Plant Prod., 42(2) (2019) 279-294 ISSN (P): 2538-543x
DOI: 10.22055/ppd.2019.24861.1569 ISSN (E): 2588-5979

# The Screening of Persian Walnut Genotypes Based on the Quantitative and Qualitative Characters and the Investigation of Genetic Diversity among Promising Samples Using ISSR Marker

Nasim Zare Rashnodi[1], Javad Erfani Moghadam[2]* and Arash Fazeli[3]

1- M.Sc. Graduate of Horticultural Science, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran
2- ***Corresponding Author:** Associate Professors, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran (J.Erfani@Ilam.Ac.Ir)
3- Associate Professors, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran

Received: 30 January, 2018 Accepted: 26 September, 2018

## Abstract

### Background and Objectives

Persian walnut (*Juglans regia* L.) belongs to the family of Juglandaceae and is one of the most important nut crops in Iran. Until recently, all of the fruitful walnut trees grown in Iran are seedling originated and thus, they exhibit a significant variation, especially in nut and kernel characteristics. Therefore, the identification of the promising genotypes based on the phenotypic traits is essential in breeding programs. The aims of the current work were to evaluate 119 Persian walnut trees in different western regions of Iran based on nut and kernel characteristics, and then to detect genetic relationships among desirable genotype using ISSR marker.

### Materials and Methods

In this research, 119 Persian walnut genotypes collected from different parts of the west of Iran were evaluated based on nut characteristics. Based on the primary evaluation, 30 superior genotypes that had desirable characters in nut and kernel properties, such as nut and kernel weight, kernel percentage, kernel removal from the nut, kernel plumpness, and kernel filled were selected and then, the genetic variation among them was evaluated using 10 ISSR primers.

### Results

The preliminary evaluation of 119 walnut genotypes illustrated that most of the evaluated genotypes showed high variability for the measured traits related to nut and kernel. Among the nut and kernel characters, the kernel shriveling showed the highest coefficient of variation (114.02%), while the lowest CV was related to the nut diameter (8.68%). Among walnut genotypes, both nut and kernel weight varied from 7-19.8 g and 2.8-9.20 g, respectively. The genetic relationship among 30 promising genotypes with ten ISSR primers indicated a considerable level of variability. All of the ISSR primers were polymorphic and produced a total of 79 alleles among the 30 genotypes, which 77 alleles were polymorphic. The size of the amplified fragments ranged from 200 bp to 1700 bp. The number of the observed alleles for each locus ranged from 3 (HB10) to 13 (UBC-807), with an average of 7.7 alleles per locus. Polymorphic index content (PIC) was observed to be highest (0.82) in the UBC-807 locus, while

the HB10 locus had the lowest value (0.51) with an average of 0.75 among ISSR locus. The Jaccard's genetic similarity coefficient ranged from 0.31 to 0.85 among the genotypes. The cluster analysis performed based on ISSR data using UPGMA, divided the genotypes into seven major groups.

## Discussion

Finally, the results of this study showed that there was high variability among walnut genotypes in terms of quantitative and qualitative characteristics of the nut and the kernel. In this study, the average nut and kernel weight among walnut genotypes varied. The difference in nut and kernel properties of germplasm under the same geographical conditions may be the result of genotypic factors. The results indicated that some genotypes (16, 4, 24, 26, 11, and 17) had desirable traits in the nut and kernel. Moreover, the Persian walnut is of most important horticultural crops grown in Iran. Therefore, these genotypes can be propagated according to the vegetative methods and used for commercial cultivation or utilized for traditional breeding and advanced biotechnology studies to achieve superior progenies.

**Keywords:** Allele, Cluster analysis, Fruit diameter, Kernel percentage, Polymorphism

# به‌گزینی ژنوتیپ‌های گردوی ایرانی برای برخی از صفات کمّی و کیفی و بررسی تنوع ژنتیکی نمونه‌های امیدبخش بر اساس نشانگر ISSR

نسیم زارع رشنودی[۱]، جواد عرفانی مقدم[۲]* و آرش فاضلی[۳]

۱-دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم باغبانی، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

۲-***نویسنده مسئول:** دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران (j.erfani@ilam.ac.ir)

۳- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۱/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۷/۰۴

## چکیده

**در این پژوهش، ۱۱۹ ژنوتیپ گردوی ایرانی در سال ۱۳۹۳ و ۱۳۹٤ از مناطق مختلف غرب کشور جمع‌آوری‌شده بودند، بر اساس صفات مربوط به خشک میوه در آزمایشگاه گروه علوم باغبانی دانشگاه ایلام مورد ارزیابی قرار گرفتند. ارزیابی اولیه ژنوتیپ‌های گردو نشان داد که تنوع بالایی در صفات اندازه‌گیری‌شده مرتبط با خشک میوه و مغز وجود دارد. در بین صفات خشک میوه، چروکیدگی مغز دارای بیشترین مقدار ضریب تنوع (۱۱٤/۰۲ درصد) بود، درحالی‌که کمترین ضریب تنوع مربوط به قطر خشک میوه (۸/٦۸ درصد) بود. در بین ژنوتیپ‌های گردو، وزن خشک میوه و مغز به‌ترتیب از ۷ تا ۱۹/۸ گرم و ۲/۸ تا ۹/۲۰ گرم متغیر بود. بر اساس ارزیابی اولیه، از بین ۱۱۹ ژنوتیپ مورد بررسی، ۳۰ ژنوتیپ برتر که دارای صفات مطلوبی در ویژگی‌های خشک میوه و مغز مانند وزن خشک میوه و مغز، درصد مغز، سهولت جدایی مغز از خشک میوه، گوشتی و توپر بودن مغز بودند، انتخاب شدند و سپس تنوع ژنتیکی بین آن‌ها با استفاده از ۱۰ آغازگر ISSR بررسی و تنوع قابل توجهی مشاهده گردید. آغازگرهای ISSR در مجموع ۷۹ آلل میان ژنوتیپ‌ها تولید کردند که ۷۷ آلل دارای چندشکلی بودند. اندازه قطعات تکثیرشده در محدوه ۲۰۰ تا ۱۷۰۰ جفت‌باز قرار داشت. تعداد آلل مشاهده‌شده برای هر مکان در دامنه سه (HB10) تا ۱۳ آلل (UBC-807) با میانگین ۷/۷۷ آلل برای هر مکان به‌دست آمد. شاخص محتوی چندشکلی (PIC) برای مکان UBC-807 دارای بیشترین مقدار (۰/۸۲) و برای مکان HB10 دارای کمترین مقدار (۰/۵۱) بود و میانگین آن در همه مکان‌های ISSR برابر با۰/۷۵ بود. دامنه تشابه ژنتیکی میان ژنوتیپ‌ها از ۰/۳۱ تا ۰/۸۵ متغیر بود. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از داده‌های ISSR به روش UPGMA، ژنوتیپ‌ها را در فاصله ژنتیکی ۰/۵۸، به هفت گروه اصلی تقسیم کرد. نتایج کلی این تحقیق نشان داد برخی از این ژنوتیپ‌ها (۱٦، ٤، ۲٤، ۲٦، ۱۱ و ۱۷) دارای صفات مطلوبی در خشک میوه و مغز هستند که می‌توانند از طریق روش‌های رویشی تکثیر و به صورت تجاری کشت شوند و یا در اصلاح سنتی گردو و مطالعات پیشرفته بیوتکنولوژی برای دستیابی به نتاج بهتر مورد استفاده قرار گیرند.**

**کلیدواژه‌ها: آلل، تجزیه خوشه‌ای، چندشکلی، درصد مغز، قطر میوه**

## مقدمه

گردو متعلق به خانواده ژوگلانداسه (Juglandaceae) و دارای هفت جنس و حدود ۶۰ گونه می‌باشد که بیشتر آن‌ها یک پایه و خزان‌دار می‌باشند (Forde, 1975). در بین گونه‌های گردو، گردوی ایرانی (*Juglans regia* L.) از نظر باغبانی توسعه بیشتری پیدا کرده و در سطح

وسیعی کشت می‌شود. گردوی ایرانی یکی از منابع ارزشمند گیاهی جهان و به‌ویژه ایران است و ایران به‌عنوان مرکز تنوع و پیدایش بسیاری از گونه‌های زراعی-باغی به ویژه گونه گردوی ایرانی، صاحب امتیاز خاصی در این زمینه می‌باشد (Forde, 1975). بر اساس آخرین گزارش سازمان خواربار جهانی در سال ۲۰۱۶، چین با ۱۷۸۵۸۷۹ تن بیش‌ترین تولید گردو خشک را به خود اختصاص داده است. بر اساس این گزارش ایالات متحده امریکا و ایران با تولید ۶۰۷۸۱۴ و ۴۰۵۲۸۱ تن گردو خشک به‌عنوان دومین و سومین کشور تولیدکننده این محصول در جهان می‌باشند (FAO, 2016).

از روش‌های مختلفی برای بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین قرابت ژنتیکی بین ارقام و توده‌های گردو و شناسایی ارقام تجاری مطلوب در سراسر جهان استفاده شده است که از آن جمله می‌توان به بررسی شاخص‌های مورفولوژیکی (Ebrahimi *et al*., 2011; Ehteshamnia *et al*., 2009a, 2009b; Ehteshamnia *et al*., 2010; Fatahi *et al*., 2010; Hassani *et al*., 2013; Mahmoodi *et al*., 2014; Orel *et al*., 2003)، ایزوزایم و RFLP (Aly *et al*., 1991)، نشانگرهای RAPD (Fatahi *et al*., 2010)، SSR (Ebrahimi *et al*., 2011; Ehteshamnia *et al*., 2009a) و ISSR (Christopoulos *et al*., 2010; Mahmoodi *et al*., 2012; Potter *et al*., 2002) اشاره کرد. ارزیابی صفات ریختی نقش مهمی در معرفی ژنوتیپ‌ها و ارقام برتر محصولات میوه دارند (Asadi Gharneh *et al*., 2015). در بین نشانگرهای مولکولی، نشانگر ISSR به دلیل دارا بودن ویژگی‌هایی مانند سریع و ارزان بودن و قابلیت تکثیر بالا می‌تواند اطلاعات با ارزشی از تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های گیاهی فراهم کند (George *et al*., 2006). توالی‌های بین ریزماهواره، نشانگرهای مولکولی نیمه تصادفی هستند که نسبت به نشانگر RAPD کارآمدتر می‌باشند (Sicard *et al*., 2005). نشانگر ISSR به طراحی آغازگر نیاز ندارد و میزان چندشکلی بیشتر و آشکارسازی راحت‌تری نسبت به دیگر نشانگرهای مولکولی دارد (Terzopoulos and Bebeli, 2008). این نشانگرها در مطالعات تنوع ژنتیکی، خویشاوندی ژنتیکی، نشان‌دار کردن ژنی، نقشه‌یابی ژنومی و زیست‌شناسی تکاملی به کار می‌روند (Reddy *et al*., 2002). Pollegioni *et al*. (2004) با استفاده از نشانگرهای SSR، ISSR و RAPD ژنوتیپ‌های بذری و هیبریدهای بین گونه‌ای را تفکیک نمودند. از هر دو نشانگر غالب (RAPD و ISSR) به‌ترتیب ۱۸۸ و ۱۶۲ باند و از نشانگر SSR، ۱۱۳ آلل به‌دست آمد. بر اساس تجزیه خوشه‌ای، سه گروه مختلف تشکیل شدند که این سه گروه شامل ۸۱ گونه گردوی سیاه، ۴۹ گونه گردوی ایرانی و ۸ هیبرید بین گونه‌ای بودند. Potter *et al*. (2002) از نشانگر ISSR به منظور بررسی میزان تنوع ژنتیکی ۴۸ نمونه گردو (*J. regia*) در باغ تحقیقاتی Wolfskill کالیفرنیا استفاده کردند. گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای منطبق با شجره شناخته شده نبود که این امر ممکن است به خاطر تعداد پایین نشانگر استفاده‌شده برای تعیین روابط ژنتیکی جمعیت‌های مورد بررسی باشد. تحقیقات وسیعی در زمینه انتخاب ژنوتیپ‌های مرغوب گردو از بین توده‌های بذری انجام شده است و ارقام معروفی نیز در اثر انتخاب و ارزیابی ژنوتیپ‌ها معرفی شده‌اند (Mahmoodi *et al*., 2013).

علی‌رغم اهمیت تجاری گردو، اطلاعات کافی در خصوص اصالت ژنتیکی و نوع رقم کشت‌شده در ایران وجود ندارد که این امر باعث کاهش صادرات گردو در بین کشورهای تولیدکننده این محصول شده است (Mardi *et al*., 2015). با توجه به این که شناسایی ژنوتیپ‌های مطلوب در سال‌های اولیه رشد و قبل از باروری امری بسیار دشوار است بنابراین ممکن است که باغدار سال‌ها وقت و هزینه زیادی را صرف نگهداری از درختانی نماید که دارای صفات مطلوبی نباشند و درنهایت خسارت جبران‌ناپذیری به باغدار وارد گردد. این پژوهش با هدف ارزیابی اولیه تعدادی از ژنوتیپ‌های گردو در غرب کشور بر مبنای خصوصیات خشک میوه و مغز جهت شناسایی و معرفی ژنوتیپ‌های برتر گردو

صورت گرفت و در ادامه، خویشاوندی ژنتیکی میان نمونه‌های مطلوب بر اساس نشانگر ISSR به منظور برآورد فواصل ژنتیکی آن‌ها و استفاده در برنامه‌های اصلاح این محصول ارزشمند بررسی شد.

## مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال ۱۳۹۳ و ۱۳۹۴ انجام شد و ۱۱۹ ژنوتیپ گردوی ایرانی که از مناطق مختلف غرب کشور شامل شهرستان خرم‌آباد، نورآباد، الشتر، کرمانشاه، کرند، هرسین، نهاوند و ملایر جمع‌آوری شده بودند با استفاده از خصوصیات موفولوژیکی مربوط به میوه مورد بررسی قرارگرفتند. در این پژوهش از هر ژنوتیپ ۱۵ عدد میوه در زمان رسیدگی کامل (اواخر مهر ۱۳۹۳) به‌صورت تصادفی برداشت شد و بعد از حذف پوست سبز، به مدت یک‌ماه در دمای اتاق خشک شدند. وزن خشک میوه و مغز آن‌ها توسط ترازوی دیجیتالی (مدل BPSIID، شرکت Sartorius، آلمان) با دقت ۰/۰۱ گرم اندازه‌گیری شد. برخی از صفات کمی مربوط به خشک میوه هر ژنوتیپ شامل ضخامت پوسته سخت، عرض، طول و قطر خشک میوه با استفاده از کولیس دیجیتالی (مدل EGL-111-111، شرکت Guanglu، ژاپن) و صفات کیفی مانند شکل دانه، روزنه انتهایی خشک میوه، گوشتی بودن مغز، سهولت جدا شدن مغز از بخش چوب، چروکیدگی و رنگ مغز در هر ژنوتیپ با استفاده از توصیف‌گر موجود برای این گیاه ارزیابی شدند (IPGRI, 1994). درصد مغز در هر ژنوتیپ بر اساس نسبت وزن مغز به وزن خشک میوه ضربدر صد به‌دست آمد (Khadivi-Khub *et al.*, 2014). تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۸ صورت گرفت. کمینه، بیشینه، میانگین و انحراف معیار هر صفت با استفاده از نرم‌افزار SPSS به‌دست آمد. درصد تنوع فنوتیپی، نسبتی از انحراف معیار هر صفت بر میانگین همان صفت در کل جمعیت می‌باشد که مقدار آن برآورد شد.

بر اساس نتایج اولیه ارزیابی، ۳۰ ژنوتیپ که دارای ویژگی‌های مطلوبی در خشک میوه و مغز بودند انتخاب شدند (جدول ۱) و درنهایت خویشاوندی ژنتیکی آن‌ها با استفاده از ۱۰ آغازگر ISSR بررسی شد. توالی آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق در جدول (۲) ذکر شده است. به منظور استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های انتخابی گردو، در بهار سال ۱۳۹۴ تعدادی برگ کاملاً جوان انتخاب شدند و استخراج DNA ژنومی با روش CTAB تغییریافته در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه باغبانی دانشگاه ایلام صورت گرفت (Doyle and Doyle, 1990). واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) با استفاده از برنامه شیب دمایی شامل یک چرخه دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه به منظور واسرشت‌سازی اولیه DNA الگو، ۴۰ چرخه دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، یک دقیقه دمای اتصال ۵۰ درجه سانتی‌گراد و دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه بود و درنهایت یک چرخه به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای تکثیر نهایی انجام شد. بعد از انجام واکنش به محصول PCR، ۵ میکرولیتر بارگذاری بافر اضافه و درنهایت ۱۲ میکرولیتر محصول PCR در ژل آگاروز ۱/۵ درصد به مدت ۱۲۰ دقیقه با ولتاژ ۹۰ ولت الکتروفورز گردید. رنگ‌آمیزی ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید انجام و باند حاصله به‌صورت صفر و یک کدگذاری شد و با استفاده از برنامه NTSYS-pc و Genalex 6.1 تجزیه گردید (Khadivi-Khub *et al.*, 2014; Peakall and Smouse, 2006).

## نتایج و بحث

### ارزیابی کلی صفات میوه

نتایج ارزیابی اولیه ۱۱۹ ژنوتیپ بر اساس صفات مربوط به خشک میوه و مغز تنوع بالایی را در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه نشان داد. درصد تنوع فنوتیپی صفت مربوط به چروکیدگی مغز با مقدار ۱۱۴/۰۲ درصد برآورد شد و بیانگر این است که اختلاف زیادی بین ژنوتیپ‌ها از لحاظ چروک بودن مغز وجود داشت. علاوه بر آن شکل دانه هم از درصد تنوع بالایی برخوردار بود (جدول ۳).

**جدول ۱- ژنوتیپ‌های انتخابی گردو برای ارزیابی تنوع ژنتیکی با نشانگر ISSR**

**Table 1. The selected walnut genotypes for investigation of genetic diversity by ISSR marker**

| شماره ژنوتیپ Genotype No. | محل جمع‌آوری Collection area | ارتفاع (متر) Altitude (m) | طول جغرافیایی Longitude (E) | عرض جغرافیایی Latitude (N) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | الشتر (Alashtar) | 1621 | 48º26'17" | 33º86'32" |
| 2 | خرم‌آباد (Khoramabad) | 1469 | 50º23'39" | 36º15'11" |
| 3 | هرسین (Harsin) | 1569 | 47º36'81" | 34º16'23" |
| 4 | ملایر (Malayer) | 1737 | 48º16'11" | 34º11'18" |
| 5 | نورآباد (Noorabad) | 1798 | 47º22'11" | 34º38'31" |
| 6 | نورآباد (Noorabad) | 1798 | 47º22'11" | 34º38'31" |
| 7 | کرمانشاه (Kermanshah) | 1352 | 47º40'32" | 34º19'31" |
| 8 | نهاوند (Nahavand) | 1671 | 48º71'46" | 34º89'26" |
| 9 | نورآباد (Noorabad) | 1798 | 47º22'11" | 34º38'31" |
| 10 | الشتر (Alashtar) | 1621 | 48º26'17" | 33º86'32" |
| 11 | الشتر (Alashtar) | 1621 | 48º26'17" | 33º86'32" |
| 12 | نهاوند (Nahavand) | 1671 | 48º71'46" | 34º89'26" |
| 13 | کرمانشاه (Kermanshah) | 1352 | 47º40'32" | 34º19'31" |
| 14 | ملایر (Malayer) | 1737 | 48º16'11" | 34º11'18" |
| 15 | هرسین (Harsin) | 1569 | 47º36'81" | 34º16'23" |
| 16 | کرند (Kerend) | 1697 | 46º13'54" | 34º17'28" |
| 17 | نهاوند (Nahavand) | 1671 | 48º71'46" | 34º89'26" |
| 18 | هرسین (Harsin) | 1569 | 47º36'81" | 34º16'23" |
| 19 | نهاوند (Nahavand) | 1671 | 48º71'46" | 34º89'26" |
| 20 | الشتر (Alashtar) | 1621 | 48º26'17" | 33º86'32" |
| 21 | هرسین (Harsin) | 1569 | 47º36'81" | 34º16'23" |
| 22 | کرمانشاه (Kermanshah) | 1352 | 47º40'32" | 34º19'31" |
| 23 | الشتر (Alashtar) | 1621 | 48º26'17" | 33º86'32" |
| 24 | ملایر (Malayer) | 1737 | 48º16'11" | 34º11'18" |
| 25 | الشتر (Alashtar) | 1621 | 48º26'17" | 33º86'32" |
| 26 | کرمانشاه (Kermanshah) | 1352 | 47º40'32" | 34º19'31" |
| 27 | کرمانشاه (Kermanshah) | 1352 | 47º40'32" | 34º19'31" |
| 28 | کرند (Kerend) | 1697 | 46º13'54" | 34º17'28" |
| 29 | کرمانشاه (Kermanshah) | 1352 | 47º40'32" | 34º19'31" |
| 30 | نورآباد (Noorabad) | 1798 | 47º22'11" | 34º38'31" |

در بین صفات اندازه‌گیری‌شده، کمترین مقدار ضریب تنوع فنوتیپی مربوط به عرض خشک میوه با ۸/۶۸ درصد و پس از آن، مربوط به طول و قطر خشک میوه بود. شاخص تنوع فنوتیپی برای صفت وضعیت روزنه انتهایی ۴۹/۵۰ درصد به‌دست آمد و بیانگر این است که از لحاظ باز و بسته بودن روزنه انتهایی میوه تنوع بالایی در بین ژنوتیپ‌ها وجود دارد. وضعیت روزنه انتهایی میوه یکی از صفات مهم در نگهداری و انبارداری محصول گردو می‌باشد. گردوهای دارای روزنه باز ضمن احتمال آلودگی قارچ‌ها، در هنگام انبارداری مورد حمله

حشرات قرار گرفته و در زمان کاشت خشک میوه نیز در خزانه به علت ورود آب زیاد به درون خشک میوه مورد خسارت قارچ‌ها و کپک‌زدگی قرار می‌گیرند. وجود روزنه در خشک میوه باعث سهولت در شکستگی پوسته سخت می‌شود و در هنگام حمل و نقل میوه خشک میوه به آسانی به دو نیم تقسیم یا مغزشان خارج می‌گردد (Forde and McGranaham, 1993). Ebrahimi *et al.* (2011) شاخص تنوع را برای صفت روزنه انتهایی میوه ۶۳ درصد بیان کردند و آن را ناشی از تنوع بالا بین ژنوتیپ‌ها در این صفت گزارش کردند. وزن خشک میوه و وزن مغز از صفات بسیار مهم در گردو می‌باشند که دامنه تغییرات این صفات برای وزن خشک میوه از ۷ تا ۱۹/۸۰ گرم و وزن مغز از ۲/۸۰ تا ۹/۲۰ گرم متغیر بود و میزان شاخص تنوع به‌دست آمده در این دو صفت به‌ترتیب ۱۸/۷۲ و ۲۰/۱۶ درصد ثبت شد (جدول ۳). در پژوهشی، Ebrahimi *et al.* (2011) با ارزیابی ۳۱ ژنوتیپ گردوی ایرانی و ۴ رقم خارجی، متوسط وزن خشک میوه را از ۷/۵۲ تا ۱۷/۵۳ گرم و وزن مغز را در حدود ۴ تا ۹/۸۳ گرم گزارش کرده‌اند. Rezaei *et al.* (2008) در ارزیابی توده‌های گردو ارومیه، وزن میوه و مغز را در ژنوتیپ‌های بررسی‌شده به‌ترتیب از ۱۰/۳ تا ۱۶ و ۵/۵ تا ۷/۲ گزارش کردند که در مقایسه با نتایج مطالعه حاضر دارای مقدار کمتری بودند. Ehteshamnia *et al.* (2009b) با ارزیابی ۹۶ خشک میوه بذری گردو در استان گلستان دامنه وزن مغز را در محدوده ۲/۱ تا ۷/۵ گرم و با شاخص تنوع ۲۵/۷۴ درصد گزارش کردند. رنگ مغز و راحتی جدا شدن از صفات مهم در بازارپسندی گردو هستند که میانگین به‌دست آمده برای این دو صفت ۳/۸۹ و ۲/۸۹ می‌باشد که نشان می‌دهد اکثر ژنوتیپ‌ها دارای رنگ مغز روشن با سهولت جدا شدن آسان بودند. این نتایج با گزارش Arzani *et al.* (2008) مطابقت داشت. با این حال در برخی از مناطق جهان رنگ کهربایی در مغز نیز از بازارپسندی خوبی برخوردار است (Nicese *et al.*, 1998). در بین ژنوتیپ‌های ارزیابی‌شده در این پژوهش، بیشترین و کمترین درصد مغز با مقدار ۶۲/۷۵ و ۳۰/۱۰ درصد با میانگین ۴۹/۱۳ درصد به دست آمد (جدول ۳). در مطالعه‌ای روی ژنوتیپ‌های گردو منطقه هیماچال پرادش هندوستان، بیشترین درصد مغز ۶۲/۵ گزارش شده است که از مقدار به‌دست آمده در این مطالعه کمتر بوده است (Sharma and Sharma, 2001). در پژوهشی دیگر، نتایج ارزیابی مورفولوژیکی ۲۰۴ ژنوتیپ گردو در مناطق شمالی و غربی ایران نشان داد متوسط وزن خشک میوه از ۱۱/۵ تا ۱۷/۲ گرم، وزن مغز ۳/۲ تا ۶/۳ گرم و درصد مغز از ۲۸ تا ۴۶/۷ درصد متغیر بود (Karimi *et al.*, 2014).

**جدول ۲- توالی آغازگرهای ISSR مورد استفاده در این مطالعه**

**Table 2. ISSR primer sequences used in this study**

| کد<br>Code | نام آغازگر<br>Primer name | توالی آغازگر<br>Primer sequence | دمای اتصال (سانتی‌گراد)<br>Annealing temperature (C°) |
|---|---|---|---|
| 1 | UBC-807 | AGA AGA GAG AGA GT | 50 |
| 2 | UBC-810 | GAG AGA GAG AGA GAG AT | 50 |
| 3 | UBC-814 | CTC TCT CTC TCT CTC TA | 50 |
| 4 | UBC-828 | TGT GTG TGT GTG TGT GA | 50 |
| 5 | UBC-818 | CAC ACA CAC ACA CAC AG | 50 |
| 6 | UBC-827 | ACA CAC ACA CAC ACA CG | 50 |
| 7 | UBC-811 | GAG AGA GAG AGA GAG AC | 50 |
| 8 | HB10 | GAG AGA GAG AGA GAG AT | 50 |
| 9 | HB12 | CTC TCT CTC TCT CTC TA | 50 |
| 10 | HB14 | CTC CTC CTC GC | 50 |

**جدول ۳- بیشینه، کمینه، میانگین، انحراف معیار و شاخص تنوع فنوتیپی صفات ارزیابی‌شده در گردو**

**Table 3. The max., min., mean, standard deviation and phenotypic diversity index of evaluated traits in walnut**

| صفات Traits | کمینه Min. | بیشینه Max. | میانگین Mean | انحراف معیار Standard deviation | شاخص تنوع فنوتیپی (درصد) Phenotypic variation Index (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| شکل خشک میوه (کد) Nut shape (code) | 1 | 9.00 | 4.44 | 2.67 | 60.14 |
| وزن یک خشک میوه (گرم) Nut weight (gr) | 7 | 19.80 | 11.90 | 2.22 | 18.72 |
| عرض خشک میوه (سانتی‌متر) Nut width (cm) | 2.38 | 3.80 | 3.23 | 0.28 | 8.68 |
| طول خشک میوه (سانتی‌متر) Nut length (cm) | 2.75 | 4.86 | 3.69 | 0.37 | 10.07 |
| قطر خشک میوه (سانتی‌متر) Nut diameter (cm) | 2.65 | 4.20 | 3.37 | 0.30 | 9.17 |
| ضخامت پوسته Shell thickness (mm) | 0.43 | 2.31 | 1.66 | 0.80 | 48.19 |
| گوشتی بودن مغز (کد) Kernel plumpness (code) | 2 | 7.00 | 4.84 | 1.27 | 26.25 |
| راحتی جدا شدن مغز (کد) Kernel removal from nut (code) | 1 | 7.00 | 2.89 | 1.69 | 58.61 |
| رنگ مغز (کد) Kernel color (code) | 1 | 7.00 | 3.89 | 1.30 | 33.45 |
| وزن مغز(گرم) Kernel weight (gr) | 2.80 | 9.20 | 5.83 | 1.20 | 20.61 |
| درصد مغز (نسبت) Kernel percentage (ratio) | 30.11 | 62.75 | 49.13 | 5.57 | 11.70 |
| چروکیدگی مغز (کد) Kernel shriveling (code) | 0 | 3.00 | 0.81 | 0.92 | 114.02 |
| روزنه خشک میوه (کد) Shell seal (code) | 1 | 9.00 | 5.51 | 2.54 | 49.50 |

نتایج گزارش‌های منتشرشده توسط محققان مختلف نشان داد تنوع زیادی در صفات مربوط به خشک میوه و مغز وجود دارد (Balci *et al*., 2001; Ebrahimi *et al*., 2001; Malvolti *et al*., 1994) که این تنوع می‌تواند به دلیل سیستم گرده‌افشانی گردو یا منشأ بذری آن باشد (Foroni *et al*., 2005). تنوع ژنتیکی بالا در گردو از لحاظ به‌نژادی از اهمیت خاصی برخوردار است (Eskandari *et al*., 2006) و توسعه ارقام جدید با کمیت و کیفیت بالا از طریق دورگ‌گیری نمونه‌های مطلوب امری ضروری به نظر می‌رسد (Amiri *et al*., 2010; Atefi, 2001). ارزیابی تنوع ژنتیکی بر اساس صفات ریختی برای شناسایی ژنوتیپ‌های مطلوب ضروری است و این صفات در برنامه‌های اصلاحی قابل بهره‌برداری هستند (Fakhraei *et al*., 2016). بر اساس نتایج ارزیابی اولیه ۱۱۹ ژنوتیپ گردو، درنهایت ۳۰ نمونه که دارای ویژگی‌های مطلوب‌تری بر اساس شاخص‌هایی مانند درصد مغز بالا، وزن مغز، گوشتی بودن مغز، سهولت جدایی مغز از خشک میوه، رنگ کهربایی تا روشن و سایر صفات

بودند انتخاب شدند و ارزیابی خویشاوندی ژنتیکی بین آن‌ها با نشانگر ISSR بررسی شد.

**تجزیه مولکولی با نشانگر ISSR**

نتایج حاکی از آن بود که همه آغازگرهای مورد استفاده سطح بالایی از چندشکلی را در بین ۳۰ ژنوتیپ انتخاب‌شده نشان دادند. تمام ۱۰ آغازگر مورد استفاده دارای باند چندشکل و در مجموع ۷۹ باند بر روی ژل آگاروز مشخص شد که از این تعداد، ۷۷ باند دارای چندشکلی بودند. نتایج به‌دست آمده از این بخش اطلاعات کافی برای تشخیص و تفکیک ژنوتیپ‌ها را از یکدیگر فراهم نمود. مقدار بالای تنوع گردو ممکن است به درجه بالای هتروزیگوتی آن نسبت داده شود (Foroni *et al*., 2005). تعداد کل باند برای هر آغازگر از ۳ تا ۱۳ باند و محدوده اندازه قطعات تولیدشده نیز از ۲۰۰ تا ۱۷۰۰ جفت‌باز متغیر بود. میزان اطلاعات چندشکلی، یکی از شاخص‌های مهم جهت مقایسه آغازگرهای مختلف از لحاظ قدرت آن‌ها برای تفکیک ژنوتیپ‌ها می‌باشد. در این تحقیق همه آغازگرهای استفاده‌شده چندشکلی بالایی را بین نمونه‌های مورد بررسی نشان دادند. تعداد باند تولیدشده برای هر آغازگر، ارزش محتوی چند شکلی مشاهده‌شده و شاخص نشانگر در جدول (۴) آمده است. بیشترین و کمترین تعداد آلل مشاهده‌شده بین آغازگرهای ISSR به‌ترتیب مربوط به آغازگر UBC-807 (۱۳ آلل) و آغازگر HB10 (۳ آلل) با میانگین ۷/۷ آلل برای هر آغازگر بود. میانگین تعداد آلل‌های مؤثر برای هر آغازگر ۵/۷۷ آلل برآورد شد. با این حال بالاترین درصد ارزش محتوی چندشکلی در آغازگر UBC-807 (۰/۸۲) ثبت شد که این امر ممکن است به خاطر بالا بودن تعداد آلل مؤثر در این آغازگر باشد. بالا بودن متوسط تعداد آلل برای هر آغازگر در نمونه‌های بررسی‌شده نشان‌دهنده تنوع بالا ژنوتیپ‌های بررسی شده می‌باشد. متوسط تعداد آلل در نتایج ارزیابی تنوع ژنتیکی گردو با استفاده از آغازگر RAPD در گزارش Nicese *et al.* (1998) ۱/۳ آلل به‌دست آمد. یکی دیگر از معیارهای تنوع ژنتیکی ضریب شانون (I) است که این ضریب برای کل آغازگرها به‌طور متوسط ۱/۷۵ ثبت شد. بیشترین مقدار آن برای آغازگر UBC-807 و کمترین مقدار آن مربوط به آغازگر HB10 است. الگوی تکثیر آغازگر UBC-807 در ۳۰ نمونه ژنوتیپ بذری گردو در شکل (۱) نشان داده شد.

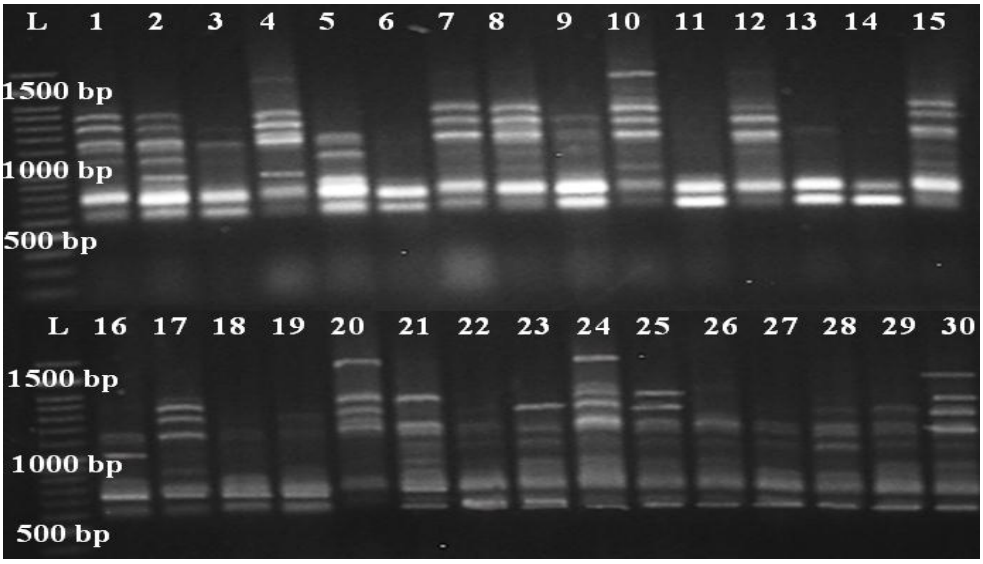
**جدول ٤- شاخص‌های ژنتیکی برای آغازگرهای ISSR در ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گردو**

**Table 4. Genetic index for ISSR primers in assessment of genetic diversity of walnut genotypes**

| MI | PIC | I | $A_e$ | $N_a$ | نام آغازگر Primer name |
|---|---|---|---|---|---|
| 4.21 | 0.82 | 3.05 | 9.77 | 13 | UBC-807 |
| 3.47 | 0.74 | 1.47 | 4.99 | 7 | UBC-810 |
| 3.96 | 0.77 | 2.40 | 7.87 | 10 | UBC-814 |
| 3.15 | 0.63 | 1.35 | 4.24 | 6 | UBC-828 |
| 3.93 | 0.73 | 1.91 | 6.27 | 8 | UBC-818 |
| 2.89 | 0.67 | 1.05 | 3.87 | 6 | UBC-827 |
| 4.12 | 0.79 | 2.74 | 8.19 | 9 | UBC-811 |
| 2.35 | 0.51 | 0.42 | 1.86 | 3 | HB10 |
| 3.94 | 0.78 | 2.06 | 7.07 | 10 | HB12 |
| 3.68 | 0.66 | 1.08 | 3.59 | 5 | HB14 |
| 3.57 | 0.71 | 1.75 | 5.77 | 7.7 | Average |

$N_a$: تعداد آلل مشاهده‌شده، $A_e$: تعداد آلل مؤثر، I: شاخص اطلاعاتی شانون، PIC: محتوی اطلاعاتی چند شکلی، MI: شاخص نشانگر.

$N_a$: Observed number of alleles, $A_e$: Effective number of alleles, I: Shannon's information index, PIC: polymorphism information content, MI: Marker index.




**شکل ۱- الگوی تکثیر آغازگر UBC-807 در ۳۰ ژنوتیپ گردو**

**Figure 1. Banding pattern generated by UBC-807 primer in 30 genotypes of walnut**

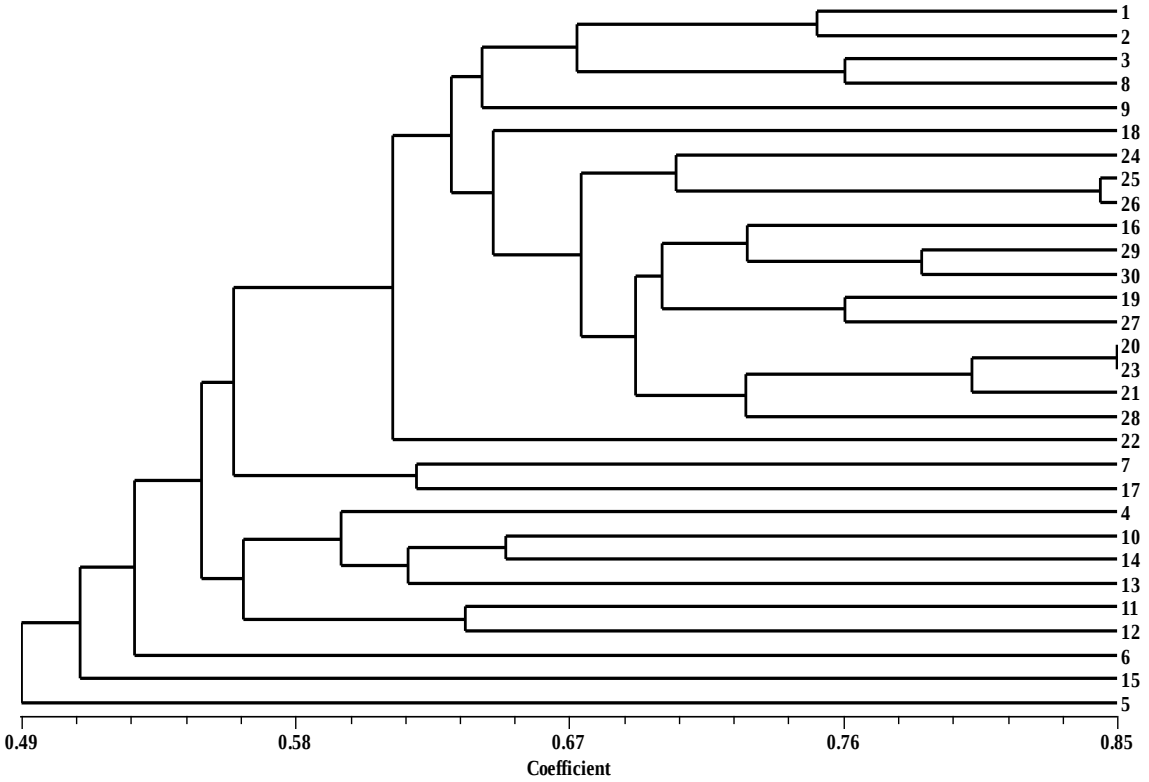
تنوع ژنتیکی ۵۶ نمونه گردو در کشور یونان با هفت آغازگر ISSR بررسی شد و در مجموع ۹۳ قطعه که اندازه آن‌ها در محدوده ۲۰۰ تا ۱۴۸۰ جفت‌باز قرار داشت به‌دست آمد. تعداد آلل برای آغازگرهای بررسی‌شده در دامنه ۷ تا ۲۰ با میانگین ۱۳/۳ آلل برای هر آغازگر بود (Christopoulos *et al.*, 2010). در گزارشی دیگر Mahmoodi *et al.* (2012) تنوع ژنتیکی را در ۱۹ ژنوتیپ و دو رقم گردو بر اساس ۱۳ نشانگر ISSR بررسی کردند که در مجموع ۲۰۸ قطعه تکثیر شد که ۱۸۲ قطعه دارای چندشکلی بود. Nicese *et al.* (1998) با استفاده از ۷۲ آغازگر RAPD بر روی ۱۹ ژنوتیپ گردو در مجموع ۲۳ باند چندشکل را گزارش کردند. در پژوهشی دیگر، تنوع ژنتیکی ۸۲ ژنوتیپ بذری گردو با استفاده از ۲۰ آغازگر RAPD بررسی شد و درصد چندشکلی در حدود ۴۹ درصد به‌دست آمد. همچنین تعداد کل باندهای مشاهده‌شده را ۶۲ عدد و اندازه باند را در محدوده ۱۵۰ تا ۱۵۰۰ جفت‌باز گزارش کردند (Ahmed *et al.*, 2012). در گزارشی دیگر با استفاده از ۴۵ آغازگر RAPD روی ۸ ژنوتیپ گردو، در مجموع ۵۱۳ باند تکثیر شد که ۳۴۰ باند دارای چندشکلی و اندازه آن‌ها در محدوده ۲۰۰-۵۰۰۰ جفت‌باز بود (Erturk and Dalkilic, 2011). Xu *et al.* (2012) با کاربرد ۲۳ آغازگر RAPD روی ۳۵ ژنوتیپ گردو که از ۸ منطقه جمع‌آوری شده بودند، محدوده سایز آلل‌ها را بین ۱۸۰-۲۰۰۰ جفت‌باز و درصد چندشکلی را ۸۶/۱ درصد گزارش نمودند. بر اساس نتایج گزارش‌های مختلف سطح چندشکلی بالا در گردو می‌تواند به‌دلیل دگرگشن بودن این گیاه باشد (Nicese *et al.* 1998). Ebrahimi *et al.* (2011) با استفاده از ۹ آغازگر ریزماهواره روی ۳۱ ژنوتیپ گردو ایرانی و ۴ رقم خارجی، در مجموع ۳۹ باند چندشکل را گزارش کردند و بیان نمودند که تعداد کل باندها بین ۲-۸ عدد متغیر است. Mahmoodi *et al.* (2013) ۲۱ نمونه گردو را براساس ۹ ریزماهواره بررسی کردند و تعداد کل باند برای هر آغازگر را در حدود ۲ تا ۷ باند گزارش کردند.

## تجزیه خوشه‌ای

ماتریس تشابه جاکارد بین ژنوتیپ‌های گردو از داده‌های ISSR محاسبه شد. بیشترین تشابه ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های ۲۳ و ۲۰ که هر دو مربوط به شهر الشتر بودند، با مقدار ۰/۸۵ و کمترین تشابه بین ژنوتیپ‌های ۴

و ۵ به‌ترتیب مربوط به ملایر و نورآباد، به مقدار ۰/۳۱ مشاهده گردید. در پژوهشی، تنوع ژنتیکی ۵۶ نمونه گردو در کشور یونان با نشانگر ISSR بررسی گردید و ضریب تشابه ژنتیکی بین آن‌ها از ۰/۱۳ تا ۰/۹۳ با میانگین ۰/۴۸ ثبت شد که بیانگر درجه بالایی از تنوع در گردو می‌باشد. در گروه‌بندی انجام‌شده ارقام بین‌المللی از نمونه‌های یونانی تفکیک شدند اما گروه‌بندی مشخص در نمونه‌های یونانی دیده نشد (Christopoulos *et al.*, 2010). Mahmoodi *et al.* (2012) با ارزیابی برخی از ژنوتیپ‌های گردو توسط نشانگر ISSR ضریب تشابه ژنتیکی را از ۰/۳۹ تا ۰/۶۷ گزارش نمودند در حالی که این ضریب با نشانگر SSR از ۰/۱۳ تا ۰/۷۶ به‌دست آمد (Mahmoodi *et al*., 2012; Mahmoodi *et al*., 2013). فاصله ژنتیکی ارتباط میان ۳۰ نمونه گردو بر اساس مقدار تشابه ژنتیکی جاکارد بوسیله تجزیه خوشه‌ای با روش UPGMA تعیین شد (شکل ۲).

بر اساس دندروگرام به دست آمده از ماتریس تشابه، ژنوتیپ‌های مورد بررسی در فاصله ۰/۵۸ به ۷ گروه متفاوت طبقه‌بندی شدند که بیانگر تنوع ژنتیکی بالایی بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه می‌باشد. Mahmoodi *et al.* (2013) بر اساس تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های مورد بررسی با استفاده از داده‌های SSR، نمونه‌ها را در دو گروه اصلی قرار دادند و هر کدام از گروه‌ها را به دو زیرگروه تقسیم‌بندی کردند. Fatahi *et al.* (2010) ۳۵ ژنوتیپ گردو را بر اساس ۱۴ آغازگر RAPD ارزیابی کردند و مقدار ضریب تشابه ژنتیکی را از ۰/۲۷ تا ۰/۸۷ گزارش نمودند. همچنین در فاصله ژنتیکی ۰/۰۱ ژنوتیپ‌ها در ۵ گروه اصلی قرار گرفتند که بیانگر اختلاف زیاد بین نمونه‌های بررسی شده می‌باشد.




**شکل ۲- تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضرایب تشابه جاکارد و روش UPGMA با استفاده از ۱۰ آغازگر ISSR در ۳۰ نمونه گردو**

**Figure 2. Cluster analysis based on Jaccard,s similarity coefficient and UPGMA method using 10 ISSR primers among 30 genotypes of walnut**

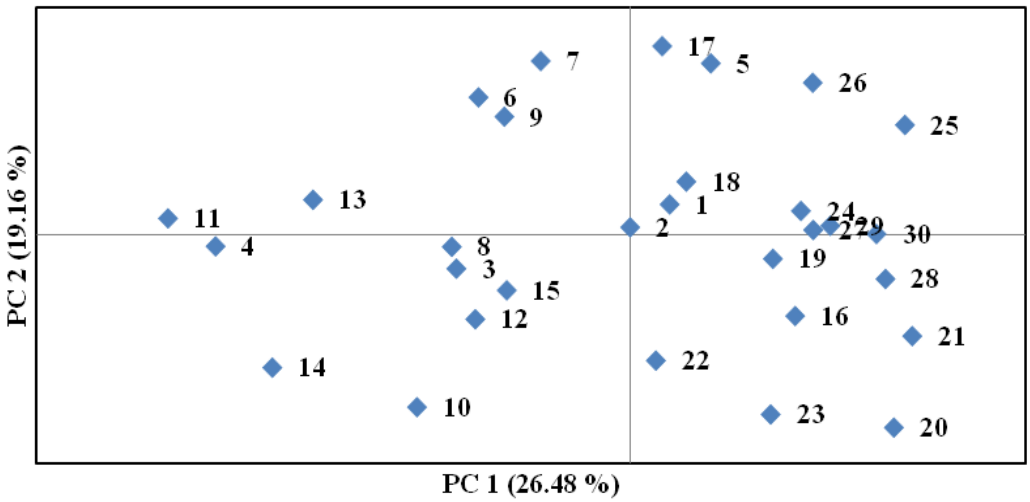
## تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس داده‌های ISSR صورت گرفت. سه عامل اصلی در مجموع ۶۲/۶۵ درصد از کل واریانس را به خود اختصاص دادند. اولین عامل بیشترین تغییرات را (۲۶/۴۸ درصد) نسبت به سایر عامل‌ها توجیه کرد و عامل دوم حدود ۱۹/۱۶ درصد تغییرات را توجیه نمود. در این پژوهش، نمودار بای‌پلات با استفاده از دو فاکتور اصلی اول و دوم که در مجموع ۴۵/۶۴ درصد از کل واریانس را نشان دادند انجام شد. پراکنش ژنوتیپ‌ها در فضای مختلف بای‌پلات نشان دهنده تنوع ژنتیکی بالا آن‌ها می‌باشد (شکل ۳). Ehteshamnia *et al.* (2009a) در بررسی تنوع ژنتیکی ۹۶ ژنوتیپ از ۵ توده طبیعی گردوی ایرانی با استفاده از ۱۱ مکان ژنی ریزماهواره، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی را براساس ماتریس تشابه به‌دست آمده از ضریب تشابه نی انجام دادند و گزارش کردند که ۴۰ مؤلفه اصلی حدود ۹۶ درصد از واریانس داده‌های مولکولی را توجیه نمودند و با توجه به دیاگرام پراکنش متغیرها بر اساس مؤلفه اول و دوم گزارش کردند که مؤلفه اول شامل تأثیرگذارترین متغیرها بوده و بیشترین درصد تغییرات (۱۱/۳۹ درصد) را توجیه نمود.

تفکیک ژنوتیپ‌ها براساس این تجزیه کاملاً با نتایج تجزیه خوشه‌ای مطابقت داشت. بر اساس نتایج به‌دست آمده، مؤلفه اول در تفکیک ژنوتیپ‌هایی مانند ۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳ و ۱۶ نقش بیشتری در مقایسه با مؤلفه دوم داشت، درحالی‌که مؤلفه دوم در تفکیک ژنوتیپ‌های ۴، ۱۱ و ۱۳ نقش بیشتری داشته است.

## نتیجه‌گیری

نتایج کلی این تحقیق نشان داد تنوع زیادی در بین ژنوتیپ‌های گردو به لحاظ صفات کمی و کیفی خشک میوه و مغز وجود دارد. در این مطالعه، میانگین وزن خشک میوه و مغز در بین ژنوتیپ‌ها متنوع بود. نتایج این تحقیق دلالت بر این دارد که ژنوتیپ‌های مورد بررسی به دلیل این که در برنامه‌های اصلاح نباتات قرار نگرفته‌اند، زمینه ژنتیکی متنوعی دارند و می‌توان با انتخاب نمونه‌های مطلوب به‌عنوان والدین به منظور تولید ارقام جدید استفاده کرد. نتایج به‌دست آمده از داده‌های ISSR، سطح قابل توجهی از تنوع را میان ژنوتیپ‌های انتخابی گردو نشان داد و نتایج به‌دست آمده از این بخش اطلاعات کافی برای تشخیص و تفکیک ژنوتیپ‌ها را فراهم کرد. از اطلاعات به‌دست آمده می توان به‌عنوان شناسنامه معتبر جهت




**شکل ۳- تجزیه به مؤلفه‌های اصلی ژنوتیپ‌های گردو بر اساس ماتریس تشابه جاکارد با استفاده از داده‌های نشانگر ISSR**

**Figure 3. Principal component analysis for walnut genotypes based on Jaccard's similarity coefficient using ISSR marker data**

شناسایی نمونه‌های مشابه و یا ژنوتیپ‌های نامشخص طی مدت زمان کوتاه و در هر موقعیت زمانی استفاده کرد و از این نتایج در بهبود اعمال مدیریت ژرم‌پلاسم‌ها استفاده نمود. از آنجایی که ارقام تجاری گردو در ایران وجود ندارد، بنابراین ژنوتیپ‌های مطلوب (۱۶، ۴، ۲۴، ۲۶، ۱۱ و ۱۷) می‌توانند از طریق روش‌های رویشی تکثیر و به‌صورت تجاری کشت شوند و یا در اصلاح سنتی گردو و مطالعات پیشرفته بیوتکنولوژی برای دستیابی به نتاج بهتر مورد استفاده قرار گیرند.

## سپاس‌گزاری

هزینه‌های این پژوهش از محل اعتبارات پژوهشی دانشگاه ایلام تأمین شده است که نگارندگان بدین‌وسیله مراتب قدردانی خود را ابراز می‌دارند.

## References

Ahmed, N., Mir, J. I., Mir, R. R., Rather, N. A., Rashid, R., Wani, S. H., Shafi, W., Mir, H. 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.

Aly, M. M., Robert, A., Fjellstrom, G., McGranahan, G. H. and Parfitt, E. (1991). Origin of walnut somatic embryos determine by RFLP and Isozyme analysis. *Hort Science*, 27(1), 61-63.

Amiri, R., Vahdati, K., Mohsenipoor, S., Mozaffari, M. R. and Leslie, C. (2010). Correlations between some horticultural traits in walnut. *Hort Science*, 45(11), 1690-1694.

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(3), 159-168.

Asadi Gharneh, H. A., Arzani, K., Shojaeiyan, A., Golparvar, A. R., and Sabaghnia, N. (2015). Evaluation of genetic diversity in some strawberry (*fragaria* × *annanasa* Duch.) cultivars in Iran using morphological characteristics. *Plant Productions*, 37(4), 93-105.

Atefi, J. (2001). Comparison of some promising Iranian walnut clones and foreign varieties. *Acta Horticulturae*, 544(4), 51-59.

Balci, I., Balta, F., Kazankaya, A. and Sen, S. M. (2001). Promising native walnut genotypes (*Juglans regia* L.) of the east black sea region of Turkey. *Journal of the American Pomological Society*, 55(4), 204-208.

Christopoulos, M. V., Rouskas, D., Tsantili, E. and 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(4), 584-592.

Doyle, J. J. and Doyle, J. L. (1990). Isolation of plant DNA form fresh tissue. *Focus*, 12(3), 13-15.

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(1), 146-151.

Ehteshamnia, A., Sharifani M. and Vahdati, K. (2010). Investigation of qualitative morphological and geographical diversity among native populations of walnut (*Juglans regia* L.) in Golestan province. *Journal of Plant Productions Research*, 17(2), 15-38. [In Farsi]

Ehteshamnia, A., Sharifani, M., Vahdati, K., and Erfani Moghaddam, V. (2009a). Investigation of genetic diversity among some native populations of walnut (*Juglans regia* L.) in Golestan province by SSR Markers. *Journal of Plant Productions Research*, 16(4), 39-58. [In Farsi]

Ehteshamnia, A., Sharifani, M., Vahdati, K., and Erfani Moghaddam, V. Musavizadeh, S. J. and Mohsenipoortaklo, S. (2009b). Investigation of morphological diversity among native populations of walnut (*Juglans regia* L.) in Golestan province, Iran. *Journal of Plant Productions Research*, 16(3), 29-48. [In Farsi]

Erturk, U. M. and Dalkilic, Z. E. (2011). Determination of genetic relationship among some walnut (*Juglans regia* L.) genotypes and their early-bearing progenies using RAPD markers. *Romanian Biotechnological Letters*, 16(1), 5944-5952.

Eskandari, S., Hassani, D. and Abdi, A. (2006). Investigation on genetic diversity of Persian walnut and evaluation of promising genotypes. *Acta Horticulturae*, 705(5), 159-166.

Fakhraei, M., Tabar, R., Sarsaiefi, M., Fattie, A., Abadozi, G. H., Hajhasani, M., Farhadi, A., Khakizad, G. H., Azizi, Z., Samadi, B., Kiani, M., Mirakhorlee, A., Foromadi, N., Mzaffari, J. and Rafezi, R. (2016). Genetic diversity Mulberry genotypes of Iran by using morphological characteristics. *Plant Productions*, 39(3), 39-50.

Fatahi, R., Ebrahimi, A. and Zamani, Z. (2010). Characterization of some Iranians and foreign walnut genotypes using morphological traits and RAPD markers. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 51(1), 51-60.

Food and Agriculture Organization (FAO) (2016). *Faostat 3*. Retrieved from http://www.fao.org/faostat/en/.

Forde, H. I. (1975). Walnuts. In J. Janick & J. N. Moore (Eds.). *Advances in fruit breeding* (pp. 439-455). West Lafayette, UK: Purdue University Press.

Forde, H. I. and McGranaham, G. H. (1993). *A new walnut cultivar Malizia*. USA: John Wiley & Sons, Inc.

Foroni, I., Rao, R., Woeste, K. and Gallitelli, M. (2005). Characterisation of *Juglans regia* L. with SSR markers and evaluation of genetic relationships among cultivars and the 'Sorrento'landrace. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 80(1), 49-53.

George, K. J., Varma, R.S., Ganga, G., Utpala, P., Sasikumar, B., Saji, K. V. and Parthasarathy, V. A. (2006). ISSR markers for genetic diversity analysis in spices-An appraisal. *Indian Journal of Horticulture*, 63(3), 302-304.

Hassani, D., Mozaffari, M. R., Dehghan Souraki, Y., Soleimani, A. and Loni, A. (2013). Vegetative and reproductive traits of some Iranian local and foreign cultivars and genotypes of walnut (*Juglans regia* L.). *Seed and Plant Improvement Journal*, 29(4), 839-855. [In Farsi]

IPGRI. (1994). *Descriptors for walnut* (*Juglans* spp.). Rome, Italy: International plant genetic resources institute.

Karimi, R., Ershadi, A., Ehteshamnia, 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.

Khadivi-Khub, A., Jahangirzadeh, S., Ahadi, E. and Aliyoun, S. (2014). Nuclear and chloroplast DNA variability and phylogeny of Iranian apples (*Malus domestica*). *Plant Systematics and Evolution*, 300(8), 1803-1817.

Mahmoodi, R., Hassani, D., Amiri, M. E. and Jafaraghaee, M. (2014). Comparison of nut characteristics and yield of some selected Persian walnut (*Juglans regia* L.) genotypes with foreign cultivars. *Seed and Plant Improvement Journal*, 30(2), 441-456. [In Farsi]

Mahmoodi, R., Rahman, F. and Paktarmani, R. (2012). Genetic diversity of Persian walnut from Iran as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Journal of the American Pomological Society*, 66(2), 101-106.

Mahmoodi, R., Rahmani, F. and Rezaee, R. (2013). Genetic diversity among *Juglans regia* L. genotypes assessed by morphological traits and microsatellite markers. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 11(2), 431-437.

Malvolti, M. E., Fineschi, S. and Pigliucci, M. (1994). Morphological integration and genetic variability in *Juglans regia* L. *Journal of Heredity*, 85(5), 389-394.

Mardi, M., Zeinalabedini, M., Haghjoyan, R., Jamali, S. H., Khayam Nekouei, S. M., Kavand, A., Ahmadi, K., Sadeghi, L., Loni, A. A., Karami, T. and Khoshkam, S. (2015). Application of microsatellite markers for identification and registration of walnut cultivars. *Journal of Horticulture Science*, 28(4), 584-593. [In Farsi]

Nicese, 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(2), 199-206.

Orel, G., Marchant, A. D., Mcleod, J. A. and Richards, G. D. (2003). Characterization of 11 Juglandaceae genotypes based on morphology, cpDNA and RAPD. *Hort Science*, 38(6), 1178- 1183.

Peakall, R. and Smouse, P. E. (2006) GENALEX 6.1: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6(1), 288-295.

Pollegioni, P., Major, A., Bartoli, S., Ducci, F., Proietti, R. and Malvolti, M. E. (2004). Application of microsattelite and dominant molecular markers for the discrimination of species and interspecific hybrids in genus *Juglans*. *Acta Horticulturae*, 705(5), 191-197.

Potter, D., Gao, F.Y., Aiello, G., Leslie, C. A. and McGranahan, G. H. (2002). Inter simple sequence repeat markers for fingerprinting and determining genetic relationships of walnut (*Juglans regia*) cultivars. *Journal of the American Pomological Society*, 127(1), 75-81.

Reddy, M. P., Sarla, N. and Siddiq, E. A. (2002). Inter simple sequences repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128(1), 9-17.

Rezaei, R., Hasani, G., Hassani, D. and Vahdati, K. (2008). Morphobiological characteristics of some newly selected walnut genotypes from seedling collection of Kahriz-Orumia. *Horticultural Science & Technology*, 9(3), 205-214. [In Farsi]

Sharma, O. C. and Sharma, S. D. (2001). Correlation between nut and kernel characters of Persian walnut seedling trees of Garsa Valley in Kullu District of Himachal Pradesh. *Acta Horticulturae*, 544(4), 129-132.

Sicard, D., Nanni, L., Porfiri, O., Bulfon, D. and Papa, R. (2005). Genetic diversity of *Phaseolus vulgaris* L. and *P. coccineus* L. landraces in central Italy. *Plant Breeding*, 124(5), 464-472.

Terzopoulos, P. J. and Bebeli, P. J. (2008). Genetic diversity analysis of Mediterranean faba bean (*Vicia faba* L.) with ISSR markers. *Field Crop Research*, 108(1), 39-44.

Xu, Z., Hu, T. and Zhang, F. (2012). Genetic diversity of walnut revealed by AFLP and RAPD markers. *Journal of Agricultural Science*, 4(7), 271-276.

© 2019 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)