

بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های برتر گردو بر اساس صفات مورفولوژیکی میوه و نشانگرهای ISSR در منطقه شاهرود

فاطمه داوودی^۱ - مهدی رضائی^{۲*} - پرویز حیدری^۳ - حسین حکم آبادی^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۷/۰۷

چکیده

بررسی تنوع ژنتیکی، شناسایی و معرفی ژنوتیپ‌های برتر گردو در ایران به‌عنوان یکی از تولیدکنندگان اصلی گردو و منشأ این گیاه، از اهمیت زیادی برخوردار است. از سال ۱۳۷۶ بذور ژنوتیپ‌های منتخب گردو از مناطق مهم گردوکاری ایران در کلکسیون گردوی مرکز تحقیقات سمنان (شاهرود) کشت شدند. از این دانه‌ها ۲۱ ژنوتیپ برتر با ویژگی‌های مناسب میوه انتخاب شدند و روی دانه‌های بذری پیوند شدند. در این پژوهش علاوه بر معرفی ویژگی‌های مهم میوه این ژنوتیپ‌ها، تنوع ژنتیکی آن‌ها با ۱۰ آغازگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت. میانگین وزن میوه و وزن مغز در ژنوتیپ‌های انتخابی به ترتیب ۱۴/۳۴ و ۷/۳۳ گرم بود. بیشترین میزان وزن میوه و مغز به ترتیب به میزان ۱۷/۵۰ و ۱۰/۳ گرم در ژنوتیپ OR23 مشاهده شد. میانگین درصد مغز گردوهای برگزیده ۵۱/۱۷ درصد بود. بیشترین میزان درصد مغز (۶۲/۷ درصد) در ژنوتیپ T₁₂ مشاهده شد. از ده آغازگر ISSR در ۲۱ ژنوتیپ برتر گردو ۱۱۲ باند ایجاد شد که از این تعداد، ۱۰۲ باند چندشکلی را نشان دادند و برای آنالیز تنوع ژنتیکی استفاده شدند. بیشترین تعداد باند در آغازگرهای UBC.826 و UBC.888 با ۱۴ باند مشاهده شد. بیشترین قدرت تفکیک‌کنندگی به میزان ۷/۷۱ در آغازگر UBC.826 و پس از آن در آغازگر UBC.887 مشاهده شد. ضریب تشابه بین ژنوتیپ‌ها از ۰/۵۱ تا ۰/۸۸ متغیر بود. دندروگرام تنوع ژنتیکی ۲۱ ژنوتیپ گردو را به دو گروه اصلی و سه گروه فرعی در گروه اول تقسیم‌بندی نمود که با میزان زیادی با نتایج دسته‌بندی آنالیز به مؤلفه‌های اصلی تطابق داشت. نتایج نشان داد فاصله ژنتیکی متوسطی بین ژنوتیپ‌ها وجود دارد و ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده از مناطق ارومیه و تویسرکان فاصله ژنتیکی بیشتری نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها دارند که با توجه به خصوصیات برتر می‌توانند به‌عنوان والدین با ژنوتیپ‌های انتخابی از منطقه شاهرود در برنامه‌های اصلاحی استفاده شوند.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، تنوع مورفولوژیکی، گردو، نشانگرهای مولکولی

مقدمه

داده‌اند (۵). مهترین گونه این جنس گردوی ایرانی *J. regia* است که اهلی شدن آن از کشورهای ایران و افغانستان آغاز شده است (۴). به‌علاوه مناطقی از آمریکا جنوبی و شمالی به‌عنوان مراکز گسترش سایر گونه‌های گردو شناخته شده است (۱). طبق گزارش فائو، ایران با تولید ۰/۴ میلیون تن گردوی خشک به‌عنوان سومین تولیدکننده مهم گردو پس از چین و ایالات متحده آمریکا مطرح است (۹). با توجه به ژرم‌پلاسم غنی و متنوع گردو در کشور، اولین قدم در برنامه‌های اصلاحی گردو شناسایی و گزینش ژنوتیپ‌های امیدبخش و برتر است. از روش‌های متنوعی جهت بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین روابط ژنتیکی بین و درون جمعیت‌های گیاهی استفاده می‌شود. استفاده از نشانگرهای مولکولی و بررسی خصوصیات مورفولوژیکی از جمله روش‌های مناسب جهت بررسی ژرم‌پلاسم‌های گردو در سراسر جهان است (۷). خصوصیات مورفولوژیکی به دلیل تأثیرپذیری از شرایط محیطی به تنهایی روش مناسبی در شناسایی ارقام نیستند؛ از این رو

گردو از گیاهان مهم اقتصادی است و مغز گردو ارزش غذایی بالایی به جهت ظرفیت بالای آنتی‌اکسیدانی و اسیدهای چرب مفید دارد (۲۴). گردو از جنس *Juglans* می‌باشد که دارای ۲۱ گونه است. بر اساس تنوع مشاهده شده بین جمعیت‌های مختلف گردو، منشاء گونه‌های این جنس را به آسیای مرکزی و نواحی اطراف آن نسبت

۱ و ۲- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود

*- نویسنده مسئول: (Email: mhrezaei@shahroodut.ac.ir)

۳- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود

۴- استادیار مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان (شاهرود)

تویسرکان، ارومیه، کرج و استان خراسان) جمع‌آوری شده بودند در کلکسیون گردو مرکز تحقیقات شاهرود در سال ۱۳۷۶ کشت شدند. این ژنوتیپ‌ها حاصل از دانه‌های گرفته شده از درختان مادری با ویژگی‌های برتر میوه بودند. دانه‌ها در شرایط کاملاً یکسان از نظر تغذیه و آبیاری پرورش یافتند و پس از باردهی از سال ۱۳۹۰ تا ۱۳۹۴ مورد بررسی قرار گرفتند و ۲۱ ژنوتیپ بر اساس خصوصیات میوه و سازگاری به شرایط آب و هوایی شاهرود انتخاب گردید و روی پایه‌های بذری پیوند شدند (جدول ۱). صفات مهم میوه همچون میانگین وزن خشک میوه، وزن مغز، درصد مغز، رنگ مغز، چسبندگی پوسته با مغز، ضخامت پوسته و اندازه خشک میوه با استفاده از توصیف نامه بین‌المللی^۲ IPGRI در ژنوتیپ‌های انتخابی مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند. برای اندازه‌گیری هر صفت مربوط به میوه از هر درخت ۲۵ عدد میوه گردو به صورت تصادفی جمع‌آوری و میانگین آن در آنالیز آماری استفاده شد.

نمونه‌گیری و استخراج DNA

جهت بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گردو انتخاب شده، ابتدا برگ‌های جوان در فصل بهار جمع‌آوری شدند و بلافاصله در ازت مایع قرار گرفته و به آزمایشگاه منتقل شدند و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد جهت حفظ و جلوگیری از تخریب نمونه‌ها قرار داده شدند. استخراج DNA از بافت‌های برگ‌ها با استفاده از روش CTAB با اندکی تغییرات (۱۳) انجام گردید. کیفیت و کمیت DNA با استفاده از دستگاه نانودراپ (IMPLEN N-60) و ژل آگارز ۰/۸ درصد صورت گرفت. غلظت نهایی تمامی DNA های استخراج شده جهت انجام واکنش زنجیره پلیمرز (PCR) به ۳۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شدند. ۱۰ آغازگر ISSR که دارای چند شکلی کافی روی سایر محصولات بودند (۲۰-۳۴) جهت بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های انتخابی گردو استفاده شد (جدول ۲).

واکنش PCR

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Biorad T100TM) در حجم ۱۵ میکرولیتر با استفاده از مسترمیکس ساخت شرکت (ویراژن) انجام گرفت. ارزیابی محصولات تکثیری PCR توسط ژل آگارز متافور (۲ درصد) با بالاترین قدرت جداسازی قطعات و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید انجام شد. پس از آشکارسازی باندها، از دستگاه ژل داک (Gel Doc Vilber E-box-CX5) جهت اسکن ژل استفاده شد. امتیازدهی باندها با استفاده از روش صفر (عدم حضور باند) و یک (حضور باند) صورت گرفت.

استفاده توأم از خصوصیات مورفولوژی و نشانگرهای مولکولی توصیه شده است (۸). استفاده از نشانگرهای مولکولی اطلاعات مفیدی با ضریب اشتباه کم را جهت بررسی تنوع درون و بین جمعیت‌های گیاهی فراهم می‌کند. آغازگرهای^۱ ISSR (نواحی بین توالی‌های تکراری ساده) از جمله نشانگرهای مولکولی پر کاربرد و کم هزینه هستند که در بررسی تنوع ژنتیکی، بیولوژی تکاملی و تهیه نقشه‌های ژنتیکی استفاده می‌شوند (۶). آغازگرهای ISSR جهت بررسی تنوع ژنتیکی در بسیاری از گیاهان از جمله زیتون (۲۹)، توت (۳۳) و گردو سیاه (۳۴) مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در پژوهشی ژنوتیپ‌های گردو ایرانی در باغات تجاری مشهد با نه آغازگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تنوع بین این ژنوتیپ‌ها پایین است و دخالت‌های انسانی بعنوان عامل تاثیرگذار بر تنوع معرفی شد (۳). پلی جینی و همکاران (۲۰) با استفاده از نه آغازگر ISSR واریته‌های گردو در چهار منطقه در ایتالیا را بررسی کردند. از نه آغازگر مورد بررسی ۱۱۵ قطعه DNA چند شکل بدست آمد که برای آنالیز تنوع مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که هرچند واریته‌های شمال و جنوب ایتالیا بسیار متمایز بودند ولی از لحاظ فاصله ژنتیکی همبستگی بالایی را نشان دادند. همچنین ۵۹ ژنوتیپ انتخابی گردو به همراه ارقام بین‌المللی آن با آغازگرهای^۲ RAPD، SSR و ISSR مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج این تحقیق مشخص شد که چندشکلی ایجاد شده توسط آغازگرهای^۱ ISSR با RAPD تقریباً برابر بود و ۲۵ آغازگر ISSR استفاده شده بیش از ۷۰٪ چندشکلی را نشان دادند (۷). بررسی تنوع ژنتیکی ۵۸ ژنوتیپ گردو در یونان با استفاده از آغازگرهای^۲ ISSR به خوبی توانست ژنوتیپ‌ها را بر اساس مناطق جغرافیای تفکیک کند و فاصله ژنتیکی^۱ ۰/۱۳ تا ۰/۹۳ بین ژنوتیپ‌ها مشاهده شد (۶).

از آنجایی که ایران یکی از مهمترین مناطق تنوع گردو در جهان می‌باشد؛ در یک طرح پژوهشی، ژنوتیپ‌های برتر گردو از مناطق مهم گردو کاری ایران انتخاب و در کلکسیون در ایستگاه تحقیقات کشاورزی استان سمنان (شاهرود) در سال ۱۳۷۶ کشت شدند. با توجه به شرایط آب و هوایی منطقه شاهرود ژنوتیپ‌های امیدبخشی بر اساس خصوصیات میوه انتخاب شدند. از این رو در این پژوهش سعی شده است که علاوه بر معرفی خصوصیات مهم میوه این ژنوتیپ‌های برتر، تنوع ژنتیکی و قرابت آنها در سطح ژنوم با آغازگرهای^۲ ISSR مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

۴۰ ژنوتیپ انتخابی که از مناطق مهم گردو کاری ایران

جدول ۱- کد و محل جمع‌آوری ژنوتیپ‌های انتخاب شده گردو
Table 1- The code and location of selected walnut genotypes

شماره ژنوتیپ Genotype number	کد ژنوتیپ Genotype code	محل جمع‌آوری Collecting location
1	T ₉	تویسرکان Tuyserkhan
2	T ₁₂	
3	T ₁	
4	SH ₁	
5	R ₂ G ₈	
6	R ₂ G ₅	
7	R ₂ G ₄	شاهرود Shahrood
8	R ₂ G ₃	
9	R ₂ G ₁	
10	R ₁ G ₇	
11	R ₁ G ₆	
12	R ₁ G ₂	ارومیه Urmia
13	OR ₄	
14	OR ₃₇	
15	OR ₂₆	
16	OR ₂₃	خراسان Khorasan
17	KH ₄	
18	KH ₃₄	
19	KH ₃₁	
20	K ₂₈	
21	K ₂₆	کرج Karaj

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای ISSR مورد استفاده
Table 2- Characteristics of ISSR primers

شماره Number	نام نشانگر Name of Marker	توالی جفت آغازگر Sequence of primers	دمای اتصال Annealing temperature (°C)
1	UBC.853	TCT CTC TCT CTC TCT CRT	50
2	UBC. 886	VDV CTC TCT CTC TCT CT	52
3	UBC.850	GTG TGT GTG TGT GTY C	52
4	UBC.890	VHV GTG TGT GTG TGT GT	54
5	UBC.887	DVD TCT CTC TCT CTC TC	50
6	UBC.826	ACA CAC ACA CAC ACA CC	54
7	S.14	AGA GAG AGA GAG AGA GT	48
8	UBC.884	HBH AGA GAG AGA GAG AG	48
9	UBC.480	GAG AGA GAG AGA GAG AYT	53
10	UBC.888	DBD CAC ACA CAC ACA CA	54

Y = (C,T), R = (A,G), B = (C,G,T), D = (A,G,T), V(A, C, G), H(A, T, C)

ژنوتیپ به صورت داده‌های بایناری یک (حضور باند) و صفر (عدم حضور باند) در نرم‌افزار Excel 2013 ثبت گردید. برای هر آغازگر

داده‌برداری و آنالیز داده‌ها
داده‌برداری از روی باندهای مشاهده شده با کیفیت برای هر

بر اساس اندازه‌گیری‌های انجام شده میانگین طول و قطر میوه به ترتیب $3/72$ و $3/46$ سانتی‌متر بدست آمد. بیشترین طول و عرض میوه در بین ژنوتیپ‌ها مربوط به ژنوتیپ KH_{31} با طول $4/3$ سانتی‌متر و عرض $3/9$ سانتی‌متر بود (جدول ۳). از لحاظ شکل میوه، بیشتر ژنوتیپ‌های انتخابی تخم مرغی شکل و برخی گرد بودند. تنها ژنوتیپ OR_4 دارای شکل میوه مستطیل کوتاه است و ژنوتیپ‌های OR_{26} و K_{26} دارای شکل میوه بیضی بودند (جدول ۳). از نظر شکل برجستگی‌های روی پوسته میوه تنها ژنوتیپ R_2G_1 دارای سطح میوه برجسته‌تر بود و بقیه ژنوتیپ‌ها پوست میوه آنها صاف و تا کمی برجسته (متوسط) بودند. میزان چسبندگی مغز به پوسته یکی از فاکتورهای کلیدی در بازاریابی میوه گردو محسوب می‌شود که به غیر از ژنوتیپ K_{26} در سایر ژنوتیپ‌ها مغز با چسبندگی بسیار کم و یا کم می‌باشد (جدول ۳). از لحاظ ضخامت پوسته تنها ژنوتیپ‌های K_{26} ، T_1 ، OR_{26} و R_2G_8 میوه‌هایی با پوست ضخیم داشتند که میزان بازاریابی را در این ژنوتیپ‌ها کاهش می‌دهد. به لحاظ صفت رنگ مغز بیشتر مردم ایران طرفدار رنگ‌های روشن هستند و آنرا حاکی از کیفیت مطلوب می‌دانند در حالی که آمریکایی‌ها کهربایی را بیشتر می‌پسندند (۱۶). در این بررسی ژنوتیپ‌های K_{26} ، K_{28} ، T_{12} ، OR_{23} ، OR_{26} ، OR_4 و KH_4 دارای رنگ روشن بودند (جدول ۳).

آنالیز ملکولی با نشانگرهای ISSR

در این پژوهش از ده آغازگر ISSR جهت بررسی تنوع ژنتیکی ۲۱ ژنوتیپ برتر گردوهای ایران در کلکسیون شاهرود استفاده شد. بطور کلی ۱۱۲ باند از واکنش PCR حاصل شد که ۱۰۲ باند چند شکلی را نشان دادند که تقریباً ۹۱ درصد پلی مورفیسم مشاهده شد (جدول ۴) که این نتایج حاکی از کارایی مناسب نشانگر و تنوع موجود بین ژنوتیپ‌ها می‌باشد. پلی جینی و همکاران (۲۱) در بررسی ۴۸ واریته گردو با هشت آغازگر ISSR، ۵۴ باند مشاهده کردند که تنها ۳۱ عدد از باندها (۵۷/۴ درصد) چند شکلی را نشان دادند. بررسی تنوع ژرم پلاسما و روابط ژنتیکی در میان ارقام گردو و ارقام محلی یونان با آغازگر ISSR نشان داد که ۸۲/۸ درصد چند شکلی توسط این نشانگرها ایجاد می‌شود (۶). همچنین لی و همکاران (۱۶) با استفاده از ۱۲ آغازگر ISSR روابط بین ۱۰۴ ژنوتیپ گردو را بررسی کردند که ۴۸۱ باند از مجموع ۴۸۵ باند تکثیر شده پلی مورفیک بودند و درصد چند شکلی ۹۱/۱ درصد محاسبه شد.

دامنه باندهای تکثیری، تعداد کل باند، تعداد باندهای چند شکلی، درصد چند شکلی، میانگین باندهای دارای اطلاعات $^{1}(AvIb)$ و قدرت تفکیک کنندگی $^{2}(Rp)$ تعیین گردید. میانگین باندهای دارای اطلاعات نشان‌دهنده رابطه بین وجود یک باند در ۵۰ درصد ژنوتیپ‌های تحت مطالعه است و قدرت تفکیک کنندگی از مجموع باندهای دارای اطلاعات (Ib) که توسط یک آغازگر تکثیر می‌شوند، بدست می‌آید (۲۳). ماتریس تشابه ژنتیکی و دندروگرام تنوع ژنتیکی به ترتیب توسط روش جاکارد و روش UPGMA با استفاده از نرم‌افزار Ntsys 2.0 (۲۶) انجام شد. آنالیز تجزیه به مؤلفه‌ها 3 بر اساس ماتریس فاصله ژنتیکی و با نرم‌افزار GenAlex 6.2 صورت پذیرفت (۱۹).

نتایج و بحث

خصوصیات مهم میوه ژنوتیپ‌های گردو

بررسی خصوصیات مهم میوه ژنوتیپ‌های مورد مطالعه نشان داد که میانگین وزن میوه و وزن مغز در ژنوتیپ‌های انتخابی به ترتیب $14/34$ و $7/33$ گرم است. به طوری که بیشترین میزان وزن میوه ($17/50$ گرم) در ژنوتیپ OR_{23} مشاهده شد که بیشتر از مقدار گزارش شده ($15/25$ گرم) توسط ارزانی و همکاران (۲) و کمتر از مقدار گزارش شده توسط شاملو و همکاران (۲۸) با مقدار $19/79$ گرم و ابراهیمی و همکاران (۸) با مقدار $7/17$ گرم بود. کمترین میزان وزن میوه ($12/10$ گرم) در ژنوتیپ R_1G_6 مشاهده گردید. بیشترین میزان وزن مغز ($10/3$ گرم) در ژنوتیپ OR_{23} و کمترین میزان وزن مغز ($5/3$ گرم) در ژنوتیپ KH_{31} مشاهده شد. وزن مغز میوه در ژنوتیپ OR_{23} بیشتر از حداکثر وزن مغز گزارش شده توسط شاملو و همکاران (۲۸) به میزان $9/48$ گرم، ابراهیمی و همکاران (۸) به میزان $7/88$ گرم، یاریلگاک و همکاران (۳۵) به میزان $9/8$ گرم و ترموریس و همکاران (۳۲) به میزان $6/32$ گرم بود. میانگین درصد مغز گردوهای انتخابی $51/17$ درصد بود. بیشترین میزان درصد مغز ($62/7$ درصد) در ژنوتیپ T_{12} مشاهده شد (جدول ۳) که بیشتر مقدار گزارش شده توسط شاملو و همکاران (۲۸) ($60/34$ درصد) و بالاتر از مقدار گزارش شده توسط یاریلگاک و همکاران (۳۵) ($59/27$ درصد) بود. بیشترین میزان واریانس و انحراف معیار در درصد مغز میوه مشاهده شد (جدول ۳). میزان واریانس نشان دهنده تنوع موجود در ژنوتیپ‌های مورد بررسی است که هر چه میزان واریانس بیشتر باشد، تنوع بیشتری از لحاظ آن صفت در میان ژنوتیپ‌ها وجود دارد.

- 1- Average band informativeness
- 2- Resolving power
- 3- Principal Coordinates Analysis

جدول ۳- خصوصیات مهم میوه ۲۱ ژنوتیپ برتر گردو انتخابی در شرایط آب و هوایی شاهرود
Table 3- Pomological properties of 21 superior walnut genotypes in Shahrood climate, Iran

ژنوتیپ‌ها Genotype code	طول میوه Nut length (cm)	عرض میوه Nut diameter (cm)	وزن میوه Nut weight (g)	شکل میوه Fruit shape	وضعیت سطح پوست چوبی Shell surface	میزان چسبندگی پوست به مغز Ease of kernel removal	ضخامت پوست چوبی Shell thickness	وزن مغز Kernel weight (g)	رنگ مغز Kernel color	درصد مغز Kernel fill percentage
T ₉	3.5	3.4	13.9	گرد Round	صاف Smooth	آسان Easy	متوسط Medium	7.4	کهربایی Amber	53.2
K ₂₆	4.2	3.6	17.3	بیضوی Elliptic	متوسط Moderate	سخت Difficult	ضخیم Thick	8.6	روشن Light	49.7
K ₂₈	4	3.6	15.8	تخم مرغی Ovate	متوسط Moderate	آسان Easy	نازک Thin	8.3	روشن Light	52.5
T ₁₂	3.5	3.4	13.9	گرد Round	صاف Smooth	متوسط Medium	نازک Thin	7.9	روشن Light	62.7
OR ₂₃	4.1	3.8	17.5	تخم مرغی Ovate	متوسط Moderate	آسان Easy	نازک Thin	10.3	روشن Light	58.8
SH ₁	3.7	3.6	13.6	تخم مرغی Ovate	صاف Smooth	آسان Easy	نازک Thin	7.5	خیلی روشن Extra light	55
T ₁	3.8	3.4	14.2	تخم مرغی Ovate	صاف Smooth	آسان Easy	ضخیم Thick	7.3	کهربایی Amber	48.3
OR ₂₆	3.8	3.1	16.8	بیضوی Elliptic	متوسط Moderate	متوسط Medium	ضخیم Thick	7.6	روشن Light	45.4
OR ₄	3.7	3.2	14	مستطیل کوتاه Short trapezoid	متوسط Moderate	متوسط Medium	ضخیم Thick	6.3	روشن Light	45
KH ₃₄	3.4	3	13.3	تخم مرغی Ovate	متوسط Moderate	آسان Easy	متوسط Medium	6.4	تیره Amber	48
KH ₃₁	4.3	3.9	15.7	تخم مرغی Ovate	متوسط Moderate	آسان Easy	نازک Thin	5.3	خیلی روشن Extra light	43.4
KH ₄	3.6	3.2	15.8	تخم مرغی Ovate	متوسط Moderate	متوسط Medium	متوسط Medium	7.6	روشن Light	48
OR ₃₇	3.3	3.1	12.5	تخم مرغی Ovate	صاف Smooth	متوسط Medium	نازک Thin	7.3	خیلی روشن Extra light	58.4
R ₂ G ₃	3.8	3.6	13.7	تخم مرغی Ovate	صاف Smooth	متوسط Medium	متوسط Medium	6.5	کهربایی روشن Light Amber	50
R ₂ G ₅	3.5	3.4	13	تخم مرغی Ovate	صاف Smooth	آسان Easy	نازک Thin	6.8	کهربایی Amber	52
R ₂ G ₈	4	3.9	17	گرد Round	کمی چروکیده Low shrivel	آسان Easy	ضخیم Thick	8.5	کهربایی روشن Light Amber	50
R ₂ G ₄	3.6	3.5	14.2	تخم مرغی Ovate	متوسط Moderate	آسان Easy	نازک Thin	6.9	کهربایی Amber	49
R ₁ G ₆	3.6	3.4	12.1	تخم مرغی Ovate	صاف Smooth	آسان Easy	متوسط Medium	5.8	کهربایی Amber	47.9
R ₁ G ₇	3.1	3.4	14.2	تخم مرغی Ovate	صاف Smooth	آسان Easy	متوسط Medium	6.9	کهربایی روشن Light Amber	48.6
R ₁ G ₂	4.1	3.9	12.6	تخم مرغی Ovate	صاف Smooth	متوسط Medium	متوسط Medium	7.9	کهربایی روشن Light amber	62.7
R ₂ G ₁	3.5	3.3	13.4	تخم مرغی Ovate	متوسط Moderate	آسان Easy	نازک Thin	6.9	کهربایی روشن Light amber	46
Min کمترین	3.1	3	12.1	-	-	-	-	5.30	-	43.40
Max بیشترین	4.3	3.9	17.5	-	-	-	-	10.30	-	62.70
Mean میانگین	3.72	3.46	14.34	-	-	-	-	7.33	-	51.17
STDEV انحراف معیار	0.31	0.27	1.69	-	-	-	-	1.08	-	5.53
Variance واریانس	0.097	0.071	2.87	-	-	-	-	1.17	-	30.57

میزان باندهای حاوی اطلاعات (AvIb) در آغازگرهای UBC887 و UBC886 به میزان ۰/۶۲ مشاهده شد. آغازگر UBC884 با میزان ۰/۱۴ کمترین باندهای حاوی اطلاعات را تولید کرد. بیشترین قدرت تفکیک کنندگی به میزان ۷/۷۱ در آغازگر UBC826 و پس از آن در آغازگر UBC.887 مشاهده شد. قدرت تفکیک شاخصی است که نشان می‌دهد هر آغازگر چه تعداد از ژنوتیپ‌ها را می‌تواند شناسایی کند با این حساب کمترین میزان Rp با میزان ۱/۲۴ در آغازگر UBC.884 مشاهده شد. در تحقیقی که عطار و همکاران (۳) نیز بر روی گردو انجام دادند بیشترین RP با مقدار ۳/۸۹ در آغازگر UBC.830 و کمترین مقدار (۰/۳۲) گزارش شده در آغازگر UBC.834 بود. طبق نتایج حاصل از تحقیق کریستوپولوس و همکاران (۶) بر ژرم پلاسماهای گردو در یونان، بالاترین و کمترین مقدار RP به ترتیب در آغازگر UBC.814 (با مقدار ۸/۱۸) و UBC.830 (با مقدار ۰/۸۶) مشاهده شد. مقدار RP نشانگر AFLP در ژنوتیپ‌های گردو با میانگین ۱۶/۲ گزارش شده است (۳). در حالی که میانگین RP با آغازگرهای ISSR، ۴/۵۲ گزارش شده است (۲۳) که نسبت به میانگین مطالعه حاضر کمتر است.

دوگان و همکاران (۷) نیز ۶۹/۱ درصد پلی‌مورفیک با ۲۵ آغازگر ISSR در ۵۹ ژنوتیپ گردو ترکیه و ارقام بین‌المللی آن، مشاهده کردند. درصد چند شکلی و میزان باندهای تکثیر شده در آغازگرهای ISSR بستگی به تنوع و تعداد ژنوتیپ‌های مورد بررسی دارد. علاوه بر این آغازگرهای مورد استفاده از نوع دجنراتیو^۱ بودند که خود باعث ایجاد حالت‌های مختلف و افزایش باندهای تکثیری از مناطق مختلف ژنوم می‌شود. میزان چندشکلی گزارش شده با آغازگرهای ISSR در بین مطالعات مختلف، متفاوت است. میزان چندشکلی خود برابندی است از فاکتورهایی همچون مواد ژنتیکی، آغازگرها و روش جداسازی باندها است و در واقع این بخش به قدرت جداسازی ژل بستگی دارد (۶). در این مطالعه برای تفکیک باندها از ژل آگاروز متافور با دمای ذوب ۷۰ درجه استفاده شد. این نوع آگاروز قادر است که باندهای با اختلاف ۴ جفت باز را از یکدیگر تفکیک کند و در نتیجه دقت و تعداد باندها افزایش می‌یابد. کمترین تعداد باندهای تکثیر شده در آغازگرهای UBC.853، UBC.884، UBC.850، UBC.886 و UBC.826 تعداد نه باند و بیشترین تعداد باند تکثیری در آغازگرهای UBC826 و UBC.888 با ۱۴ باند مشاهده شد (جدول ۴). آغازگر UBC826 با ۱۴ باند بیشترین تعداد باند چند شکل را تولید کرد (شکل ۱). بیشترین

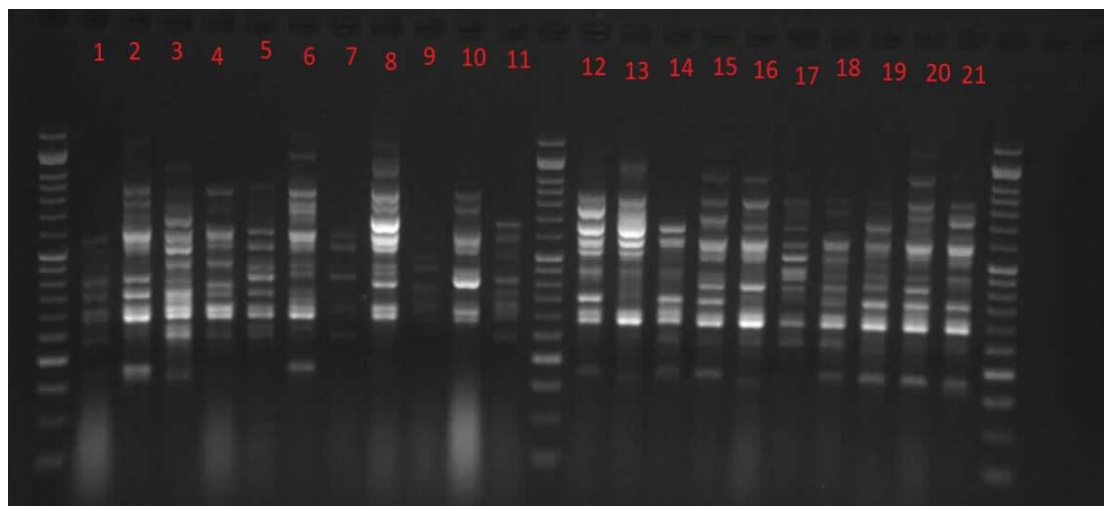
جدول ۴- چندشکلی ایجاد شده ناشی از آغازگرهای ISSR در ژنوتیپ‌های برتر گردو در ایران
Table 4- Polymorphism exhibited by ISSR primers in superior walnut genotype in Iran

آغازگر Primer	توالی Primer sequence	دامنه باند Bond range (bp)	تعداد باند Bond Number	تعداد باند چند شکل Polymorphism bond	چندشکلی (%) Polymorphism %	AVIb	Rb
UBC.853	VDG (CT)7	200-1000	9	7	78	0.32	2.86
UBC.884	HBH (AG)7	200-700	9	7	78	0.14	1.24
S14	(AG)8 T	250-1200	12	10	83	0.51	6.10
UBC.888	DBD(CA)7	150-1200	14	11	79	0.47	6.57
UBC.887	DVD(TC)7	250-1200	12	12	100	0.62	7.43
UBC.840	(GA)8YT	150-1500	11	10	91	0.41	4.48
UBC.890	VHV(GT)7	150-1000	13	13	100	0.51	6.57
UBC.826	(AC)8C	150-1200	14	14	100	0.55	7.71
UBC.850	7YC(GT)	150-900	9	9	100	0.41	3.71
UBC.886	VDV(CT)7	150-800	9	9	100	0.62	5.62
total	-	-	112	102	-	-	-

Y = (C,T), R = (A,G), B = (C,G,T), D = (A,G,T), V(A, C, G), H(A, T, C)

AvIb: Average band informative اطلاعات میانگین باندهای حاوی اطلاعات , Rb: resolving power قدرت تفکیک کنندگی

1- degenerate primer



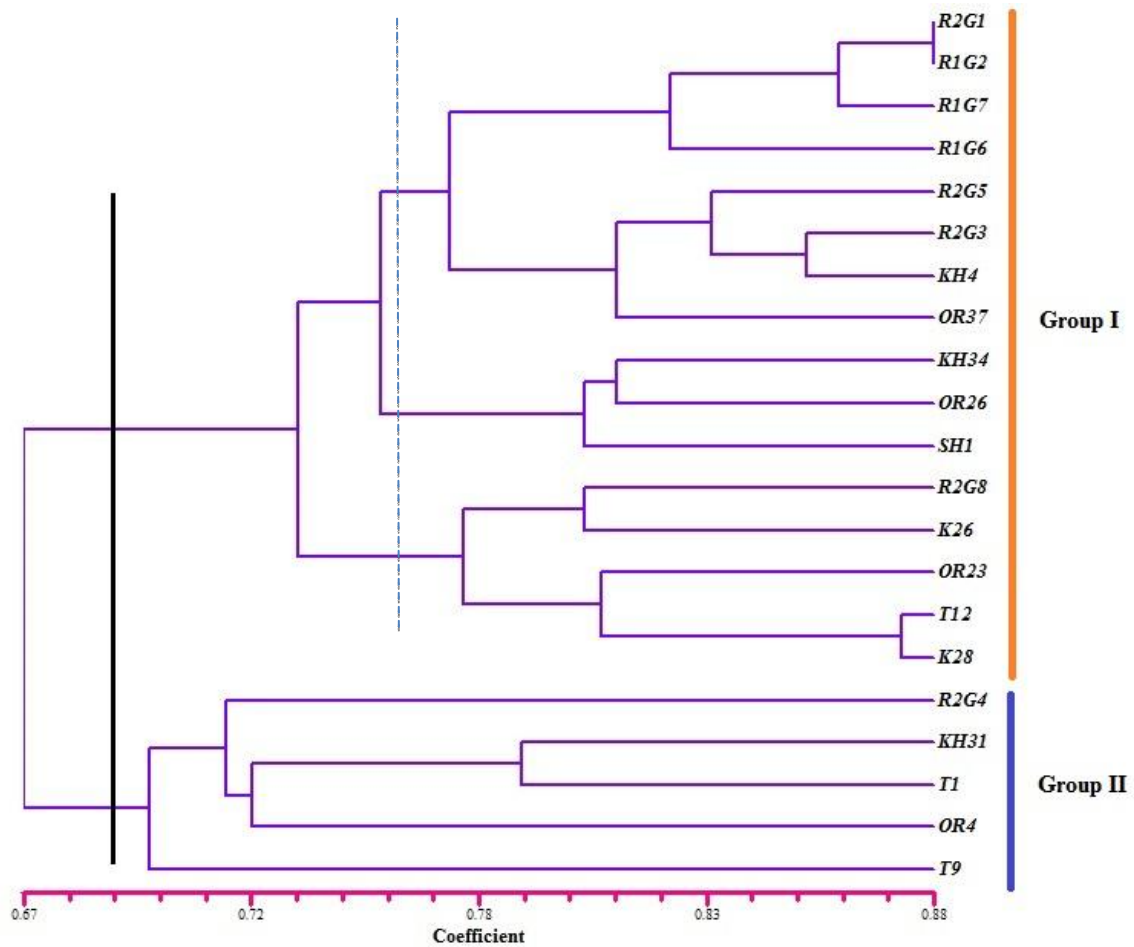
شکل ۱- الگوی باندهای DNA تکثیر شده از ۲۱ ژنوتیپ برتر گردو با آغازگر UBC.826 بروی ژل آگاروز متافور
Figure 1- DNA banding pattern of 21 superior walnut genotypes reproduced by UBC.826 primer on metaphor agarose gel

تنوع ژنتیکی و میزان خویشاندی ژنوتیپ‌ها بر اساس داده‌های ISSR

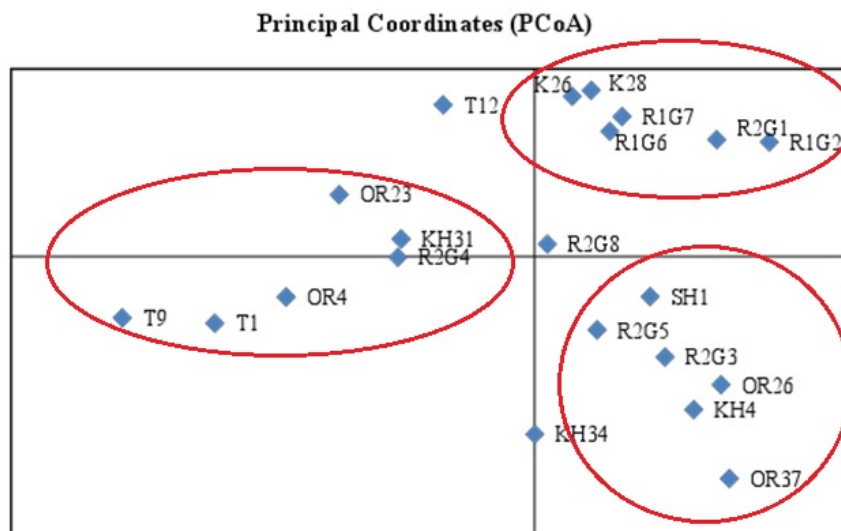
نتایج ماتریس تشابه بین ۲۱ ژنوتیپ گردو بر اساس ۱۰۲ باند تکثیری از آغازگرهای ISSR نشان داد که ضریب تشابه ژنوتیپ‌ها بین ۰/۵۱ تا ۰/۸۸ متغیر می‌باشد (جدول ماتریس تشابه آورده نشده است). بیشترین تشابه (۸۸ درصد) بین ژنوتیپ‌های R_2G_1 با R_1G_2 و همچنین ژنوتیپ‌های R_1G_7 با R_1G_2 وجود داشت که هر دو ژنوتیپ از منطقه شاهرود جمع‌آوری شده بودند. کمترین ضریب تشابه به میزان ۰/۵۱ بین ژنوتیپ‌های T_9 و OR_{37} مشاهده شد. در کل فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه پایین بود. عطار و همکاران (۳) با مطالعه گردوی ایرانی در باغات مشهد دریافتند که تنوع بسیار پایینی بین ژنوتیپ‌ها وجود دارد و تنوع کم را به دخالت‌های انسانی نسبت دادند. فورناری و همکاران (۱۰) با بررسی ژنوتیپ‌های گردو توسط آلوزایم‌ها در مناطق آسیا و اروپا دریافتند خود گرده‌افشانی در گردو باعث کاهش تنوع شده است. آغازگرهای ISSR در طیف وسیعی از مطالعات از جمله بررسی تنوع ژنتیکی، فیلوژنی، نقشه‌برداری ژنتیکی و زیست‌شناسی تکاملی مفید هستند (۲۵) و در بسیاری از گونه‌های درختی مانند گردو (۲۲) زیتون (۲۹) انجیر (۲۷) و آلو (۱۵) به صورت عملی استفاده شده‌اند. در مطالعه حاضر آغازگرهای ISSR توانستند میزان چندشکلی بالایی را نشان دهند که این مهم حاکی از مناسب بودن این نشانگر در بررسی تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها است.

دندروگرام تنوع ژنتیکی ۲۱ ژنوتیپ در شکل ۲ ارائه شده است. کلاستر ژنوتیپ‌ها را در ضریب تشابه حدود ۰/۶۹ می‌توان به دو گروه اصلی تقسیم‌بندی نمود. همچنین گروه اول در ضریب تشابه ۰/۷۷

می‌توان به سه زیر گروه تقسیم‌بندی نمود. زیر گروه اول تماماً (بغیر از ژنوتیپ‌های KH_4 و OR_{37}) مربوط به ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده از منطقه شاهرود هستند که بیشترین تشابه ژنتیکی هم بین برخی از این ژنوتیپ‌ها (R_1G_2 با R_2G_1 و R_1G_7) مشاهده شد. زیر گروه دوم شامل ژنوتیپ‌های KH_{34} ، OR_{26} و SH_1 بود و ژنوتیپ‌های R_2G_8 ، K_{26} ، OR_{23} ، T_{12} و K_{28} در زیر گروه سوم قرار گرفتند. ژنوتیپ‌های R_2G_4 ، KH_{31} ، T_1 ، OR_4 و T_9 که دارای فاصله ژنتیکی زیاد بودند در گروه دوم قرار گرفتند. ژنوتیپ T_9 دارای فاصله ژنتیکی بیشتری نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها بود (شکل ۲). نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCOA) نشان داد که ژنوتیپ‌ها بر حسب توزیع بر مبنای دو مولفه اول در سه گروه قرار گرفته‌اند در گروه اول ژنوتیپ‌های K_{26} ، K_{28} ، R_1G_2 ، R_1G_6 ، R_1G_7 و R_2G_1 قرار گرفتند که اکثر ژنوتیپ‌های برتر شاهرود در این گروه واقع شدند. دندروگرام نیز همه این ژنوتیپ‌ها در گروه اول قرار گرفته بودند (شکل ۳). در گروه دوم تجزیه به مؤلفه‌های اصلی ژنوتیپ‌های OR_{37} ، KH_{34} ، KH_4 ، OR_{26} ، R_2G_3 ، R_2G_5 و SH_1 قرار گرفتند و ژنوتیپ‌های OR_{23} ، KH_{31} ، R_2G_4 ، OR_4 ، T_1 و T_9 در گروه سوم تقسیم‌بندی شدند. این ژنوتیپ‌ها بجز OR_{23} در گروه دوم تجزیه کلاستر بودند. نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی تا حدود زیادی نتایج تجزیه کلاستر را تأیید کرد. سه مؤلفه اول به ترتیب ۱۸/۵۵، ۱۰/۲۴ و ۹/۱۹ درصد از تغییرات را توجیه کردند که در مجموع این سه مؤلفه ۳۷/۹۸ درصد تغییرات را پوشش دادند که این نشان‌دهنده کارایی مناسب آغازگرهای ISSR انتخابی است.



شکل ۲- دندروگرام تشابه ژنتیکی ۲۱ ژنوتیپ برتر گردو با استفاده از داده‌های نشانگر ISSR
 Figure 2- UPGMA dendrogram of 21 superior walnut genotypes based on ISSR data.



شکل ۳- تجزیه به محورهای اصلی (PCoA) حاصل از ماتریکس تشابه ژنتیکی ۲۱ ژنوتیپ برتر گردو
 Figure 3- Principal Coordinates Analysis (PCoA) via similarity matrix of 21 walnut genotypes

نتیجه‌گیری

بررسی‌های مورفولوژیکی نشان داد ژنوتیپ‌های انتخابی گردو به لحاظ خصوصیات برتر مغز و خشک میوه از کیفیت بالایی برخوردارند و ژنوتیپ‌های T₁₂ و OR₂₃ دارای بالاترین درصد و وزن مغز در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی می‌باشند. فن‌آوری نشانگر ISSR یک روش ارزان آسان و رضایت‌بخش برای ارزیابی روابط ژنتیکی و تنوع ژنتیکی در میان ارقام گردو است. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که این نشانگر چندشکلی مناسب جهت تفکیک ژنوتیپ‌های گردو داراست. ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده از شاهرود دارای تنوع ژنتیکی کمتری بین خود هستند و احتمالاً مقدار تنوع مشاهده شده مرتبط به دخالت‌های انسانی است. ژنوتیپ‌های تویسرکان و ارومیه دارای تنوع

و فاصله ژنتیکی بیشتری هستند لذا با توجه خصوصیات برتر میوه در این ژنوتیپ‌ها به‌ویژه ژنوتیپ‌های T₁₂ و OR₂₃ می‌تواند به عنوان والدین برتر جهت تلاقی با ژنوتیپ‌های انتخابی از منطقه شاهرود استفاده شوند. نتایج گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس نشانگرهای مولکولی با گروه‌بندی حاصل از صفات کیفی تا حدود زیادی مطابقت داشت که حاکی از کارایی مناسب نشانگر ISSR است. در کل استفاده توأم از صفات مورفولوژیکی و نشانگرهای مولکولی جهت بررسی تنوع ژنتیکی در گردو پیشنهاد می‌گردد و با توجه به تنوع زیاد گردو در ایران، پیشنهاد می‌گردد یک بانک ژرم پلاسمی از این گیاه تهیه گردد و بصورت گسترده مورد بررسی قرار گیرد تا امکان معرفی و اصلاح واریته‌های مناسب فراهم گردد.

منابع

- 1- Aradhya M., Woeste K., and Velasco D. 2010. Genetic diversity, structure and differentiation in cultivated walnut (*Juglans regia* L.). *Acta Horticulturae*, 861: 127-132.
- 2- Arzani K., Mansouri Ardakan H., and Vezvaei A. 2008. Morphological variation among Persian walnut (*Juglans regia* L.) genotype from central Iran. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 36: 159-168.
- 3- Attar S.H., Davarinezhad G.R., Samiee L., and Moghaddam M. 2017. Study of genetic diversity of some Persian walnut genotypes in Mashhad commercial orchards by using ISSR marker. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 31(3): 611-620. (In Persian with English abstract)
- 4- Bayazit S., Kaza K., Golbitti S., Cevik V., Ayanoglu H., and Ergul A. 2007. AFLP analysis of genetic diversity in low chill requiring walnut (*Juglans regia* L.) genotyping from Hatay, Turkey. *Scientia Horticulturae*, 111: 394-398.
- 5- Browicz K. 1976. Juglandaceae. In: Rechinger, K.H. (Ed.), *Flora Irinica*. Akademische Druck-u Verlagsanstalt, 121: 1-5
- 6- 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.
- 7- Dogan Y., Kafkas S., Sutyemez M., Akca Y., and Türemis N. 2014. Assessment and characterization of genetic relationships of walnut (*Juglans regia* L.) genotypes by three types of molecular markers. *Scientia Horticulturae*, 168: 81-87.
- 8- 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.
- 9- FAO. 2016. FAO statistical yearbook. Agricultural production, Food and Agriculture Organization of the United Nations (<http://faostat.fao.org/site/291.default.aspx>).
- 10- Fornari B., Canata F., Spada M., and Malvolti M.E. 1999. Aozyme analysis of genetic diversity differentiation in European and Asiatic walnut (*Juglans regia* L.) populations. *Forest Genetics*, 6(9): 115-127.
- 11- Gerald D.S., Woeste K., Aradhya M.K., Koehmstedt A., Simon C., Potter D., Leslie C.A., and McGranahan G.H. 2005. Characterization of 14 microsatellite markers for genetic analysis and cultivar identification of walnut. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130: 348-354.
- 12- Jaccard P. 1908. Nouvelle reserches sur la distribution florale. *Bulletin de la societe des sciences naturelles*, 44: 223-227.
- 13- Kafkas S., Ozkan H., and Sutyemez M. 2005. DNA polymorphism and assessment of genetic relationships in walnut genotypes based on AFLP and SAMPL markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130: 585-590.
- 14- Li H., and Chen G. 2008. Genetic relationship among species in the genus *Sonneratia* in China as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Journal Biochemical Systematic and Ecology*, 36: 392-398.
- 15- Liu W., Liu D., Zhang A., Feng C., Yang J., Yoon J., and Li S. 2007. Genetic diversity and phylogenetic relationships among plum germplasm resources in China assessed with Inter-simple Sequence Repeat markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 132: 619-628.
- 16- McGranahan G.P., and Leslie C. 1990. Walnuts (*Juglans*). *Acta Horticulturae*, 290: 907-951.
- 17- Niceses F.P., Hormaza J.I., and McGranahan G.H. 1998. Molecular characterization and genetic relatedness among walnut (*Juglans regia* L.) genotypes based on RAPD markers. *Euphytica*, 101: 199-206.

- 18- Oliveira C.M., Mota M., Monte-Corvo L., Goulao L., and Silva D.M. 1999. Molecular typing of *Pyrus* based on RAPD markers. *Scientia Horticulturae*, 79: 163–174.
- 19- Peakall R., and Smouse P.E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*. 28: 2537-2539.
- 20- Pollegioni P., Bartoli S., Cannata F., and Malvoti M.E. 2003. Genetic differentiation of four Italian walnut varieties by inter simple sequence repeat. *Journal of Genetics and Breeding*, 57(3): 231–240.
- 21- Pollegioni P., Major A., Bartoli S., Ducci F., Proietti R., and Malvoti M.E. 2005. Application of microsatellite and dominant molecular markers for the discrimination of species and interspecific hybrids in genus *Juglans*. *Acta Horticulturae*, 705: 191-197.
- 22- Potter D., Gao F., Aiello G., Leslie C., and McGranahan G.H. 2002. Intersimple sequence repeat markers for fingerprinting and determining genetic relationships of walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 127: 75-81.
- 23- Prevost A., and Wilkinson M.J. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting. *Theoretical Applied Genetics*, 98: 107–112.
- 24- Rahimipanah M., Hamed M., and Mirzapour M. 2010. Antioxidant activity phenolic contents of Persian walnut (*Juglans regia* L.) green husk extract. *American Journal of Food Science and Technology*, 1: 105-111.
- 25- 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.
- 26- Rohlf F.J. 1998. NTSyS-p.c. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (Version 2.0). Exeter Software Publishers Ltd., Setauket.
- 27- Sahli-Hannachi A., Chatti K., Mars M., Marrakchi M., and Trifi M. 2005. Comparative analysis of diversity in two Tunisian collections of fig cultivars based on random amplified polymorphic DNA and inter simple sequence repeats fingerprints. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 52: 563–573.
- 28- Shamlu F., Rezaei M., Biabani A., and Khanahmadi A. 2015. Morphological Diversity among Walnut Genotypes of in Azadshar, Iran. *Journal of Horticulture Science*, 30(3): 469-479. (In Persian)
- 29- Terzopoulos P.J., Kolano B., Bebeli P.J., Kaltsikes P.J., and Metzidakis I. 2005. Identification of *Olea europaea* L. cultivars using inter-simple sequence repeat markers. *Scientia Horticulturae*, 105: 45–51.
- 30- Terzopoulos P.J., and Bebeli P.J. 2008. Genetic diversity analysis of Mediterranean faba bean (*Vicia faba* L.) using ISSR markers. *Field Crops Research*, 108: 39–44.
- 31- Tian L., xiang A., Li-SI Z., Hai Rong W., and Qing L. 2011. ISSR Analysis of Genetic Diversity among Seedling Walnut (*Juglans* spp.)Populations. *Journal of Plant Genetic Resources*, 12(4): 640-645.
- 32- Tsmouris G., Hatziantoniou S., and Demetzos C. 2002. Lipid analysis of Greek walnut oil (*Juglans regia* L.). *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57: 51- 56.
- 33- Vijayan K., Awasthi K., Sprivasava P., and Sarachandra B. 2006. Genetic Analysis of Indian Mulberry Varieties Through Molecular Markers. *Hereditas*, 141:8-14.
- 34- Woeste K., Burns R., Rhodes O., and Michler C. 2002. Thirty polymorphic nuclear microsatellite loci from black walnut. *Journal of Heredity*, 93: 58–60.
- 35- Yartilgac T., Koyuncu F., Koyuncu M.A., Kazankaya A., and Sen S.M. 2001. Some promising walnut selections (*Juglans regia* L.) *Acta Horticulturae*, 544: 93-96.



Genetic Diversity of Superior Walnut Genotypes Revealed by ISSR Markers in Shahrood, Iran

F. Davoodi¹ - M. Rezaei^{2*} - P. Heidari³ - H. Hokmabadi⁴

Received: 10-03-2018

Accepted: 29-09-2018

Introduction: Iran is known as the origin of Persian walnut in the world, and so the study of genetic diversity, identifying and introducing superior walnut genotypes from the main walnut production areas in Iran is very important. From the beginning of the year 2001, seeds of selected walnut genotypes from important walnut production area of Iran were collected and cultivated in a walnut collection in Semnan Research Center (Shahrood), Iran. From this collection, promising walnut genotypes were selected based on climate adaptability to Shahrood area and pomological characteristics. In this research, in addition to introducing fruit characters of these walnut selected genotypes, genetic diversity and their genotypes relationship in the genome level have been also investigated with the ISSR markers.

Materials and Methods: 40 selected genotypes of important walnut regions of Iran (Tuyserkhan, Orumieh, Karaj and Khorasan province) were cultivated in a walnut collection at the Shahrood Research Center in 2001. From these seedlings, 21 genotypes were selected on the base of pomological characteristics and they were grafted onto Persian walnut seedlings. Pomological traits of the fruits of these selected genotypes including the average of nut weight, kernel weight, kernel percentage, shell attachment to the kernel, kernel color, shell thickness and nut size and shape were measured. DNA was extracted from young leaves of walnut genotype by CTAB method and its quality and quantity evaluated on the agarose gel as well as the Nano drop, and then genomic DNA was amplified with the 10 ISSR primers in PCR. The amplified bands were separated by Metaphor agarose gel and stained with Ethidium bromide. For each primer, the amplified band range, the total number of bands, the number of polymorphic bands, the polymorphic percentage, Average informative band (AvIb) and resolving power (Rp) was determined. UPGMA dendrogram based on Jaccard similarity matrix was the performance by Ntsys 2.0 software. Principle Coordinate analysis was performed based on the genetic distance matrix with GenAlex 6.2 software.

Results and Discussion: The mean of fruit and kernel weight in selected walnut genotypes were 14.34 and 7.33 g, respectively. The highest nut and kernel weight was found to be 17.5 and 10.3 g, respectively in OR23. The Kernel weight was more than kernel weight reported by Shamlu et al. (2015), Yarilgak et al. (2001) and Tasmuris et al. (2002) (9.40, 8.88 and 6.32 g). The average of kernel percentage in selected walnuts was 51.5%. The highest percentage of the kernel (62.7%) was observed in T12 genotype. from the ten ISSR primers in 21 walnut genotypes, 112 DNA fragments were amplified and 102 DNA bonds of them were polymorphic and they were used for genetic variation analysis. The highest number of amplified DNA bands was observed in UBC826 and UBC888 primers with 14 bands. The highest average band informative (AvIb), 0.62, was observed in UBC887 and UBC886 primers. The highest resolving power (Rp) was found to be 7.71 in UBC826 primer and then in UBC.887 primer. The Jaccard' similarity coefficient of genotypes varies from 0.51 to 0.88. The results showed that the genetic distance of selected genotypes of walnut is medium. The dendrogram analysis of 21 genotypes of walnuts was divided genotypes into two main groups and three subgroups in the first group, which greatly matched the results of the PCoA. The genotypes were collected from Shahrood were inserted on the first subgroup of GI in dendrogram analysis, except of KH4 and OR37 genotypes, and the highest genetic similarity was observed between some of these genotypes (R1G2 with R2G1 and R1G7). The second group includes

1 and 2- M.Sc. Student and Assistant Professor, Department of Horticulture, Shahrood University of Technology, Iran
(*- Corresponding Author Email: mhrezaei@shahroodut.ac.ir)

3- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Shahrood University of Technology, Iran

4- Assistant Professor, Semnan Agriculture and Natural Resources Research Center, Semnan Iran

genotypes KH34, OR26, and SH1. Subgroup 3 of the first group contains R2G8, K26, OR23, T12, and K28. The second group has high genetic distances including R2G4, KH31, T1, OR4, and T9.

Conclusion: The ISSR marker technology is an inexpensive, easy and satisfactory way to evaluate genetic relationships and genetic variation among walnut cultivars. The results of this research showed that these markers (ISSR) are suitable for study of variation in walnut genotypes. The genotypes collected from Shahrood had a lower genetic diversity, and the observed diversity is probably related to human interactions. The Tuyserkan and Urmia genotypes showed more genetic variation. The results of clustering based on molecular markers were largely matched with the grouping based on qualitative traits. The results showed that there is a moderate genetic distance between selected walnuts genotypes. The genotypes collected from Urmia and Tuyserkan regions have a higher genetic distance than other genotypes and which according to their superior characteristics, they can be used as parent along with selected walnut genotypes from the Shahrood area in a breeding program.

Keywords: Clustering, Genetic diversity, ISSR markers, Walnut genotypes