Evaluation of some walnut genotypes in the west of Iran using fruit characteristics and RAPD marker

Nassim Zare Rashnoodi [1], Javad Erfani Moghadam [1] and Arash Fazeli [2*]
[1] Horticulture Department, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran
[2] Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran

Abstract
Persian walnut (Juglans regia L.) belongs to the family Juglandaceae is one of the most important nut crops in Iran. In this research, morphometric and genetic variations among some genotypes of Persian walnut collected from different parts of west Iran were evaluated based on nut characteristics and RAPD markers. In the first experiment, 29 traits related to nut and kernel were used to evaluate genetic potential of 119 walnut genotypes. The primary results of fruit morphometric characteristics showed that there is high variability in the some evaluated traits such as fruit shape, nut diameter and Kernel removal from nut in studied genotypes. Also, in the second experiment, the genetic diversity among 50 genotypes of walnut was evaluated using 13 RAPD markers. A total of 87 alleles were produced in the 13 RAPD markers with their sizes ranging from 140 to 2500 bp. The number of observed alleles for each locus ranged from 4 (OPA-18 and OPA-13) to 11 (OPA-09), with an average of 6.46 alleles per locus. Shannon's information index (I) value was observed to be highest (3.20) in the OPA-09 locus, while the OPA-13 locus had the lowest value (0.70) with an average of 1.66 among RAPD locus. The Jaccards' genetic similarity coefficient ranged from 0.08 to 0.79 among genotypes. Finally, our results demonstrate some of these genotypes have been desirable traits and must be conserved as valuable genetic resources, from the perspective of breeding.

Key words: Cluster analysis, Genetic resource, RAPD, Walnut

* Corresponding Author: a.fazeli@ilam.ac.ir

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال نهم، شمارهٔ سی و سوم، پاییز ۱۳۹۶، صفحهٔ ۱۸-۱
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۰۸/۱۰
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۶/۰۳/۲۰
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۶/۰۳/۲۲

ارزیابی برخی از ژنوتیپ‌های گردو در غرب ایران براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی میوه و نشانگر مولکولی RAPD

نسیم زارع رشنودی [۱]، جواد عرفانی مقدم [۱]، آرش فاضلی [۲*]
[۱] گروه علوم باغبانی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران
[۲] گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

چکیده

گردوی ایرانی (*Juglans regia* L.) متعلق به خانوادهٔ گردوسانان (Juglandaceae) و یکی از مهم‌ترین محصولات خشکبار در ایران است. در پژوهش حاضر، برخی ژنوتیپ‌های جمع‌آوری‌شدهٔ گردو از مناطق مختلف غرب ایران براساس ویژگی‌های میوه و نشانگر مولکولی RAPD ارزیابی شدند. بررسی حاضر در قالب دو آزمایش جداگانه انجام شد که در آزمایش اول، توانمندی ژنتیکی ۱۱۹ ژنوتیپ گردو براساس ۲۹ ویژگی مربوط به دانه و مغز ارزیابی شد. نتایج اولیهٔ ارزیابی ویژگی‌های مورفولوژیک میوه نشان دادند تنوع زیادی در برخی از صفات مانند شکل میوه، ضخامت پوستهٔ سخت، قطر دانه و جداشدن لپه از دانه در ژنوتیپ‌های بررسی‌شده وجود دارد و وزن دانه از ۷ تا ۸/۱۹ گرم متغیر بود. در آزمایش دوم، تنوع ژنتیکی بین ۵۰ ژنوتیپ گردوی انتخابی با ۱۳ نشانگر RAPD بررسی شد. درمجموع، ۸۴ آلل از ۱۳ مکان RAPD تکثیر شد و اندازهٔ آلل در محدودهٔ ۱۴۰ تا ۲۵۰۰ جفت باز متغیر بود. تعداد آلل‌های مشاهده‌شده برای هر مکان در دامنهٔ ۴ (OPA-18 و OPA-13) تا ۱۱ آلل (OPA-09) با میانگین ۶/۴۶ آلل متغیر بود. شاخص اطلاعاتی شانون (I) برای مکان OPA-09، زیاد (۳/۲۰) و برای مکان OPA-18، کمترین مقدار (۰/۷) بود و میانگین آن بین همهٔ مکان‌های RAPD، ۱/۶۶ ثبت شد. دامنهٔ ضریب تشابه ژنتیکی جاکارد میان ژنوتیپ‌ها از ۰/۰۸ تا ۰/۷۹ متغیر بود. تجزیهٔ خوشه‌ای با روش UPGMA براساس داده‌های RAPD، خویشاوندی ژنتیکی زیادی را بین ژنوتیپ‌ها نشان داد و در فاصلهٔ ژنتیکی ۴۶٪، به ۵ گروه اصلی تقسیم شدند. نتایج کلی نشان دادند برخی از این ژنوتیپ‌ها صفات مطلوبی دارند که می‌توانند منابع ژنتیکی باارزشی برای اصلاح گردو باشند.

واژه‌های کلیدی: تجزیهٔ کلاستر، گردو، منابع ژنتیکی، وزن دانه

* نگارندهٔ مسؤول: نشانی پست الکترونیک: a.fazeli@ilam.ac.ir ، شمارهٔ تماس: ۰۸۴۳۲۲۲۳۴۸۷۵

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

گردو یکی از منابع ارزشمند گیاهی جهان و به‌ویژه ایران است. ایران به این دلیل که محل پیدایش و تنوع بسیاری از گونه‌های زراعی-باغی به‌ویژه گونهٔ گردوی ایرانی است، امتیاز ویژه‌ای در این زمینه دارد. در خانوادهٔ گردوسانان، هفت جنس و حدود ۶۰ گونه وجود دارند که بیشتر آنها یک‌پایه و خزان‌دار هستند (Forde, 1975). جنس *Juglans* شامل ۲۰ گونه است که همگی میوهٔ خوراکی تولید می‌کنند (McGranahan and Leslie, 1990). بین گونه‌های گردو، گردوی ایرانی (*Juglans regia* L.) از نظر باغبانی توسعهٔ بیشتری پیدا کرده است و در سطح گسترده‌ای کشت می‌شود (Forde, 1975). ایران خاستگاه گردو به شمار می‌رود که بیان‌کنندهٔ وجود بیشترین تنوع ژنتیکی گردو در این سرزمین است (Beede and Hasey, 1998). *J. regia* در ایران در عرض جغرافیایی ۲۹ تا ۳۹ درجهٔ شمالی و طول جغرافیایی ۴۵ تا ۶۹ درجهٔ شرقی به‌خوبی رشد می‌کند که این محدوده، از درهٔ گز و مغان در شمال کشور تا اقلید فارس در جنوب و از ارتفاعات جنوب غربی ارومیه تا کوه تفتان در جنوب شرقی را در بر می‌گیرد. منشاء طبیعی گردو، مناطق کوهستانی آسیای مرکزی و به‌ویژه جنگل‌های شمال ایران است (Radnia, 1996). در پژوهشی، خاستگاه گردوی ایرانی، رشته‌کوه‌های آسیای مرکزی، از ترکیه و ایران، بخش‌هایی از جنوب شوروی سابق، غرب چین و شرق هیمالیا گزارش شده است که به‌دلیل مقاومت زیاد به شرایط نامساعد به‌سرعت در سطح گسترده‌ای کشت شده است (Charles *et al.*, 1998).

گردو بادگرده‌افشان است و براساس روش تولیدمثلی مبتنی بر دگرگشنی متمایز می‌شود. این ویژگی از ناهم‌رسی گل‌های گردو ناشی می‌شود که از خودگرده‌افشانی جلوگیری می‌کند (Fornari *et al.*, 2001)؛ باوجود تنوع ژنتیکی فراوان گردوی ایرانی، هنوز رقم ویژه‌ای از آن در ایران به ثبت نرسیده است و تنها براساس منشاء پیدایش به اکوتیپ‌های آذربایجانی، همدانی، قزوینی، شهمیرزادی، بافت کرمانی، بهبهانی، البرزی و غیره یا براساس کیفیت پوست و شکل میوه به نام‌های کاغذی، نوک‌کلاغی، گلابی‌شکل، سنگی و سوزنی شهرت یافته است.

برای بهره‌وری از منابع ژنتیکی با بیشترین کارایی، شناخت مواد ژنتیکی نگهداری‌شده ضروری است. یافتن فواصل ژنتیکی بین افراد یا جمعیت‌ها و آگاهی از روابط خویشاوندی گونه‌های مد نظر در برنامه‌های اصلاحی، امکان سازمان‌دهی ژرم‌پلاسم و نمونه‌گیری موثرتر را از ژنوتیپ‌ها فراهم می‌کند (Goldstein and Schlotterer, 1999). پژوهش‌های گسترده‌ای درزمینهٔ انتخاب ژنوتیپ‌های مرغوب گردو از بین توده‌های بذری، در اروپا و آمریکا انجام و ارقام معروفی نیز به‌دنبال انتخاب و ارزیابی ژنوتیپ‌ها معرفی شده‌اند. در گزارشی، بین توده‌های بذری گردو در کالیفرنیا، رقم یورکا (Eureka) انتخاب و معرفی شد (McGranahan *et al.*, 1998). Ferhatoglu (۱۹۹۳) در ترکیه، از بین ۱۱۶ ژنوتیپ

گـردو، تعـداد ۹ ژنوتیـپ را براسـاس کیفیـت مغـز، درصد مغز، میزان محصول، عادت گل‌دهی، عـادت میوه‌دهی، زمان رسیدن و دیگر ویژگی‌های کمّـی و کیفـی انتخـاب و ارزیـابی کـرد. Aleta و Ninot (۱۹۹۳) در اسـپانیا ژنوتیـپ‌هـای گـردو را براسـاس صفات کمّی و کیفـی ارزیـابی و تعـداد ۶۷ ژنوتیـپ برتر را از توده‌های بذری انتخاب و معرفـی کردنـد. در پژوهشی، Lansari و همکاران (۲۰۰۱) با بررسی ۵۵ ژنوتیپ از مراکش و هفت کولتیـوار از فرانسـه و مقایسهٔ آنها با ارقام روندومونسی (Rondomoncy)، فرانکـــت، لارا (Lara)، فرتلـــی (Fertly)، فرنـــر (Ferner)، H93-63 (فرانکت× پـدرو) و H94-101 (فرانکت× لارا) به این نتیجـه رسـیدند کـه اخـتلاف زیادی بین ارقام و ژنوتیپ‌ها در صفاتی ماننـد، طـول و قطـر شـاخه، وزن دانـه، وزن مغـز و وزن پوسـت وجود دارد.

از روش‌های مختلفی برای بررسی تنـوع ژنتیکـی و تعیین قرابت ژنتیکی بین ارقام و توده‌های گـردوی اروپایی و آسـیایی و شناسـایی ارقـام تجـاری گـردو استفاده شده است که از آن جمله می‌توان به بررسی شـاخص‌هـای مورفولوژیـک (Orel *et al*., 2003)، آلـوزایم (Forde, 1975)، ایـزوزایم (Fornari *et al*., 2001)، نشـانگر RELP (Aly *et al*., 1991) و نشـانگر ISSR (Potter *et al*., 2002) اشـاره کـرد. Nicese و همکاران (۱۹۹۸)، از نشانگرهای RAPD برای تشـخیص و تمـایز ۱۹ واریتـهٔ گـردو بـا شـجرهٔ شناخته‌شده استفاده کردند. پس از امتیازدهی بانـدها به‌صورت صـفر و یـک و محاسـبهٔ مـاتریس تشـابه و گـروه‌بنـدی بـا روش UPGMA، سـه گـروه کـاملا متمایز باتوجه‌به منابع اصلی ژنوتیپ‌ها به دست آمـد. این نتـایج نشـان دادنـد کـه تکنیـک RAPD، ارقـام نزدیک گردو و همچنین ارقـام جدیـد را نمـی‌توانـد شناسـایی کنـد. Orel و همکـاران (۲۰۰۳) ارتبـاط درون‌گونـه‌ای و درون‌جنسـی ۸ گونـه از جـنس *Juglans* و سه عضو دیگر خـانوادهٔ Juglandaceae را با نشانگرهای مورفولوژیک، DNA کلروپلاسـت و RAPD ارزیابی کردند. درمجموع، بـا ۸ آغـازگر RAPD، ۱۳۸ باند تولید شد که تنها ۷۸ عدد از آنهـا چندشـــکل بودنـــد و وضـــوح کـــافی داشـــتند. Pollegioni و همکـــاران (۲۰۰۴) بـــا نشـــانگرهای SSR، ISSR و RAPD، ژنوتیـــپ‌هـــای بـــذری و هیبریدهای بین‌گونه‌ای را تفکیک کردنـد. از هـردو نشانگر غالب RAPD و ISSR به‌ترتیـب ۱۸۸ و ۱۶۲ باند و از نشانگر SSR، ۱۱۳ آلـل بـه دسـت آمـد. از مزایـای نشـانگر RAPD مـی‌تـوان بـه بـی‌نیـازی بـه اطلاعات اولیه دربارهٔ ردیف DNA برای طراحـی و سـاخت آغازگرهـا اشـاره کـرد. همچنـین امکـان بررسی هم‌زمان چنـدین جایگـاه در ژنـوم نمونـه‌هـا، بی‌نیازی به کاوشگر، مواد پرتوزا، هزینهٔ کم، کاربرد و سـرعت اجـرای آن از دیگـر مزایـای ایـن نشـانگر مولکولی است (Nas *et al*., 2004).گردو در مناطق غربـی ایـران ژنوتیـپ‌هـای متعـددی دارد. درواقـع به‌علت‌اینکه در گذشته کاشت و ازدیاد گردو با بذر انجام شده‌اند، تعداد زیادی از درختان گردو با زمینهٔ ژنتیکی متنوع در این مناطق وجود دارند و شناسـایی ژنوتیپ‌های مطلوب و ارزیابی خویشاوندی بین آنها می‌تواند در اصلاح این میوهٔ خشکبار بـرای دسـتیابی به نتاج یا ژنوتیپ‌هایی با وزن میـوه و کیفیـت بیشـتر

موثر باشد. ارزیابی فواصل ژنتیکی، برای انتخاب والدین با هدف دورگ‌گیری اهمیت دارد و انتخاب نمونه‌هایی که فاصلهٔ ژنتیکی بیشتری دارند، به وجودآمدن نتاجی قوی‌تر و بهتر را باعث می‌شود.

مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر، ۱۱۹ ژنوتیپ گردو که از مناطق مختلف غرب کشور شامل شهرستان خرم‌آباد، نورآباد، الشتر، کرمانشاه، کرند، هرسین، نهاوند و ملایر جمع‌آوری شده بودند با ویژگی‌های مورفولوژیک مربوط به میوه بررسی شدند. پژوهش حاضر، در سال‌های ۱۳۹۳ تا ۱۳۹۴ برای شناسایی ژنوتیپ‌های برتر و امیدبخش گردو از جنبهٔ مورفولوژیک در برخی از مناطق مختلف غرب کشور با کشت متداول گردو انجام شد (جدول ۱). میوهٔ نمونه‌های بررسی‌شده در مرحلهٔ بلوغ کامل به‌طور تصادفی از بخش‌های مختلف درختان گردو جمع‌آوری و از لحاظ ۲۹ صفت مختلف کمّی و کیفی مربوط به دانه و مغز میوه بررسی شدند (جدول ۲). در پژوهش حاضر، ۱۵ عدد میوه از هر ژنوتیپ، ارزیابی و وزن دانه‌ها و مغز آنها با ترازوی دیجیتالی (مدل BPSIID، شرکت Sartorius، آلمان) با دقت یک‌صدم گرم محاسبه شد؛ سپس ویژگی‌های مربوط به هر ژنوتیپ مانند عرض، طول و قطر دانه با کولیس دیجیتالی (مدل EGL-111-111، شرکت Guanglu، ژاپن) و صفات کیفی مانند بافت پوست، رنگ پوست، رنگ مغز، روزنهٔ انتهایی و غیره در هر ژنوتیپ با توصیف‌کنندهٔ موجود برای این گیاه ارزیابی شدند. تحلیل داده‌ها با نرم‌افزارهای Excel و SPSS انجام شد. ضریب شاخص تنوع، نسبت انحراف معیار هر صفت بر میانگین همان صفت در کل جمعیت است که مقدار آن نیز برآورد شد. در آزمایش دوم، ۵۰ ژنوتیپ گردوی دارای بیشترین مقدار وزن دانه و مغز و همچنین صفات مطلوب مانند درصد مغز فراوان، گوشتی‌بودن مغز، رنگ مناسب و راحت‌جداشدن مغز از دانه انتخاب شدند و با ۱۳ آغازگر RAPD بررسی شدند (جدول ۳). توالی آغازگرهای استفاده‌شده در بررسی حاضر، در جدول ۴ آورده شده است. برای استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های انتخابی گردو، ۵ میوهٔ مناسب از هر ژنوتیپ در اوایل پاییز سال ۱۳۹۴ به‌مدت دو هفته در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد در سردخانه، سرمادهی مرطوب شدند؛ سپس بذرها به‌صورت جداگانه در گلدان‌های پلاستیکی در گلخانه کشت شدند. پس از رشد گیاهان، زمانی‌که برگ‌ها در حالت کاملا جوان بودند، از هر ژنوتیپ، یک گیاهچه انتخاب شد؛ سپس نمونهٔ برگ، جمع‌آوری و استخراج DNA ژنومی با روش CTAB تغییریافته (Doyle and Doyle, 1990) انجام شد. برای انجام واکنش PCR، DNA استخراج‌شده با غلظت ۱۰ نانوگرم بر ماکرولیتر، رقیق و آماده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۱۵ میکرولیتر انجام شد که شامل ۳ میکرولیتر DNA (۱۰ نانوگرم در میکرولیتر)، ۲ میکرولیتر آغازگر (۱۰ پیکومول در میکرولیتر)، ۷ میکرولیتر PCR Master Mix (2X) تهیه‌شده از شرکت سیناژن (منیزیم کلراید ($MgCl_2$) ۳ میلی‌مولار، DNTPs ۱/۶ میلی‌مولار و آنزیم Taq

جدول ۱- فهرست ژنوتیپ‌های استفاده‌شده در بررسی تنوع ژنتیکی گردو براساس صفات مورفولوژیک

کد ژنوتیپ	محل جمع‌آوری	ارتفاع (متر)	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی	کد ژنوتیپ	محل جمع‌آوری	ارتفاع (متر)	طول جغرافیایی	عرض جغرافیایی
۱	کرمانشاه	۱۳۱۸	۴°۴۷′۹″	۲۰°۳۴′۴۹″	۶۱	نوراباد	۱۷۸۶	۵۸°۴۷′۳۲″	۴°۳۴′۳۶″
۲	ملایر	۱۸۷۷	۴۸°۴۹′۱۸″	۱۹°۳۴′۳″	۶۲	هرسین	۱۷۲۴	۳۵°۴۷′۵۸″	۱۷°۳۴′۳۳″
۳	الشتر	۱۶۲۱	۱۵°۴۸′۵۱″	۵۳°۳۳′۷″	۶۳	الشتر	۱۶۲۱	۱۵°۴۸′۵۱″	۵۳°۳۳′۷″
۴	الشتر	۱۶۲۱	۱۵°۴۸′۵۱″	۵۳°۳۳′۷″	۶۴	الشتر	۱۶۲۱	۱۵°۴۸′۵۱″	۵۳°۳۳′۷″
۵	الشتر	۱۶۲۱	۱۵°۴۸′۵۱″	۵۳°۳۳′۷″	۶۵	نوراباد	۱۷۸۶	۵۸°۴۷′۳۲″	۴°۳۴′۳۶″
۶	کرمانشاه	۱۳۱۸	۴°۴۷′۹″	۲۰°۳۴′۴۹″	۶۶	کرمانشاه	۱۳۱۸	۴°۴۷′۹″	۲۰°۳۴′۴۹″
۷	الشتر	۱۶۲۱	۱۵°۴۸′۵۱″	۵۳°۳۳′۷″	۶۷	خرم اباد	۱۱۸۰	۲۰°۴۸′۱۷″	۲۸°۳۳′۲۶″
۸	نهاوند	۱۶۴۱	۲۱°۴۸′۵۶″	۱۲°۳۴′۱۴″	۶۸	هرسین	۱۷۲۴	۳۵°۴۷′۵۸″	۱۷°۳۴′۳۳″
۹	کرند	۱۶۴۵	۱۴°۴۶′۴″	۱۷°۳۴′۱۷″	۶۹	کرمانشاه	۱۳۱۸	۴°۴۷′۹″	۲۰°۳۴′۴۹″
۱۰	نهاوند	۱۶۴۱	۲۱°۴۸′۵۶″	۱۲°۳۴′۱۴″	۷۰	نهاوند	۱۶۴۱	۲۱°۴۸′۵۶″	۱۲°۳۴′۱۴″
۱۱	الشتر	۱۶۲۱	۱۵°۴۸′۵۱″	۵۳°۳۳′۷″	۷۱	هرسین	۱۷۲۴	۳۵°۴۷′۵۸″	۱۷°۳۴′۳۳″
۱۲	خرم اباد	۱۱۸۰	۲۰°۴۸′۱۷″	۲۸°۳۳′۲۶″	۷۲	الشتر	۱۶۲۱	۱۵°۴۸′۵۱″	۵۳°۳۳′۷″
۱۳	خرم اباد	۱۱۸۰	۲۰°۴۸′۱۷″	۲۸°۳۳′۲۶″	۷۳	هرسین	۱۷۲۴	۳۵°۴۷′۵۸″	۱۷°۳۴′۳۳″
۱۴	کرند	۱۶۴۵	۱۴°۴۶′۴″	۱۷°۳۴′۱۷″	۷۴	کرمانشاه	۱۳۱۸	۴°۴۷′۹″	۲۰°۳۴′۴۹″
۱۵	نهاوند	۱۶۴۱	۲۱°۴۸′۵۶″	۱۲°۳۴′۱۴″	۷۵	نوراباد	۱۷۸۶	۵۸°۴۷′۳۲″	۴°۳۴′۳۶″
۱۶	کرند	۱۶۴۵	۱۴°۴۶′۴″	۱۷°۳۴′۱۷″	۷۶	کرمانشاه	۱۳۱۸	۴°۴۷′۹″	۲۰°۳۴′۴۹″
۱۷	خرم اباد	۱۱۸۰	۲۰°۴۸′۱۷″	۲۸°۳۳′۲۶″	۷۷	کرند	۱۶۴۵	۱۴°۴۶′۴″	۱۷°۳۴′۱۷″
۱۸	خرم اباد	۱۱۸۰	۲۰°۴۸′۱۷″	۲۸°۳۳′۲۶″	۷۸	کرمانشاه	۱۳۱۸	۴°۴۷′۹″	۲۰°۳۴′۴۹″
۱۹	الشتر	۱۶۲۱	۱۵°۴۸′۵۱″	۵۳°۳۳′۷″	۷۹	نوراباد	۱۷۸۶	۵۸°۴۷′۳۲″	۴°۳۴′۳۶″
۲۰	خرم اباد	۱۱۸۰	۲۰°۴۸′۱۷″	۲۸°۳۳′۲۶″	۸۰	نهاوند	۱۶۴۱	۲۱°۴۸′۵۶″	۱۲°۳۴′۱۴″
۲۱	هرسین	۱۷۲۴	۳۵°۴۷′۵۸″	۱۷°۳۴′۳۳″	۸۱	هرسین	۱۷۲۴	۳۵°۴۷′۵۸″	۱۷°۳۴′۳۳″
۲۲	ملایر	۱۸۷۷	۴۸°۴۹′۱۸″	۱۹°۳۴′۳″	۸۲	ملایر	۱۸۷۷	۴۸°۴۹′۱۸″	۱۹°۳۴′۳″
۲۳	الشتر	۱۶۲۱	۱۵°۴۸′۵۱″	۵۳°۳۳′۷″	۸۳	الشتر	۱۶۲۱	۱۵°۴۸′۵۱″	۵۳°۳۳′۷″
۲۴	ملایر	۱۸۷۷	۴۸°۴۹′۱۸″	۱۹°۳۴′۳″	۸۴	کرمانشاه	۱۳۱۸	۴°۴۷′۹″	۲۰°۳۴′۴۹″
۲۵	الشتر	۱۶۲۱	۱۵°۴۸′۵۱″	۵۳°۳۳′۷″	۸۵	کرمانشاه	۱۳۱۸	۴°۴۷′۹″	۲۰°۳۴′۴۹″
۲۶	الشتر	۱۶۲۱	۱۵°۴۸′۵۱″	۵۳°۳۳′۷″	۸۶	کرمانشاه	۱۳۱۸	۴°۴۷′۹″	۲۰°۳۴′۴۹″
۲۷	ملایر	۱۸۷۷	۴۸°۴۹′۱۸″	۱۹°۳۴′۳″	۸۷	الشتر	۱۶۲۱	۱۵°۴۸′۵۱″	۵۳°۳۳′۷″
۲۸	خرم اباد	۱۱۸۰	۲۰°۴۸′۱۷″	۲۸°۳۳′۲۶″	۸۸	کرند	۱۶۴۵	۱۴°۴۶′۴″	۱۷°۳۴′۱۷″
۲۹	الشتر	۱۶۲۱	۱۵°۴۸′۵۱″	۵۳°۳۳′۷″	۸۹	ملایر	۱۸۷۷	۴۸°۴۹′۱۸″	۱۹°۳۴′۳″

۳۰	الشتر	۱۶۲۱	۱۵°۴۸′۵۱″	۵۳°۳۳′۷″	۹۰	کرمانشاه	۱۳۱۸	۴°۴۷′۹″	۲۰°۳۴′۴۹″
۳۱	الشتر	۱۶۲۱	۱۵°۴۸′۵۱″	۵۳°۳۳′۷″	۹۱	نهاوند	۱۶۴۱	۲۱°۴۸′۵۶″	۱۲°۳۴′۱۴″
۳۲	نهاوند	۱۶۴۱	۲۱°۴۸′۵۶″	۱۲°۳۴′۱۴″	۹۲	نهاوند	۱۶۴۱	۲۱°۴۸′۵۶″	۱۲°۳۴′۱۴″
۳۳	الشتر	۱۶۲۱	۱۵°۴۸′۵۱″	۵۳°۳۳′۷″	۹۳	نوراباد	۱۷۸۶	۵۸°۴۷′۳۲″	۴°۳۴′۳۶″
۳۴	خرم اباد	۱۱۸۰	۲۰°۴۸′۱۷″	۲۸°۳۳′۲۶″	۹۴	الشتر	۱۶۲۱	۱۵°۴۸′۵۱″	۵۳°۳۳′۷″
۳۵	نهاوند	۱۶۴۱	۲۱°۴۸′۵۶″	۱۲°۳۴′۱۴″	۹۵	کرمانشاه	۱۳۱۸	۴°۴۷′۹″	۲۰°۳۴′۴۹″
۳۶	الشتر	۱۶۲۱	۱۵°۴۸′۵۱″	۵۳°۳۳′۷″	۹۶	کرند	۱۶۴۵	۱۴°۴۶′۴″	۱۷°۳۴′۱۷″
۳۷	نهاوند	۱۶۴۱	۲۱°۴۸′۵۶″	۱۲°۳۴′۱۴″	۹۷	الشتر	۱۶۲۱	۱۵°۴۸′۵۱″	۵۳°۳۳′۷″
۳۸	الشتر	۱۶۲۱	۱۵°۴۸′۵۱″	۵۳°۳۳′۷″	۹۸	خرم اباد	۱۱۸۰	۲۰°۴۸′۱۷″	۲۸°۳۳′۲۶″
۳۹	کرمانشاه	۱۳۱۸	۴°۴۷′۹″	۲۰°۳۴′۴۹″	۹۹	خرم اباد	۱۱۸۰	۲۰°۴۸′۱۷″	۲۸°۳۳′۲۶″
۴۰	هرسین	۱۷۲۴	۳۵°۴۷′۵۸″	۱۷°۳۴′۳۳″	۱۰۰	نهاوند	۱۶۴۱	۲۱°۴۸′۵۶″	۱۲°۳۴′۱۴″
۴۱	الشتر	۱۶۲۱	۱۵°۴۸′۵۱″	۵۳°۳۳′۷″	۱۰	خرم اباد	۱۱۸۰	۲۰°۴۸′۱۷″	۲۸°۳۳′۲۶″
۴۲	نوراباد	۱۷۸۶	۵۸°۴۷′۳۲″	۴°۳۴′۳۶″	۱۰۲	کرند	۱۶۴۵	۱۴°۴۶′۴″	۱۷°۳۴′۱۷″
۴۳	نهاوند	۱۶۴۱	۲۱°۴۸′۵۶″	۱۲°۳۴′۱۴″	۱۰۳	نهاوند	۱۶۴۱	۲۱°۴۸′۵۶″	۱۲°۳۴′۱۴″
۴۴	هرسین	۱۷۲۴	۳۵°۴۷′۵۸″	۱۷°۳۴′۳۳″	۱۰۴	الشتر	۱۶۲۱	۱۵°۴۸′۵۱″	۵۳°۳۳′۷″
۴۵	نهاوند	۱۶۴۱	۲۱°۴۸′۵۶″	۱۲°۳۴′۱۴″	۱۰۵	نهاوند	۱۶۴۱	۲۱°۴۸′۵۶″	۱۲°۳۴′۱۴″
۴۶	الشتر	۱۶۲۱	۱۵°۴۸′۵۱″	۵۳°۳۳′۷″	۱۰۶	هرسین	۱۷۲۴	۳۵°۴۷′۵۸″	۱۷°۳۴′۳۳″
۴۷	کرمانشاه	۱۳۱۸	۴°۴۷′۹″	۲۰°۳۴′۴۹″	۱۰۷	الشتر	۱۶۲۱	۱۵°۴۸′۵۱″	۵۳°۳۳′۷″
۴۸	خرم اباد	۱۱۸۰	۲۰°۴۸′۱۷″	۲۸°۳۳′۲۶″	۱۰۸	خرم اباد	۱۱۸۰	۲۰°۴۸′۱۷″	۲۸°۳۳′۲۶″
۴۹	الشتر	۱۶۲۱	۱۵°۴۸′۵۱″	۵۳°۳۳′۷″	۱۰۹	کرند	۱۶۴۵	۱۴°۴۶′۴″	۱۷°۳۴′۱۷″
۵۰	هرسین	۱۷۲۴	۳۵°۴۷′۵۸″	۱۷°۳۴′۳۳″	۱۱۰	خرم اباد	۱۱۸۰	۲۰°۴۸′۱۷″	۲۸°۳۳′۲۶″
۵۱	الشتر	۱۶۲۱	۱۵°۴۸′۵۱″	۵۳°۳۳′۷″	۱۱۱	الشتر	۱۶۲۱	۱۵°۴۸′۵۱″	۵۳°۳۳′۷″
۵۲	الشتر	۱۶۲۱	۱۵°۴۸′۵۱″	۵۳°۳۳′۷″	۱۱۲	نوراباد	۱۷۸۶	۵۸°۴۷′۳۲″	۴°۳۴′۳۶″
۵۳	نهاوند	۱۶۴۱	۲۱°۴۸′۵۶″	۱۲°۳۴′۱۴″	۱۱۳	الشتر	۱۶۲۱	۱۵°۴۸′۵۱″	۵۳°۳۳′۷″
۵۴	نوراباد	۱۷۸۶	۵۸°۴۷′۳۲″	۴°۳۴′۳۶″	۱۱۴	نوراباد	۱۷۸۶	۵۸°۴۷′۳۲″	۴°۳۴′۳۶″
۵۵	کرند	۱۶۴۵	۱۴°۴۶′۴″	۱۷°۳۴′۱۷″	۱۱۵	الشتر	۱۶۲۱	۱۵°۴۸′۵۱″	۵۳°۳۳′۷″
۵۶	الشتر	۱۶۲۱	۱۵°۴۸′۵۱″	۵۳°۳۳′۷″	۱۱۶	هرسین	۱۷۲۴	۳۵°۴۷′۵۸″	۱۷°۳۴′۳۳″
۵۷	الشتر	۱۶۲۱	۱۵°۴۸′۵۱″	۵۳°۳۳′۷″	۱۱۷	ملایر	۱۸۷۷	۴۸°۴۹′۱۸″	۱۹°۳۴′۳″
۵۸	الشتر	۱۶۲۱	۱۵°۴۸′۵۱″	۵۳°۳۳′۷″	۱۱۸	الشتر	۱۶۲۱	۱۵°۴۸′۵۱″	۵۳°۳۳′۷″
۵۹	نهاوند	۱۶۴۱	۲۱°۴۸′۵۶″	۱۲°۳۴′۱۴″	۱۱۹	کرمانشاه	۱۳۱۸	۴°۴۷′۹″	۲۰°۳۴′۴۹″
۶۰	کرمانشاه	۱۳۱۸	۴°۴۷′۹″	۲۰°۳۴′۴۹″					

جدول ۲- صفات اندازه‌گیری‌شدهٔ میوه و واحد آنها

صفات	واحد	روش اندازه‌گیری				
درصد مغز	درصد					
وزن چوب	گرم	ترازوی دیجیتال				
وزن مغز	گرم	ترازوی دیجیتال				
چروکیدگی مغز	کد	۱- نوک چروکیده	۲- کمتر از ۵۰درصدچروکیده	۳-بیش‌از ۵۰درصدچروکیده	۴- پوک	
اندازهٔ مغز	کد	۱- خیلی ریز	۳- ریز	۵- متوسط	۷- درشت	۹- خیلی درشت
رنگ مغز	کد	۱- خیلی روشن	۳- روشن	۵- متوسط	۷- تیره	
راحتی جداشدن مغز	کد	۱- خیلی راحت	۳- راحت	۵- متوسط	۷- سخت	
گوشتی بودن مغز	کد	۱- ضعیف	۵- متوسط	۷- گوشتی کامل		
تقسیم بندی اولیه و ثانویهٔ غشای دانه	کد	۳- نازک	۵- متوسط	۷- ضخیم		
پربودن مغز	کد	۱- خیلی کم	۳- کم	۵- متوسط	۷- زیاد	۹- خیلی زیاد
میزان سختی دو نیمه‌شدن پوست سخت	کد	۱- خیلی کم	۳- کم	۵- متوسط	۷- زیاد	۹- خیلی زیاد
میزان سهولت جداشدن لپه‌ها	کد	۱- خیلی آسان	۳- آسان	۵- متوسط	۷- مشکل	۹- خیلی مشکل
ضخامت پوست سخت	کد	۱- خیلی نازک	۳- نازک	۵- متوسط	۷- ضخیم	
قطر دانه	میلی‌متر	کولیس دیجیتال				
طول دانه	میلی‌متر	کولیس دیجیتال				
عرض دانه	میلی‌متر	کولیس دیجیتال				
عمق شیار درکناره‌های بالشتک روی درز دانه	کد	۳- کم	۵- متوسط	۷- زیاد		
ضخامت تیغهٔ میانی لپه‌ها	کد	۱- خیلی نازک	۳- نازک	۵- متوسط	۷- ضخیم	۹- زیاد
طرز قرارگیری بالشتک روی درز دانه	کد	۱- روی نیفه بالایی	۲- روی ۳/۲ نیمهٔ بالایی	۳- روی همهٔ طول درز		
میزان نمود بالشتک روی درز دانه	کد	۱- ضعیف	۲- متوسط	۳- شدید		
شکل نوک قاعدهٔ دانه	کد	۱- باریک	۲- گرد	۳- تخت	۴- گود (فرورفته)	
شکل نوک دانه (نقطهٔ انتهایی مادگی)	کد	۱- باریک	۲- گرد	۳- تخت	۴- گود (فرورفته)	
روزنهٔ انتهایی پوست سخت	کد	۱- باز یا دارای پوشش بسیار نازک	۳- دارای پوشش بسیار نازک	۵- پوشش متوسط	۷- پوشش قوی	۸- پوشش خیلی قوی
تضاریس پوست سخت	کد	۱- تضاریس زیاد	۲- تضاریس متوسط	۳- بدون تضاریس		
رنگ پوست دانه	کد	۱- خیلی روشن	۳- روشن	۵- متوسط	۷- تیره	۹- خیلی تیره
ساختار سطحی دانه	کد	۱- کمی شیاردار	۲- شیاردار متوسط	۳- شیاردار شدید	۴- خط برجسته	
بافت پوست	کد	۱- خیلی صاف	۲- صاف	۵- متوسط	۷- ناصاف	۹- خیلی ناصاف
شکل دانه	کد	۱- گرد ۲- مثلثی ۳- تخم مرغی	۴- تخم مرغی ۵- ذوزنقه کوتاه	۶- ذوزنقهٔ کشیده	۷- بیضوی پهن	۸- بیضوی ۹- قلبی
وزن یک دانه	گرم	ترازوی دیجیتال				

جدول ۳- فهرست ژنوتیپ‌های برتر و انتخاب‌شده از ارزیابی مورفولوژیک گردو برای بررسی خویشاوندی ژنتیکی آنها با نشانگر RAPD

ردیف	منطقهٔ جمع‌آوری	کد ژنوتیپ- مورفولوژیک	ردیف	منطقهٔ جمع‌آوری	کد ژنوتیپ- مورفولوژیک
۱	الشتر	۱۹	۲۶	کرمانشاه	۴۱
۲	خرم‌آباد	۱۳	۲۷	الشتر	۳
۳	الشتر	۹۷	۲۸	ملایر	۲۲
۴	هرسین	۴۰	۲۹	الشتر	۱۱۳
۵	ملایر	۸۹	۳۰	الشتر	۵
۶	نورآباد	۱۱۱	۳۱	الشتر	۸۳
۷	نورآباد	۵۴	۳۲	کرمانشاه	۶۶
۸	کرمانشاه	۱۱۹	۳۳	کرمانشاه	۷۸
۹	نهاوند	۴۵	۳۴	کرند	۸۸
۱۰	نورآباد	۷۹	۳۵	کرمانشاه	۶۷
۱۱	الشتر	۵۲	۳۶	نورآباد	۶۵
۱۲	الشتر	۲۶	۳۷	نورآباد	۶۱
۱۳	نهاوند	۷۰	۳۸	الشتر	۴۹
۱۴	کرمانشاه	۶۹	۳۹	نورآباد	۷۵
۱۵	ملایر	۸۲	۴۰	هرسین	۷۱
۱۶	نهاوند	۴۳	۴۱	الشتر	۱۹
۱۷	خرم‌آباد	۱۰۱	۴۲	هرسین	۴۷
۱۸	هرسین	۸۱	۴۳	الشتر	۵۷
۱۹	کرند	۱۰۴	۴۴	خرم‌آباد	۴۲
۲۰	نهاوند	۳۵	۴۵	نهاوند	۳۷
۲۱	هرسین	۷۳	۴۶	نورآباد	۵۴
۲۲	الشتر	۳۱	۴۷	نهاوند	۵۳
۲۳	نهاوند	۱۰۰	۴۸	الشتر	۲۹
۲۴	الشتر	۱۱۵	۴۹	کرند	۹۶
۲۵	هرسین	۶۸	۵۰	کرمانشاه	۳۹

جدول ۴- توالی آغازگرهای RAPD استفاده‌شده در پژوهش حاضر

نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال (درجهٔ سانتی‌گراد)	منبع
OPA-05	AGG AAT CTT G	۳۷	Ahmed *et al*., 2012
OPA-02	TGC CGA GCT G	۳۷	Singh *et al*., 2014
OPA-09	GGG TAA CGC C	۳۷	Singh *et al*., 2014
OPA-13	CAG CAC CCA C	۳۷	Ahmed *et al*., 2012
OPA-16	AGC CAG CGA A	۳۷	Singh *et al*., 2014
OPA-18	AGG TGA CCG T	۳۷	Singh *et al*., 2014
OPB-06	TGC TCT GCC C	۳۷	Singh *et al*., 2014
OPB-14	TCC GCT CTG G	۳۷	Singh *et al*., 2014
CUSTOMPRIMER	CGC ACC GCA G	۳۷	Singh *et al*., 2014
UBC-43	AAA ACC GGG C	۳۷	Ahmed *et al*., 2012
UBC-292	AAA CAG CCC G	۳۷	Ahmed *et al*., 2012
UBC-691	AAA CCA GGC G	۳۷	Ahmed *et al*., 2012
UBC-429	AAA CCT GGA C	۳۷	Ahmed *et al*., 2012

۰/۲ واحد بر میکرومولار) و ۳ میکرولیتر آب استریل‌شده با دستگاه ترموسایکلر (مدل AG، شرکت Eppendorf، آلمان) بود. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با برنامهٔ شیب دمایی به‌صورت یک چرخهٔ دمایی ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه برای واسرشت‌سازی اولیهٔ DNA الگو، ۴۰ چرخهٔ دمایی ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، یک دقیقه دمای اتصال ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و دمای تکثیر ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد به‌مدت ۲ دقیقه و درنهایت، چرخه‌ای به‌مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد برای تکثیر نهایی انجام شد. پس از انجام واکنش، به محصول PCR، ۵ میکرولیتر بافر بارگذاری (Loading dye)، اضافه و درنهایت، ۱۲ میکرولیتر محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد به‌مدت ۱۲۰ دقیقه با ولتاژ ۹۰ ولت الکترفورز شد. رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید انجام و باند حاصل‌شده به‌صورت صفر و یک نام‌گذاری شد و داده‌های حاصل با برنامهٔ NTSYS-pc تجزیه شدند. همچنین محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) براساس دستورالعمل Anderson و همکاران (۱۹۹۳) با نرم‌افزار Excel برآورد شد.

نتایج و بحث

ارزیابی کلی صفات میوه: مقادیر کمینه، بیشینه، میانگین، انحراف معیار و شاخص تنوع فنوتیپی برای هر یک از صفات در جدول ۵ آمده است. بین صفات اندازه‌گیری‌شده، بیشترین درصد تنوع فنوتیپی، مربوط به صفت چروکیدگی مغز با مقدار ۱۱۴/۰۲ بود که نشان‌دهندهٔ اختلاف زیادی بین ژنوتیپ‌های بررسی‌شده، از لحاظ گوشتی‌بودن مغز و چروک‌بودن آنها است. علاوه‌برآن، شکل دانه هم درصد تنوع زیادی داشت. بین همهٔ صفات، کمترین مقدار شاخص تنوع فنوتیپی مربوط به عرض دانه با ۸/۶۸ درصد و پس از آن، مربوط به طول و قطر دانه بود. وضعیت روزنهٔ انتهایی میوه یکی از صفات مهم در نگهداری و انبارداری محصولات گردو است. گردوهای دارای روزنهٔ باز ضمن احتمال آلودگی با قارچ‌ها، هنگام انبارداری با حملهٔ حشرات مواجه می‌شوند و در زمان کاشت دانه نیز در خزانه به‌علت ورود آب زیاد به درون دانه با قارچ‌ها و کپک‌زدگی آسیب می‌بینند. وجود روزنه در دانه، سهولت در شکستگی پوستهٔ سخت را باعث می‌شود و هنگام حمل‌ونقل میوه، دانه به‌آسانی به دو نیم تقسیم یا مغزش خارج می‌شود (Forde and McGranahan, 1993). شاخص تنوع فنوتیپی برای این صفت ۴۹/۵۰ درصد است و بیان می‌کند که از لحاظ باز و بسته‌بودن روزنهٔ انتهایی میوه، تنوع زیادی بین ژنوتیپ‌ها وجود دارد. Ebrahimi و همکاران (۲۰۰۹) شاخص تنوع را برای روزنهٔ انتهایی میوه، ۶۳ درصد بیان کردند و آن را به‌دلیل تنوع زیاد بین ژنوتیپ‌ها در این صفت گزارش کردند. وزن دانه و وزن مغز از صفات بسیار مهم در گردو هستند که دامنهٔ تغییرات این صفات برای وزن دانه از ۷ تا ۱۹/۸۰ گرم و وزن مغز از ۲/۸۰ تا ۹/۲۰ گرم متغیر بود و میزان شاخص تنوع به دست‌آمده در این دو صفت به‌ترتیب ۱۸/۷۲ و ۲۰/۱۶ درصد بود که نشان می‌دهد میزان تغییرات وزن دانه و وزن مغز نسبتا زیاد است که این نتایج با آمار Ebrahimi

جدول ۵- ویژگی‌های کلی صفات بررسی‌شده در ژنوتیپ‌های گردو

صفت	کمینه	بیشینه	میانگین	انحراف معیار	شاخص تنوع فنوتیپی درصد
وزن یک دانه (گرم)	۷	۱۹/۸۰	۱۱/۹۰	۲/۲۲	۱۸/۷۲
شکل دانه	۱	۹	۴/۴۴	۲/۶۷	۶۰/۱۴
بافت پوست	۱	۹	۴/۱۰	۱/۳۱	۳۲/۱۲
ساختار سطحی دانه	۱	۴	۲/۰۲	۰/۸۱	۴۰/۳۸
رنگ پوست سخت	۱	۹	۴/۳۱	۱/۴۹	۳۴/۷۹
تضاریس پوست سخت	۱	۳	۲/۱۰	۰/۵۶	۲۶/۷۵
روزنهٔ انتهایی پوست سخت	۱	۹	۵/۵۱	۲/۵۴	۴۹/۵۰
شکل نوک دانه (نقطهٔ انتهایی مادگی)	۱	۴	۲/۳۳	۰/۶۷	۲۹/۱۰
شکل نوک قاعدهٔ دانه	۱	۴	۲/۲۴	۰/۸۱	۲۲/۳۶
میزان نمود بالشتک روی درز دانه	۱	۷	۳/۹۳	۱/۴۴	۸۲/۳۶
طرز قرارگیری بالشتک روی درز دانه	۱	۳	۲/۰۵	۰/۷۳	۳۵/۹۳
ضخامت تیغهٔ میانی لپه‌ها	۱	۸	۴/۲۱	۱/۲۸	۳۰/۵۹
عمق شیاردرکناره‌های بالشتک روی درز دانه	۱	۷	۲/۹۰	۱/۲۱	۴۱/۶۷
عرض دانه (سانتی‌متر)	۲/۳۸	۳/۸۰	۳/۲۳	۰/۲۸	۸/۶۸
طول دانه (سانتی‌متر)	۲/۷۵	۴/۸۶	۳/۶۹	۰/۳۷	۱۰/۰۷
قطر دانه (سانتی‌متر)	۲/۶۵	۴/۲۰	۳/۳۷	۰/۳۰	۹/۱۷
ضخامت پوست سخت	۱	۷	۳/۴۶	۱/۶۷	۴۸/۴۱
میزان سهولت جداشدن لپه‌ها	۱	۹	۴/۱۹	۲/۴۳	۵۸/۱۰
میزان سختی دونیمه‌شدن پوست سخت	۱	۹	۳/۸۷	۲/۰۲	۵۲/۳۳
پربودن مغز	۲	۹	۶/۵۱	۱/۷۳	۲۶/۶۶
تقسیم‌بندی اولیه و ثانویهٔ غشای دانه	۱	۷	۳/۸۶	۱/۶۸	۴۳/۵۱
گوشتی‌بودن مغز	۲	۷	۴/۸۴	۱/۲۷	۲۶/۲۵
راحتی جداشدن مغز	۱	۷	۲/۸۹	۱/۶۹	۵۸/۶۱
رنگ مغز	۱	۷	۳/۸۹	۱/۳۰	۳۳/۴۵
اندازهٔ مغز	۲	۸	۴/۹۰	۱/۲۳	۲۵/۱۶
چروکیدگی مغز	۰	۳	۰/۸۱	۰/۹۲	۱۱۴/۰۲
وزن مغز (گرم)	۲/۸۰	۹/۲۰	۵/۸۳	۱/۲۰	۲۰/۶۱
وزن چوب (گرم)	۳	۱۱/۳۰	۶/۰۴	۱/۴۰	۲۳/۳۱
درصد مغز	۳۰/۱۱	۶۲/۷۵	۴۹/۱۳	۵/۵۷	۱۱/۷۰

و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت دارد. همچنین Rezaei و همکاران (۲۰۰۸) در ارزیابی توده‌های ارومیه، وزن میوه و مغز ژنوتیپ‌های برتر را به‌ترتیب از ۱۰/۳ تا ۱۶ و ۵/۵ تا ۷/۲ گزارش کردند که نسبت به مقادیر به دست‌آمده از پژوهش حاضر کمتر هستند. رنگ مغز و راحتی جدا شدن از صفات مهم در بازارپسندی گردو هستند که میانگین‌های به دست‌آمده برای این دو صفت به‌ترتیب ۳/۸۹ و

۲/۸۹ هستند که نشان می‌دهند بیشتر ژنوتیپ‌ها مغزی به رنگ روشن با ویژگی سهولت جداشدن داشته‌اند؛ اگرچه مردم آمریکا رنگ کهربایی را بیشتر می‌پسندند (McGranahan *et al.*, 1998). ژنوتیپ‌هایی که Arzani و همکاران (۲۰۰۸) معرفی کردند نیز مغز روشن با ویژگی سهولت جداشدن داشتند. بین ژنوتیپ‌های ارزیابی‌شده در پژوهش حاضر، بیشترین درصد مغز مربوط به ژنوتیپ ۱۵ با مقدار ۶۲/۷۵ درصد و کمترین آن مربوط به ژنوتیپ ۶۴ با مقدار ۳۰/۱۰ درصد بود. در بررسی انجام‌شده بر ژنوتیپ‌های گردو درمنطقهٔ هیماچال پرادش هندوستان، بیشترین درصد مغز، ۶۲/۵ گزارش شده است که از مقدار به دست‌آمده در بررسی حاضر کمتر بوده است (Sharma and Sharma, 2001).

تجزیهٔ مولکولی با نشانگر RAPD: نتایج آزمایش دوم نشان داد همهٔ آغازگرهای استفاده‌شده، مقدار زیادی از چندشکلی را بین همهٔ ژنوتیپ‌های بررسی‌شده نشان دادند. همهٔ ۱۳ آغازگر استفاده‌شده، باند چندشکل روی ژنوتیپ‌ها ایجاد کردند و درمجموع، ۸۴ باند روی ژل آگارز مشخص شدند. نتایج به دست‌آمده از این بخش، اطلاعات کافی را برای تشخیص و تفکیک ژنوتیپ‌ها از یکدیگر فراهم کردند. مقدار زیاد تنوع گردو ممکن است به درجهٔ زیاد هتروزیگوتی آن نسبت داده شود. تعداد کل باند برای هر آغازگر از ۴ تا ۱۱ باند و حدود اندازهٔ قطعات تولیدشده نیز از ۱۴۰ تا ۲۵۰۰ جفت باز متغیر بود. میزان اطلاعات چند شکلی، یکی از شاخص‌های مهم برای مقایسهٔ آغازگرهای مختلف از لحاظ قدرت آن‌ها برای تفکیک ژنوتیپ‌ها است. در پژوهش حاضر، همهٔ آغازگرهای استفاده‌شده، چندشکلی زیادی بین نمونه‌های بررسی‌شده نشان دادند. تعداد باند تولیدشده برای هر آغازگر و ارزش محتوی چندشکلی مشاهده‌شده در جدول ۶ آمده است. نتایج نشان دادند بیشتر آغازگرهای استفاده‌شده، شاخص تنوع زیادی دارند و بیان‌کنندهٔ کارایی آنها در تفکیک ژنوتیپ‌ها از همدیگر هستند. بین آغازگرهای استفاده‌شده در بررسی حاضر، دو آغازگر OPA-18 و OPB-14 با درصد چندشکلی کمتر از ۰/۶۰، کمترین مقدار تنوع را در نمونه‌های گردو نشان دادند.

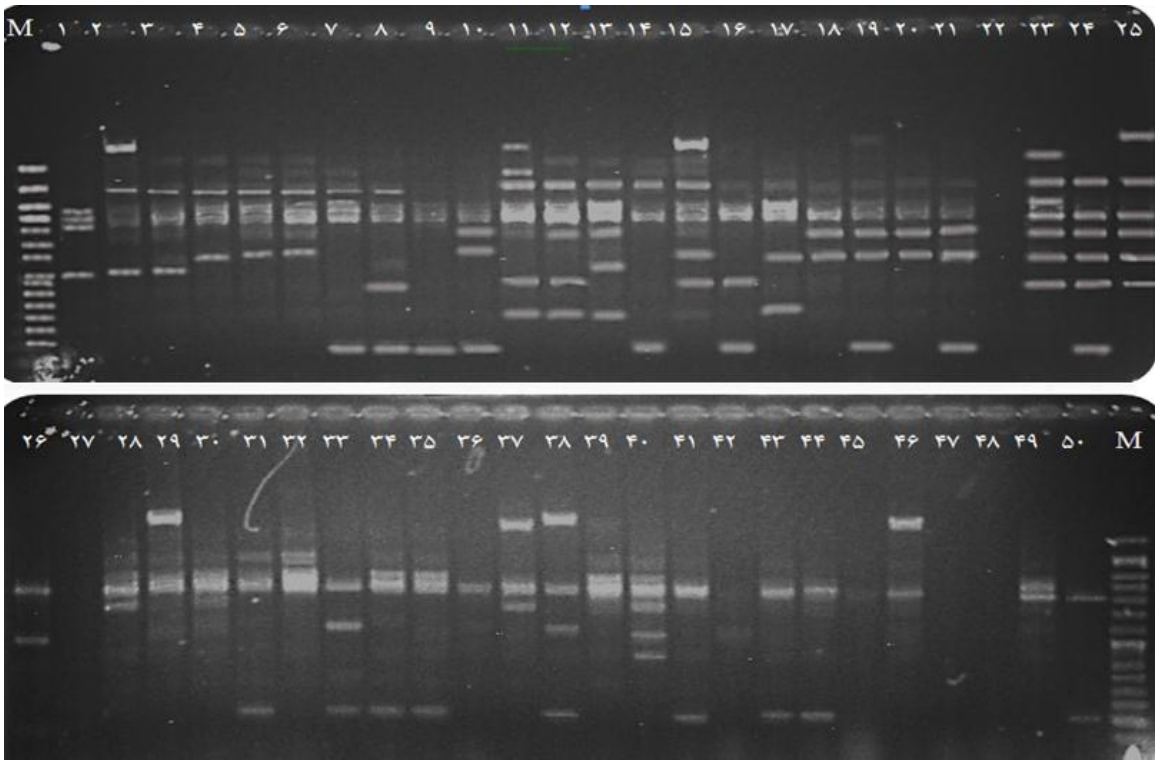
میانگین تعداد آلل مشاهده‌شده برای آغازگرهای RAPD، ۶/۶۹ است که بیشترین تعداد آلل برای آغازگر OPA-09، ۱۱ آلل و کمترین تعداد برای آغازگر OPA-18، ۴ آلل به دست آمد. میانگین تعداد آلل‌های موثر ۵/۱۰ آلل برآورد شد. باوجوداینکه آغازگر OPA-09 بیشترین تعداد آلل را داشت؛ ولی بیشترین درصد ارزش محتوای اطلاعات چندشکلی، مربوط به آغازگر CUSTOMPRIMER و ۹۳ درصد بود که این مسئله به تعداد آلل مؤثر برای هر آغازگر مربوط می‌شود. یکی دیگر از معیارهای تنوع ژنتیکی ضریب شانون (I) است که این ضریب برای کل آغازگرها به‌طور متوسط ۱/۶۶ ثبت شد. بیشترین مقدار آن برای آغازگر OPA-09 و کمترین مقدار آن مربوط به آغازگر OPA-18 است. Nicese و همکاران (۱۹۹۸) با ۷۲ آغازگر RAPD روی ۱۹

جدول ۶- شاخص‌های ژنتیکی محاسبه‌شده برای آغازگرهای RAPD در بررسی ژنوتیپ‌های گردو

ردیف	نام آغازگر	تعداد آلل مشاهده‌شده (Na)	تعداد آلل موثر (Ne)	ضریب اطلاعات شانون (I)	Polymorphism Information Content (PIC)
۱	OPA-05	۸	۶/۰۳	۱/۸۷	۰/۸۴
۲	OPA-02	۸	۶/۶۹	۲/۲۸	۰/۹۰
۳	OPA-09	۱۱	۹/۴۵	۳/۲۰	۰/۹۰
۴	OPA-13	۴	۲/۵۴	۰/۷۰	۰/۷۷
۵	OPA-16	۵	۴/۰۴	۱/۳۷	۰/۶۶
۶	OPA-18	۴	۳/۱۰	۰/۹۷	۰/۵۹
۷	OPB-06	۶	۵/۱۵	۱/۷۵	۰/۷۳
۸	OPB-14	۵	۳/۶۹	۱/۱۶	۰/۵۷
۹	CUSTOMPRIMER	۱۰	۷/۹۱	۲/۵۰	۰/۹۳
۱۰	UBC-43	۶	۴/۹۱	۱/۶۳	۰/۷۵
۱۱	UBC-292	۵	۳/۴۴	۱/۰۳	۰/۶۴
۱۲	UBC-691	۷	۵/۳۰	۱/۷۶	۰/۸۱
۱۳	UBC-429	۵	۴/۰۴	۱/۳۹	۰/۶۳
	میانگین	۶/۴۶	۵/۱۰	۱/۶۶	۰/۷۵

ژنوتیپ گردو درمجموع، ۲۳ باند چندشکل را گزارش و بیان کردند که نشانگر RAPD می‌تواند به اندازهٔ کافی، چندشکلی را بین ژنوتیپ‌های گردو تشخیص دهد. Ahmed و همکاران (۲۰۱۲)، ۸۲ ژنوتیپ بذری گردو را بررسی کردند و با به‌کارگیری ۲۰ آغازگر RAPD روی آنها، مقدار چندشکلی را ۴۹ درصد اعلام کردند. همچنین تعداد کل باندهای مشاهده‌شده را ۶۲ عدد و اندازهٔ باند را در محدودهٔ ۱۵۰ تا ۱۵۰۰ باز گزارش کردند. Erturk و Dalkilic (۲۰۱۱) با ۴۵ آغازگر RAPD روی ۸ ژنوتیپ گردو، درمجموع توانستند ۵۱۳ باند را روی ژل آگارز مشاهده کنند که از این تعداد، ۳۴۰ باند، چندشکل و اندازهٔ آنها در محدودهٔ ۲۰۰ تا ۵۰۰۰ باز بودند. Xu و همکاران (۲۰۱۲) با کاربرد ۲۳ آغازگر RAPD بر ۳۵ ژنوتیپ گردو که از ۸ منطقه جمع‌آوری شده بودند، محدودهٔ اندازهٔ آلل‌ها را بین ۱۸۰ تا ۲۰۰۰ گزارش کردند و نتیجه گرفتند که آغازگرهای استفاده‌شده، ۸۶/۱ درصد، چندشکلی دارند. الگوی تکثیر آغازگر CUSTOMPRIMER در ۵۰ نمونهٔ ژنوتیپ بذری گردو در شکل ۱ نشان داده شده‌اند.

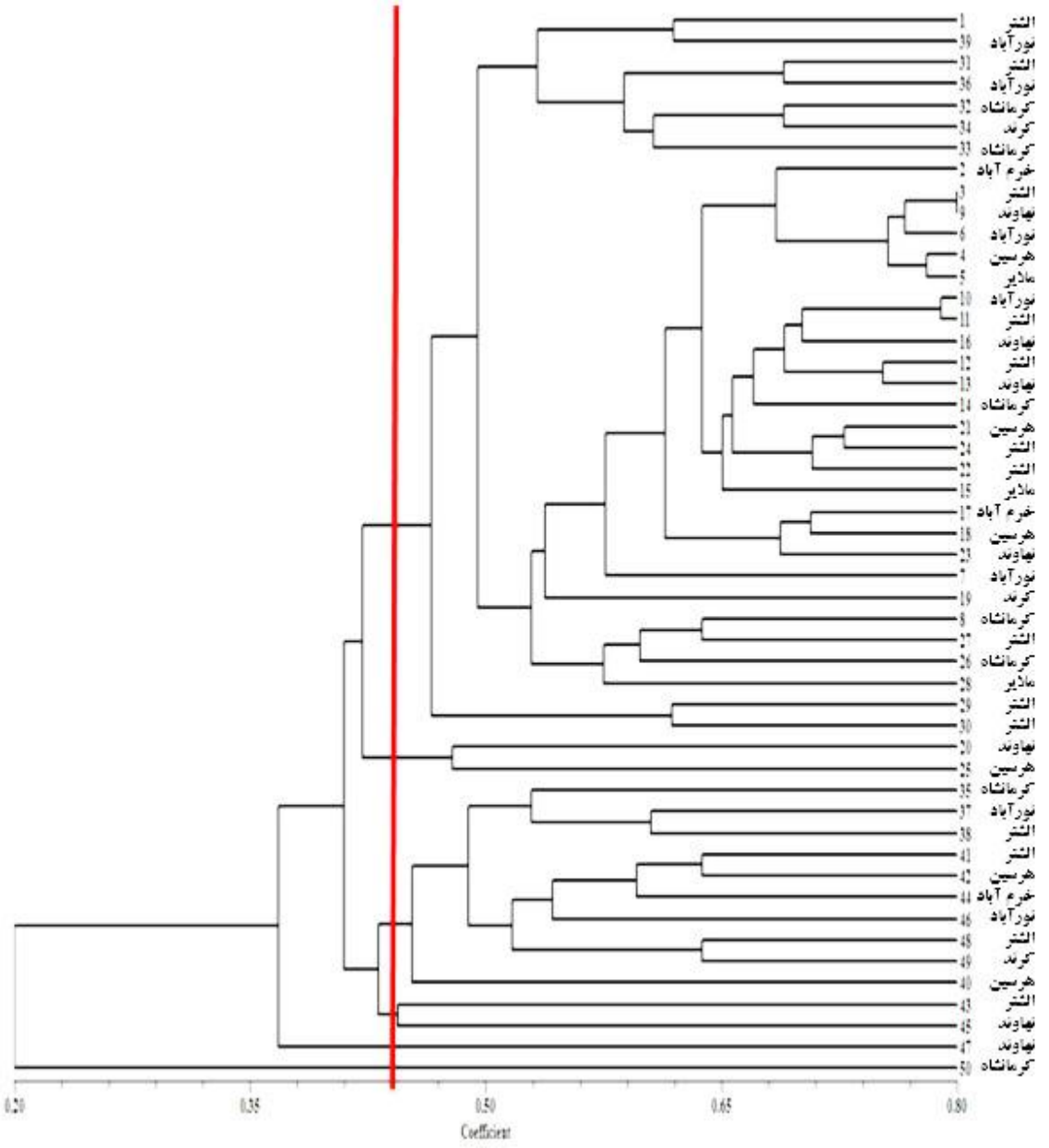
ماتریس تشابه جاکارد بین ژنوتیپ‌های گردو از داده‌های RAPD محاسبه شد. بیشترین تشابه ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های ۹ و ۳ با مقدار ۰/۷۹ و کمترین تشابه بین ژنوتیپ‌های ۲۲ و ۵۰ با مقدار ۰/۰۸ مشاهده شد. براساس دندروگرام به دست‌آمده از ماتریس تشابه جاکارد، ژنوتیپ‌های بررسی‌شده در فاصلهٔ تقریبا ۰/۴۶ به ۵ گروه تقسیم شدند (شکل ۲). در این بین، گروه ۱ با ۳۴ نمونه بیشترین تعداد ژنوتیپ را داشت. گروه‌های ۵ و ۶ هر کدام ۱



شکل ۱- الگوی تکثیر باندی در ۵۰ نمونهٔ ژنوتیپ بذری گردو با آغازگر CUSTOMPRIME

ژنوتیپ را در خود جای دادند و گروه سوم شامل دو ژنوتیپ ۲۰ و ۲۵ بود. نمونهٔ ۳ و ۹ بیشترین شباهت را به هم داشتند. باتوجه‌به نتایج به دست‌آمده از تجزیهٔ خوشه‌ای و جدول ضریب تشابه ژنتیکی جاکارد، ژنوتیپ ۵۰ که از شهر کرمانشاه جمع‌آوری شده بود، خود به‌تنهایی در گروه پنجم قرار گرفت که با ژنوتیپ‌های بررسی‌شده، تفاوت ژنتیکی زیادی را نشان داد.

Ebrahimi و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی ۳۱ ژنوتیپ و چهار رقم خارجی گردو با نشانگرهای ریزماهواره با تشابه دایس و روش UPGAM در فاصلهٔ ژنتیکی ۰/۱، ژنوتیپ‌ها را به چهار گروه اصلی تقسیم‌بندی کردند. Fatahi و همکاران (۲۰۱۰) در پژوهش خود بر ۳۵ ژنوتیپ گردو با ۱۴ آغازگر RAPD براساس مقدار تشابه ژنتیکی جاکارد و روش UPGAM، کمترین و بیشترین تشابه را به‌ترتیب ۰/۲۷ و ۰/۸۷ گزارش کردند. همچنین در فاصلهٔ ژنتیکی ۰/۰۱، ژنوتیپ‌ها در ۵ گروه اصلی قرار گرفتند. Xu و همکاران (۲۰۱۲) در بررسی ۳۵ ژنوتیپ گردو با ۳۲ آغازگر RAPD براساس ضریب تشابه جاکارد، در فاصلهٔ ۰/۳۴، ژنوتیپ‌ها را به سه گروه اصلی تقسیم کردند. Ehteshamnia و همکاران (۲۰۱۰) باتوجه‌به دندروگرام حاصل از تجزیهٔ خوشه‌ای اطلاعات ۱۱ نشانگر ریزماهواره، در ژنوتیپ‌های گردوی ایرانی با ضریب تشابه نی و با روش گروه‌های غیروزنی جفت‌شده، ژنوتیپ‌های بررسی‌شده را به ۶ گروه تقسیم کردند. Ahmed و همکاران (۲۰۱۲) با



شکل۲- دندروگرام به دست‌آمده از تجزیهٔ خوشه‌ای بین ژنوتیپ‌های گردو براساس ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA با داده‌های نشانگر RAPD

بررسی ۸۲ ژنوتیپ گردو و به کارگیری ۱۳ نشانگر SSR و ۲۰ نشانگر RAPD، با کلاستر به دست‌آمده از روش ضریب تشابه جاکارد، ژنوتیپ‌ها را در ۴ گروه اصلی قرار دادند. در پژوهشی، تنوع درون‌گونه‌ای در پستهٔ وحشی براساس الگوهای پروتئینی بررسی شد و سه جمیعت بررسی‌شده از همدیگر به‌خوبی تفکیک شدند (Seyedi *et al.*, 2010). نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان دادند که ۹ مؤلفهٔ اصلی، حدود ۷۱/۲۱ درصد از واریانس داده‌های مولکولی را توجیه می‌کنند (جدول ۷).

جدول ۷- مقادیر ویژهٔ واریانس و درصد تجمعی واریانس به دست‌آمده از ۹ عامل اصلی در بررسی تنوع ژنوتیپ‌های گردو با نشانگر RAPD

عامل	مقادیر ویژه	واریانس (درصد)	واریانس تجمعی (درصد)
۱	۲۴/۵۱	۴۹/۰۲	۴۹/۰۲
۲	۲/۸۷	۵/۷۵	۵۴/۷۷
۳	۱/۷۰	۳/۴۱	۵۸/۱۹
۴	۱/۵۰	۳	۶۱/۱۹
۵	۱/۱۱	۲/۲۳	۶۳/۴۳
۶	۱/۰۸	۲/۱۸	۶۵/۶۱
۷	۱	۲/۰۱	۶۷/۶۳
۸	۱/۹۳	۱/۸۶	۶۹/۴۹
۹	۰/۸۹	۱/۷۹	۷۱/۲۸

نخستین مولفه، خود به‌تنهایی ۴۹/۰۲ درصد از واریانس کل را توجیه کرد. Ehteshamnia و همکاران (۲۰۱۰) در بررسی تنوع ژنتیکی ۹۶ ژنوتیپ از ۵ تودهٔ طبیعی گردوی ایرانی با ۱۱ مکان ژنی ریزماهواره، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی را براساس ماتریس تشابه به دست‌آمده از ضریب تشابه نی انجام دادند. آنها گزارش کردند که ۴۰ مؤلفهٔ اصلی، حدود ۹۶ درصد از واریانس داده‌های مولکولی را توجیه می‌کنند. این نشان می‌دهد نشانگرهای ریزماهوارهٔ مطالعه، در قسمت‌های مختلف ژنوم پراکنده هستند.

پراکنش ژنوتیپ‌ها در فضای مختلف بای‌پلات نشان‌دهندهٔ تنوع ژنتیکی زیاد بین آنها است و همچنین تجمع افراد در یک ناحیه از پلات، نشان‌دهندهٔ تشابه ژنتیکی آن افراد است. در بررسی حاضر، تجزیهٔ بای‌پلات با دو عامل اصلی اول و دوم انجام شد که به‌ترتیب، ۴۹/۰۲ و ۵/۷۵ درصد از واریانس کل را توجیه کرده بودند (شکل ۳). براساس مقدار زیاد برای عامل اول و دوم، ژنوتیپ‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۱، ۲۲، ۲۳ و ۲۴ در گروه اول در قسمت بالا سمت راست بای پلات جای گرفتند. .نمونه‌های ۴۵، ۴۳، ۴۰، ۴۷، ۳۱، ۲۳، ۳۳، ۳۵، ۳۵، ۳۶، ۳۷، ۳۸، ۳۹، ۴۰، ۴۱، ۴۲، ۴۴، ۴۶، ۴۸ و ۴۹ کمترین مقدار را برای مؤلفهٔ دوم ولی مقدار زیاد را برای مؤلفهٔ اول دارند و در گروه دوم قرار گرفتند. ژنوتیپ ۵۰ با کمترین مقدار برای مؤلفهٔ اول و با قرارگرفتن روی محور عامل دوم، خود به‌تنهایی در یک گروه جداگانه (گروه سوم) جای گرفت. نتایج حاصل از تجزیهٔ بای پلات با نتایج حاصل از تجزیهٔ خوشه‌ای به دست آمده از ضریب تشابه جاکارد مطابقت زیادی را نشان داد. Ehteshamnia و همکاران (۲۰۱۰) باتوجه‌به دیاگرام پراکنش متغیرها براساس مولفهٔ اول و دوم گزارش کردند که مؤلفهٔ اول شامل تأثیرگذارترین متغیرها بود که بیشترین درصد از تغییرات (۱۱/۳۹ درصد) را توجیه می‌کند. همچنین مطابق با گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در دندروگرام، ژنوتیپ ها را براساس مؤلفه‌های اصلی اول و دوم در ۶ دستهٔ متفاوت قرار دادند.

جمع‌بندی

نتایج ارزیابی ژنوتیپ‌های گردو براساس ویژگی‌های مورفولوژیک میوه و نشانگر RAPD در پژوهش حاضر نشان دادند که تنوع ژنتیکی بسیار زیادی بین ژنوتیپ‌های بررسی‌شده وجود دارند که

می‌توانند مواد ژنتیکی مناسب برای پژوهش‌های اصلاحی این گیاه در آینده باشند. این تنوع زیاد می‌تواند به‌دلیل ماهیت دگرگشن‌بودن این گونهٔ گیاهی و همچنین ازدیاد بذری این گیاه باشد. نتایج مربوط به ازریابی ۱۱۹ ژنوتیپ گردو نشان دادند بین ژنوتیپ‌های ارزیابی‌شده در پژوهش حاضر، ژنوتیپ‌های ۵ (الشتر)، ۱۰۴ (الشتر)، ۸۹ (ملایر)، ۲۲ (ملایر)، ۶۶ (کرمانشاه) و ۹۷ (الشتر) میوه‌های بزرگتر و با کیفیت بیشتر (درصد مغز بیشتر، گوشتی‌بودن مغز، رنگ کهربایی، جداشدن راحت‌تر مغز از دانه) داشتند که می‌توان آنها را به‌صورت رویشی تکثیر کرد و گسترش داد یا نتایج به دست‌آمده از بخش مولکولی پژوهش حاضر را در برنامهٔ اصلاح این محصول استفاده کرد. واکنش PCR با ۱۳ آغازگر RAPD بر ۵۰ ژنوتیپ بذری گردو نشان داد که همهٔ ۱۳ آغازگر استفاده‌شده، باند چندشکل روی ژنوتیپ‌ها ایجاد کردند و درمجموع، ۸۴ باند روی ژل آگارز مشخص شدند. نتایج به دست‌آمده از این بخش، اطلاعات کافی برای تشخیص و تفکیک ژنوتیپ‌ها را از یکدیگر فراهم کردند.

سپاسگزاری

هزینه‌های پژوهش حاضر از محل اعتبارات پژوهشی دانشگاه ایلام تامین شده‌اند. دراینجا نگارندگان مراتب سپاسگزاری خود را اعلام می‌کنند.

منابع

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: An International Journal of Functional Plant Biology 18(2): 149–160.

Aleta, N. and Ninot, A. (1993) Exploration and evaluation of Spanish native walnut (*Juglans regia L.*) population from Catalonia and Galicia. Acta Horticulturae 311: 17-23.

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. HortScience 27(1): 61-63.

Anderson, A., Churchill, G. A., Autrique, J. E., Tanksley, S. D. and Sorrells, M. E. (1993) Optimizing parental selection for genetic linkage maps. Genome 36: 181-186.

Arzani, K., Mansouri Ardakan, H. and Vezvaei, A. (2008) Morphological variation among persian walnut (*Juglans regia*) genotype from central Iran. New Zealand Journal of Cropand Horticulteral Science 36: 159-168.

Beede, R. H. and Hasey, J. K. (1998) The history of the walnut in California. In: Walnut production manual (Ed. Ramos, D. E.) 8-15. University of California. Division of Agriculture and Natural Resources. Publication 3373, California.

Charles, A., Leslie, C. A. and McGranahan, G. H. (1998) The origin of the walnut. In: Walnut production manual (Ed. Ramos, D. E.) 3-7. University of California. Division of Agriculture and Natural Resources. Publication 3373, California.

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

Ebrahimi, A., Fattahi Moghaddam, M. R., Zamani, Z., Vahdati, K. (2009) An investigation on genetic diversity of 608 persian walnut accessions for screening of some genotypes of superior traits. Iranian Journal of Horticultural Sciences 4: 83-94 (in Persian).

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 Production 17: 15-38 (in Persian).

Erturk, U. and Dalkilic, Z. (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.

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.

Ferhatoglu, Y. (1993) The characteristics of walnut cultivars obtained through selection. Acta Horticulturae 311: 34-36.

Forde, H. I. (1975) Walnuts. In: Advances in Fruit (Eds. Janick, J. and Moore, J. R.) 439-455. Purdue University Press, West Lafayette, Indiana.

Forde, H. I. and McGranahan, G. H. (1993) A new walnut cultivar Malizia. John Wiley and Sons, New Jersey.

Fornari, B., Malvolti, M. E., Taurchini, D., Fineschi, S., Beritognolo, I., McCaglia, E. and Cannata, F. (2001) Isozyme and organellar DNA analysis of genetic diversity in natural/naturalised European and Asiatic walnut (*Juglans regia*) populations. Acta Horticulturae 544: 167-178.

Goldstein, D. B. and Schlotterer, C. (1999) Microsatellites: evolution and applications. Oxford University Press. NewYork.

Lansari, A., Hassani, E. and Nabil, D. (2001) Preliminary results on walnut germplasm evaluation in Morocco. Acta Horticulturae 504: 27-35.

McGranahan, G. and Leslie, C. (1990) Walnuts (*Juglans*). In: Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops (Eds. Moore, J. N. and Balington, J. R.) 907–951. Wageningen University. Wageningen.

McGranahan, G. H., Charles, A., Leslie, C. A., Philips, H. A. and Dandaker, A. (1998) Propagation. In: Walnut production manual (Ed. Ramos, D. E.) 71-83. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources. Publication 3373, California.

Nas, M. N., Mutlu, N. and Read, P. E. (2004) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of long-term cultured hybrid hazelnut. HortScience 39: 1079-1082.

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, cp DNA and RAPD. HortScience 38: 1178-1183.

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: 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 Society for Horticultural Science 127: 75-81.

Radnia, H. (1996) Rootstock for Fruit Crops. Agriculture Education Press, Karaj (Translated in Persian).

Rezaei, R., Hasani, G., Hassani, D. and Vahdati, K. (2008) Morphobiological characteristics of some newly selected walnut genotypes from seedling collection of Kahriz – Orumia. Journal of Horticultural Science and Technology 9(3): 205-214 (in Persian).

Seyedi, N., Jalali, S. G. A., Moghaddam, M., Tabari, M. and Mohammadi, S. A. (2010) Application of seed storage protein in intra-specific variation in three population of *Pistacia atlantica* desf. Journal of Plant Biology 2: 1-14.

Sharma, S. H. and Sharma, O. C. (2001) Studies on variation in nut and kernel characters and selection of superior walnut seedlings (*Juglans regia* L.) from Garsa and Jogindernagar areas of Himachal Pradesh. Acta Horticulturae 544: 47-50.

Singh, S. K., Meghwal, P. R., Pathak, R. and Gautam, R. (2014) Molecular markers assisted identification of intraspecific hybrids in *Ziziphus mauritiana*. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences 84: 603-611.

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