ارزیابی مولکولی برخی ژنوتیپ‌های برتر گردوی ایرانی با استفاده از آغازگر ISSR

سعادت ساریخانی خرمی [۱]، کاظم ارزانی [۱*]، عبدالعلی شجاعیان [۱]، محمدمهدی عرب [۲]، مسعود ملکی [۱]

[۱] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

[۲] گروه علوم باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول: arzani_k@modares.ac.ir

چکیده

با توجه به اینکه ایران مرکز پیدایش و تنوع گردوی ایرانی (*Juglans regia* L.) در دنیا به شمار می‌رود؛ پژوهش حاضر در ادامه طرح ارزیابی جمعیت گردو در استان فارس (۱۳۸۸-۱۳۹۱) و با هدف ارزیابی ژرم‌پلاسم موجود در مناطق مهم گردوکاری استان فارس (شهرستان‌های بوانات، اقلید و سپیدان) طی سال‌های ۱۳۹۴-۱۳۹۱ انجام گرفت. در همین راستا، تعداد ۸۱ ژنوتیپ منتخب از ۴۱۲ ژنوتیپ گردو در شهرستان بوانات و ۴۸ ژنوتیپ در شهرستان اقلید مورد ارزیابی نهایی مورفولوژیک، بیوشیمیایی، سیتولوژیک و مولکولی قرار گرفتند. در بخش ارزیابی مولکولی، جمعیت گردو در شهرستان بوانات (مشتمل بر ۸۱ ژنوتیپ منتخب بذری) با استفاده از ۶ آغازگر ISSR مورد انگشت‌نگاری DNA و ارزیابی مولکولی قرار گرفت. براساس نتایج به دست آمده، میانگین میزان چندشکلی این شش آغازگر در جمعیت مورد مطالعه ۷۲/۷۲ درصد بود. تعداد باندهای چندشکل در آغازگرهای مورد مطالعه بین ۱۲ (P28) تا ۳۷ (P25 و P27) متغیر بود. میزان محتوای اطلاعات چند شکلی آغازگرها و همچنین شاخص نشانگر به‌ترتیب بین ۰/۳۸-۰/۲۹ و ۱۲/۲۱-۴/۲۴ متغیر بود. همچنین میانگین میزان تغییرات شاخص تنوع ژنی Nei و شاخص شانون نیز به‌ترتیب ۰/۲۲ و ۰/۳۳ بود. براساس نتایج به دست آمده، داده‌های حاصل از شش آغازگر نشانگر ISSR توانست تفکیک خوبی بین ژنوتیپ‌های برتر گردو در شهرستان بوانات انجام دهد.

کلمات کلیدی: **ژرم‌پلاسم، ژنوتیپ، نشانگر ISSR، چندشکلی، تنوع ژنی.**

مقدمه

گردوی ایرانی (*Juglans regia* L.) در بین محصولات باغبانی از اهمیت اقتصادی ویژه‌ای در سطح جهان برخوردار است (Mao and Hua, 2012). با توجه به طبیعت تولیدمثلی و همچنین تکامل بلندمدت تحت شرایط محیطی پیچیده، تنوع ژنتیک بالایی در جمعیت گردو مشاهده می‌شود (Yang, 2005). به‌منظور انجام برنامه به‌نژادی، وجود تنوع ژنتیک و ارزیابی آن بسیار حائز اهمیت می‌باشد. در واقع، با توجه به مشکلات شدید فعلی از جمله تغییر اقلیم و کم آبی، تنها راه برای تداوم تولید و امنیت غذایی، استفاده و بهره‌برداری از تنوع ژنتیک است (Govindaraj *et al.*, 2015). خوشبختانه، با توجه به وجود یک ژرم‌پلاسم بسیار بزرگ و متنوع گردو در کشور، می‌توان نسبت به پیاده‌سازی برنامه‌های به‌نژادی مهم و بزرگ اقدام کرد که در این مسیر، اولین قدم، ارزیابی تنوع ژنتیک و شناسایی ژنوتیپ‌های برتر می‌باشد (Arzani *et al.*, 2008).

انواع مختلفی از نشانگرهای مولکولی اعم از نشانگرهای بیوشیمیایی (آیزوزایم‌ها) و نشانگرهای مبتنی بر DNA برای شناسایی و ارزیابی گونه‌ها و ارقام گردو، مطالعه روابط بین و درون‌گونه‌ای (Foroni *et al.*, 2001)، تعیین فقدان آپومیکتیک، روابط فیلوژنتیک و ارزیابی تنوع ژنتیک میان ارقام و ژنوتیپ‌های گردو (Fjellstrom and Parfitt, 1994)، شناسایی گردوهای پوست نازک و ضخیم (Zhang Li *et al.*, 2007)، شناسایی هیبریدهای بین گونه‌ای، ارزیابی ارتباطات ژنتیک میان ژنوتیپ‌ها و ساخت نقشه پیوستگی ژنی (Fatahi *et al.*, 2010) استفاده شده‌اند. از نشانگرهای ISSR برای ارزیابی و توصیف ژرم‌پلاسم ارقام گردوی کالیفرنیا و مطالعات تنوع ژنتیک، نشانمند کردن ژنی، نقشه ژنومی و بیولوژی تکاملی (Pollegioni *et al.*, 2003) و در بسیاری مطالعات دیگر استفاده شده است.

گردو یکی از محصولات مهم در باغ‌های استان فارس به‌ویژه باغ‌های سنتی می‌باشد و همین امر سبب شده تا استان فارس جایگاه دوم تولید گردو در کشور را به خود اختصاص دهد. وجود گردو در باغ‌های سنتی که طی سالیان متمادی از طریق بذر تکثیر شده‌اند، یک جمعیت غنی و متنوع از این محصول را در استان فارس بوجود آورده است. این جمعیت بزرگ، بستر بسیار مناسبی برای انجام برنامه‌های به‌نژادی می‌باشد و به‌نظر می‌رسد با یک برنامه به‌نژادی و مدیریتی صحیح می‌توان ارقام و پایه‌های با ارزشی را معرفی نمود. لذا این پژوهش با هدف بررسی میزان تنوع در جمعیت مورد مطالعه و قرابت بین ژنوتیپ‌های برتر از جنبه مولکولی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های برگی از ژنوتیپ‌های مورد نظر در این مرحله به دو روش نمونه خشک و ازت مایع تهیه گردید. نمونه‌های خشک در پاکت‌های کاغذی در درون پاکت‌های پلاستیکی دارای سیلیکاژل نگهداری شدند. با توجه به نتایج بهتر نمونه‌های خشک شده در ازت مایع، از این نمونه‌ها جهت استخراج نهایی DNA ژنومی استفاده گردید. بدین منظور، نمونه‌های برگی در داخل هاون چینی و با استفاده از ازت مایع به خوبی پودر شدند و مقدار ۰/۰۱ گرم از نمونه برگی پودر شده جهت استخراج DNA استفاده گردید. در این آزمایش از روش روش CTAB تغییر یافته جهت استخراج DNA استفاده گردید. طی پیش آزمایش‌های انجام شده، غلظت بهینه برای انجام واکنش زنجیره پلی‌مراز ۴/۲۳ نانوگرم بر میکرولیتر DNA بود. به همین دلیل برای این منظور و در حجم واکنش ۱۳ میکرولیتر، مقدار ۲/۷۵ میکرولیتر DNA با غلظت ۲۰ نانوگرم بر میکرولیتر استفاده گردید. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (BIORAD, T100™ Thermal Cycler) و در حجم ۱۳ میکرولیتر انجام شد. در این آزمایش از الکتروفورز ژل عمودی پلی‌اکریل‌آمید (مدل Scientific CBS) جهت تفکیک قطعات DNA استفاده گردید. در این روش دو نوع ژل Stacking (با غلظت پنج درصد) و ژل Running (با غلظت ۱۰ درصد) تهیه گردید. پس از اتمام الکتروفورز، ضمن جدا کردن دو شیشه از یکدیگر، ژل به آهستگی روی سینی رنگ‌آمیزی قرار می‌گیرد و مراحل رنگ‌آمیزی ژل پلی‌اکریل آمید با استفاده از نیترات نقره دو درصد انجام گرفت.

به‌منظور آنالیز داده‌های حاصل از ارزیابی مولکولی، ابتدا داده‌ها به‌صورت صفر و یک؛ صفر برای عدم وجود و یک برای وجود باند، نمره‌دهی شدند. از نرم‌افزار GenAlex 6.501 برای تجزیه و تحلیل پارامتری مربوط به تنوع جمعیت از قبیل هموزیگوسیتی موردانتظار، درصد آلل‌های چندشکل، شاخص تنوع ژنی و شاخص شانون و تعداد آلل مؤثر استفاده شد. همچنین از نرم‌افزار NTSYS نیز برای رسم درخت‌واره و محاسبه ضریب کوفنتیک استفاده گردید. تجزیه ارتباطی پنج صفت مهم به‌نژادی گردو در جمعیت گردوی مورد مطالعه، با استفاده از نرم‌افزار SPSS با روش رگرسیون گام‌به‌گام انجام شد.

نتایج

میزان تنوع موجود در جمعیت‌های مورد مطالعه

برای بررسی تنوع در باغ‌های مورد مطالعه، ژنوتیپ‌های گردو در هر باغ به‌عنوان یک جمعیت کوچک در نظر گرفته شد و ساختار ژنتیک هر یک از این جمعیت‌های کوچک مورد بررسی قرار گرفت. بررسی ساختار ژنتیک هشت جمعیت کوچک مورد مطالعه در شهرستان بوانات نشان داد که میزان آلل‌های چند شکل (PPL)، تعداد آلل‌های متفاوت به‌ترتیب بین ۸۷/۵۰-۳۶/۸۸ درصد و ۱/۷۷-۰/۸۹ متغیر بود. همچنین میزان تغییرات شاخص تنوع ژنی Nei (He) و شاخص شانون (I) نیز به‌ترتیب بین ۰/۲۶-۰/۱۴ و ۰/۴۰-۰/۲۱ بود. بیشترین میزان درصد آلل‌های چند شکل مربوط به جمعیت FaBaNs بود. البته پس از آن، جمعیت FaBaHr با ۸۳/۷۵ درصد دارای بیشترین میزان درصد آلل‌های چندشکل بود. کمترین میزان درصد آلل‌های چند شکل در جمعیت FaBaKr (۳۶/۸۸ درصد) مشاهده گردید. پس از آن، کمترین میزان این صفت در جمعیت‌های FaBaHm (۵۱/۲۵ درصد) و FaBaCh (۵۵/۶۳) درصد مشاهده گردید (جدول ۴-۴۲).

مقدار شاخص تنوع ژنی Nei بیانگر فاصله متوسط بین آلل‌ها در یک جمعیت است (سلطانلو و همکاران، ۱۳۸۸). بیشترین میزان شاخص تنوع ژنی (۰/۲۶) مربوط به جمعیت FaBaHr و FaBa بود. به همین دلیل می‌توان گفت که این دو جمعیت دارای بالاترین میزان تنوع بودند. پس از این دو جمعیت، بیشترین میزان شاخص تنوع ژنی مربوط به جمعیت‌های

FaBaNs و FaBaSa بود. همچنین بیشترین تعداد آلل‌های مؤثر (۱/۷۷) مربوط به جمعیت FaBaNs بود و پس از آن جمعیت faBaHr (۱/۷۳) دارای بیشترین تعداد آلل مؤثر بود. تعداد آلل مؤثر در جمعیت‌های FaBaSa و FaBa به‌ترتیب ۱/۶۸ و ۱/۵۳ بود. شاخص شانون (I) به‌عنوان یکی دیگر از شاخص‌های تنوع ژنی جمعیت، برای بیانگر میزان چندشکلی در بین ژنوتیپ‌ها استفاده می‌شود (حاج منصور و همکاران، ۱۳۸۹). بررسی شاخص شانون در جمعیت‌های مورد مطالعه نشان داد که بیشترین میزان این شاخص مربوط به جمعیت FaBaHr بود و پس از آن، جمعیت‌های FaBaNs و FaBa بیشترین میزان شاخص شانون را دارا بودند. کمترین میزان این شاخص در جمعیت FaBaKr مشاهده گردید (جدول ۱).

جدول ۱- تنوع ژنتیک برآورد شده (±SE) در جمعیت‌های مختلف گردو در شهرستان بوانات بر اساس شش آغازگر ISSR

جمعیت	PPL	Na	He	I
FaBaCh	۵۵/۶۳	۱/۲۳ ± ۰/۰۷	۰/۱۹ ± ۰/۰۲	۰/۲۹ ± ۰/۰۲
FaBaSa	۸۱/۸۸	۱/۶۸ ± ۰/۰۶	۰/۲۵ ± ۰/۰۱	۰/۳۸ ± ۰/۰۲
FaBaHr	۸۳/۷۵	۱/۷۳ ± ۰/۰۵	۰/۲۶ ± ۰/۰۱	۰/۴۰ ± ۰/۰۲
FaBaNs	۸۷/۵۰	۱/۷۷ ± ۰/۰۵	۰/۲۵ ± ۰/۰۱	۰/۳۹ ± ۰/۰۲
FaBaGm	۶۲/۵۰	۱/۳۴ ± ۰/۰۷	۰/۲۳ ± ۰/۰۲	۰/۳۴ ± ۰/۰۲
FaBaHm	۵۱/۲۵	۱/۱۸ ± ۰/۰۷	۰/۱۸ ± ۰/۰۲	۰/۲۶ ± ۰/۰۲
FaBaKr	۳۶/۸۸	۰/۸۹ ± ۰/۰۷	۰/۱۴ ± ۰/۰۲	۰/۲۱ ± ۰/۰۲
FaBa	۷۴/۳۸	۱/۵۳ ± ۰/۰۷	۰/۲۶ ± ۰/۰۲	۰/۳۹ ± ۰/۰۲
میانگین	۶۶/۷۲	۱/۴۲ ± ۰/۰۲	۰/۲۲ ± ۰/۰۱	۰/۳۳ ± ۰/۰۱

PPL: درصد آلل‌های چندشکل؛ Na: تعداد آلل‌های مؤثر؛ He: شاخص تنوع ژنی Nei؛ I: شاخص شانون

بررسی میزان تنوع درون و بین جمعیت‌ها

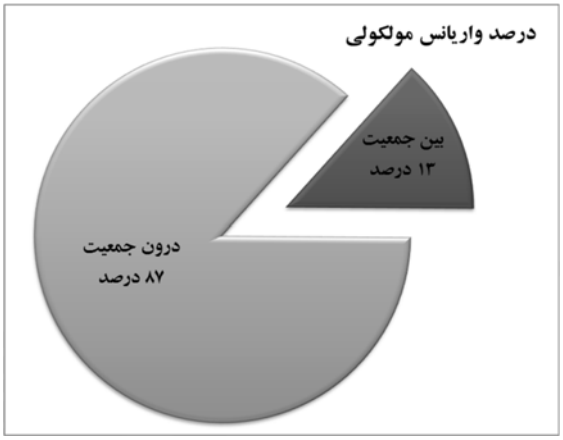
به‌منظور تعیین میزان تنوع ژنتیک درون جمعیت و بین جمعیت‌های مورد مطالعه گردو در شهرستان تجزیه واریانس انجام گرفت که گواه از وجود تنوع ژنتیک معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد درون جمعیت و بین جمعیت‌ها بود (جدول ۲).

میزان تنوع بین جمعیت‌ها ۱۳ درصد و میزان تنوع درون جمعیت‌ها ۸۷ درصد بود. به‌عبارت‌دیگر، میزان تنوع درون جمعیت‌های مورد مطالعه ۶۵ درصد بیشتر از تنوع بین جمعیت‌ها بود (شکل ۱).

جدول ۲- تجزیه واریانس مولکولی در هشت جمعیت گردو در شهرستان بوانات، استان فارس با استفاده از نشانگر ISSR

منبع تنوع	درجه آزادی	میانگین مجموع مربعات	واریانس	درصد تنوع (درصد)
بین جمعیت	۷	۶۸/۰۰**	۴/۳۶	۱۳
درون جمعیت	۶۹	۲۸/۰۹**	۲۸/۰۸	۸۷
کل	۷۶		۳۲/۴۵	۱۰۰

** وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد



شکل۱- توزیع تنوع ژنتیک درون و بین جمعیت گردو با استفاده از نرم‌افزار GenAlexو نشانگرهای ISSR

تخمین فاصله ژنتیک بین جمعیت‌ها

به‌منظور تخمین فاصله ژنتیک بین جمعیت‌های مورد مطالعه در شهرستان بوانات براساس داده‌های حاصل از نشانگر ISSR، ماتریس تشابه Nei با استفاده از نرم‌افزار GenAlex به دست آمد. براساس نتایج به دست آمده، کمترین میزان تشابه بین جمعیت FaBaCh با جمعیت FaBa (۰/۸۶) و FaBaKr (۰/۸۷) بود و جمعیت FaBaCh بیشترین فاصله ژنتیک را با این دو جمعیت داشت (جدول ۳).

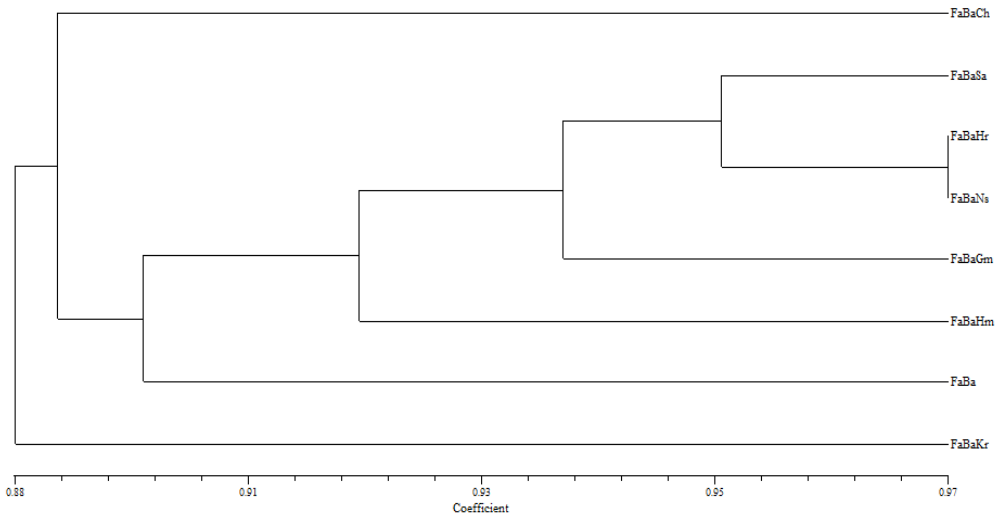
جدول ۳- ماتریس تشابه حاصل از داده‌های نشانگر ISSR با استفاده از نرم‌افزار GenAlex

جمعیت	FaBaCh	FaBaSa	FaBaHr	FaBaNs	FaBaGm	FaBaHm	FaBaKr
FaBaSa	۰/۹۱	۱/۰۰					
FaBaHr	۰/۸۸	۰/۹۵	۱/۰۰				
FaBaNs	۰/۹۱	۰/۹۵	۰/۹۷	۱/۰۰			
FaBaGm	۰/۸۸	۰/۹۲	۰/۹۴	۰/۹۴	۱/۰۰		
FaBaHm	۰/۸۹	۰/۹۱	۰/۹۲	۰/۹۳	۰/۹۱	۱/۰۰	
FaBaKr	۰/۸۷	۰/۸۸	۰/۸۸	۰/۸۹	۰/۸۹	۰/۹۰	۱/۰۰
FaBa	۰/۸۶	۰/۸۸	۰/۹۰	۰/۹۲	۰/۸۸	۰/۹۰	۰/۸۸

به‌طوری کلی جمعیت‌های مورد مطالعه در شهرستان بوانات فاصله ژنتیک کمی با یکدیگر داشتند و ضریب تشابه آن‌ها بالا (۱-۰/۸۶) بود. بیشترین میزان تشابه بین جمعیت‌های FaBaHr و FaBaNs (۰/۹۷) وجود داشت. به‌طوری‌که در تجزیه خوشه‌ای این دو جمعیت با کمترین فاصله ژنتیک در یک خوشه قرار گرفتند (شکل ۲). پس از آن، بیشترین میزان تشابه مربوط به جمعیت FaBaSa با FaBaNs و FaBaHr (۰/۹۵) بود (جدول ۳).

تجزیه خوشه‌ای جمعیت گردوی مورد مطالعه با استفاده از داده‌های حاصل از نشانگر ISSR

بررسی دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای جمعیت مورد مطالعه براساس اطلاعات حاصل از نشانگر ISSR حاکی از یک تفکیک بسیار خوب بین جمعیت‌ها براساس اطلاعات حاصل از نشانگر ISSR بود. به‌طوری‌که جمعیت FaBaKr در یک خوشه مجزا از سایر جمعیت‌ها قرار گرفت. پس از آن، جمعیت FaBaCh که مربوط به منطقه مسه می‌باشد، با یک فاصله ژنتیک زیاد از سایر جمعیت‌ها، در یک خوشه جدا قرار گرفت. همچنین جمعیت FaBa که متشکل از چند ژنوتیپ در مساجد و منازل مختلف بود، نیز در یک خوشه قرار گرفت. جمعیت‌های FaBaSa، FaBaHr، FaBaNs و FaBaGm با کمترین فاصله ژنتیک از یکدیگر در یک خوشه قرار گرفتند و جمعیت FaBaHm با یک فاصله ژنتیک بیشتر از این جمعیت‌ها قرار داشت (شکل ۲).

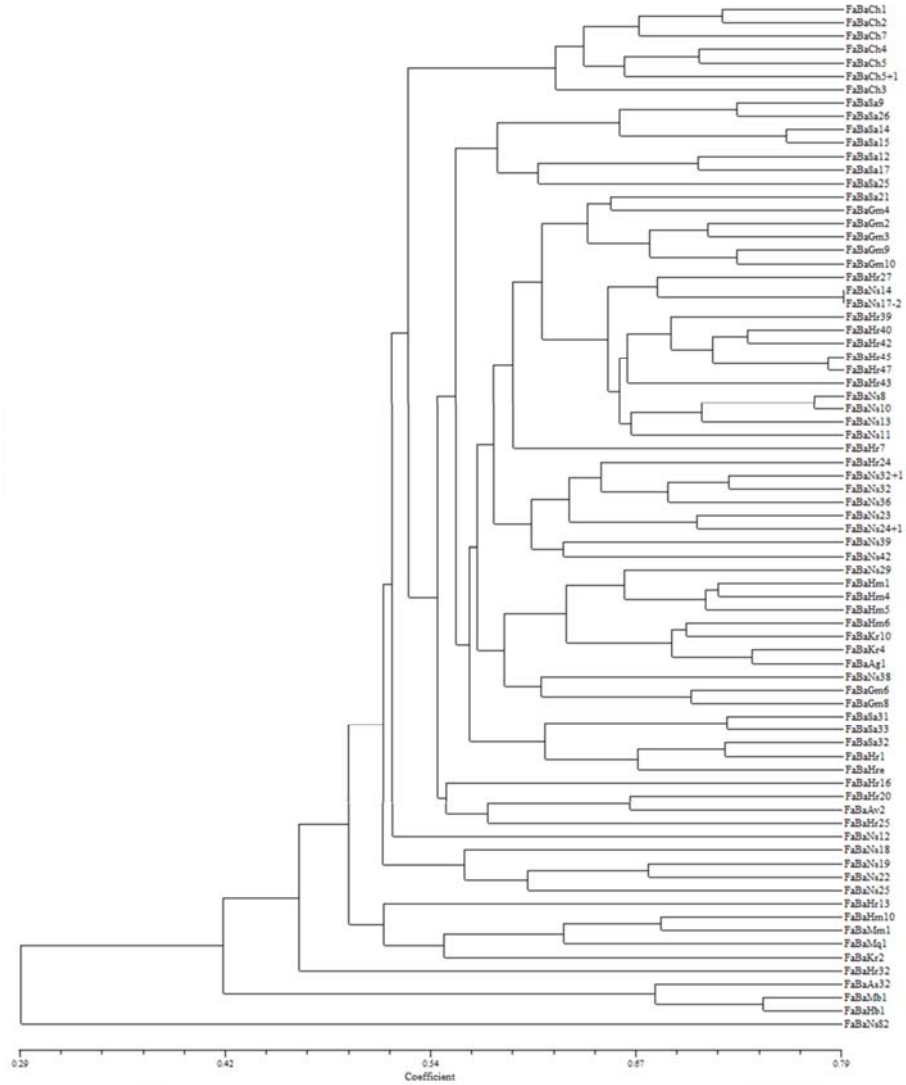


شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌های گردو در شهرستان بوانات براساس اطلاعات حاصل از نشانگر ISSR

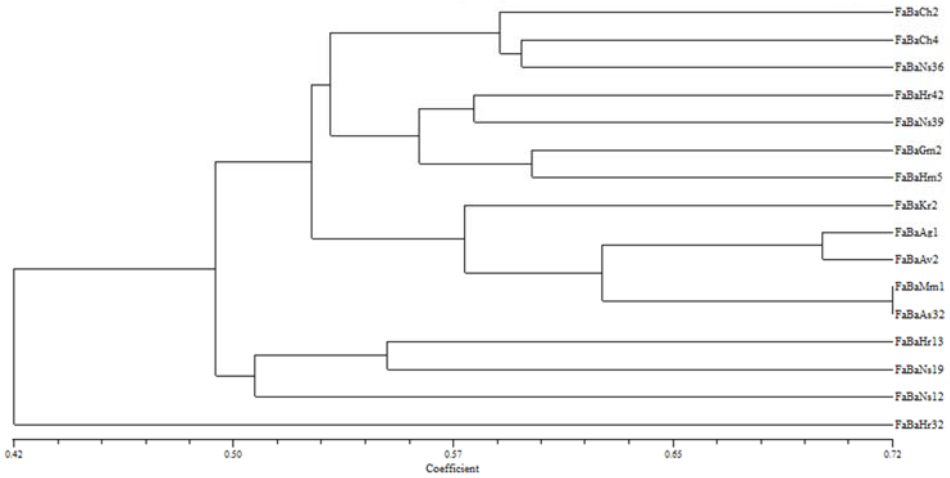
بررسی دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در جمعیت گردوی شهرستان بوانات نشان داد که ژنوتیپ FaBaNsS2 خود به‌تنهایی در یک خوشه مجزا قرار گرفت و بیشترین فاصله ژنتیک را با سایر ژنوتیپ‌های مورد مطالعه نشان داد. همچنین ژنوتیپ‌های FaBaMb1، FaHb1 و FaBaAs32 که مربوط به منطقه دوراه بودند، در یک خوشه قرار گرفتند. نکته مهم در دندروگرام تجزیه خوشه‌ای افراد، قرارگیری عمده ژنوتیپ‌های یک باغ در یک خوشه بود. این موضوع به‌ویژه در مورد ژنوتیپ‌های FaBaCh، FaBaHm، FaBaGm و FaBaKr صادق بود. به‌طوری‌که تمام ژنوتیپ‌های در جمعیت FaBaCh در یک خوشه با کمترین فاصله ژنتیک از یکدیگر قرار گرفت. ژنوتیپ‌های موجود در جمعیت FaBaHm و FaBaGm نیز هر یک در یک خوشه قرار گرفتند (شکل ۳).

تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های برتر گردو در شهرستان بوانات با استفاده از داده‌های حاصل از نشانگر ISSR

علاوه بر آنالیزهای افراد و جمعیت، از داده‌های مولکولی به‌منظور خوشه‌بندی ۱۶ ژنوتیپ برتر مورد مطالعه در شهرستان بوانات استفاده گردید. همان‌طور که دندروگرام به دست آمده نشان می‌دهد (شکل ۳)، ژنوتیپ FaBaHr32 خود به‌تنهایی در یک خوشه مجزا قرار گرفت که احتمالاً علت این امر عدم تکثیر DNA این ژنوتیپ توسط آغازگر P18 می‌باشد. ژنوتیپ‌های FaBaCh2 و faBaCh4 که مربوط به یک منطقه و یک باغ بودند، همراه با ژنوتیپ FaBaNs36 در یک خوشه قرار گرفتند. ژنوتیپ FaBaNs12 که دارای میوه‌های بسیار درشت با وزن میوه و مغز بالا بود، خود به‌تنهایی در یک خوشه قرار گرفت و کمترین فاصله ژنتیک را با ژنوتیپ‌های FaBaNs19 و FaBaHr13 نشان داد. براساس نتایج به دست آمده، دو ژنوتیپ FaBaAg1 و FaBaAv2 که دیربرگده‌ترین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در شهرستان بوانات بودند، در کمترین فاصله ژنتیک از یکدیگر قرار گرفتند و با ژنوتیپ‌های FaBaKr2، FaBaMm1 و FaBaAs32 در یک خوشه قرار گرفتند (شکل ۴).



شکل ۳- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌های گردو در شهرستان بوانات براساس اطلاعات حاصل از نشانگر ISSR



شکل ۴- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های برتر گردو در شهرستان بوانات براساس اطلاعات حاصل از نشانگرهای مولکولی ISSR

بحث

همان‌طور که گفته شد، به‌منظور بررسی میزان تنوع در هر یک از باغ‌های مورد مطالعه در شهرستان بوانات، هر باغ به‌عنوان یک جمعیت در نظر گرفته شد. بررسی میزان تنوع این جمعیت‌ها نشان داد که میانگین آلل‌های چند شکل و تعداد آلل‌های متفاوت به‌ترتیب ۶۶/۷۲ درصد و ۱/۴۲ بود. همچنین میزان تغییرات شاخص تنوع ژنی Nei (He) و شاخص شانون (I) نیز به‌ترتیب بین ۰/۲۶-۰/۱۴ و ۰/۴۰-۰/۲۱ بود. به‌طورکلی شاخص‌های مذکور بیانگر میزان تنوع در جمعیت‌های مورد مطالعه می‌باشند و به‌عبارتی از شاخص‌های تنوع ژنی جمعیت برای بیان چند شکلی می‌باشند (حاج‌منصور و همکاران، ۱۳۸۹؛ سلطانلو و همکاران، ۱۳۸۸) که بالا بودن این شاخص‌ها در مطالعات ما حاکی از وجود تنوع ژنتیک بالا می‌باشد. با توجه به بالا بودن میزان این شاخص‌های در جمعیت‌های FaBaHr، FaBaNs و FaBaSa می‌توان گفت این جمعیت‌ها دارای بالاترین میزان تنوع بودند. مطالعات صورت گرفته روی جمعیت گردو در کوه‌های شمال چین نیز حاکی این بود که میزان شاخص شانون (I) و شاخص تنوع ژنی Nei به‌ترتیب بین ۰/۴۰-۰/۱۹ و ۰/۲۶-۰/۱۳ متغیر بود (Ji *et al.*, 2014).

نشانگر ISSR به‌طور موفقیت‌آمیزی برای تخمین میزان تنوع ژنتیک در سطوح بین و درون جمعیت‌ها، در دامنه وسیعی از گونه‌های گیاهی مورد استفاده قرار گرفته است (Reddy *et al.*, 2002). بررسی تنوع بین و درون جمعیت‌های مورد مطالعه در شهرستان بوانات حاکی از این بود که تنوع درون جمعیت‌ها (۸۷ درصد) به‌مراتب بیشتر از تنوع ژنتیک بین جمعیت‌ها (۱۳ درصد) بود. نتایج مشابهی توسط وحدتی و همکاران (۲۰۱۵) روی جمعیت گردو در استان کرمان گزارش گردید (Vahdati *et al.*, 2015). کریستوپولس و همکاران (۲۰۱۰) میزان تشابه ژنتیک در جمعیت گردو در یونان بین ۰/۹۳-۰/۱۳ با میانگین ۰/۴۸ گزارش کردند (Christopoulos *et al.*, 2010). بررسی نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که دامنه تغییرات ضریب تشابه بین ۰/۹۷-۰/۸۶ متغیر بود. همچنین بیشترین میزان تشابه Nei در بین جمعیت‌های مورد مطالعه مربوط به جمعیت‌های FaBaHr و FaBaNs بود.

بررسی تنوع در باغ‌های مورد مطالعه، نشان داد که جمعیت گردوی FaBaKr دارای کمترین میزان تنوع درون جمعیت بود و پس از آن جمعیت‌های FaBaHm و FaBaCh دارای کمترین میزان تنوع بودند. بررسی درختان موجود در این باغ‌ها نشان می‌دهد که هر یک از این باغ‌ها داری یک ژنوتیپ برتر و مسن (FaBaKr2، FaBaCh2 و FaBaHm5) هستند که در نه‌تنها خصوصیات آن برای باغدار، بلکه برای ساکنان این مناطق مشخص می‌باشد؛ به همین دلیل با توجه به نتایج حاصل از ارزیابی مولکولی و مورفولوژیک می‌توان گفت که درختان موجود در این باغ‌ها در نتیجه کشت بذر این ژنوتیپ‌ها برتر و مسن توسعه پیدا کرده‌اند.

تست مانتل بین ماتریس تشابه داده‌های حاصل ارزیابی مولکولی ژنوتیپ‌های برتر گردو با ماتریس تشابه حاصل از داده‌های مورفولوژیک، بیوشیمیایی و سیتوژنتیک انجام گرفت که نتایج حاصل از این تست نشان داد که هر چند تا حدودی بین داده‌های مورفولوژیک با ماتریس تشابه مولکولی همبستگی وجود داشت ولی از نظر آماری بین هیچ یک از ماتریس‌های تشابه ارتباط معنی‌داری مشاهده نگردید. نشانگر ISSR نواحی بین ریزماهواره‌ها را تکثیر می‌کند و گزارش شده است در بسیاری از موارد، ممکن است نواحی تکثیری توسط این نشانگر جزء نواحی کد شونده نمی‌باشد و به همین دلیل منطقی می‌باشد که گاهاً همبستگی بین این نشانگرها با صفات مورفولوژیک و بیوشیمیایی وجود نداشته باشد (Reddy *et al.*, 2002).

براساس نتایج به دست آمده، داده‌های حاصل از شش آغازگر نشانگر ISSR توانست تفکیک خوبی بین ژنوتیپ‌های برتر گردو در شهرستان بوانات انجام دهد. به‌عنوان مثال دو ژنوتیپ دیربرگده FaBaAv2 و FaBaAg1 با کمترین فاصله ژنتیک در یک خوشه قرار گرفتند. کریستوپولس و همکاران (Christopoulos *et al.*, 2010) در ارزیابی جمعیت گردوی کشور یونان و جی و همکاران (Ji *et al.*, 2014) در ارزیابی جمعیت گردوی شمال چین با استفاده از نشانگر ISSR گزارش کردند که این نشانگر توانست تفکیک خوبی بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه انجام داد که با نتایج حاصل از آزمایش‌های مطابقت داشت. کریمی و همکاران (Karimi *et al.*, 2014)، ابراهیمی و همکاران (Ebrahimi *et al.*, 2011) و وحدتی و همکاران (Vahdati *et al.*, 2015) گزارش کردند که تفکیک خوبی بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در ایران با استفاده از نشانگر SSR به دست آمد.

منابع

Arzani, K., Mansouri Ardakan, H., Vezvaei, A. and Roozban, M.R. 2008. Morphological variation among Persian walnut (*Juglans regia*) genotypes from central Iran. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science; 36:159–168.

Christopoulosa, M.V., Rouskasb, D., Tsantili, E. and Bebelic, 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: 584–592.

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; 130:146–151.

Fatahi, R., Ebrahimi, A. and Zamani, Z. 2010. Characterization of some Iranians and foreign walnut genotypes using morphological traits and RAPDs markers. Horticultural Environment Biotechnology; 51 (1): 51–60.

Fjellstrom, R.G. and Parfitt, D.E. 1994a. RFLP inheritance and linkage in walnut. Theoretical and Applied Genetics; 89(6): 665-670.

Foroni, B., Malvoiti, M.E., Taurchini, D. and Finesch, S., Beritognolo, I., Maccaglia, E., and Cannata, F. 2001. Isozyme and organellar DNA analysis of genetic diversity in natural European and Asiatic walnut (*Juglans regia* L.) populations. Acta Horticulturae; 544.

Govindaraj, M., Vetriventhan, M. and Srinivasan, M. 2015. Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: an overview of its analytical perspectives. Hindawi Publishing Corporation, Genetics Research International: 1-14.

Karimi, R., Ershadi, A., Ehtesham Nia, A., Sharifani, M., Rasouli, M., Ebrahimi, A. and Vahdati, K. 2014. Morphological and Molecular Evaluation of Persian Walnut Populations in Northern and Western Regions of Iran. Journal of Nuts; 5(2): 21-31.

Mao, X. and Hua, Y. 2012. Composition, Structure and Functional Properties of Protein Concentrates and Isolates Produced from Walnut (*Juglans regia* L.). International Journal of Molecular Science; 13: 1561-1581.

Pollegioni, P., Bartoli, S., Cannata, F. and Malvolti, M.E., 2003. Genetic differentiation of four Italian walnut (*Juglans regia* L.) varieties by inter simple sequence repeat (ISSR). Journal of Genetics and Breeding; 57, 231–240.

Reddy, M.P., Sarla, N. and Siddiq, E.A. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euphytica; 128: 9–17.

Vahdati,K., Mohseni Pourtaklu, S., Karimi, R., Barzehkar, R., Amiri, R., Mozaffari, M. and Woeste, K. 2015. Genetic diversity and gene flow of some Persian walnut populations in southeast of Iran revealed by SSR markers. Plant Systematics and Evolution; 301: 691–699.

Yang, L.X. 2005. Effect of water extracts of larch on growth of Manchurian walnut seedlings. Journal of Forest Research; 16: 285–288.

Zhang, L., Lanying, Z. and Qianwen, X. 2007. Identification of RAPD markers linked to thickness gene of shuck in walnut. Advances in Biological Research; 1 (5-6): 137-140.

Molecular Evaluation of Some Walnut (*Juglans regia* L.) Superior Genotypes in Fars Province using ISSR Primer

Saatat Sarikhani Khorrami, Kazem Arzani*, Abdolali Shojaeen
Department of Horticulture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
**Corresponding Author:*

Abstract

Considering that Iran is the center for the emergence and diversity of Iranian walnut (*Juglans regia* L.), the present study is carried out following the walnut population evaluation project in Fars province during 1388-1391, and with the aim of evaluating of germplasm in the important regions of Fars province (Bavanat, Eghlid and Sepidan) during 1391-1394. In this regard, 81 selected genotypes from 412 walnut genotypes in Bavanat city and 48 genotypes in Eğlid city were evaluated for morphological, biochemical, cytologic and molecular evaluation. In the molecular evaluation, the walnuts population in Bavanat (containing 81 selected genotypes of seed) was arranged using six ISSR primers for fingerprinting and molecular evaluation. Based on the results, the average polymorphism of these six initiators in the population was 72.72%. The number of polymorphic bands in the primers was between 12 (P28) to 37 (P25 and P27). The content of the polymorphic information of the primers as well as the indicator of the variables, varied between 0.29- 0.38 and 2.24-21.12 respectively. The mean of changes in the Nei genetic variation index and Shannon index was 0.22 and 0.33 respectively. Based on the results, the data from the six ISSR marker initiators were able to distinguish between superior walnut genotypes in Bavanat.

***Keywords*: Germplasm, Genotype, ISSR Indicator, Polymorphism, Gene Diversity.**