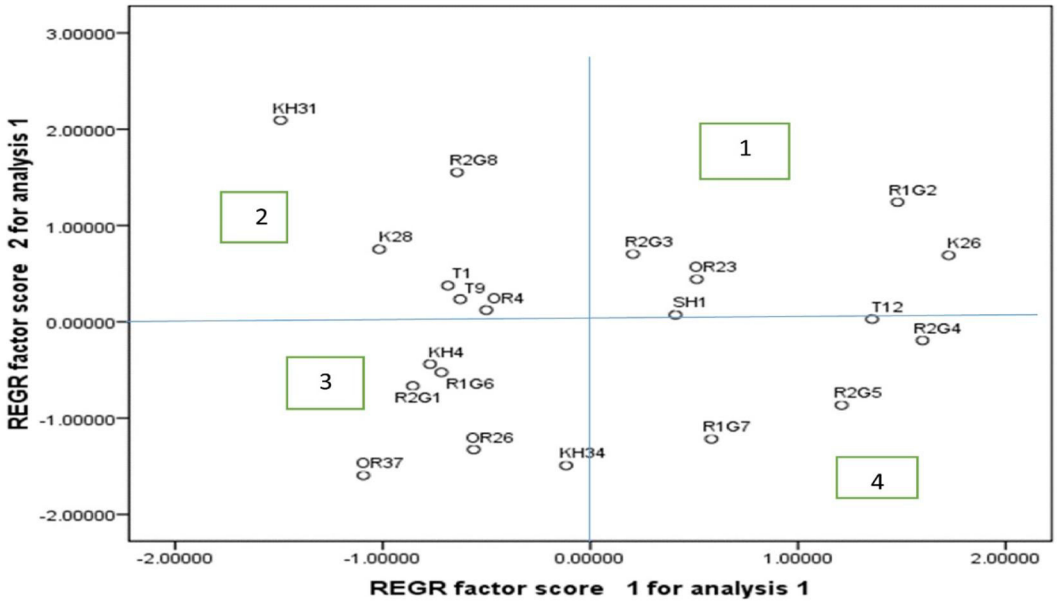
فاصله‌ی نسبتاً دوری از هم قرارگرفته‌اند. در بررسی صفات این گروه در زمینه برگ دهی و تیپ گلدهی و زمان رسیدن محصول و درصد مغز مشخص‌شده که اکثر ژنوتیپ ها در این صفات یکسان هستند. به‌طورکلی سطح تنوع در ژنوتیپ ها خوب بوده و می‌تواند در کارهای بعدی مورداستفاده بیش‌تر قرار گیرد.



شکل ۵-۱ کلاستر تنوع مورفولوژیکی ۲۱ ژنوتیپ برتر گردو با استفاده از صفات کمی و کیفی

۵-۱-۶ آنالیز بای پلات

در شکل (۵-۲) آنچه مشخص می‌شود رابطه ژنوتیپ ها به‌صورت تصویری است که ژنوتیپ ها با یکدیگر در چه فاصله‌ای قرار گرفتند در واقع این پلات یک تأییدی بر نتایج کلاستر است. پلات به ۴ گروه تقسیم شده که تنها گروه ۲ ژنوتیپ ها تماما نتایج کلاستر را تایید میکند و در بقیه گروه ها تعداد کمتری از ژنوتیپ ها برابری می‌کنند. تجزیه پلات درک راحت‌تری را درزمینه فاصله ژنوتیپ ها از یکدیگر می‌دهد (ابراهیمی و همکاران، ۱۳۸۸). در این شکل همان‌طور که مشاهده می‌شود ژنوتیپ KH31 در فاصله‌ای دورتر واقع شده است و ژنوتیپ های R2G8 و K28 نزدیک‌ترین ژنوتیپ ها به آن هستند. به دلیل اینکه درخت گردو دارای گرده‌افشانی باز است و از طرفی دیگر از طریق دانه تکثیر می‌شود می‌تواند سطح بالایی از جمعیت‌های متنوعی را ایجاد کند به همین دلیل استفاده از روش مورفولوژیکی به‌تنهایی برای شناسایی کاربرد ندارد. بلکه استفاده توأم از روش‌های مولکولی و مورفولوژیکی می‌تواند سطح بالایی از شناسایی را ایجاد کند (Ebrahimi *et al*., 2011).



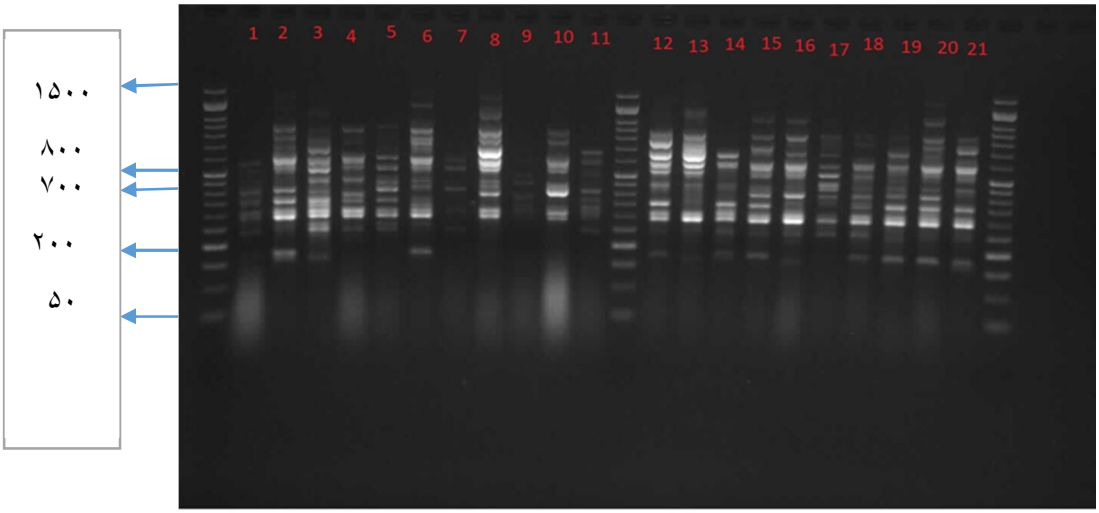
شکل ۵-۲ بای پلات ۲۱ ژنوتیپ برتر گردو و میزان نزدیکی ژنوتیپ ها

۵-۲ تنوع ژنتیکی با مارکر ISSR

در این پژوهش از ۱۰ آغازگر ISSR جهت بررسی تنوع ژنتیکی ۲۱ ژنوتیپ برتر گردوهای ایران در کلکسیون شاهرود استفاده شد. به‌طورکلی ۱۱۲ باند از انجام واکنش PCR حاصل شد که ۱۰۲ باند چندشکلی را نشان دادند که تقریباً ۹۱٪ پلی مورفیسم مشاهده شد (جدول ۵-۶) که این نتایج حاکی از کارایی مناسب نشانگرها و تنوع موجود بین ژنوتیپ‌ها است. پلی جینی[1] و همکاران (۲۰۰۵) در بررسی ۴۸ واریته گردو با هشت آغازگر ISSR، ۵۴ باند مشاهده کردند که تنها ۳۱ عدد از باندها (۵۷/۴ درصد) چندشکلی را نشان دادند. بررسی تنوع ژرم پلاسم و روابط ژنتیکی در میان ارقام گردو و ارقام محلی یونان با نشانگر ISSR نشان داد که ۸۲/۸ درصد چندشکلی توسط این نشانگرها ایجاد می‌شود (Christopolous *et al*., 2010). همچنین لی[2] و همکاران (۲۰۰۸) با استفاده از ۱۲ آغازگر ISSR روابط بین ۱۰۴ ژنوتیپ گردو را بررسی کردند که ۴۸۱ باند از مجموع ۴۸۵ باند تکثیرشده پلی مورفیک بودند و درصد چندشکلی ۹۱/۱ درصد محاسبه شد. دوگان[3] و همکاران (۲۰۱۴) نیز ۶۹/۱ درصد پلی مورفیک با ۲۵ نشانگر ISSR در ۵۹ ژنوتیپ گردو ترکیه و ارقام بین‌المللی آن، مشاهده کردند. درصد چندشکلی و میزان باندهای تکثیرشده در آغازگرهای ISSR بستگی به تنوع و تعداد ژنوتیپ‌های مورد بررسی دارد. نتایج پلی مورفیسم مشخص‌شده توسط نشانگر ISSR در بین مطالعات مختلف متفاوت بوده است که خود فرایندی است از فاکتورهایی همچون مواد ژنتیکی، آغازگرها و روش جداسازی باندها است و در واقع این بخش به میزان قدرت جداسازی ژل بستگی دارد (Christopolous *et al*.,2010). در این مطالعه برای تفکیک باندها از ژل آگاروز متافوز با دمای ذوب ۷۰ درجه استفاده شد. این نوع آگاروز قادر است که باندهای با اختلاف ۴ جفت باز را از یکدیگر تفکیک کند و در نتیجه دقت و تعداد باندها افزایش می‌یابد. کمترین تعداد باندهای تکثیرشده در آغازگرهای UBC.853، UBC.884، UBC.850 و UBC.886 با تعداد نه باند و بیشترین تعداد باند

[1] Polligioni
[2] Li
[3] Dogan

تکثیری در آغازگرهای UBC.826 و UBC.888 با ۱۴ باند مشاهده شد (جدول ۵-۶). بیشترین میزان میانگین باندهای حاوی اطلاعات (AvIb) در آغازگرهای UBC887 و UBC886 به میزان ۰/۶۲ مشاهده شد. آغازگر UBC884 با میزان ۰/۱۴ کمترین باندهای حاوی اطلاعات را تولید کرد. بیشترین قدرت تفکیک‌کنندگی به میزان ۷/۷۱ در آغازگر UBC826 و پس‌ازآن در آغازگر UBC.887 مشاهده شد. قدرت تفکیک شاخصی است که نشان می‌دهد هر آغازگر چه تعداد از ژنوتیپ ها را می‌تواند شناسایی کند با این حساب کمترین میزان Rp با میزان ۱/۲۴ در آغازگر UBC.884 مشاهده شد. در تحقیقی که عطار و همکارانش (۱۳۹۶) نیز در گردو انجام دادند بیشترین RP با مقدار ۳/۸۹ در آغازگر UBC.830 و کمترین مقدار ۰/۳۲ گزارش‌شد که متعلق به آغازگر UBC.834 بود. طبق نتایج حاصل از تحقیق کریستوپولوس و همکاران (۲۰۱۰) بر روی ژرم پلاسم‌های گردو در یونان، بالاترین و کمترین مقدار RP به ترتیب در آغازگر UBC.814 (با مقدار ۸/۱۸) و UBC.830 (با مقدار ۰/۸۶) مشاهده شد. مقدار RP نشانگرهای AFLP در ژنوتیپ‌های گردو با میانگین ۱۶/۲ گزارش‌شده است (عطار و همکاران، ۱۳۹۶). درحالی‌که میانگین RP با آغازگرهای ISSR، ۴/۵۲ گزارش‌شده است (Prevoest *et al.*, 1999) که نسبت به میانگین مطالعه حاضر کمتر است.



شکل ۵-۳- الگوی باندی DNA تکثیرشده از ۲۱ ژنوتیپ برتر گردو با آغازگر UBC.826 بروی ژل آگاروز متافور

جدول ۵-۶ چندشکلی ایجادشده حاصل از آغازگرهای ISSR در ژنوتیپ‌های برتر گردو در ایران							
آغازگر	توالی	دامنه باند	تعداد باند	تعداد باند چندشکلی	درصد چندشکلی	AVIb	Rb
UBC.853	VDG (CT)7	۲۰۰-۱۰۰۰	۹	۷	۷۸	۰/۳۲	۲/۸۶
UBC.884	HBH (AG)7	۲۰۰-۷۰۰	۹	۷	۷۸	۰/۱۴	۱/۲۴
S14	(AG)8 T	۲۵۰-۱۲۰۰	۱۲	۱۰	۸۳	۰/۵۱	۶/۱۰
UBC.888	DBD(CA)7	۱۵۰-۱۲۰۰	۱۴	۱۱	۷۹	۰/۴۷	۶/۵۷
UBC.887	DVD(TC)7	۲۵۰-۱۲۰۰	۱۲	۱۲	۱۰۰	۰/۶۲	۷/۴۳
UBC.840	(GA)8YT	۱۵۰-۱۵۰۰	۱۱	۱۰	۹۱	۰/۴۱	۴/۴۸
UBC.890	VHV(GT)7	۱۵۰-۱۰۰۰	۱۳	۱۳	۱۰۰	۰/۵۱	۶/۵۷
UBC.826	(AC)8C	۱۵۰-۱۲۰۰	۱۴	۱۴	۱۰۰	۰/۵۵	۷/۷۱
UBC.850	7YC)GT	۱۵۰-۹۰۰	۹	۹	۱۰۰	۰/۴۱	۳/۷۱
UBC.886	VDV(CT)7	۱۵۰-۸۰۰	۹	۹	۱۰۰	۰/۶۲	۵/۶۲
Total	-	-	۱۱۲	۱۰۲	-	-	-

Y = (C,T), R = (A,G), B = (C,G,T), D = (A,G,T), AvIb: Average band informative

Rb: resolving power میانگین **باندهای حاوی اطلاعات**

۵-۲-۱ تنوع ژنتیکی و میزان خویشاوندی ژنوتیپ ها بر اساس داده‌های ISSR

نتایج ماتریس تشابه بین ۲۱ ژنوتیپ گردو بر اساس ۱۰۲ باند تکثیری از آغازگرهای ISSR نشان داد که ضریب تشابه ژنوتیپ‌ها بین ۰/۵۱ تا ۰/۸۸ متغیر است. بیشترین تشابه (۸۸٪) بین ژنوتیپ‌های R2G1 با R1G2 و همچنین ژنوتیپ‌های R1G7 با R1G2 وجود داشت که هر دو ژنوتیپ از منطقه شاهرود جمع‌آوری‌شده بودند.کمترین ضریب تشابه به میزان ۰/۵۱ بین ژنو تیپ‌های T9 و OR37 مشاهده شد. عطار و همکاران (۱۳۹۶) بامطالعه گردوی ایرانی در باغات مشهد دریافتند که تنوع بسیار پایینی بین ژنوتیپ‌ها وجود دارد و تنوع کم را به دخالت‌های انسانی نسبت دادند. فورناری[1] و همکاران

[1] Fornari

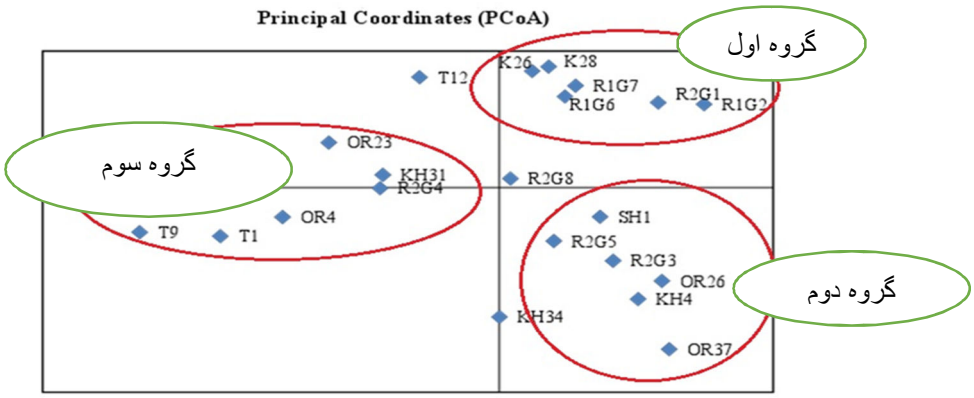
(۱۹۹۹) با بررسی ژنوتیپ های گردو توسط آلوزایم‌ها در مناطق آسیا و اروپا دریافتند خود گرده‌افشانی در گردو باعث کاهش تنوع شده است. ژنوتیپ‌های منطقه شاهرود که ازلحاظ پومولوژیکی میوه نیز دارای برتری نسبت به سایر ژنوتیپ‌های منتخب بودند و همچنین بالاترین تشابه ژنتیکی را با یکدیگر نشان دادند و از سوی دیگر ژنوتیپ‌های ارومیه و تویسرکان بیشترین فاصله را داشته‌اند که می‌توانند والدین مناسب در کارهای اصلاحی معرفی شوند. آغازگرهای ISSR در طیف وسیعی از مطالعات ازجمله بررسی تنوع ژنتیکی، فیلوژنی، نقشه‌برداری ژنتیکی و زیست‌شناسی تکاملی مفید هستند (Reddy *et al*., 2002) و بر روی بسیاری از گونه‌های درختی مانند گردو (Potter *et al*., 2002) زیتون (Terzopoulos *et al*., 2005) انجیر (Sahli-Hannachi *et al*., 2005) و آلو (Liu *et al*., 2007) به‌صورت عملی استفاده شده‌اند. در مطالعه حاضر نشانگرهای ISSR توانستند میزان چندشکلی بالای را نشان دهند که این مهم حاکی از مناسب بودن این نشانگرها در بررسی تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها است.

۵-۲-۲ دندروگرام تنوع ژنتیکی با مارکر ISSR

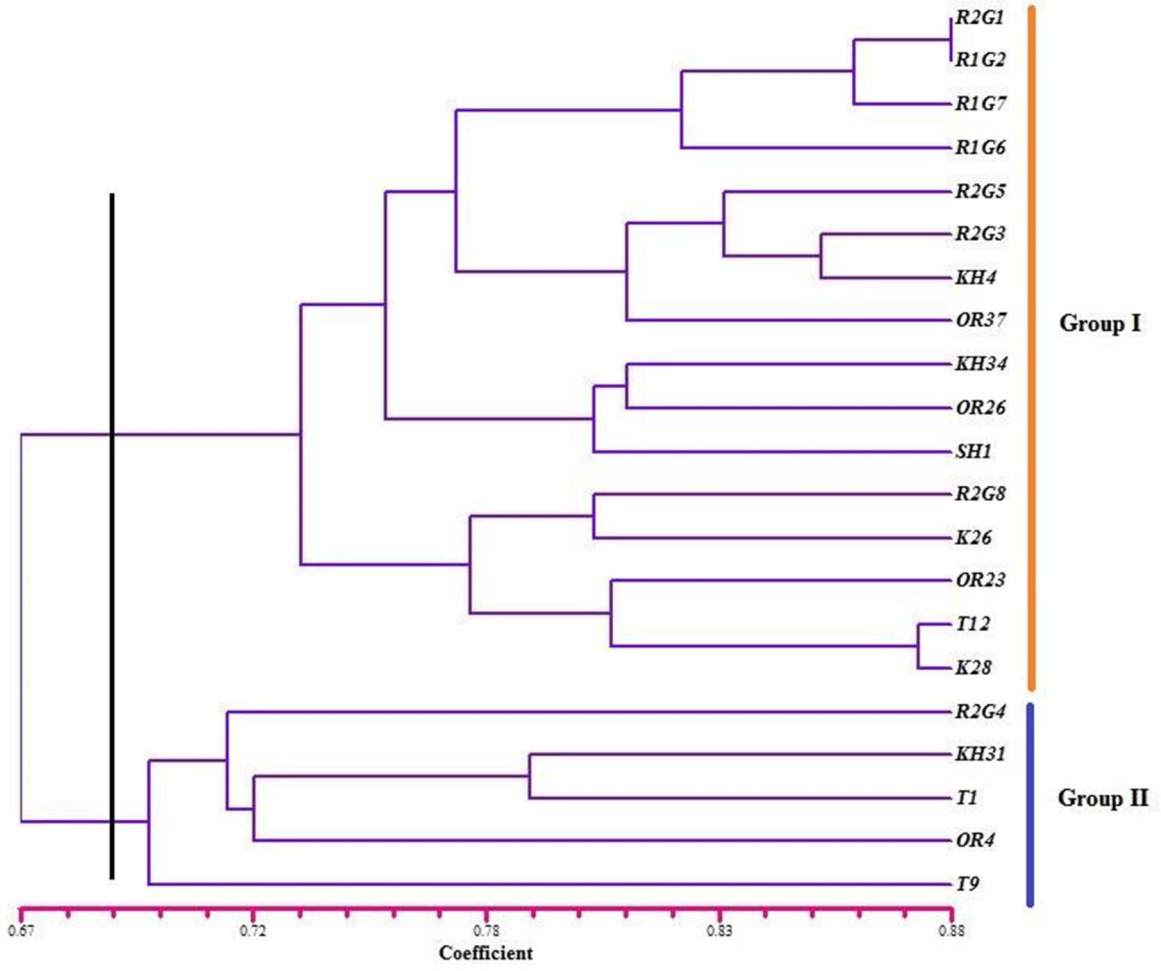
دندروگرام تنوع ژنتیکی ۲۱ ژنوتیپ در شکل(۵-۴) ارائه‌شده است. کلاستر ژنوتیپ ها را در ضریب تشابه حدود ۰/۶۹ می‌توان به دو گروه اصلی تقسیم‌بندی نمود. همچنین گروه اول در ضریب تشابه ۰/۷۷ می‌توان به سه زیرگروه تقسیم‌بندی نمود. زیرگروه اول تماماً (به‌غیراز ژنوتیپ‌های KH4 و OR37) مربوط به ژنوتیپ‌های جمع‌آوری‌شده از منطقه شاهرود هستند که بیشترین تشابه ژنتیکی هم بین برخی از این ژنوتیپ ها (R1G2 با R2G1 و R1G7) مشاهده شد. زیرگروه دوم شامل ژنوتیپ‌های KH34، OR26 و SH1 بودند و ژنوتیپ‌های R2G8، K26، OR23، T12 و K28 در زیرگروه سوم گروه اول قرار گرفتند. ژنوتیپ‌های R2G4، KH31، T1، OR4 و T9 که دارای فاصله ژنتیکی زیاد بودند در گروه دوم بودند که ژنوتیپ T9 دارای تنوع ژنتیکی بیشتر نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها بود (شکل ۵-۴).

۵-۲-۳ تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCOA) در شکل (۵-۵) نشان داده شده است که ژنوتیپ‌ها برحسب توزیع بر مبنای دو مؤلفه اول در سه گروه قرارگرفته‌اند. در گروه اول ژنوتیپ‌های K26، K28، R1G2، R1G6، R1G7 و R2G1 قرار گرفتند که اکثر ژنوتیپ‌های برتر شاهرود در این گروه واقع شدند که در دندروگرام همگی این ژنوتیپ‌ها در گروه اول قرارگرفته بودند (شکل ۵-۴). در گروه دوم مؤلفه‌های اصلی ژنوتیپ‌های OR37، KH34، KH4، OR26، R2G3، R2G5 و SH1 قرار گرفتند و ژنوتیپ‌های OR23، KH31، R2G4، OR4، T1 و T9 در گروه سوم قرار گرفتند که این ژنوتیپ‌ها به‌جز OR23 بقیه در گروه دوم کلاستر قرار گرفتند. نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی تا حدود زیادی نتایج تجزیه کلاستر را تائید کرد. نتایج PCO نیز همان‌طور مشخص‌شده است تأییدی معتبر بر آنالیز دندروگرام است همان‌طور که در دندروگرام ژنوتیپ ها در دو گروه مجزا شدند در اینجا هم ژنوتیپ ها با یکدیگر در بخش‌های مجزا قرار گرفتند ولی در همان گروه‌های اصلی دندروگرامی خود قرار گرفتند. سه مؤلفه اول به ترتیب ۱۸/۵۵، ۱۰/۲۴ و ۹/۱۹ درصد از تغییرات را توجیه کردند که درمجموع این سه مؤلفه ۳۷/۹۸ درصد تغییرات را پوشش دادند (جدول۵-۵) که این نتیجه از کارایی مناسب نشانگرهای ISSR انتخاب‌شده حکایت دارد.



شکل ۵-۵- تجزیه به محورهای اصلی (PCoA) حاصل از ماتریکس تشابه ژنتیکی ۲۱ ژنوتیپ برتر گردو



شکل ۵-۴- دندروگرام تنوع ژنتیکی ۲۱ ژنوتیپ برتر گردو با استفاده از ۱۰ آغازگر ISSR

با توجه به جدول ۵-۷ تجزیه ژنوتیپ ها به سه گروه صورت گرفت. گروه اول با داشتن ۱۸/۵۵ درصد بیشترین تعداد ژنوتیپ را دارا است. گروه دوم با ۱۰/۲۴ درصد و گروه سوم با ۹/۱۹ درصد به ترتیب گروه های بعدی هستند. در معیار ارزش واقعی گروه اول با بالاترین مقدار ۱۴/۹۵ بیشترین مقدار را به خود اختصاص داده است گروه دوم ۸/۲۵ و گروه سوم ۷/۴۰ هستند.

جدول ۵-۷ تجزیه به مؤلفه‌های اصلی برای مارکر ISSR در ۲۱ ژنوتیپ گردو			
Axis	۱	۲	۳
درصد تجمعی	۱۸/۵۵	۱۰/۲۴	۹/۱۹
Cum%	۱۸/۵۵	۲۸/۸۰	۳۷/۹۸
Eigen Value	۱۴/۹۵	۸/۲۵	۷/۴۰

۵-۳ آنالیز مارکر SSR

در این پژوهش از ۶ آغازگر SSR استفاده شده است به‌طور کل ۳۲ آلل ایجاد شده که در این بین سهم آغازگرهای WGA054 و WGA089 با ۴ آغازگر کمترین مقدار و آغازگر WGA009 با ۸ آلل بیشترین مقدار را به خود اختصاص داد. میانگین تعداد آلل‌ها درمجموع ۵/۱۷ بوده است (جدول ۵-۸). در تحقیقی که توسط شاملو و همکاران (۱۳۹۴) انجام شد با استفاده از ۱۰ آغازگر به‌طور کل ۴۷ آلل ایجاد شد که آغازگر WGA054 با ۱۱ آلل بیشترین و آغازگر WGA005 با ۳ آلل کمترین مقدار را داشته است وانگ[1] و همکاران (۲۰۰۸) در بررسی تنوع ژنتیکی گردوهای مرکز و جنوب غربی چین برای جایگاه WGA086 ۹ آلل را گزارش کردند. دوگان[2] و همکاران (۲۰۱۴) در پژوهش خود در زمینه روابط ژنتیکی ارقام گردو با کمک آغازگر SSR بیشترین تعداد (۱۷) آلل را در آغازگر WGA 202مشاهده کردند. دانگل[3] و همکاران (۲۰۰۵) از ۱۴ نشانگر SSR برای شناسایی ۴۷ ژنوتیپ گردوی ایرانی و یک‌پایه هیرید استفاده کردند و به ازای هر مکان ژنی ۸-۳ آلل را شناسایی کردند. فورونی[4] و همکاران (۲۰۰۵) 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

[1] - Wang
[2] Dogan
[3] - Dangl
[4] -Foroni

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. ابراهیمی و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی گردوی ایرانی رقم سورنتو برای WGA054 ۷ آلل با دامنه اندازه آللی ۲۶۶-۲۴۰ جفت‌باز گزارش کردند. وسته[1] وهمکاران (۲۰۰۲) در مطالعه ۳۰ نشانگر هسته‌ای ریزماهواره‌ای را در گردوی سیاه برای این جایگاه ۱۲ آلل را گزارش کرد. در پژوهش محمودی و همکاران (۲۰۱۳) که بر روی تنوع ژنتیکی تعدادی از ژنوتیپ‌های گردوی ایرانی بر اساس صفات مورفولوژی و ریز ماهواره‌ها انجام شد تعداد آلل های ایجادشده توسط ۹ آغازگر ۳۴ آلل بوده که کمترین آن در آغازگر WGA071 با ۲ آلل و بیشترین آن با ۷ آلل در WGA202 گزارش کردند.تعداد آلل های مؤثر در این تحقیق در هر جفت آغازگر با میانگین ۳/۸۵ بود. در این صفت بیشترین حالت را آغازگر WGA009 با مقدار ۵/۸۰ به خود اختصاص داد و در تصویر(۵-۵) تعداد باندهای ایجاد شده تئسط این آغازگر برای هر ژنوتیپ نشان داده شده است. کمترین مقدار تعداد آلل موثر را نیز WGA089 با مقدار ۳/۲۲ دارا بود. در پژوهش محمودی و همکاران (۲۰۱۳) این صفت در آغازگر WGA071 کمترین مقدار (۱/۸۹) بود و بیشترین مقدار را آغازگر WGA202 (۴/۰۶) نمایش داد. در پژوهش شاملو و همکاران (۱۳۹۴) تعداد آلل های موثر در آغازگرهای WGA054 و WGA069 بیشترین مقدار را دارا بود (۸/۹۷۴) و آغازگر WGA005 کمترین مقدار (۲/۰۲۶) را در این صفت به خود اختصاص داد جدول (۵-۸).

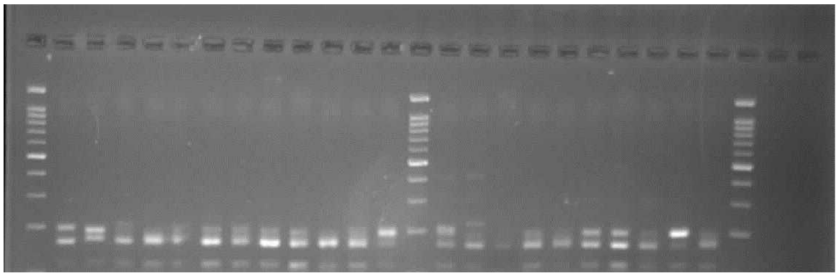
در صفت هتروزیگوتی مشاهده‌شده در میان ۶ آغازگر این پژوهش محدوده هتروزیگوتی از ۰/۹۵ تا ۰ بوده است که آغازگرهای WGA054 و WGA009 بیشترین مقدار را نشان دادند مانند پژوهش محمودی و همکاران (۲۰۱۳) درحالی‌که آغازگرهای WGA001 و WGA089 هیچ هتروزیگوتی را بیان نکردند. در صفت هتروزیگوتی مورد انتظار بازهم آغازگر WGA009 بیشترین مقدار (۰/۸۳) به خود اختصاص داده و کمترین (۰/۶۹) این صفت را همان‌طور که در جدول ۵-۸ مشاهده می‌شود

[1] - Woeste

مربوط به آغازگر WGA089 است که میانگین این صفت ۰/۷۳ است. در پژوهش شاملو و همکاران (۱۳۹۴) این صفت در محدوده ۰/۴۷ تا ۰/۷۵ است. در صفت شاخص بیشترین هتروزیگوتی مورد انتظار تثبیت‌شده با میانگین ۰/۷۵ بود و آغازگرها در محدوده ۰/۷۱ تا ۰/۸۵ می‌باشند که در این صفت بازهم WGA009 بیشترین و WGA089 کمترین مقدار را به خود اختصاص دادند. در صفت شاخص تثبیت بیشترین مقدار مثبت را می‌توان در پرایمرهای WGA001 و WGA089 با مقدار ۱/۰۰ و کمترین آن WGA054 با مقدار ۰/۲۹- مشاهده کرد. در شاخص شانون با میانگین ۱/۴۳ بیشترین مقدار را WGA009 با مقدار ۱/۸۸ و کمترین با مقدار ۱/۲۳ در آغازگر WGA089 است (جدول ۵-۸).

جدول ۵-۸ صفات به‌دست‌آمده از آغازگرهای SSR در ۲۱ ژنوتیپ گردو

	تعداد باند (Na)	تعداد باند مؤثر (Ne)	شاخص شانون (I)	هتروزیگوتی مشاهده‌شده (Ho)	هتروزیگوتی موردانتظار (He)	(uHe)	شاخص تثبیت (F)
WGA276	۵	۳/۴۵	۱/۳۷	۰/۸۱	۰/۷۱	۰/۷۳	-۰/۱۴
WGA054	۴	۳/۴۷	۱/۳۵	۰/۹۵	۰/۷۳	۰/۷۵	-۰/۲۹
WGA032	۵	۳/۴۷	۱/۳۹	۰/۷۶	۰/۷۱	۰/۷۳	-۰/۰۷
WGA001	۵	۳/۴۵	۱/۳۶	۰/۰۰	۰/۷۱	۰/۷۳	۱/۰۰
WGA009	۸	۵/۸۰	۱/۸۸	۰/۹۵	۰/۸۳	۰/۸۵	-۰/۱۵
WGA089	۴	۳/۲۲	۱/۲۳	۰/۰۰	۰/۶۹	۰/۷۱	۱/۰۰
میانگینMean	۵/۱۷	۳/۸۵	۱/۴۳	۰/۸۵	۰/۷۳	۰/۷۵	۰/۲۲
SE	۰/۶۰	۰/۴۰	۰/۰۹	۰/۱۹	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۲۵



شکل ۵-۵- الگوی باندی DNA تکثیرشده از ۲۱ ژنوتیپ برتر گردو با آغازگر WGA009 بروی ژل آگاروز متافور

۵-۴ کلید شناسایی

آنالیز مکان ژنی ژنوتیپ های برتر گردو بر اساس ۶ مکان ژنی میکروساتلایت در جدول (۵-۹) ارائه‌شده است که از طریق این داده‌ها به‌راحتی می‌توان ژنوتیپ ها را در جمعیت‌های مختلف شناسایی کرد. کلید شناسایی در ۲۱ ژنوتیپ برتر گردو به‌طور کامل نشان داده‌شده است مثلاً کلید شناسایی در ژنوتیپ k26 را می‌توان این گونه بیان کرد(۲۲۰-۲۲۰)(۲۰۰-۱۹۰)(۱۶۵-۱۶۵)(۲۴۰-۲۱۰)(۱۴۰-۱۲۰)(۲۱۰-۱۸۰) درواقع این ارقام در کنار هم یک بارکد را برای شناسایی این ژنوتیپ در میان تمامی ژنوتیپ ها ایجاد کرد.

جدول ۵-۹ مکان ژنی ژنوتیپ های برتر گردو بر اساس ۶ مکان ژنی میکروساتلایت						
code	WGA276	WGA054	WGA032	WGA001	WGA009	WGA089
K26	۱۸۰-۲۱۰	۱۲۰-۱۴۰	۲۱۰-۲۴۰	۱۶۵-۱۶۵	۱۹۰-۲۰۰	۲۲۰-۲۲۰
K28	۱۹۰-۲۰۰	۱۲۰-۱۴۰	۲۵۰-۲۵۰	۲۰۰-۲۰۰	۱۸۵-۲۱۰	۲۳۰-۲۳۰
KH31	۱۹۰-۱۹۰	۱۲۰-۱۴۰	۲۴۰-۲۵۰	۲۰۰-۲۰۰	۱۸۰-۲۰۵	۲۴۰-۲۴۰
KH34	۱۹۰-۱۹۰	۱۱۰-۱۳۰	۲۴۰-۲۵۰	۱۹۰-۱۹۰	۱۸۰-۱۹۰	۲۲۰-۲۲۰
KH4	۱۷۰-۱۹۰	۱۲۰-۱۴۰	۲۴۰-۲۵۰	۲۰۰-۲۰۰	۱۸۵-۲۰۰	۲۴۰-۲۴۰
OR23	۱۹۰-۲۰۰	۱۱۰-۱۳۰	۲۵۰-۲۵۰	-	۱۹۰-۲۰۵	۲۲۰-۲۲۰
OR26	۱۷۰-۱۹۰	۱۳۰-۱۳۰	۲۲۰-۲۶۰	۱۹۰-۱۹۰	۱۸۰-۲۰۰	۲۳۰-۲۳۰
OR37	۱۸۰-۱۸۰	۱۱۰-۱۳۰	۲۵۰-۲۶۰	۱۹۵-۱۹۵	۱۸۵-۲۱۰	۲۲۰-۲۲۰
OR4	۱۹۰-۱۹۰	۱۱۰-۱۴۰	۲۲۰-۲۵۰	۱۹۰-۱۹۰	۱۸۰-۲۰۰	۲۳۰-۲۳۰
R1G2	۱۸۰-۱۹۰	۱۲۰-۱۴۰	۲۴۰-۲۵۰	۱۹۵-۱۹۵	۱۸۰-۲۱۵	۲۴۰-۲۴۰
R1G6	۱۸۰-۲۰۰	۱۱۰-۱۴۰	۲۴۰-۲۶۰	۱۹۵-۱۹۵	۱۸۵-۱۸۵	۲۳۰-۲۳۰
R1G7	۱۷۰-۱۹۰	۱۲۰-۱۴۰	۲۲۰-۲۵۰	۱۹۵-۱۹۵	۱۸۰-۲۱۵	۲۴۰-۲۴۰
R2G1	۱۸۰-۱۹۰	۱۲۰-۱۴۰	۲۴۰-۲۴۰	۱۹۵-۱۹۵	۱۸۵-۲۱۰	۲۴۰-۲۴۰
R2G3	۱۷۰-۱۹۰	۱۲۰-۱۳۰	۲۴۰-۲۵۰	۲۰۰-۲۰۰	۱۹۰-۲۲۰	۲۲۰-۲۲۰
R2G4	۱۹۰-۲۰۰	-	۲۲۰-۲۵۰	۲۰۰-۲۰۰	۱۸۵-۲۰۰	۲۳۰-۲۳۰
R2G5	۱۷۰-۲۰۰	۱۲۰-۱۴۰	۲۵۰-۲۶۰	۱۹۰-۱۹۰	۱۸۰-۲۰۰	۲۲۰-۲۲۰
R2G8	۱۸۰-۱۹۰	۱۲۰-۱۴۰	۲۲۰-۲۵۰	۲۰۰-۲۰۰	۱۸۵-۲۰۰	۲۲۰-۲۲۰
SH1	۱۹۰-۲۰۰	۱۱۰-۱۳۰	۲۱۰-۲۵۰	۲۰۵-۲۰۵	۱۸۵-۲۰۵	۲۴۰-۲۴۰
T1	۱۸۰-۲۰۰	۱۲۰-۱۴۰	۲۴۰-۲۴۰	۲۰۰-۲۰۰	۱۸۵-۲۰۵	۲۳۰-۲۳۰
T12	۱۹۰-۲۰۰	-	۲۴۰-۲۴۰	۱۹۵-۱۹۵	۱۸۵-۲۰۰	۲۲۰-۲۲۰
T9	۱۸۰-۲۰۰	۱۱۰-۱۲۰	۲۱۰-۲۵۰	۱۹۵-۱۹۵	۱۸۰-۲۰۵	۲۵۰-۲۵۰

۵-۵ احتمال تفکیک به‌وسیله ماکروستلایت ها

بهترین کلید شناسایی را مارکر WGA009 با احتمال تفکیک ۰/۸۴ و بالاترین احتمال تفکیک ۰/۹۰ ایجاد کرده است (جدول ۵-۱۰). بعد از آن WGA276 و WGA032 و WGA001 با مقدار ۰/۷۷ احتمال بالایی از تفکیک را در برگرفته‌اند و در مرحله بعدی WGA054 و WGA089 با مقدار ۰/۶۸ کمترین تفکیک را نشان داده‌اند. از این بین WGA089 هموزیگوت و تک باند است.

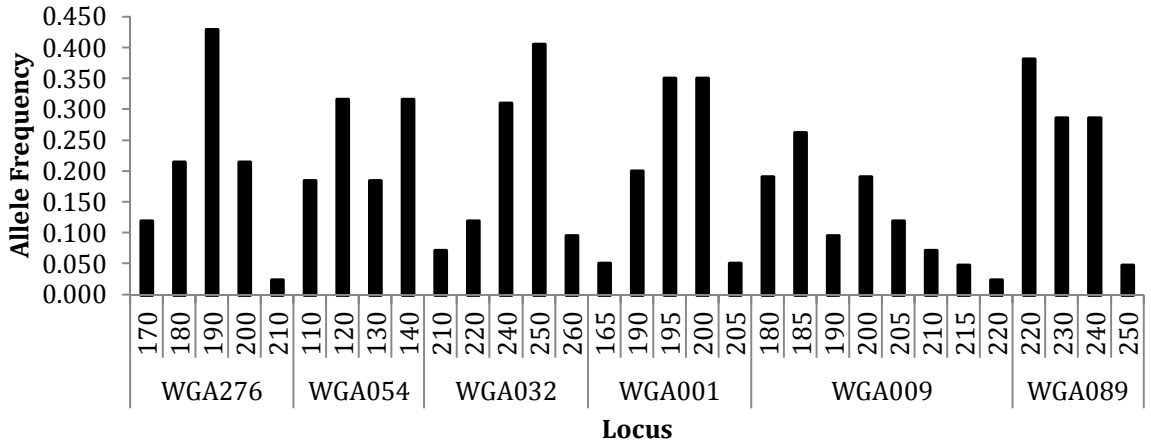
جدول ۵-۱۰ احتمال و بالاترین سطح احتمال تفکیک در ۶ آغازگر SSR

جایگاه	احتمال تفکیک	بالاترین سطح احتمال تفکیک
WGA276	۰/۶۵	۰/۷۷
WGA054	۰/۶۶	۰/۶۸
WGA032	۰/۶۶	۰/۷۷
WGA001	۰/۶۳	۰/۷۷
WGA009	۰/۸۴	۰/۹۰
WGA089	۰/۵۸	۰/۶۸

۵-۶ عملکرد اختصاصی میکروساتلایت ها

با توجه به نمودار ۵-۱ در آغازگر WGA274 در سطح ۲۱۰ به‌صورت اختصاصی می‌تواند ژنوتیپ را شناسایی کند و درآغازگر بعدی WGA054 در سطح ۱۱۰ و ۱۳۰ به‌صورت مساوی عملکرد اختصاصی صورت گرفته است و در آغازگر WGA032 در سطح ۲۵۰ در اکثر ژنوتیپ ها تفکیک صورت گرفته و درواقع عملکرد غیراختصاصی داشته است. در WGA009 که بیشترین سطوح تفکیک را و بیشترین حالت اختصاصی را دارد در سطح ۲۲۰ اختصاصی عمل کرد. در WGA032 بیشترین باند

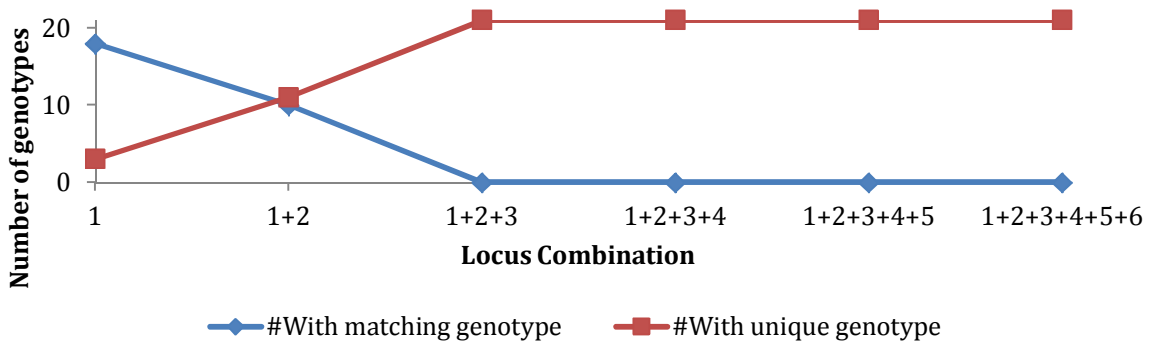
غیراختصاصی در سطح ۲۲۰ و اختصاصی‌ترین آن در سطح ۲۵۰ است. در واقع سطوح نموداری پایین تر از ۰/۰۵ نشان دهنده ی اختصاصی بودن آغازگرها در آن سطح از آلل است.



نمودار ۵-۱ شناسایی آلل ها به کمک ۶ مکان ژنی

۵-۷ نمودار احتمال شناسایی ۲۱ ژنوتیپ برتر گردو با والدین تصادفی در ۶ مکان ژنی SSR

این نمودار (۵-۲) نشان می‌دهد که با یک مکان ژنی احتمال شناسایی ۳ ژنوتیپ وجود دارد با دو مکان ژنی بیش از ۱۱ ژنوتیپ را می‌توان تفکیک کرد و با ۳ مکان ژنی تمام ژنوتیپ ها قابل‌تفکیک هستند و می‌توان کلید شناسایی را ایجاد کرد و درنهایت با هر ۶ مکان ژنی تمام ژنوتیپ ها قابل تفکیک هستند.



نمودار ۵-۲ احتمال شناسایی ژنوتیپ ها با والدین تصادفی در ۶ مکان ژنی SSR

۵-۸ کلید شناسایی بر اساس مکان ژنی میکروساتلایت

کلید شناسایی بر اساس مکان ژنی میکروساتلایت برای ۲۱ ژنوتیپ گردو بر اساس ۳ مکان ژنی در ۵ ژنوتیپ اول انجام‌شده است. با توجه به جدول ۵-۱۱ مکان ژنی WGA009 توانسته به‌تنهایی ۵ ژنوتیپ ازجمله ژنوتیپ های R1G6, KH34, K26, OR23.R2G3 را شناسایی کند. در حالت دوم مکان ژنی WGA276 توانسته ۱۴ ژنوتیپ را به‌تنهایی شناسایی کند ولی ژنوتیپ های T12 و R2G4 تنها با به کار بردن سومین مکان ژنی WGA001 توانسته‌اند تفکیک شوند.

به‌طور کلی آنچه از جدول ۵-۱۱ برآورد می‌شود این است که در این پژوهش که ۲۱ ژنوتیپ جهت شناسایی مورد بررسی قرار گرفتند با ۳ مکان ژنی می‌توان تمامی این ژنوتیپ ها را شناسایی کرد.

جدول ۵-۱۱ تفکیک ۲۱ ژنوتیپ گردو بر اساس ۳ مکان ژنی SSR

code	WGA009		WGA276		WGA001	
R1G6	۱۸۵	۱۸۵				
KH34	۱۹۰	۱۸۰				
K26	۲۰۰	۱۹۰				
OR23	۲۰۵	۱۹۰				
R2G3	۲۲۰	۱۹۰				
OR4	۲۰۰	۱۸۰	۱۹۰	۱۹۰		
R2G5	۲۰۰	۱۸۰	۲۰۰	۱۷۰		
OR26	۲۰۰	۱۸۰	۱۹۰	۱۷۰		
R2G8	۲۰۰	۱۸۵	۱۹۰	۱۸۰		
KH4	۲۰۰	۱۸۵	۱۹۰	۱۷۰		
T12	۲۰۰	۱۸۵	۲۰۰	۱۹۰	۱۹۵	۱۹۵
R2G4	۲۰۰	۱۸۵	۲۰۰	۱۹۰	۲۰۰	۲۰۰
KH31	۲۰۵	۱۸۰	۱۹۰	۱۹۰		
T9	۲۰۵	۱۸۰	۲۰۰	۱۸۰		
T1	۲۰۵	۱۸۵	۲۰۰	۱۸۰		
SH1	۲۰۵	۱۸۵	۲۰۰	۱۹۰		
OR37	۲۱۰	۱۸۵	۱۸۰	۱۸۰		
R2G1	۲۱۰	۱۸۵	۱۹۰	۱۸۰		
K28	۲۱۰	۱۸۵	۲۰۰	۱۹۰		
R1G7	۲۱۵	۱۸۰	۱۹۰	۱۷۰		
R1G2	۲۱۵	۱۸۰	۱۹۰	۱۸۰		

۵-۹ نتیجه‌گیری

تغییرات آب و هوایی می تواند بر روی صفات مورفولوژیکی تاثیر گذار باشد اما محققان و اصلاح گران دریافتند که می توان از صفات مورفولوژیکی برجسته مانند میوه و مغز به عنوان آغازگر استفاده کنند و جمعیت های گیاهی را شناسایی و دسته بندی کنند. بر اساس این تحقیق ژنوتیپ T12 از منطقه تویسرکان بهترین خصوصیات کمی و کیفی را داشته است. از سوی دیگر فن‌آوری نشانگرها یک روش ارزان، آسان و رضایت‌بخش برای ارزیابی روابط ژنتیکی و تنوع ژنتیکی و ایجاد کلید شناسایی در میان ارقام گردو است. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که این نشانگرها چند شکلی مناسب جهت تفکیک ژنوتیپ‌های گردو را دارا هستند نشانگر WGA009 بهترین قدرت تفکیک را در بین سایر آغازگرها ایجاد کرده است. ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده از شاهرود دارای تنوع ژنتیکی کمتری بین خود هستند ژنوتیپ های R2G1 و G2R1 از نظر ژنتیکی کاملا مشابه هستند که میتوان نتیجه گرفت این ژنوتیپ ها با نام محلی متفاوت ولی ژنتیکی یکسان مورد استفاده قرار گرفتند. احتمالاً مقدار تنوع مشاهده‌شده در بین ژنوتیپ های شاهرود مرتبط به دخالت‌های انسانی است. ژنوتیپ‌های تویسرکان و ارومیه دارای تنوع و فاصله ژنتیکی بیشتری هستند و می‌توان جهت مطالعات تکمیلی ژنوتیپ‌های این ناحیه مورد مطالعه قرار بگیرند. ژنوتیپ T9 بیشترین فاصله ژنتیکی را با سایر ژنوتیپ ها داشته است. نتایج گروه-بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس نشانگرهای مولکولی با گروه‌بندی حاصل از صفات کیفی تا حدود زیادی مطابقت داشت که حاکی از کارایی مناسب نشانگرهای SSR,ISSR است. در این تحقیق کلید شناسایی بر اساس مکان ژنی میکروساتلایت برای ۲۱ ژنوتیپ گردو ایجاد شد که با استفاده از این کلید شناسایی به راحتی می توان این ژنوتیپ ها را در میان هزاران ژنوتیپ دیگر شناسایی کرد. در کل استفاده توأم از صفات مورفولوژیکی و نشانگرهای مولکولی جهت بررسی تنوع ژنتیکی در گردو پیشنهاد می‌گردد و با توجه به تنوع زیاد گردو در ایران، پیشنهاد می‌گردد یک بانک ژرم پلاسمی از این گیاه تهیه گردد و به‌صورت گسترده مورد بررسی قرار گیرد تا امکان معرفی و اصلاح واریته‌های مناسب فراهم گردد.

۵-۱۰ پیشنهادات

۱. برنامه ای برای ایجاد کلید شناسایی ژنوتیپ های برتر تمام نقاط کشور

۲. شناسایی ژنوتیپ ها به وسیله بارکد های الکترونیکی و در دسترس قرارگرفتن به صورت آنلاین

۳. جمع آوری تمام ژنوتیپ های برتر کل کشور و ایجاد کلکسیون

۴. بررسی سایر صفات مورفولوژیکی و پومولوژیکی

۵. استفاده از تعداد بیشتری از نشانگرها جهت شناسایی دقیق و مطمئن

منابع

ابراهیمی ع. فتاحی مقدم م. زمانی ذ. و وحدتی ک ، (۱۳۸۸) "بررسی تنوع ژنتیکی ۶۰۸ ژنوتیپ بذری گردو (*Juglans regia*) و انتخاب برخی ازژنوتیپ‌های دارای صفات برتر" مجله علوم باغبانی. دوره ۴۰ شماره ۴ 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 تولیدات-گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.- جلد ۱۶ شماره ۴

باباجانپور ع. ا. نعمت زاده ق. ع. مجیدی ا. ابراهیمی آ. حاجی پور ع. هاشمی س. ح. ر. علوی س. م، (۱۳۹۰) "بررسی تنوع و روابط ژنتیکی بین تعدادی از ارقام برنج با استفاده از صفات زراعی و نشانگرهای مولکولی RAPD".

بدرزاده م. (۱۳۸۶) "مروری بر رده بندی گیاهی نهاندانگان" چاپ اول ص ۴۶-۴۳.

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

خسروی م. (۱۳۹۰) "کشت و پرورش گردو" .انتشارات تاک. چاپ اول ص ۲۵-۳۵.

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

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

درویشیان م. (۱۳۷۶) " پرورش گردو به روش جدید". انتشارات فنی، تهران. ص ۱۰.

راحمی م. (۱۳۹۰) "بررسی میزان پروتئین، روغن و اسیدهای چرب برخی از ارقام گردو *Juglans regia* و تاثیر دانه گرده بر برخی خصوصیات آن" فصلنامه علوم وصنایع غذایی. شماره ۵ .ص۲۵

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 ۱۰۱.

شاملو ف. رضایی م. بیابانی ع. خان احمدی ع. (۱۳۹۵) "بررسی تنوع مورفولوژیکی ژنوتیپهای گردوی شهرستان آزادشهر". مجله علوم باغبانی، جلد ۳۰، شماره۳ ص ۴۶۹-۴۷۹.

شاملو ف، (۱۳۹۴) پایان نامه کارشناسی ارشد: " بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گردو (*Juglans regia* L) منطقه شهرستان آزادشهر با استفاده از نشانگر مولکولی ریز ماهواره"، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، ص ۶۵-۲۷.

طاهری آ. سیدی ن. عبد الهی مندولکانی ب. (۱۳۹۴) " تجزیه ارتباطی برخی صفات فیزیولوژیک در گردوی ایرانی تحت تنش خشکی با استفاده از نشانگرهای SSR". مجله جنگل ایران، شماره ۲ ص ۲۰۹-۲۲۳.

طباطبایی‌یزدی م، زرینی غ، سپهری‌زاده ض، و قاسمیان ع، (۱۳۸۶) "ترجمه مقدمه‌ای بر کلون‌سازی ژن‌ها و آنالیزDNA" ،براون ت.ا، (مؤلف) انتشارات خانه زیست‌شناسی، تهران، ۴۶۷ص

عطار ش. داوری نژاد غ. سمیعی ل. مقدم م، (۱۳۹۶) " بررسی تنوع ژنتیکی برخی ژنوتیپ های گردوی ایرانی در باغات تجاری مشهد با نشانگر ISSR" مجله علوم باغبانی، دوره ۳۱، شماره ۳ ص ۶۱۱-۶۲۰

فرخی ج. ناصری ل.ع. (۱۳۹۰) " بررسی تنوع ژنتیکی سیبهای بومی ایران با استفاده از نشانگر SSR" مجله فن آوری زیستی در کشاورزی. جلد ۱۰. شماره ۲ ص ۳۴-۲۷.

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 " فن آوری تولیدات‌گیاهی. جلد ۲.شماره ۹.

گریگوریان و. (۱۳۸۱) "فیزیولوژی پیوند و روشهای پیوند زنی".چاپ اول ص ۱۹۹-۱۹۱.

مجتهد ج، (۱۳۹۵) " گردو" چاپ اول، نشر جهادکشاورزی، ص۲۴-۲

محسنی س، (۱۳۸۶)، پایانامه ارشد: "بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های گردوی ایرانی در استان کرمان با استفاده از نشانگر ریزماهوراه"، دانشکده ابوریحان، دانشگاه تهران، ص ۲۴.

مردی م. زین العابدینی م. حق جویان ر .جمالی ح. خیام نکویی م. کاوند ع. احمدی ک. صادقی ل. لونی ع. کرمی ط. خوشکام. (۱۳۹۳) " کاربرد نشانگرهای ریزماهواره جهت شناسایی و ثبت ارقام گردو". مجله علوم باغبانی. جلد ۲۸، شماره ۴ ص۵۹۳-۵۸۴.

مردی م. زین العابدینی م. زینالو ع. خیام نکویی م. جمالی ح. کاوند ع. پتکی پ. احمدی ک. عبدی س. شمس کیا ف. خوشکام ص. طاهرنژاد ز. لونی ع.(۱۳۹۵) " کاربرد نشانگرهای ریزماهواره جهت شناسایی و ثبت ارقام زیتون" مجله پژوهش های تولید گیاهی، دوره ۲۳، شماره ۱.

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، شماره ۱، ص ۷۳-۶۵.

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

Alba V. Montemurro C. Sabetta W. Pasqualone A. Blanco A. (2009) " SSR-based identification key of cultivars of Olea europaea L. diffused in Southern-Italy" J. Scientia Horticulturae. 123, pp. 11-16.

Aradhya M. Woeste K. Velasco D.(2010) "Genetic diversity, structure and differentiation in cultivated walnut (*Juglans regia* L.)" J. Acta Hort. 861, pp. 127-132.

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.

Atefi J. (1993) "Evalution of walnut genotype in Iran". Acta Horticulturae. 311, pp 25-33.

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

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

Chen L. Ma Q. Chen Y. Pei D. (2014) "Identification of major walnut cultivars grown in China based on nut Phenotypes and SSR markers". J. Hort. SCI. 168, pp 240-248.

Christopoulos M V. Rouskas D. Tsantili E. Bebeli P J. (2010) "Germplasm diversity and genetic relationships among walnut (*Juglans regia* L.) cultivars and Greek local selections revealed by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers" Scientia Horticulturae. 125, pp. 584-592.

Delseny M. J. Salses R. Cooke C. Sallaud f. Regad P. Lagoda E. Guiderdoni M. Ventelon C. Brugidou and A. Ghesquiere. (2001) "Rice genomics Present and future". Plant Physiol. Biochem. 39, pp 323-334.
Dogan Y. Kafkas S. Sütyemez M. Akca Y. Türemis N. (2014) "Assessment and characterization of genetic relationships of walnut (*Juglans regia* L.) genotypes by three types of molecular markers". Scientia Horticulturae. 168, pp 81–87.
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. 2016. FAO statistical yearbook. Agricultural production,Food and Agriculture Organization of the United Nations (http: faostat.fao.org.site.291.default.aspx).
Fatahi R. Ebrahimi A. Zamani Z. (2010) "Characterization of some Iranians and foreign walnut genotypes using morphological traits and RAPDs markers'. Hortic Environ Biotechnol. 51, pp 51–60.
Forde H. I. & McGranaham G. H. (1993) "A new walnut cultivar Malizia. John Wiley & Sons, Inc, USA. 311, pp 46-49.
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.
Fornari B. Canata F. Spada M And Malvolti M. E. (1999) "Alozyme analysis of genetic diversity differentiation in European and Asiatic walnut (*Juglans regia* L.) populations" .Forest Genetics. 6, pp 115-127.
Foroni I. Rao R. Woeste K. and Gallitelli M. (2005) "Characterization of Juglans regiaL. 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. 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.
Francesca PI. Pamfil D, Raica P. Petricele IV. (2010) "Assessment of the genetic variability among some Juglans cultivars from the Romanian National Collection at SCDP
va ˘lcea using RAPD markers". Rom Biotech Lett. 15, pp 41-49.
Gupta, P. K., Varshney, R. K., Sharma, P. C., & Ramesh, B. (1999). Molecular markers and their applications in wheat breeding. Plant breeding, 118(5), 369-390.
Jaccard P. (1908) "Nouvelle reserches sur la distribution florale. Bulletin de la societe des sciences naturelles". 44, pp 223–227.
Jafari-Sayadi M. H. (2006) "Genetic diversity of iranian native walnut population of northern forests and morphological comparation them with walnut other region of country (Doctoral dissertation, Ph. D. Thesis of Forest Science, Agricultural and Natural Source Faculty. Tehran University.
Kafkas S. Ozkan H. Sutyemez M. (2005) "DNA polymorphism and assessment of genetic relationships in walnut genotypes based on AFLP and SAMPL markers".Journal of the American society for horticultural science. 130, pp 585–590.

Karimi R. Ershadi A. Vahdati K. Woeste K. (2010) "Molecular characterization of Persian walnut populations in Iran with microsatellite markers". J. HortScience. 45, pp 1403–1406.
Kumar L.S. (1999) "DNA markers in plant improvement". Biotechnol Adv. 17, pp 143–183.
Li H. Chen G. (2008) "Genetic relationship among species in the genous Sonneratia in China as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers".Journal Biochemical Systematic and Ecology. 36, pp. 392–398.
Liu W. Liu D. Zhang A. Feng C. Yang J. Yoon J. Li S. (2007) "Genetic diversity and phylogenetic relationships among plum germplasm resources in China assessed with Inter-simple Sequence Repeat markers". Journal of the American Society for Horticultural science. 132, pp 619–628.
Mahmoodi R. Rahmani F. Paktarmani R. (2012) "Genetic diversity of Persian walnut from Iran as revealed by intersimple sequence repeat (ISSR) markers". J Am Pomol Soc.
66, pp 101-106.
Mahmoodi R. Rahmani F. Rezaee R. (2013) "Genetic diversity among Juglans regia L. genetypes assessed by morphological traits and microsatellite markers". Span. J. Agric. Res. 11, pp 431–437.
Malvolti M.E. Paciucci M. Cannata F. and Fineschi S. (1993) “Genetic variation in Italian populations of Juglans regia L” Acta Horticulturae. 311, pp. 86-94.
Manning W.E. (1978) "The classification within the Juglandaceae". Ann. Mol. Bot. Gard.
65, pp 1058–1087.
McGranahan G. (2005) "Characterization of 14 microsatellite markers for genetic analysis and cultivar identification of walnut". J Amer Soc Hort Sci. 130, pp. 348-354.
McGranahan G. H. Charles A. Leslie C. A. Philips H. A. & Dandaker A. (1998), “Walnut Propagation. In: D. Ramos (ed.), Walnut Production Manual”, University of California, DANRPubl, Davis, pp. 71-83.
McGranahanp G.p and Leslie C. (1990) “Walnuts (Juglans)” Acta Horticulturae. 290, pp. 907-951.
Mustafa Hama Salieh F. Abdul Razzaki Tahir N. Mahmood Faraj J. (2013) " Assessment of Genetic Relationship among Some Iraqi Walnut Genotypes (Juglans regia L.) in Sulaimani Region Using RAPD and SSR Molecular Marker". Jordan gournal of Agricultural Sciences. 9, pp 351-362.
Nicese F.P. Hormaza J.I. McGranahan G.H. (1998). "Molecular characterization and genetic relatedness among walnut (*Juglans regia* L.) genotypes based on RAPD markers". Euphytica .101. pp 199–206.
Omrani-Sabbaghi A. Shahriari M. Falahati-Anbaran M. Mohammadi S.A. Nankali A. Mardi M. Ghareyazie B. (2007) "Microsatellite markers based assessment of genetic diversity in Iranian olive (*Olea europaea* L.) collections". Sci. Hortic. 112. pp 439‑447
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.
Pop, I.F. Vicol A.C. Botu M.R. Paul A.R. Vahdati K. Pamfil D. (2013) "Relationships of
walnut cultivars in a germplasm collection: comparative analysis of phenotypic and molecular data". Sci. Hortic. 153. pp 124–135.

Potter D. Gao F. Aiello G. Leslie C. and McGranahan G. H. (2002) "Intersimple sequence repeat markers for fingerprinting and determining genetic relationships of walnut (Juglans regia L.) cultivars". Journal of the American Society for Horticultural Science. 127, pp 75-81
Prevost A. Wilkinson M.J. (1999) "A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting". Theoretical Applied Genetics. 98, pp 107–112.
Rafalski J. Vogel J. Morgante M. Powell W. Andre C. Tingey S. (1996) "Generating and using DNA markers in plants". In: Birren, B., Lai, E. (Eds.), Nonmammalian Genomic Analysis. A practical guide. Academic Press, San Diego, pp 75–134.
Rahimipanah M. Hamedi M. Mirzapour M. (2010) "Antioxidant activity phenolic contents of Persian walnut (*Juglans regia* L.) green husk extract". American Journal Farmacology scientia. 1, pp 105-111.
Reddy M.P. Sarla N. Siddiq E.A.(2002) "Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding". Euphytica, 128 pp 9–17.
Reid W. (2010) "propagation of pecan and black walnut in Missouri". University of Missouri Center for agroforestry.
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.
Rohlf F.J. (1998). NTSyS-p.c. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (Version 2.0). Exeter Software Publishers Ltd., Setauket.
Sahli-Hannachi A. Chatti K. Mars M. Marrakchi M. Trifi M.(2005) "Comparative analysis of diversity in two Tunisian collections of fig cultivars based on random amplified polymorphic DNA and inter simple sequence repeats fingerprints". Genetic Resources and Crop Evolution. 52, pp 563–573.
Sharma O. C. & Sharma S. D. (2001) "Correlation between nut and kernel character of Persian walnut seedling trees of Garsa valet in kullu district of Himachal Pradesh". Acta Horticulturae. 544, pp 129-132.
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.705p.
Solar A. and Stampar F. (2004) "Evaluation of Some Perspective Walnut Genotype in Slovenia" Acta Horticulturae.52. pp. 705.
Stanford A.M. Harden R. Parks C.R. (2000) "Phylogeny and biogeography of Juglans (Juglandeceae) based on mATK and ITS sequence data". Am. J. Botany. 87, pp 872–882.
Stuber C. W. Polacco M. & Senior M. L. (1999) "Synergy of empirical breeding, marker-assisted selection, and genomics to increase crop yield potential". Crop Science, 39. pp 1571-1583.
Terzopoulos P.J. Kolano B. Bebeli P.J. Kaltsikes P.J. Metzidakis I. (2005) "Identification of Olea europaea L. cultivars using inter-simple sequence repeat markers".
Scientia Horticulturae. 105, pp 45–51.
Tsmouris G. Hatziantoniou S and Demetzos C. (2002) "Lipid analysis of Greek walnut oil (Juglans regia L.)". Natur frosch. 57, pp 51- 56.

Vahdati K & Zareie N. (2006) "Evaluation of side-stub and hypocotyle grafting efficiency for walnut propagation in Iran". Acta Horticulturae. 705, pp 175-17.
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.
Williams J. G. K. Kubelik A. R Livad J. K. and Tingey S. V. (1990) “DNA polymorphism amplifed by arbitrary primers are useful as genetic markers” J. Nucleic Acids Res.18,Pp. 6251-6235.
Woeste K. Burns R. Rhodes O. and Michler C. (2002) “Thirty polymorphic nuclear microsatellite loci from black walnut” J. Hered. 93, pp. 5-60.
Xiao, J., J.. Li, L. Yuan, S.R. McCouch and S.D. Tanksley. (1996). "Genetic diversity and its relationship to hybrid performance and heterosis in rice as revealed by PCR based markers in rice". Theoretical and Applied Genetics. (92), pp: 637-643.
Yarilgac T. Koyuncu F. Koyuncu M. A. Kazankaya A and Sen S. M. (2001) "Some promising walnut selections (*Juglans regia* L.)". Acta Horticulturae. 544, pp 93-96.

پیوست

۱-محلول‌های استخراج DNA

۱-الف) 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.

۱-الف بافر جداکننده		
نام ماده	میزان مصرف	غلظت نهایی
Tris- Hcl	۱/۲۱ گرم	۱۰ میلی‌مولار
Triton 100x	۱۰ سی‌سی	یک درصد
$Mgcl_2$	۱/۰۱ گرم	۵ میلی‌مولار
Sucrose	۱۰۹/۵۳	۰/۳۲ مولار
حجم نهایی	۱۰۰۰ سی‌سی	-

۱-ب بافر لیز کننده		
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	

۱-ب) بافر CTAB

۱-پ) اجزای تشکیل دهنده بافر CTAB	
نام مواد	میزان مصرف
Tris- Hcl	۱۰۰ میلی مولار
Nacl	۱۶/۲۴ گرم
EDTA	۲۰ میلی مولار
CTAB	۲ درصد
بتامرکاپتواتانول	۱ درصد
PVP	۱ درصد

۲- محلول های تهیه ژل

۲-الف) 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).

۲-ب) 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.

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

Abstract:

Genetic diversity DNA key identification and introducing superior walnut genotypes is very important in Iran as one of the main producers of walnut and the origin of this plant. In 2001, walnut collection germplasm estabolished semnan Research Center (Shahrood) from seeds of selected walnut genotypes important Iranian walnut areas. From these seedlings, 21 genotypes were selected with well pomological characteristics and were grafted onto seedlings. The morphological and pomological characteristics genetic variation of these genotypes, was investigated with 10 ISSR primers and 6 SSR primers pair. Nut weight and kernel weight were 17.5g and 10.3g respectively in OR23 genotype. The average kernel percentage of selected walnuts was 51.5%. The highest kernel percentage (62.7%) was observed in T12 genotype. The shell thickness of the K26, T1, and OR26 and R2G8 genotypes was thick which reduced marketing of this genotype. Of the ten ISSR primers, 112 fragments were produced in 21 walnut genotypes, 102 of them were polymorphism and used for genetic diversity analysis. The highest bands number of was observed in UBC.826 and UBC.888 primers with 14 bands. The highest Rp was 7.71 in UBC.826 primer and then in UBC.887primer. The similarity coefficient between walnut genotypes varied from 0.51 to 0.88. Dendrogram divided 21 walnut genotypes into two main groups and three subgroups in the first group, which consistently matched the results. The six SSR loci, a total 32 alleles were obtain that the highest allele number,8, was observed in WGA009. The identification key was created based on the loci for 21 walnut genotypes. WGA009 and WGA276 were able to identification 19 genotypes from 21 genotypes.

Keywords: Walnut, Genetic diversity, Identification key, Dendrogram, Microsatellite

Faculty of Agriculture

M.Sc. Thesis in Biotechnology and Molecular Genetics of Horticultural Products

Preparation of keys molecular identification walnut cultivar by SSR-markers in shahrood

By:Fatemeh davoudi

Supervisor:
Dr. Mehdi Rezaie

Advisor:
Dr. Hosein Hokm Abadi
Dr. Parviz Heidari

June 2018