

بررسی تنوع ژنتیکی گردوی ایرانی (*Juglans regia* L.) با نشانگرهای SSR

- ❖ **آیدا طاهری؛** دانشجوی دکتری جنگلداری، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
- ❖ **نسرین سیدی*؛** استادیار گروه جنگلداری، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
- ❖ **بابک عبدالهی مندولکانی؛** دانشیار گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه و گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشکده زیست‌فناوری، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

چکیده

تعیین میزان تنوع ژنتیکی در مواد گیاهی اولین گام برای شناسایی، حفظ و نگهداری ذخایر توارثی و اساس تحقیقات ژنتیکی و برنامه‌های اصلاحی است. استفاده از نشانگرهای مولکولی یکی از ابزارهای مهم در ارزیابی تنوع ژنتیکی گیاهان بومی است. در این پژوهش تنوع ژنتیکی ۶۲ نهال گردوی ایرانی با استفاده از ۱۰ جفت آغازگر SSR مطالعه شد. ده مکان SSR در مجموع ۵۳ آلل تولید کرد. کمترین و بیشترین تعداد آلل، به ترتیب مربوط به مکان‌های WGA۶۹، WGA۷۱ (۴ آلل) و WGA۱ (۷ آلل) بود. بیشترین میزان هتروزیگوتی مشاهده شده توسط مکان WGA۲۷۶ ثبت شد. همه مکان‌های SSR در نهال‌های بررسی شده انحراف معنی‌داری ($p \leq 0/01$) از تعادل هاردی-واینبرگ نشان دادند. تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA براساس ضرایب تشابه دایس، نهال‌های بررسی شده را به چهار گروه اصلی تقسیم کرد. بررسی ساختار جمعیت با نرم‌افزار Structure ۲,۳,۱، دو گروه ($K=2$) احتمالی را شناسایی کرد. اطلاعات حاصل براساس ماتریس سهم عضویت افراد و میزان Fst نشان داد که تمایز چشمگیری بین زیرگروه‌های احتمالی وجود ندارد. از اطلاعات حاصل از این تحقیق می‌توان در برنامه‌های اصلاحی تولید هیبرید در گردو برای شناسایی نهال‌های دارای فاصله ژنتیکی کافی به منظور بهره‌برداری از هتروزیس مفید باشد.

واژگان کلیدی: تعادل هاردی-واینبرگ، تنوع ژنتیکی، گردوی ایرانی، نرم‌افزار Structure

مقدمه

نشانگرهای AFLP [۹]، RAPD [۸]، RFLP [۷] و غیره استفاده شده است. به‌عنوان مثال، در مطالعه‌ای از ۱۲ نشانگر SSR برای بررسی تنوع ژنتیکی ۴۸ ژنوتیپ گردوی ایرانی استفاده و در کل ۶۶ آلل شناسایی و ۸-۳ آلل به‌ازای هر مکان SSR گزارش شد [۱۰]. در مطالعه‌ای دیگر تنوع ژنتیکی زیادی در جمعیت‌های گردو در هند با استفاده از نشانگرهای SSR مشاهده شد که این تنوع به دیرزیستی زیاد این گونه و گرده‌افشانی با باد نسبت داده شد. نشانگرهای SSR به‌خوبی توانستند جمعیت‌های مختلف گردو را متمایز کنند و در مقایسه با نشانگرهای RAPD، در تمایز ژنوتیپ‌ها و جمعیت‌های گردو، کارایی بیشتری داشتند [۱۱].

محققان در ایران نیز تنوع ژنتیکی زیادی را در ژنوتیپ‌های بومی، با استفاده از ۹ مکان SSR و صفات مورفولوژیک گزارش کردند، به‌طوری که ۳۴ آلل در ۲۱ ژنوتیپ شناسایی شد. در اغلب بررسی‌ها نشانگرهای SSR به‌دلیل مزایای ویژه نسبت به دیگر نشانگرهای مولکولی بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند [۱۲]. از جمله مزایای این نشانگرها، می‌توان به آسان بودن تفسیر نتایج آن، میزان زیاد پلی‌مورفیسم حتی در سطح ارقام و ژنوتیپ‌های یک گونه، فراوانی و تنوع زیاد آلل‌های SSR در سطح ژنوم یوکاریوت‌ها، هم‌بارز بودن آنها، تکرارپذیر بودن نتایج و در نهایت انتقال‌پذیر بودن در سطح گونه‌های نزدیک اشاره کرد [۱۱].

بنابراین با توجه به کارایی زیاد نشانگرهای SSR، هدف این مطالعه استفاده از این نشانگرها برای بررسی تنوع ژنتیکی برخی نهال‌های گردوی ایرانی به‌منظور تولید ژنوتیپ‌هایی با صفات برتر و حفظ ذخایر ارزشمند این گونه بود.

گردوی ایرانی (*Juglans regia* L.) از خانواده Juglandaceae در اصل بومی آسیای مرکزی، غربی و همچنین ایران (مناطق زاگرس و کرانه جنوبی دریای خزر) است که در آسیا از شرق هیمالیا تا چین گسترش یافته و در حال حاضر نیز در جای‌جای جهان توسعه پیدا کرده است [۱]. خانواده Juglandaceae دارای ۶۰ گونه است که ۲۰ گونه از آنها در جنس *Juglans* قرار گرفته و مشهورترین گونه آنها گردوی پارسی (*J. regia* L.) است [۲، ۳]. هم چوب مرغوب و هم میوه عالی این گونه، از لحاظ اقتصادی باارزش است و به همین دلیل این گونه درختی از گذشته تا امروز به‌شدت بهره‌برداری شده و در قانون حفاظت از جنگل‌ها و مراتع با عنوان گونه حفاظت‌شده معرفی شده است [۴]. در فلات ایران گردو در عرض‌های جغرافیایی ۲۹ تا ۳۹ درجه شمالی و طول‌های جغرافیایی ۴۵ تا ۶۴ درجه شرقی، از مناطق پست تا ارتفاع ۲۵۰۰ متر از سطح دریا، به‌صورت اهلی یا وحشی در مناطق شمال، غرب و مرکز کشور یافت می‌شود [۵]. براساس آمار سازمان خواربار جهانی (FAO)، تولید جهانی این محصول در سال ۲۰۱۰ بیش از ۲/۵ میلیون تن بوده که در بین کشورهای تولیدکننده، ایران با تولید ۲۷۰ هزار تن پس از کشورهای چین و آمریکا در مقام سوم قرار دارد. وجود شرایط مناسب برای کشت گردو، تکثیر جنسی و سطح وسیع زیر کشت آن، سبب شده که این گونه تنوع بسیار زیادی در ایران داشته باشد. چنین تنوعی در بین جمعیت‌های بومی گردو، فرصت‌های زیادی را برای اصلاح گردو فراهم می‌آورد [۶]. برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در گردو از نشانگرهای مختلفی مانند

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی شامل ۶۲ نهال دوساله گردو بود که برگ‌های تازه سرشاخه‌های آنها نمونه‌برداری و برای استخراج DNA استفاده شد. عملیات آزمایشگاهی در آزمایشگاه ژنومیکس پژوهشکده زیست‌فناوری دانشگاه ارومیه انجام گرفت. استخراج DNA به روش CTAB انجام گرفت و کمیت و کیفیت DNA با دو روش اسپکتوفوتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد تعیین شد. پس از تعیین غلظت DNA، نمونه‌های استخراجی در حدود ۲۰ نانوگرم در میکرولیتر برای واکنش‌های PCR رقیق شد.

تجزیه نشانگرهای SSR

در این تحقیق از ۱۰ جفت آغازگر SSR استفاده شد (جدول ۱). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۰ میکرولیتری شامل ۲۰ نانوگرم DNA ژنومی، بافر استخراج ۱۰ برابر، کلرید منیزیم ۲۵ میلی‌مول، ۰/۲ میلی‌مول از هر dNTPs، یک واحد آنزیم Taq DNA polymerase و ۱ میکرومول از هر کدام از آغازگرهای مستقیم (Forward) و معکوس (Reverse) در دستگاه ترموسایکلر (Applied Biosystem, USA) انجام گرفت [۱۳]. چرخه حرارتی واکنش‌های PCR شامل یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال در دمای مناسب برای هر جفت آغازگر (جدول ۱) به مدت ۴۰ ثانیه، بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و در پایان چرخه‌ها بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه انجام گرفت. الکتروفورز محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز ۳ درصد با ولتاژ ۸۰ به مدت ۲-۳ ساعت انجام

گرفت و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، عکس‌برداری با استفاده از دستگاه ژل داکيومنت بیورد (Gel logic 212 pro, Carestream, Bio Rad, USA) صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

باند‌های حاصل از نشانگرهای SSR به صورت هم‌بارز امتیازدهی شد و شاخص‌های مرتبط با تنوع ژنتیکی شامل میانگین هتروزیگوتی مورد انتظار (He) و مشاهده شده (Ho)، شاخص اطلاعاتی شانون (I)، تعداد آل‌های موثر (Ne) و انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ برای مکان‌های SSR با استفاده از نرم‌افزار ۶,۴ GenAlEx [۱۴] محاسبه شد. برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها، تجزیه کلاستر براساس ضریب تشابه دایس و الگوریتم (Unweighted Pair-Group Method UPGMA Arithmetic Average) در نرم‌افزار ۲,۰۲ NTSYSpc [۱۵] انجام گرفت. تجزیه به مختصات اصلی (Principal Co-ordinate Analysis) نیز با این نرم‌افزار انجام گرفت و با سه مؤلفه اول نمودار سه‌بعدی برای گروه‌بندی و بررسی روابط بین نمونه‌ها ترسیم شد. به منظور تعیین زیرگروه‌های احتمالی و بررسی ساختار ژنتیکی جمعیت، از نرم‌افزار ۲,۳,۱ Structure [۱۶] در حالت Admixture با ۵۰۰۰۰ بار Burn-in و ۵۰۰۰۰ بار تکرار MCMC در مقادیر مختلف K (از ۱ تا ۲۰ و ۱۰ تکرار برای هر K) استفاده شد. عدد K بهینه براساس روش ΔK محاسبه و تعیین شد.

نتایج و بحث

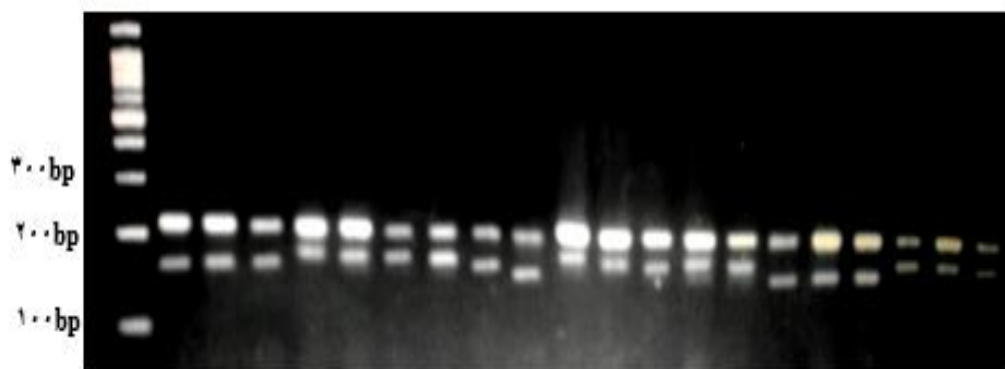
براساس نتایج به دست آمده، ده مکان SSR استفاده شده در این تحقیق، ۵۳ آل را در ۶۲ نهال گردو شناسایی کردند. مکان‌های WGA۶۹ و WGA۷۱ کمترین (۴)

WGA^{۲۰۲} تولید شد (جدول ۲). بررسی میزان انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ در جمعیت بررسی شده نشان داد که مقدار آماره کای اسکور برای تمام مکان‌ها معنی دار است ($p \leq 0.01$) که نشان‌دهنده انحراف از تعادل هاردی-واینبرگ مکان‌های SSR مورد استفاده در جمعیت بررسی شده است. برقرار نبودن تعادل هاردی-واینبرگ در جمعیت بررسی شده، ممکن است به دلیل کوچک بودن جمعیت و هموزیگوتی نهال‌های بررسی شده باشد.

آلل) و مکان WGA^۱ بیشترین (۷ آلل) را دارا بودند (شکل ۱). تعداد آلل‌های مؤثر بین ۲/۸۵ تا ۵/۷۹ متغیر و میانگین آن ۴/۳۰ بود که کمترین و بیشترین مقدار آن به ترتیب در مکان‌های WGA^۱ و WGA^{۲۰۲} مشاهده شد. میانگین هتروزیگوتی مشاهده‌شده کل مکان‌های بررسی شده ۰/۴۶ بود که مکان WGA^{۲۷۶} بیشترین میزان این شاخص را نشان داد. همچنین میانگین هتروزیگوتی مورد انتظار در جمعیت مطالعه‌شده برای ۱۰ مکان SSR، ۰/۷۶ محاسبه شد که کمترین و بیشترین میزان آن به ترتیب توسط مکان‌های WGA^۱ و

جدول ۱. توالی و برخی خصوصیات آغازگرهای SSR استفاده‌شده

آغازگر	توالی آغازگر (۵'→۳')	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد)	تعداد آلل (Na)	۱	۲	۳	۴	فرآوانی آلی	۵	۶	۷
WGA ^۱	ATTGGAAGGGAAGGAAATG CGGCACATACGTAATAC	۵۸	۷	-/۰۴	-/۱۳	-/۳۰	-/۲۵		-/۱۵	-/۱۰	-/۰۳
WGA ^۴	TGTTGCATTGACCCACTTGT TAAGCCAACATGGTATGCCA CATCAAAGCAAGCAATGGG CCATTGCTCTGTGATTGGG	۵۸	۵	-/۱۳	-/۲۷	-/۳۰	-/۲۸		-/۰۰	-	-
WGA ^۹	TTAGTTAGCAAACCCACCCG AGATGCACAGACCAACCCTC	۵۷	۶	-/۱۱	-/۳۱	-/۱۷	-/۰۹		-/۱۵	-	-
WGA ^{۶۹}	ACCCGAGAGATTCTGGGAT GGACCCAGCTCCTCTCTCT	۵۸	۴	-/۱۲	-/۴۳	-/۲۵	-/۱۹		-	-	-
WGA ^{۷۱}	ACCCGAGAGATTCTGGGAT GGACCCAGCTCCTCTCTCT	۵۹	۴	-/۱۳	-/۲۵	-/۴۵	-/۰۶		-	-	-
WGA ^{۸۹}	ACCCATCTTTACAGTGTG TGCCATAATTAGCAATTCCA	۵۸	۵	-/۱۰	-/۲۶	-/۳۴	-/۲۳		-/۰۶	-	-
WGA ^{۱۱۸}	TGTGCTCTGATCTGCCTCCC GGGTGGGTGAAAAGTAGCA CCATCTACCGTTGCACATTTT GCTGGTGGTCTATCATGG	۵۹	۵	-/۱۷	-/۳۶	-/۲۵	-/۱۴		-/۰۷	-	-
WGA ^{۲۰۲}	CTCACTTCTCGGCTCTTCC GGTCTTATGTGGGCAGTCGT	۶۰	۶	-/۱۴	-/۱۹	-/۱۸	-/۱۴		-/۲۲	-/۱۴	-
WGA ^{۲۷۶}	TCCAATCGAAACTCCAAGG TGCCAAAGACGATGATGGA	۵۸	۶	-/۱۴	-/۲۱	-/۲۲	-/۲۵		-/۰۷	-/۱۲	-
WGA ^{۳۱۱}	TCCAATCGAAACTCCAAGG TGCCAAAGACGATGATGGA	۵۷	۵	-/۰۹	-/۲۱	-/۳۷	-/۲۰		-/۱۱	-	-



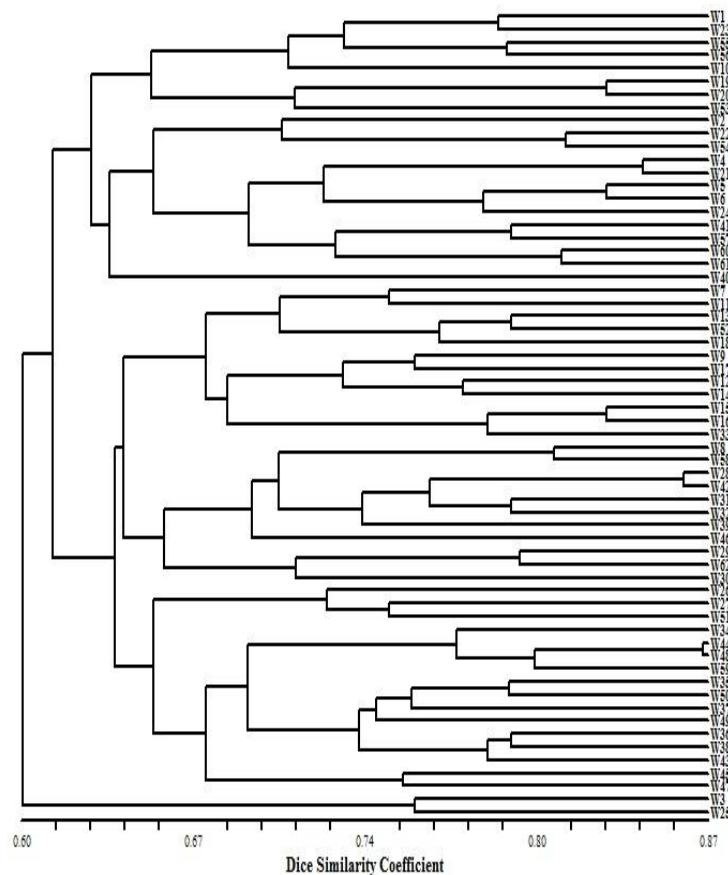
شکل ۱. الگوی بانندی آغازگر WGA^{۶۹} روی برخی از نهال‌های گردو

جدول ۲. برخی شاخص‌های ژنتیکی برای آغازگرهای SSR در جمعیت گردوی بررسی شده

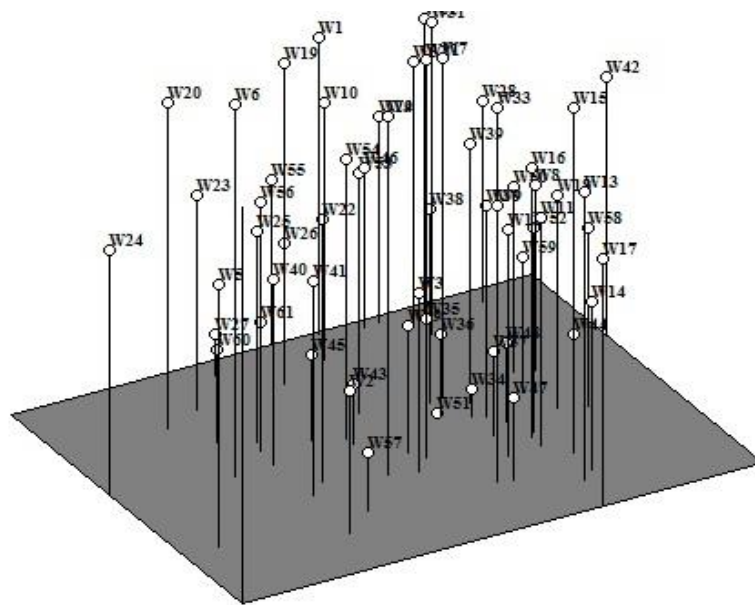
آغازگر	تعداد آلل (Na)	تعداد آلل موثر (Ne)	شاخص شانون (I)	هتروزیگوتی مشاهده شده (Ho)	هتروزیگوتی مورد انتظار (He)
WGA۱	۷	۴/۹۱	۱/۷۲	۰/۰۸	۰/۸۰
WGA۴	۵	۳/۷۹	۱/۳۸	۰/۰۲	۰/۷۴
WGA۹	۶	۵/۱۰	۱/۷۱	۰/۰۷	۰/۸۰
WGA۶۹	۴	۳/۲۹	۱/۲۸	۰/۷۳	۰/۷۰
WGA۷۱	۴	۲/۸۵	۱/۱۷	۰/۰۰	۰/۶۵
WGA۸۹	۵	۳/۹۵	۱/۴۶	۰/۴۰	۰/۷۵
WGA۱۱۸	۵	۴/۰۱	۱/۴۹	۰/۶۳	۰/۷۵
WGA۲۰۲	۶	۵/۷۹	۱/۷۷	۰/۸۵	۰/۸۳
WGA۳۶	۶	۵/۲۴	۱/۷۱	۰/۸۸	۰/۸۱
WGA۳۱	۵	۴/۰۳	۱/۴۹	۰/۳۲	۰/۷۵
میانگین	۵/۳	۴/۳۰	۱/۵۲	۰/۴۶	۰/۷۶

تجزیه کلاستر براساس روش UPGMA (شکل ۲) و ضریب تشابه دایس، ۶۲ نهال گردو را در ۴ گروه عمده قرار داد. نتایج تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) نشان داد که سه مؤلفه اول به ترتیب ۹/۲۹، ۸/۱۹ و ۷/۸۰ درصد از تنوع کل را توجیه می‌کنند (شکل ۳). نمودار سه‌بعدی حاصل از این روش براساس سه مؤلفه اول نیز تا حدودی گروه‌بندی حاصل از تجزیه کلاستر را تأیید کرد.

تجزیه کلاستر براساس روش UPGMA (شکل ۲) و ضریب تشابه دایس، ۶۲ نهال گردو را در ۴ گروه عمده قرار داد. نتایج تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) نشان داد که سه مؤلفه اول به ترتیب ۹/۲۹، ۸/۱۹ و ۷/۸۰ درصد از تنوع کل را توجیه می‌کنند (شکل ۳). نمودار سه‌بعدی حاصل از این روش براساس سه مؤلفه اول نیز تا حدودی گروه‌بندی حاصل از تجزیه کلاستر را تأیید کرد.



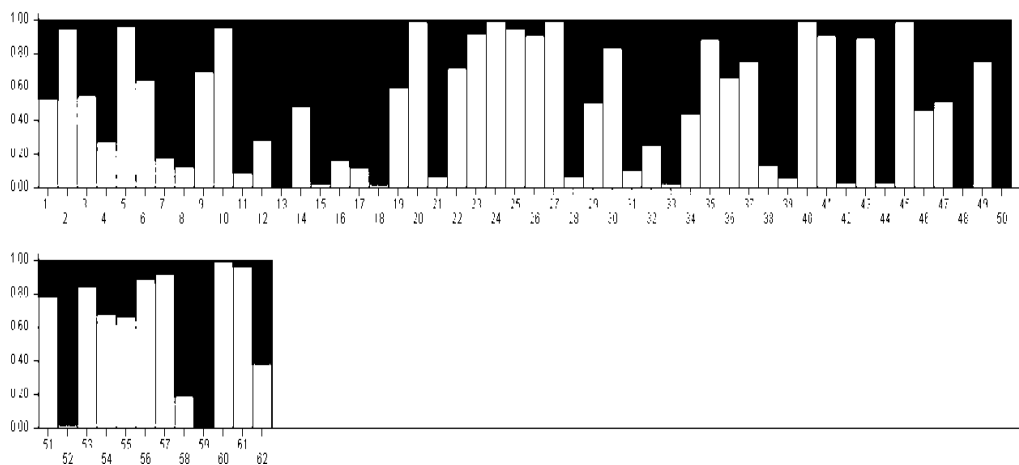
شکل ۲. دندروگرام ۶۲ نهال گردو با الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه دایس براساس ۱۰ مکان SSR



شکل ۳. نمودار سه‌بعدی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی در ۶۲ نهال گردوی ایرانی با استفاده از ۱۰ مکان SSR

از تمایز کم بین گروه‌هاست. در باریلات ارائه شده توسط نرم‌افزار Structure (شکل ۴) هر گروه با رنگی متمایز مشخص شده است، به طوری که دو رنگ مجزا از هم برای هر فرد نشان‌دهنده تعلق آن فرد به یکی از گروه‌ها یا هر دو گروه است. محاسبه ماتریس سهم عضویت (جدول ۳) هر فرد به گروه‌ها نشان داد که هر فرد با چه ضریبی به هر یک از گروه‌ها تعلق دارد.

به منظور تعیین زیرگروه‌های احتمالی و تأیید گروه‌های متمایز حاصل از تجزیه کلاستر نهال‌های بررسی شده، تجزیه ساختار ژنتیکی جمعیت با استفاده از نرم‌افزار Structure انجام گرفت. از بین مقادیر مختلف K (براساس روش ΔK)، مقدار $K=2$ مناسب‌ترین عدد برای محاسبه متوسط شاخص تثبیت (Fst) برای هر گروه برآورد شد. در هر دو گروه، مقادیر متوسط Fst کمتر از ۰/۲ بود که حاکی



شکل ۴. باریلات رسم‌شده توسط نرم‌افزار Structure ۲,۳,۱ براساس داده‌های حاصل از ۱۰ مکان SSR، محور افقی مربوط به نهال‌ها و محور عمودی سهم تعلق هر فرد به هر گروه را نشان می‌دهد.

جدول ۳. ماتریس سهم عضویت (ماتریس Q) محاسبه شده توسط نرم افزار Structure ۲,۳,۱ براساس K=۲

نهایها	زیرگروه ۱	زیرگروه ۲	نهایها	زیرگروه ۱	زیرگروه ۲
W1	۰/۴۷	۰/۵۳	W33	۰/۹۷	۰/۰۳
W2	۰/۰۴	۰/۹۶	W34	۰/۵۵	۰/۴۵
W3	۰/۴۵	۰/۵۵	W35	۰/۱۱	۰/۸۹
W4	۰/۷۲	۰/۲۸	W36	۰/۳۴	۰/۶۶
W5	۰/۰۳	۰/۹۷	W37	۰/۲۴	۰/۷۶
W6	۰/۳۶	۰/۶۴	W38	۰/۸۶	۰/۱۴
W7	۰/۸۲	۰/۱۸	W39	۰/۹۳	۰/۰۷
W8	۰/۸۷	۰/۱۳	W40	۰/۰۰	۱
W9	۰/۳۱	۰/۶۹	W41	۰/۰۹	۰/۹۱
W10	۰/۰۴	۰/۹۶	W42	۰/۹۶	۰/۰۴
W11	۰/۹۰	۰/۱۰	W43	۰/۱۱	۰/۸۹
W12	۰/۷۱	۰/۲۹	W44	۰/۹۶	۰/۰۴
W13	۰/۹۹	۰/۰۱	W45	۰/۰۰	۱
W14	۰/۵۱	۰/۴۹	W46	۰/۵۳	۰/۴۷
W15	۰/۹۷	۰/۰۳	W47	۰/۴۸	۰/۵۲
W16	۰/۸۳	۰/۱۷	W48	۰/۹۸	۰/۰۲
W17	۰/۸۸	۰/۱۲	W49	۰/۲۴	۰/۷۶
W18	۰/۹۸	۰/۰۲	W50	۰/۹۸	۰/۰۲
W19	۰/۴۰	۰/۶۰	W51	۰/۲۱	۰/۷۹
W20	۰/۰۰	۱	W52	۰/۹۷	۰/۰۳
W21	۰/۹۳	۰/۰۷	W53	۰/۱۶	۰/۸۴
W22	۰/۲۸	۰/۷۲	W54	۰/۳۱	۰/۶۸
W23	۰/۰۸	۰/۹۲	W55	۰/۳۳	۰/۶۷
W24	۰/۰۰	۱	W56	۰/۱۱	۰/۸۹
W25	۰/۰۵	۰/۹۵	W57	۰/۰۷	۰/۹۳
W26	۰/۰۹	۰/۹۱	W58	۰/۸۰	۰/۲۰
W27	۰/۰۰	۱	W59	۰/۹۸	۰/۰۲
W28	۰/۹۳	۰/۰۷	W60	۰/۰۰	۱
W29	۰/۴۹	۰/۵۱	W61	۰/۰۳	۰/۹۷
W30	۰/۱۶	۰/۸۴	W62	۰/۶۱	۰/۳۹
W31	۰/۸۸	۰/۱۱			
W32	۰/۷۴	۰/۲۶			

اعداد متن جدول ضریب تعلق هر فرد به گروه‌های احتمالی را نشان می‌دهد.

WGA۱ در تحقیق حاضر نیز استفاده شده است، ممکن است به دلیل تنوع بیشتر توده‌ها و ژنوتیپ‌های گردوی موجود در ایران در مقایسه با ارقام و ژنوتیپ‌های خارجی باشد این تفاوت احتمالاً ناشی از وجود والد‌های متنوع در این توده‌هاست که طی سال‌های متمادی به ایجاد تلاقی‌های تصادفی و افزایش تنوع منجر شده است. با کاربرد همین نشانگرها محققان

در مطالعه‌ای که از ۱۴ نشانگر SSR برای شناسایی ۴۷ ژنوتیپ گردوی ایرانی و یک پایه هیبرید استفاده شد، به‌ازای هر مکان ژنی ۸-۳ آلل شناسایی شد [۱۳]. در کامپانیای ایتالیا نیز، با استفاده از ۱۲ نشانگر SSR ۸-۳ آلل به‌ازای هر مکان گزارش شد [۱۷]. بیشتر بودن تعداد آلل‌های مشاهده‌شده در هر مکان SSR در این مطالعه که برخی از آن مکان‌ها مانند WGA۹ و

بودن میانگین تعداد آل‌های مشاهده‌شده در مقایسه با تحقیق حاضر ممکن است به دلیل قابلیت زیاد نشانگرهای SSR، در تمایز چندشکلی ژنتیکی بین جمعیت‌ها، نسبت به نشانگرهای آلوزایم و ایزوزایم باشد. در مطالعه‌ای دیگر بر روی ۱۶ نمونه از بانک ژن و ۵ رقم از گردوی ایرانی، میانگین تعداد آل‌ها در هر مکان ۴/۲۵ گزارش شد [۱۲] که با میانگین تعداد آل در هر مکان در مطالعه حاضر (۵/۳) تا حدودی مطابقت دارد.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج مطالعه حاضر می‌توان انتظار داشت با تلاقی بین نهال‌هایی که در گروه‌هایی با فاصله ژنتیکی زیادی از هم قرار گرفته‌اند، نتایج برتر برای انتخاب در برنامه‌های اصلاحی تولید شود؛ چراکه یکی از راه‌های مطمئن برای دستیابی به هتروزیس زیاد، استفاده از مواردی است که دارای کمترین خویشاوندی باشند و شناسایی تلاقی‌های حاوی هتروزیس زیاد، مهم‌ترین قدم در تولید محصولات هیبرید است و به‌طور معمول با قدرت ترکیب‌پذیری و فاصله ژنتیکی بیشتر می‌توان هیبریدهای با عملکرد بیشتر تولید کرد. بهتر است برای مشخص شدن گروه‌هایی با فاصله ژنتیکی مناسب، تعداد زیادی نهال گردو با نشانگرهای دیگر به‌همراه خصوصیات مورفولوژیک و رابطه خویشاوندی آنها نیز ارزیابی شوند.

۴۶ تا ۹۰ آل به‌ازای هر مکان ژنی در گردوی سیاه را شناسایی کردند [۱۸]. برای تمام مکان‌های SSR تعداد آل گزارش‌شده توسط این پژوهشگران بیشتر از مقدار مشاهده‌شده در مطالعه حاضر بود. این تفاوت در تعداد آل‌ها ممکن است ناشی از وحشی بودن توده‌های گردوی سیاه و عدم دخالت‌های بشری در آنها و تفاوت در محیط اکوجغرافیایی باشد. در بررسی تنوع ژنتیکی ۲۸ ژنوتیپ از ۴ توده گردوی ایرانی در استان همدان با استفاده از ۱۱ نشانگر SSR در مجموع ۴۷ آل شناسایی شد که تعداد آل در هر مکان از ۲ تا ۹ متغیر بود. حداقل و حداکثر تعداد آل در این مطالعه به‌ترتیب در مکان‌های WGAV۱ (۲ آل) و WGA۲۷۶ (۹ آل) بود که در مطالعه حاضر نیز این مکان‌ها به‌ترتیب کمترین و بیشترین تعداد آل را شناسایی کردند. میانگین تعداد آل‌های مشاهده‌شده در گردوهای مطالعه حاضر ۵/۳ و میزان شاخص شانون ۱/۵۲ بود؛ درحالی که در مطالعه این پژوهشگران میانگین تعداد آل‌های مشاهده‌شده در هر توده برای همه مکان‌های SSR ۳/۲۵ و میانگین شاخص شانون برای همه توده‌ها ۰/۹۳ بود. تفاوت موجود احتمالاً به دلیل گزینش برای صفات مطلوب در جمعیت‌های گردو در استان همدان و بنابراین کاهش تنوع آلی در این جمعیت‌ها و همچنین کم بودن تعداد نمونه‌های مطالعه شده باشد [۱۹]. همچنین با بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های گردوی آسیایی و اروپایی با استفاده از نشانگرهای آلوزایم و ایزوزایم ۲/۲۹-۲/۱۴ آل در هر جمعیت شناسایی شد [۲۰]. این تفاوت و کم

References

- [1]. Gerard, W.K., Crocker, T.F., and Bertrand, P.F. (2003). *Minor Fruits and Nuts in Georgia*. University of Georgia, 214 p.
- [2]. Ducci, F., Rogatis, A., and Proietti, R. (1997). Protezione delle risorse genetiche di *Juglans regia* L. *Annali Istituto Sperimentali Selvicoltura*, 26: 35–55.
- [3]. McGranahan, G.H., Charles, A., Leslie, C.A., Philips, H.A., and Dandaker, A. (1998). Walnut Propagation. In: D. Ramos (ed.), *Walnut Production Manual*, University of California, DANRPubl., Davis, pp 71-83.
- [4]. Sehgal, D., and Raina, S.N. (2008). DNA markers and germplasm resource diagnostics: new perspectives in crop improvement and conservation strategies. In: Arya ID, Arya S (eds) *Utilization of biotechnology in plant sciences*. Microsoft Printech (I) Pvt. Ltd, Dehradun, pp 39–54.
- [5]. Vahdati, K., and Zareie, N. (2006). Evaluation of side-stub and hypocotyle grafting efficiency for walnut propagation in Iran. *Acta Horticulturae*, 705: 175-179.
- [6]. Ruiz-Garcia, L., Lopez-Ortega, G., Fuentes Denia, A., and Frutos Tomas, D. (2011). Identification of a walnut (*Juglans regia* L.) germplasm collection and evaluation of their genetic variability by microsatellite markers. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 9(1): 179-192.
- [7]. Aly, M.M., Robert, A., Fjellstrom, G., McGranahan, G.H., and Parfitt, E. (1992). Origin of walnut somatic embryos determine by RFLP and Isozyme analysis. *Hort Science*, 27(1): 61-63.
- [8]. Niceses, F.P., Hormaza, J.I., and McGranahan, G.H. (1998). Molecular characterization and genetic relatedness among walnut (*Juglans regia* L.) genotypes based on RAPD markers. *Euphytica*, 101:199-206.
- [9]. Bayazit, S., Kazan, K., Golbitti, S., Cevik, V., Ayanogla, H., and Ergul, A. (2007). AFLP analysis of genetic diversity in low chill requiring walnut (*Juglans regia* L.) genotyping from Hatay. Turkey, *Scientia Horticulturae*, 111: 394-398.
- [10]. Feroni, I., Woeste, K., Monti, L.M., and Rao, R. (2007). Identification of ‘Sorrento’ walnut using simple sequence repeats (SSRs). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54:1081-109.
- [11]. Nazeer Ahmed, J.I.M., ReyazulRouf, M., Nazir Ahmad, R., Rizwan, R., Shabir, H., Wani WajidaShafi Hidayatullah, M., and Sheikh, M.A. (2012). SSR and RAPD analysis of genetic diversity in walnut (*Juglans regia* L.) genotypes from Jammu and Kashmir, India. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 18(2): 149–160.
- [12]. Mahmoodi, R., Rahmani, F., and Rezaee, R. (2013). Genetic diversity among *Juglans regia* L. genotypes assessed by morphological traits and microsatellite markers. *Journal of Agricultural Research*, 11(2), 431-437.
- [13]. Dangl, G.S., Woeste, K.E., Aradhya, M.K., Koehmstedt, A., Simon, C., Potter, D., Leslie, C.A., and McGranahan, G.H. (2005). Characterization of fourteen microsatellite markers for genetic analysis and cultivar identification of walnut. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130(3): 348-354.
- [14]. Peakall, R., and Smouse, P.E. (2006). GENALEX 6.4: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288 -295.
- [15]. Rohlf, F.J. (1998). *NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.0*. Setauket, New York.

- [16]. Pritchard, J.K., Stephens, M., and Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155:945-959.
- [17]. Foroni, I., Woeste, K., Monti, L.M., and Rao, R. (2006). Identification of 'Sorrento' walnut using simple sequence repeats (SSRs). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 85: 311-321.
- [18]. Victory, E.R., Glaubitz, J.C., Rhodes, O.E., and Woeste, K.E. (2006). Genetic homogeneity in *Juglans nigra* (Juglandaceae) at nuclear microsatellites. *American Journal of Botany*, 93:118-126.
- [19]. Karimi, R., Ershadi, A., and Vahdati, K. (2008). Analysis of Genetic Diversity Among Some Persian Walnut Populations of Hamedan Province Using SSR Markers. *Plant Production Technology*, 9(2): 43-53. (In Farsi).
- [20]. Fornari, B., Malvolti, M.E., Taurchini, D., Fineschi, S., Beritognolo, I., McCaglia, E., and Cannata, F. (2001). Isozym and organellar DNA analysis of genetic diversity in natural/naturalised European and Asiatic walnut (*Juglans regia* L.) populations. *Acta Horticulturae*, 544: 167-178.