

شناسایی نشانگرهای آگاهی بخش با استفاده از صفات مورفولوژی و نشانگرهای مولکولی (RAPD و SSRs) در جمعیت گردوهای ایرانی

عزیز ابراهیمی (۱)، محمدرضا فتاحی مقدم (۲)، ذبیح الله زمانی (۳)

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد پردیس کشاورزی دانشگاه تهران، ۲- استادیار پردیس کشاورزی دانشگاه تهران، ۳- دانشیار پردیس کشاورزی دانشگاه تهران

کشور ایران از نظر سطح زیر کشت و میزان تولید گردو مقام سوم را در بین کشورهای تولیدکننده گردو داراست. به همین منظور جهت بررسی تنوع ژنتیکی و شناسایی برخی از ژنوتیپ های بذری برتر آزمایشاتی به شرح زیر انجام شد. از نشانگرهای مورفولوژی و مولکولی (RAPD و SSRs) برای تعیین سطح تنوع و خویشاوندی ۳۵ ژنوتیپ گردو استفاده گردید. ۱۴ آغازگر RAPD در مجموع ۱۸۰ نوار در کل ژنوتیپ ها تکثیر کردند که از بین آنها ۱۷۴ نوار که چندشکل بودند، بدست آمد. محدوده تشابه ژنتیکی ژنوتیپ ها بین ۰/۳۷ تا ۰/۸۹ بود. از ۹ مکان ریزماهوره انتخاب شده از بخش های مختلف ژنوم گردو استفاده گردید. شباهت ژنتیکی محاسبه شده براساس اطلاعات نشانگرهای ریز ماهوره از ۰/۳۳ (بین دو ژنوتیپ از ریز و شهر کرد) تا ۰/۸۷ (بین دو ژنوتیپ) متفاوت بود. نتایج حاصله تا حدودی ارتباط نسبی بین تنوع ژنتیکی و منطقه جغرافیایی را نشان داد. بطوریکه ژرم پلاسما های مربوط به فراس و شهرکرد در گروه های متفاوت جای گرفتند. در پایان از ۱۷۴ باند بدست آمده از مارکر RAPD و ۳۹ باند در مارکر SSRs با ۲۲ صفت مورفولوژی مورد ارزیابی قرار گرفت. نشانگرهای آگاهی بخش از لحاظ رگرسیون خطی و رگرسیون چندگانه رابطه معنی داری داشتند که این نشانگرهای آگاهی بخش در اصلاح گیاهان مفید می باشد.

واژه های کلیدی: نشانگرهای آگاهی بخش، گردو، تنوع ژنتیکی، مورفولوژی، RAPD و SSR

مقدمه:

تنوع ژنتیکی از ملزومات و اساس اصلاح گیاهان است که از تکامل طبیعی نشات گرفته و مهمترین جزء در پایداری نظام های بیولوژیکی است و سازگاری دراز مدت و بقای جمعیت های گیاهی را تضمین می کند. افزایش جمعیت انسانی، عامل اصلی استفاده بی رویه از منابع طبیعی در جهت افزایش تولیدات کشاورزی می باشد. در بسیاری از موارد، این افزایش تولیدات با تخریب منابع زیستی و فرسایش شدید ذخایر توارثی همراه بوده است. حفاظت و استفاده از منابع ژنتیکی گیاهی برای بقاء و بهبود تولیدات گیاهی ضروری می باشد و به عنوان نیازی اساسی، در توسعه پایدار و کاهش فقر محسوب می شود. پیشرفت در زمینه تکنولوژی نشانگرهای DNA، اصلاح کنندگان و ژنتیکدان های گیاهی بسیاری از مشکلات موجود در زمینه طبقه بندی و حفاظت ژرم پلاسما گیاهی کمک کرده است.

نیسس و همکاران (۱۹۹۸) مارکر RAPD را روی ۱۹ ژنوتیپ گردو در دانشگاه کالیفرنیا بررسی کردند. آنها با استفاده از این مارکر توانستند اختلاف بین ژنوتیپ های گردو و حتی ارتباط نزدیک بین کولتیوارها را ارزیابی کنند.

اولین بار توسط ووست و همکاران (۲۰۰۲) تعدادی از مکانهای SSR ژنوم گردوی سیاه را مطالعه جدا سازی و معرفی نمودند. فرونی و همکاران (۲۰۰۵) با استفاده از نشانگرهای ریز ماهوره، میزان تنوع ژنتیکی گردوهای موجود در سورنتوی ایتالیا را مورد بررسی قرار دادند. جرال و همکاران (۲۰۰۵) از نشانگر ریز ماهوره به منظور شناسایی ارقام و

شجره آنها، تعیین میزان تنوع ژنتیکی آنها و تسهیل مدیریت کلکسیون ارقام و کنترل تجارت مواد گیاهی استفاده کردند (جرالد و همکاران، ۲۰۰۵).

هم اکنون آزمایشگاه های زیادی در کشورهای در حال توسعه و در ایران نیز برای این منظور احداث شده اند. گیاهان مختلفی (انار، خرمالو، آلبالو، پسته، سیب و مرکبات...) تاکنون مورد ارزیابی ملکولی قرار گرفته اند که گردو با توجه به میزان تولید آن در سطح جهان و با توجه به اینکه ایران از نظر میزان تولید در سطح جهان مقام سوم را داراست، از جایگاه ویژه و ضروری برخوردار است.

مواد و روش ها:

در این پژوهش طی سالهای ۱۳۸۳-۱۳۸۴ بررسی های اولیه به منظور انتخاب ژنوتیپ های برتر در ۶۰۸ ژنوتیپ بذری در روستای باشهر، ۴۲ ژنوتیپ در روستای سیرک از توابع شهرستان نیریز فارس و ۳۱۲ ژنوتیپ بذری در شهرستان بوانات فارس آغاز شد. پس از بررسی کامل صفات فنولوژیک و مورفولوژیک ۷ ژنوتیپ از روستای باشهر، ۳ ژنوتیپ از روستای سیرک و ۶ ژنوتیپ از شهرستان بوانات به عنوان ژنوتیپ های برتر انتخاب شدند. در سال ۱۳۸۵ خشک میوه ژنوتیپ های معرفی شده از فارس همراه با ۱۵ ژنوتیپ برتر گردو انتخاب شده از مراکز تحقیقاتی مختلف چهار محال بختیاری، موسسه نهال و بذر کرج، مرکز تحقیقات باغبانی دانشگاه تهران و به همراه ۴ رقم خارجی در شهریور ماه جمع آوری و در آزمایشگاه گروه علوم باغبانی دانشگاه تهران مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول ۱). از هر ژنوتیپ ۱۰ تا ۱۵ عدد دانه به صورت تصادفی انتخاب و ۲۲ صفت کمی و کیفی (جدول ۲) بر اساس دیسکریپتور مورد بررسی قرار گرفتند در پایان ۳۵ ژنوتیپ با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD و SSRs ارزیابی و نشانگرهای آگاهی بخش شناسایی شدند.

نتایج و بحث:

نتایج حاصل از نشانگر های مورفولوژیک و مولکولی نشان دهنده تنوع بالا در بین ژنوتیپ هاست. ژنوتیپ NFE3 که دورترین ژنوتیپ در مجموعه است و ژنوتیپ برتر شناخته شده از نیریز می باشد در فاصله ۰/۳۷ تشابه از سایر ژنوتیپ ها قرار گرفت. ژنوتیپ های NFE1 و NFE5 نیز با ویژگی های نسبی متفاوت در گروهی مستقل با سایر ژنوتیپ ها قرار گرفتند. ژنوتیپ JAHANI یکی از ژنوتیپ های موجود در کرج و بعد از آن CCGM1 از شهرکرد نیز در گروه های هم شکل قرار گرفتند. در مجموع قرار گیری ۵ ژنوتیپ برتر از سه جایگاه مختلف کشور در فاصله ژنتیکی نسبتاً دور از هم در کلاستر جای این امید را دارد که تلاقی این ژنوتیپ های برتر با توجه به اینکه منشاء ژنتیکی متفاوتی دارند می تواند در آینده نتایج ارزنده ای را داشته باشد. بقیه ژنوتیپ ها با فاصله ژنتیکی کمتری گروه بندی شدند که ژنوتیپ های خارجی هم در داخل آنها قرار گرفتند که نشان می دهد از لحاظ منشاء ژنتیکی شباهت های بالایی با هم دارند. بر این اساس توصیه می گردد در برنامه های اصلاحی از ژنوتیپ های برتر هر گردو که با توجه به نتایج بدست آمده از ارزیابی مورفولوژیکی نیز دارای برتری های نسبی می باشند جهت ایجاد جمعیت های در حال تفرق استفاده گردد. مطمئناً اگر اندازه جمعیتها مناسب باشند می تواند به تولید ژنوتیپ های برتر از والدین (که خود نیز نسبتاً مطلوب محسوب می شوند) امیدوار بود.

در پایان از ۱۷۴ باند بدست آمده از مارکر RAPD و ۳۹ باند در مارکر SSRs با ۲۲ صفت مورفولوژی مورد ارزیابی قرار گرفت. نشانگرهای آگاهی بخش از لحاظ رگرسیون خطی و رگرسیون چند گانه رابطه معنی داری داشتند که این نشانگرهای آگاهی بخش در اصلاح گیاهان مفید می باشد.

منابع:

- Woeste, K., Burns, R., Rhodes, O and Michler, C., (2002). Thirty polymorphic nuclear microsatellite loci from black walnut. *J. Hered.* 93: 58-60
- Foroni, I., Rao, R., Woeste, K., and M., Gattitelli, (2005). Characterisation of *Juglans regia* L. with SSR markers and evaluation of genetic relationships among cultivars and the 'Sorrento' landrace. *J. Hort. Sci. Biotechnol.* 80: 49-53
- Nicese, F.P., Hormasa, J.I and McGranaham, G.H. (1998). Molecular characterization and genetic relatedness among walnut (*Juglans regia* L.) genotypes based on RAPD markers. *Euphytica*, 101:199-206.
- Gerald, S. D., Woeste, K., Mallikarjuna, K., Aradhya, K., Koehmstedt, A. and Simon, C.. (2005). Characterization of 14 microsatellite markers for genetic analysis and cultivar identification of walnut. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 130:348-354.

Association analysis and genetic diversity of morphologically important traits using SSRs, RAPD marker in Persian walnut population

Abstract

Iran is the third country in the world in point of walnut cultivation and production areas. the following experiments were conducted to study the genetic diversity of some walnut genotypes from different internal and foreign areas. In this experiment, RAPD and SSRs marker was applied to determine genetic diversity and phylogenetic relationships of 35 walnut genotypes. From 14 RAPD primers that were used for all genotype, 180 bands were amplified among them 174 were polymorphic. The least and highest similarity coefficient were 0.37 and 0.89% respectively. In SSRs marker with 9 selected SSRs to provide uniform a maximum coverage. Genetic similarities calculated from SSRs for whole genomes data range from 33% (two genotypes from Neyrize and Shahre Kord) to 87% (two genotype from Shahre Kord). Their results are indicated and nearly relationship between genetic diversity and geographical regions, in which Fars and Shahre Kord germplasm placed in different group. A total of 9 SSR and 14 RAPD markers gave significant association with at least one of 22 traits, with linear or with multiple regression, different markers showed association using both approaches (linear and multiple regressions), and therefore may prove useful for marker-assisted breeding after necessary validation.

Key word; informative marker, walnut, genetic diversity, morphology, RAPD and SSRs