

بررسی سیتوژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های داخلی و خارجی گردوی ایرانی

Evaluation of the cytogenetic diversity in exotic and domestic Persian walnut cultivars

مریم مسی‌وند^۱، محمد جعفرآقایی^{۲*}، وحیده پیام‌نور^۱، داراب حسنی^۲ و سجاد بکایی^۲

- ۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی‌ارشد و استادیار، دانشگاه منابع طبیعی گرگان
۲- به ترتیب دانشیار، استادیار و کارشناسی‌ارشد، موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر

Mosivand M¹, Jaffaraghaei M^{*2}, Payamnour V¹, Hassani D², Bokaei S²

1. MSc Student and Assistant Professor, Natural Resources of Gorgan University
2. Associate Professor, Assistant Professor and MSc Student, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mjaghaei@spii.ir

(تاریخ دریافت: ۹۲/۴/۸ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۷/۳۰)

چکیده

به منظور بررسی تنوع سیتوژنتیکی و تعیین روابط خویشاوندی شش ژنوتیپ منتخب داخلی و خارجی گردوی ایرانی، کاریوتیپ نمونه‌های مورد مطالعه شامل ارقام Serr، Z30، Pedro، Z63، و ژنوتیپ‌های B21 و K72 با استفاده از یاخته‌های ریشه حاصل از کشت بذور مورد بررسی قرار گرفت. ده صفحه متافازی مناسب از هر نمونه انتخاب و تعداد کروموزوم‌ها و کاریوتیپ استاندارد برای جمعیت‌ها به طور جداگانه تهیه و پارامترهای کروموزوم‌ها شامل طول کروموزوم، بازوی بلند، بازوی کوتاه، نسبت بازوی کوتاه به کل، نسبت بازوی بلند به کوتاه و شاخص کروموزومی اندازه‌گیری شد. در نمونه‌های دیپلوئید، تعداد کروموزوم‌ها برابر $2n=32$ و عدد پایه کروموزومی در آنها $n=16$ بوده و تیپ کروموزوم‌ها از نوع متاساتریک، ساب متاساتریک و به ندرت تلوساتریک و بدون ماهواره بودند. اندازه متوسط کروموزوم‌ها در ارقام این جنس ۸ میکرون محاسبه شد. با استفاده از تجزیه کلاستر به روش "وارد" نمونه‌ها براساس خصوصیات کاریوتایی به سه گروه مجزا تقسیم شدند به طوری که در گروه اول رقم‌های K72 و Z30، Z63، Pedro در گروه دوم ژنوتیپ B21 و در گروه سوم نیز Serr به تنهایی قرار گرفت.

واژه‌های کلیدی

تنوع ژنتیکی
کاریوتایپ
کروموزوم
دیپلوئید
گردوی ایرانی

مقدمه

گردو گیاهی یک پایه متعلق به خانواده Juglandaceae است. این خانواده دارای ۶۰ گونه بوده که ۲۰ گونه آن در جنس *Juglans* قرار می‌گیرد (Osman 1974; Mitra et al. 2002). این گیاه نیازمند مناطق معتدله مرطوب، خاکهای عمیق، حاصلخیز، لومی و زهکشی شده می‌باشد. رویشگاه آن از کوه‌های کارپات از شرق اروپا آغاز شده و با عبور از کشورهای ترکیه، عراق، ایران، افغانستان و جنوب کشور روسیه به سمت هیمالیا کشیده می‌شود (Arulsekhar et al. 1986). در فلات ایران گردو از مناطق پست تا ارتفاع ۲۵۰۰ متری از سطح دریا، به صورت اهلی یا وحشی در مناطق شمال، غرب و مرکز شمال یافت می‌شود (Vahdati and Zareie 2006). در میان گونه‌های این جنس گردوی ایرانی (*J. regia*)، گونه‌ای چند منظوره و از نظر اقتصادی بسیار پراهمیت محسوب می‌شود. چوب پر نقش و نگار، استفاده از مغز و دانه و اهمیت آن در پارک سازی موید این مطلب هستند. طبق آمار (FAO 2010) ایران با تولید ۲۷۰۳۰۰ تن مقام سوم جهان را به خود اختصاص داده است. در این میان چین با تولید ۱۰۶۰۶۰۰ تن در مقام اول، آمریکا با تولید ۴۵۸۰۰۰ تن در مقام دوم و ترکیه با تولید ۱۷۸۱۴۲ تن در مقام چهارم جهان جای دارد. نقش عمومی سیتوژنتیک فراهم آوردن اطلاعات کمی روی تاریخچه تکاملی گیاه، بررسی سیتولوژیکی و تعیین مشخصات آن، قرابت گونه‌ها و از این قبیل موارد است. برخی از این اطلاعات جهت دسترسی به اهداف اصلاحی و تعیین استراتژی مناسب ضروری است و وجود اختلاف در شکل و اندازه کروموزوم‌ها می‌تواند بیانگر اختلاف ژنتیکی باشد (Sheidai et al. 2002). لذا بررسی‌های کروموزومی برای مطالعات ژنتیکی و اصلاحی در گیاهان مختلف از اهمیت بالایی برخوردار هستند. بررسی تفاوت تعداد کروموزوم‌ها و سطح پلوئیدی از نقطه نظر بررسی امکان تلاقی بین گونه‌ای و یا دورگه‌سازی سوماتیکی اهمیت دارد (Bauchan 1998). مورفولوژی کروموزوم می‌تواند به عنوان یکی از مفیدترین معیارها جهت بررسی روابط تاکسونومیکی باشد (Stebbins 1971). با توجه به اینکه مطالعات کروموزومی در گونه مورد نظر محدود

است. (Tulecke et al. 2003) اقدام به تکثیر گونه ایرانی (*J. regia*) در شرایط درون شیشه‌ای با استفاده از بافت‌های آندوسپرمی بذور کرده سپس مطالعات کروموزومی بر روی گیاهچه‌ی حاصله انجام دادند. (Yajima et al. 1997) خصوصیات کروموزوم‌های گردو (*J. regia*) را بررسی کرده‌اند. در ایران (Hosseiny 1388) نیز تجزیه کروموزومی گردوی ایرانی (رقم هارتلی) را انجام داده و آنرا دیپلوئید دانسته است. هدف از انجام این تحقیق بررسی سیتوژنتیکی برخی ارقام خارجی و داخلی گردوی ایرانی (*J. regia*) و طبقه‌بندی نمونه‌های بررسی شده جهت استفاده در مطالعات به‌نژادی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های مورد بررسی شامل: ارقام و ژنوتیپ‌های گردوی ایرانی (*J. regia*)، از بخش تحقیقات باغبانی موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر تهیه و در آزمایشگاه سیتوژنتیک بانک ژن گیاهی ملی ایران، مورد مطالعه قرار گرفتند. از نمونه‌های فوق دو رقم Serr و Pedro از ارقام خارجی گردوی ایرانی هستند (جدول ۱). از هر نمونه ۴۰ عدد بذر انتخاب و برای شکستن خواب در کیسه‌های پلاستیکی محتوی پرلیت مرطوب، به مدت ۳ ماه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و مرتب هوادهی شد. پس از حذف خواب، بذور در گلدان‌های دو طبقه کاشته شدند تا امکان برداشت ریشه‌های تازه از فاصله میان دو گلدان فراهم شود. ریشه‌ها با محلول ۰/۰۲٪ مولار ۸- هیدروکسی کینولین^۱ به مدت سه ساعت در یخچال با دمای چهار درجه سانتی‌گراد، پیش‌ تیمار شدند. جهت تثبیت کروموزوم‌ها، ریشه‌های شسته شده به مدت ۳۶ تا ۴۸ ساعت، در محلول لویتسکی (یک قسمت محلول اکسید کرومیک ۰/۱ و یک قسمت فرمالدهید ۰/۱۰) در دمای چهار درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و سپس به مدت ۳ ساعت در جریان آب روان قرار گرفتند. جهت هیدرولیز ریشه‌ها از محلول هیدروکسید سدیم یک نرمال به مدت ۱۷ دقیقه استفاده و سپس شستشو به مدت ۱۵ دقیقه با آب مقطر انجام شد. رنگ‌آمیزی با

^۱ Hydroxy quinolin-8

جدول ۱- مشخصات و مبدا جمع آوری نمونه های مورد مطالعه

مبدا جمع آوری شده	(<i>J. regia</i>) ژنوتیپ‌های گردوی ایرانی	ردیف	مبدا جمع آوری شده	(<i>J. regia</i>) ارقام گردوی ایرانی	ردیف
ایران	B21	۱	آمریکا	Serr	۱
ایران	k72	۲	آمریکا	Pedro	۲
-	-		ایران	Z30 (دماوند)	۳
-	-		ایران	Z63 (جمال)	۴

استفاده از استوآیرون همتوکسلین^۱ با روش (Agayave 1998) انجام و پس از آن نمونه‌ها در دمای ۳۵-۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۶ ساعت نگهداری شدند. برای حل شدن دیواره یاخته‌ها از آنزیم سیتاز به مدت ۲۴ ساعت در دمای چهار درجه سانتی‌گراد استفاده شد. اسکواش با استفاده از استیک اسید ۴۵ درصد و دائمی کردن نمونه‌ها با فاز گازی نیتروژن مایع به مدت ۳-۵ دقیقه انجام شده و نمونه‌ها عکسبرداری شدند. ویژگی‌های سیتولوژیکی شامل طول کروموزوم، طول بازوی بلند، طول بازوی کوتاه، نسبت بازوی کوتاه به کل، بازوی نسبی (نسبت بازوی بلند به کوتاه) و شاخص کروموزومی به عنوان شاخص تمایز نمونه‌ها استفاده شد. کروموزوم‌ها بر اساس روش (Leaven et al. 1964) و با توجه به مکان سانترومر نامگذاری شدند. جهت اندازه‌گیری و تجزیه پارامترهای سیتوژنتیکی و کاریوگرام از نرم‌افزارهای Exell, Micro Measure و SPSS استفاده شد.

نتایج و بحث

بررسی‌های سیتولوژیکی نشان داد که چهار رقم Z30, Z63, Serr, Pedro) و دو ژنوتیپ B21, K72 از گردوی ایرانی، همگی دیپلوئید و دارای ۳۲ کروموزوم و فاقد ماهواره هستند (جدول ۲). تعداد کروموزوم و تشریح کاریوتیپ مربوط به ارقام و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در (جدول ۳) و میانگین و انحراف معیار به دست آمده از صفات اندازه‌گیری شده از نمونه‌های مختلف در (جدول ۴) نشان داده شده است.

در رقم سر (Serr) از مجموع ۱۶ جفت کروموزوم ۱۳ جفت کروموزوم بزرگ و ۳ جفت کروموزوم کوچک مشاهده شد (کروموزوم‌هایی که طول آنها بیشتر از ۱/۷ میکرون اندازه‌گیری شدند بزرگ، کروموزوم‌های کمتر از ۱/۷ میکرون کوچک نامیده شدند). کروموزوم‌های همولوگ شماره ۱، ۴، ۸، ساب‌متاسانتریک و بقیه کروموزوم‌ها به صورت متاسانتریک هستند. میانگین طول کروموزوم‌های هاپلوئید ۸/۸۳ میکرون و میانگین طول بازوی بلند به بازوی کوتاه در این گونه ۱/۴۹ میکرون برآورد شد. طول کروموزوم‌ها از ۷/۵۰ تا ۵/۵۱ متغیر اندازه‌گیری شد. طول بازوی کوتاه ۳/۵۵ میکرون و بازوی بلند ۵/۲۷ میکرون اندازه‌گیری شد. در رقم دماوند (Z30) ۱۲ جفت کروموزوم بزرگ و ۴ جفت کروموزوم کوچک مشاهده شد. کروموزوم‌های همولوگ شماره ۱، ۵، ۷، ۹، ۱۰، ۱۳ و ۱۴ ساب‌متاسانتریک و بقیه کروموزوم‌ها به صورت متاسانتریک دیده شدند. میانگین طول کروموزوم‌های هاپلوئید ۷/۲۸ میکرون و میانگین طول بازوی بلند به بازوی کوتاه در این گونه ۱/۶۲ میکرون برآورد شد. طول کروموزوم‌ها از ۸/۸۷ تا ۶/۴۳ میکرون متغیر اندازه‌گیری شد. طول بازوی کوتاه ۲/۸۸ میکرون و بازوی بلند ۴/۴ میکرون اندازه‌گیری شد. در رقم جمال (Z63) ۴ جفت کروموزوم بزرگ و ۱۲ جفت کروموزوم کوچک مشاهده شد. کروموزوم‌های همولوگ شماره ۱، ۵، ۴، ۶، ۷، ۱۲، ۱۴، ۵ متاسانتریک، هفت جفت ساب‌متاسانتریک و یک جفت آکروسانتریک دیده شد. میانگین طول کروموزوم‌های هاپلوئید ۷/۰۴ و میانگین طول بازوی بلند به بازوی کوتاه در این گونه ۱/۳۶ میکرون برآورد شد. طول کروموزوم‌ها از ۵/۳۰ تا ۷/۴۳

² Aceto- Iron-Hematoxline

جدول ۲- نام‌گذاری کروموزوم بر اساس نسبت بازوها (Leaven et al. 1964)

نوع کروموزوم	نسبت بازوها	مکان سانترومر
متاستریک	m	نقطه میانی
متاستریک	m	منطقه میانی
ساب-متاستریک	s. m	نیمه میانی
آکروستریک	a	منطقه انتهایی
تلوستریک	t	نقطه انتهایی

جدول ۳- تعداد کروموزوم و تشریح کاریوتیپ مربوط به ارقام و ژنوتیپ‌های گردو

دامنه اندازه (μm)	کاریوتیپ	تعداد کروموزوم ها	گونه
۵/۵۱ - ۷/۵۰	۱۳m+۳sm	۲n=۲x=۳۲	serr
۶/۴۳ - ۸/۸۷	۱M+۸m+۷ sm	۲n=۲x=۳۲	Z30
۵/۳۰ - ۷/۴۳	۱M+۷m+۷ sm+۱a	۲n=۲x=۳۲	Z63
۵/۰۴ - ۹/۲۴	۱M+۱۰m+۵ sm	۲n=۲x=۳۲	Pedro
۵/۸۱ - ۸/۰۷	۱۳m+۳ sm	۲n=۲x=۳۲	K72
۵/۵۱ - ۷/۵۰	۱M+۹m+۶ sm	۲n=۲x=۳۲	B21

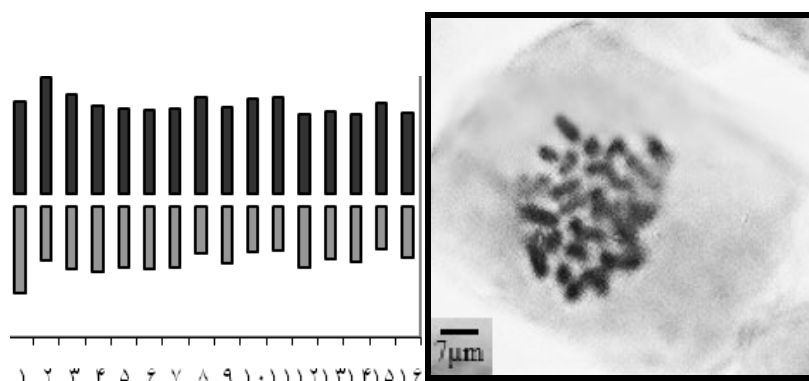
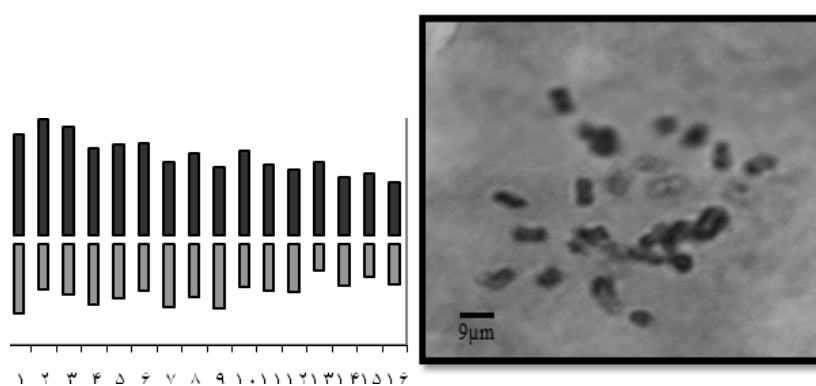
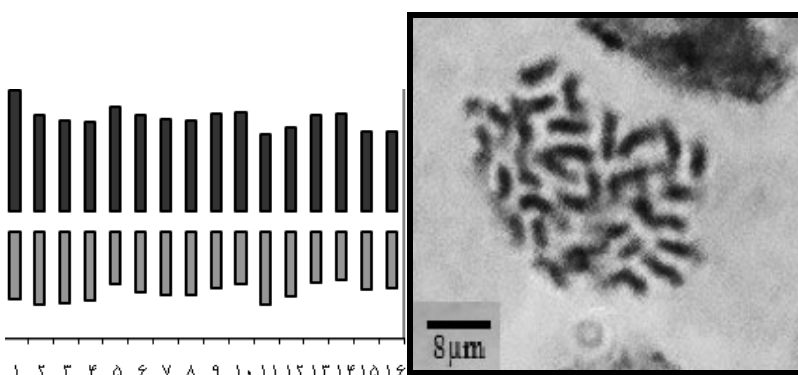
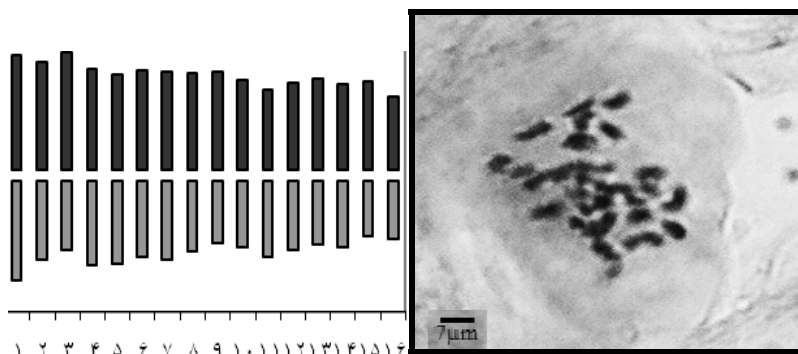
جدول ۴- میانگین و انحراف معیار به دست آمده از صفات اندازه گیری شده از نمونه‌های مختلف

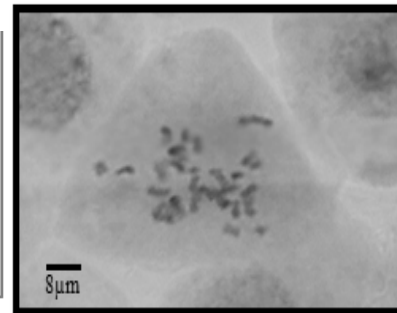
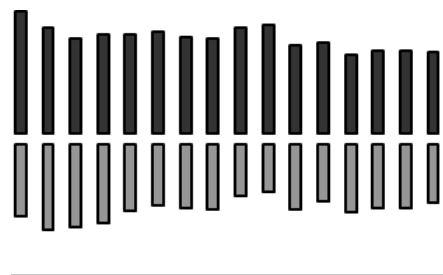
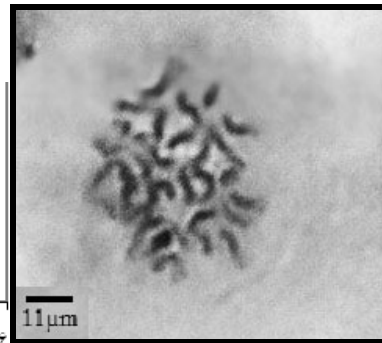
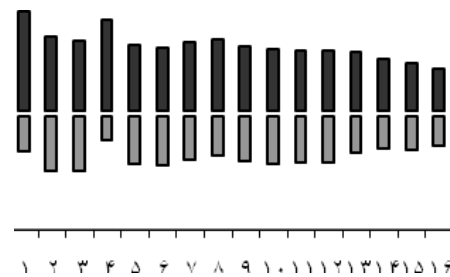
CI	(L/S) بازوی نسبی	% of set	میانگین بازوی کوتاه	میانگین بازوی بلند	طول کل کروموزوم‌ها (هابلوئید)	گونه
۰/۴۱±۰/۰۳	۱/۴۹±۰/۲۰	۰/۰۳۲±۰/۰۵۳	۳/۵۵±۰/۶۷	۵/۲۷±۱/۱۴	۸/۸۳±۱/۶۶	serr
۰/۳۹±۰/۰۴	۱/۶۲±۰/۳۲	۰/۰۳۱±۰/۰۴۷	۲/۸۸±۰/۶۱	۴/۴±۰/۸۰	۷/۲۸±۱/۱۷	Z30
۰/۴۳±۰/۰۳	۱/۳۶±۰/۱۹	۰/۰۳۱±۰/۰۳۷	۳±۰/۴۲	۳/۱±۰/۵۵	۷/۰۴±۰/۸۳	Z63
۰/۳۸±۰/۰۰۳	۱/۶۸±۰/۰۳	۰/۰۳۱±۰/۰۲۴	۲/۶۷±۰/۲۳	۴/۳۸±۰/۳۸	۷/۰۶±۰/۵۳	Pedro
۰/۴۲±۰/۰۰۹	۱/۵۷±۰/۳۹	۰/۰۳۱±۰/۰۵۲	۲/۷۲±۰/۶۷	۳/۹۸±۰/۸۸	۶/۷۱±۱/۳۷	K72
۰/۳۹±۰/۰۰۴	۱/۶۶±۰/۳۷	۰/۰۳۱±۰/۰۵۳	۲/۳۸±۰/۴۸	۳/۷۱±۰/۷۴	۶/۱۵±۱/۰۳	B21

(L/S) = میانگین نسبت بازوی بلند به بازوی کوتاه کروموزوم; $CI = (S/L + S \times 100) \% \text{ of Set}$; میانگین نسبت بازوهای کوتاه به کل

میکرون متغیر بود. طول بازوی کوتاه سه میکرون و بازوی بلند ۱/۳ میکرون اندازه‌گیری شد. در رقم (Pedro) دو جفت کروموزوم بزرگ و ۱۴ جفت کروموزوم کوچک مشاهده شد. کروموزوم‌های همولوگ شماره ۳، ۲، ۱۵، ۱۰، ۱۳ ساب‌متاستاتریک و بقیه کروموزوم‌ها به صورت متاستاتریک دیده شد. میانگین طول

کروموزوم‌های هابلوئید ۷/۰۶ میکرون و میانگین طول بازوی بلند به بازوی کوتاه در این رقم ۱/۶۸ میکرون برآورد شد. طول کروموزوم‌ها از ۹/۲۴ تا ۵/۰۴ میکرون متغیر اندازه‌گیری شد. طول بازوی کوتاه ۲/۶۷ میکرون و بازوی بلند ۴/۳۸ میکرون اندازه‌گیری شد. در رقم K72، از مجموع ۱۶ جفت کروموزوم، ۴ جفت





شکل ۱- نمایش کاریوتایپ و ایدیوگرام گردو. الف) رقم جمال؛ ب) رقم دماوند؛ ج) رقم Pedro؛ د) رقم B21؛ ه) رقم serr؛ و) رقم K72. محور افقی ایدیوگرام شماره کروموزوم‌ها و محور عمودی بیانگر طول نسبی کروموزوم‌ها است.

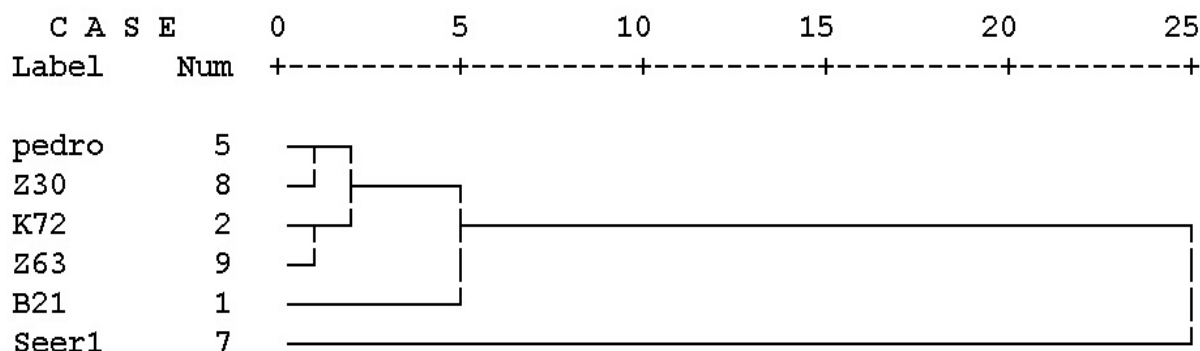
ماهواره در هیچکدام از نمونه‌های مورد مطالعه در سطح کروموزوم‌ها مشاهده نشد. تجزیه کلاستر حاصل از ۶ ژنوتیپ/رقم در (شکل ۲) نشان داده شده است. دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر به دست آمده با استفاده از روش وارد^۱ می‌باشد. این دندروگرام به نوعی برگرفته از میانگین کلی از صفات مورد نظر (طول کروموزوم، بازوی بلند، بازوی کوتاه، نسبت بازوی کوتاه به کل، نسبت بازوی بلند به کوتاه و شاخص کروموزومی) به عنوان متغیر، بر روی نمونه‌های مورد ارزیابی قرار گرفته می‌باشد. نمونه‌های مورد بررسی در سه گروه مجزا تقسیم شدند. در گروه اول رقم‌های K72, Z30, Z63, Pedro قرار گرفتند و در گروه دوم ژنوتیپ B21 و در خوشه سوم نیز رقم گردوی ایرانی serr به تنهایی قرار گرفت. بنابراین تصور می‌شود سه دسته زیرمجموعه به لحاظ تنوع سیتولوژیک وجود دارد.

در ارزیابی تنوع سیتوژنتیکی ارقام و ژنوتیپ‌های داخلی و خارجی گردوی ایرانی مشخص شد (Hosseini 1388) و (2003) Yajima et al. نیز به چنین نتایجی دست یافته و کروموزوم‌ها را

کروموزوم بزرگ و ۱۲ جفت کروموزوم کوچک مشاهده شد. کروموزوم‌های همولوگ شماره ۱، ۴، ۸ ساب‌متاسانتريک و بقیه کروموزوم‌ها به صورت متاسانتريک دیده شدند. میانگین طول کروموزوم‌های هاپلوئید ۶/۷۱ میکرون و میانگین طول بازوی بلند به بازوی کوتاه در این گونه ۱/۵۷ میکرون برآورد شد. طول کروموزوم‌ها از ۸/۰۷ تا ۵/۸۱ میکرون متغیر اندازه‌گیری شد. طول بازوی کوتاه ۲/۷۲ میکرون و بازوی بلند ۳/۹۸ میکرون اندازه‌گیری شد. در ژنوتیپ (B21) دو جفت کروموزوم بزرگ و ۱۴ جفت کروموزوم کوچک مشاهده شد. کروموزوم‌های همولوگ شماره ۱، ۲، ۳، ۸، ۱۰، ۱۱ ساب‌متاسانتريک و بقیه کروموزوم‌ها به صورت متاسانتريک دیده شدند. میانگین طول کروموزوم‌های هاپلوئید ۶/۱۵ میکرون و میانگین طول بازوی بلند به بازوی کوتاه در این گونه ۱/۶۶ میکرون برآورد شد. طول کروموزوم‌ها از ۷/۵۰ تا ۵/۵۱ میکرون متغیر اندازه‌گیری شد. طول بازوی کوتاه ۲/۳۸ میکرون و بازوی بلند ۳/۷۱ میکرون اندازه‌گیری شد. (شکل ۱) کروموزوم‌ها، ایدیوگرام کروموزوم‌های هاپلوئید مربوط به نمونه‌های مورد بررسی را نشان می‌دهد. چنانچه مشاهده می‌شود

^۱ Ward

Rescaled Distance Cluster Combine



شکل ۲- دندروگرام نمونه‌های گردوی ایرانی مورد مطالعه براساس روش وارد

طول کروموزوم در رقم Serr بیشتر از سایر نمونه‌ها به دست آمد این رقم در خوشه‌ای جداگانه قرار گرفت. همچنین ژنوتیپ B21 نیز دارای کمترین طول کروموزوم در میان نمونه‌های مورد بررسی است که در خوشه‌ای جداگانه قرار گرفته است (شکل ۲).

دیپلوئید و تعدادشان را در گردوی ایرانی ۳۲ عدد گزارش کردند، ولی (Tulecke et al. 2003) در منطقه مورد مطالعه کروموزوم‌ها را تریپلوئید و برابر $2n = 3x = 48$ گزارش کردند. نتایج به دست آمده به لحاظ کاریوتیپیک با نتایج (Hosseiny 1388) مبنی بر اینکه اکثر کروموزوم‌ها از نوع متاسانتریک، ساب متاسانتریک و به ندرت تلوسانتریک و بدون ماهواره بوده مطابقت دارد. Pogosyan et al. (1976) گزارش کردند، تفاوت معناداری در مورفولوژی کروموزوم‌های گردو دیده نشده که شامل ۱۰ کروموزوم متاستریک و ۲۲ کروموزوم آکروسنتریک بودند که مغایر با نتایج حاصل از این تحقیق است. طول کلی کروموزوم‌ها در تحقیق حاضر بین ۹/۲۴ تا ۵/۰۴ میکرون اندازه‌گیری شد که با نتایج حاصل از (Zakhar'eva et al. 1982)، بزرگترین طول کروموزوم در همه نمونه‌ها کمتر از ۱/۷ میکرومتر و کوچکترین آن ۰/۸ میکرومتر بود و همچنین (Hosseiny 1388) اندازه ۳۲ کروموزوم از ۱/۴ تا ۳/۷۷ میکرومتر متفاوت بود مغایرت دارد. اگرچه نمونه‌های مورد مطالعه در این تحقیق همگی دیپلوئید و $2n=32$ شمارش شدند و تیپ اکثر کروموزوم نمونه‌های بدست آمده در این تحقیق بر طبق روش (Leaven et al. 1964) از نوع متاسانتریک و ساب متاسانتریک مشاهده شد، ولی وجود تفاوت در صفات مورد بررسی از جمله (طول کلی کروموزوم‌ها، میانگین بازوی بلند و میانگین بازوی کوتاه و...) باعث شد که تجزیه کلاستر نمونه‌ها را به سه دسته مجزا تقسیم کند. با توجه به اینکه

منابع

- Agayave YM (1998) Advanced squash for investigation of plants. Chromosomes. fourth Iranian Congress on crop production and Breeding Science, Isfahan University Technology, Isfahan, Iran 1-20 (In Farsi).
- Agayave YM (2002) New features in karyotype structure and origin of saffron, *Rcous sativus* L. Cytologia 67: 245-252 (In Farsi).
- Arulsekhar S, MC Granahan GH, Parfitt DE (1986) Inheritance of hosphoglucomutase and esterase isozymes in Persian walnut, Journal of Heredity 77: 220-221.
- Bauchan GR, Hossain MA (1998) Karyotypic analysis of N-banded chromosomes of diploid alfalfa: *Medicago sativus* ssp. Caeruleo and ssp. Palcata and their hybrid. Journal of Heredity 98: 191-193.
- FAO (2010) FAOSTAT. Food and agriculture commodities production. Available at <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. FAO, Rome, Italy.
- Hosseiny M, Lotfi M, Vahdati K, Hasani D (2009) Haploidy Induction in Walnut by pollen. Proceeding of Sixth Iranian Horticultural Science Congress. Rasht Iran (In Farsi).
- Leaven A, Fredga K, Sandberg A (1964) Nomenclature for centromic Position on chromosomes. Hereditas 52:201-220.
- Mitra SK, Rathor DS, Bose Tk (1991) Temperate Friuts. Horticulture and Allied Pub. India 646 p.

Osman AM, Reuther A, Erickson LC (1974) Xenia and metaxenia studies in the date palm phoenix dactylifera L. date Growers Institute Report. electrophoretic and ecological analysis of Quercus acrocarpa population in Black hill of South 51: 6-7.

Pogosyan AI, Kartelev VGA (1976) Comparative caryological analysis of two natural botanical varieties of walnut (*Juglans regia* L.). Institut botanik, Armenia SSR. Biologicheskii Zhurnal Armenii (Hayastani Kensabanakan Handes) 4: 89-91.

Sheidai M, Zogagi-far S, Khanafshar S, Zehzad B (2002) Karyotypic study in some Iranian species and populations of Tulipa L. (Liliaceae). CARYOLOGIA-FIRENZE- 55: 81-89.

Stebbins GL (1971) Chromosomal evolution in higher plants. Chromosomal evolution in higher plants Contemporary biology Series of student texts in contemporary biology, London: the University of Michigan, Edward Arnold Publisher Ltd, London 216 page.

Tulecke W, McGranahan G, Ahmadi H (2003) Regeneration by somatic embryogenesis of triploid plants from endosperm of walnut, *Juglans regia* L. cv Manregian.

Antioch Coll., Yellow Springs, OH 45387, USA Journal. Plant Cell Reports 1988 5: 301-304.

Vahdati K, Zareie N (2006) Evaluation of side-stub and hypocotyle grafting efficiency for walnut propagation in Iran. Acta Horticulturae, *Juglans regia* walnuts 705:175-179.

Yajima M, Watanabe Y, Yanagisawa K, Shomura S, Chino S, Oyamada S, Sato S, Torra-Reventos M, Yamaura I, Yamanaka S (2003) Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, 3-15-1, Tokida, Ueda, Nagano 386-8567, Japan. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 2: 134-140.

Yajima M, Nakamura H, Takahashi K, Watanabe Y, Saito S, Yokozawa Y (1997) Somatic chromosome numbers of colchicine-treated Shinano walnut (*Juglans regia* L.) and its F1 seedlings. Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, Ueda, Nagano 386, Japan. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 1997 4: 677-683.

Zakhareva OI, Ketrits LM, Duskabilov TD (1982) Karyological study of Tajikistan forms of walnut (*Juglans regia* L.). Zonal'naya opyt'naya stantsiya, Faizabad, Tajik SSR. Ahboroti Akademijai Fanoi RSS Tocikiston, Subai Fanoi Biology 4:82-85.