بررسی تنوع ژنتیکی سرده انجیر (*Ficus* L.) در ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی توالی‌های تکراری ساده میانی

لیدا دولتیان[1]، حامد خدایاری[2،*] و عبدالناصر محمدی[2]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان

۲- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۱۵ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹٦/۰۵/۳۰)

چکیده

انجیر به عنوان یک محصول مهم، در چند دهه اخیر به دلیل بروز تنش‌های زنده و غیر زنده دچار فرسایش ژنتیکی شده است. هدف از این تحقیق تعیین تنوع ژنتیکی گونه‌های خودروی سرده *Ficus* در ایران با استفاده از نشانگر ISSR می‌باشد. جهت انجام این تحقیق، تعداد ۲۳ نمونه جمعیتی متعلق به گونه‌های این جنس از سراسر کشور جمع آوری و DNA ژنومی آنها از برگ استخراج گردید. از میان ۱۸ آغازگر ISSR مورد آزمایش، شش جفت آغازگر که باندهای مناسب و قابل تحلیل داشت، انتخاب و فرآیند PCR پس از تعیین دمای مناسب برای آنها انجام شد. در مجموع تعداد ۸۳ باند الکتروفورزی PCR تولید شد که از این تعداد ۷۸ باند پلی‌مورفیک بودند. از میان آغازگرهای استفاده شده، آغازگرهای $(AG)_8$ C، $(TG)_8$ A و $(GT)_8$ C مناسب‌ترین آغازگر برای کاربرد در مطالعات آتی تشخیص داده شد. بر اساس نتایج به دست آمده از دندرو گرام رسم شده حاصل از آنالیز داده‌های ISSR، ۲۳ جمعیت *Ficus* در چهار گروه قرار گرفتند. نتایج حاصل از تحلیل واریانس مولکولی نشان داد که بالاترین میزان فاصله ی ژنتیکی بین جمعیت‌های درون گونه‌ها است. نتایج این تحقیق نشان داد که تاکسون های متعلق به سرده *Ficus* در ایران از لحاظ تبارزایی بسیار به هم نزدیک می‌باشند و ارتباط تولید مثلی و جریان ژنی بین آنها بالا است.

واژگان کلیدی: تبارزایی، توالی‌های تکراری ساده میانی، جریان ژنی، انجیر، ایران

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: **Khodayari.h@lu.ac.ir**

مقدمه

انجیر (*Ficus* L.) یکی از جنس‌های مهم خانواده *Moraceae* با ۸۳۰ گونه در دنیا می‌باشد که اعضا آن در مناطق حاره‌ای و نیمه حاره‌ای جهان پراکنش دارند. سرده انجیر به صورت درختچه‌ای یا درختی و گاهی بالا رونده یا خزنده، یک پایه یا دو پایه و دارای شیرابه، برگ‌های ساده، همیشه سبز یا خزان کننده، متناوب یا به ندرت متقابل، کامل تا پنجه‌ای لوب‌دار با شکل و اندازه‌های متنوع دیده می‌شود (Azizian, 2000). این سرده به دلیل تغییر زیاد در ظاهر، گونه‌هایش بسیار مورد توجه است (Rout and Aparajita, 2009). جنس *Ficus* در ایران دارای تاکسون های درختی یا درختچه‌ای خودرو شامل: *F.johannis* Boiss ،*F. benghalensis* L.،*F. carica* L. و *F. carica* subsp. *rupesteris* Hausskn. می‌باشد (Mozaffarian, 2000). تاکسون‌های مذکور از نظر عدد کروموزومی دیپلوئید با تعداد ۲۶ کروموزم هستند (Azizian, 2000). ویژگی‌های خاص درخت انجیر و مقاومت آن در مقابل بعضی از عوامل نامساعد محیطی به ویژه شوری خاک، باعث شده که این درخت با ارزش، به طیف وسیعی از شرایط آب و هوایی سازگار باشد. امروزه آگاهی جهانی در مورد ارزش غذایی انجیر افزایش یافته است و می‌تواند به عنوان یکی از گروههای کاربردی غذایی مورد بررسی قرار می‌گیرد. در زمینه پزشکی از میوه آن شربتی به نام فیجین برای درمان بیماری یبوست تهیه می‌شود و در درمان بیماری نقرس، زخم‌ها و تسریع در التیام آن‌ها حائز اهمیت است (Hanafi, 2007). هم اکنون بخش عمده مواد غذایی از تعداد اندکی از گونه-های گیاهی به دست می‌آید و بهبود ژنتیکی این گونه‌ها یک موضوع حیاتی جهت بقای انسان‌ها است (Almajali *et al.*, 2012).

داده های مولکولی مربوط به DNA، یکی از منابع مهم تاکسونومی است که روز به روز بر اهمیت آن افزوده می-شود (Judd *et al.*, 2002). سریع‌ترین بازدهی که می‌توان از کاربرد زیست شناسی مولکولی به دست آورد، استفاده از نشانگرهای مولکولی است. نشانگرهای توالی‌های تکراری ساده میانی (Inter-simple sequence Repeat; ISSR)، نوع جدیدی از نشانگرهای بسیار چندریخت مبتنی بر PCR هستند که DNA را با استفاده از یک آغازگر تک رشته‌ای ۱۶–۱۸ جفت باز تکثیر می‌کنند و به صورت غالب به ارث می‌رسند که در مطالعه و تحقیق بر روی تنوع ژنتیکی، انگشت نگاری، تکامل نژادی، نشاندارکردن ژن، نقشه برداری ژنتیکی و زیست شناسی تکاملی مفید می‌باشند (Milad *et al.*, 2011). انجیر به عنوان یک محصول مهم، در چند دهه اخیر به دلیل بروز تنش‌های زنده و غیر زنده دچار فرسایش ژنتیکی شده است. برای حفاظت ژنتیکی، استفاده از خصوصیات مورفولوژیکی و مولکولی، تنوع گونه‌ها تعیین و ارزیابی می‌شود و استفاده از این دو نوع نشانگرهای مولکولی و مورفولوژیکی، دو فن مفید برای حفاظت ژنتیکی هستند (Salhi-Hannachi *et al.*, 2004).

در مطالعه‌ای، شازده احمدی و خرازی (Shazdeh Ahmadi and Kharazi, 2016) نتیجه‌گیری نمودند که نشانگرهای ISSR می‌توانند به عنوان یک سیستم مناسب جهت تشخیص تنوع و روابط ژنتیکی در اصلاح گیاه توتون مورد استفاده قرار گیرد. هیکل و همکاران (Heikal *et al.*, 2008) ارتباط فیلوژنتیک گونه‌های *Ficus* در مصر را با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD و نشانگرهای ISSR مورد بررسی قرار دارند و بیان داشتند که استفاده از این نشانگرهای مولکولی یک روش ایده آل برای بهبود و حفاظت از منابع ژنتیکی گیاهی است. گواسمی و همکاران (Guasmi *et al.*, 2006) سطح تنوع ژنتیکی ارقام درخت انجیر در تونس را با استفاده از نشانگرهای ISSR مورد بررسی قرار دادند. روت و آپاراجیتا (Rout and Aparajita, 2009) از نشانگرهای مولکولی ISSR برای شناسایی ژنتیکی و همچنین رابطه فیلوژنتیک بین ارقام و گونه‌های *Ficus* موجود در شرق هندوستان استفاده نمودند. کالیسکان و همکاران (Caliskan *et al.*, 2012) تغییرپذیری ژنتیکی نمونه‌های

انجیر ترکیه را با تکنیک نشانگرهای SSR و RAPD مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که تنوع ژنتیکی بالا بین نمونه های انجیر وجود دارد که می‌توان برای برنامه‌های اصلاح نژادی انجیر یک منبع ژنتیکی ارزشمند را ایجاد کرد. سلهی حناچی و همکاران (Salhi-Hannachi *et al.*, 2004)، تنوع ژنتیکی تعدادی از واریته های انجیر تونسی را بوسیله نشانگرهای مولکولی ISSR و RAPD مورد بررسی قرار دادند. مهدویان و همکاران (Mahdavian *et al.*, 2008) شناسایی و مطالعه تنوع ژنتیکی ارقام انجیر در ایران را با استفاده از صفات ریخت شناسی انجام دادند که نتایج تجزیه واریانس نشان داد تمام صفات مورد بررسی در محدوده ارقام معنی‌دار هستند که نشان دهنده تنوع در صفات مورد بررسی بود.

این تحقیق با هدف مطالعه تنوع ژنتیکی نمونه‌های جمعیتی مربوط به سرده انجیر در ایران با استفاده از نشانگرهای ISSR به منظور تدبیر حفاظتی ژرم‌پلاسم باقی مانده انجیر انجام شد. انتظار می‌رود از منابع ژنتیکی فعلی نه تنها به خاطر بقاء گونه، بلکه به خاطر ایجاد تنوع و تغییرپذیری کافی برای برنامه‌های به‌نژادی آینده، محافظت به عمل آید.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: آزمایش‌های مربوط به تحقیق حاضر در آزمایشگاه تحقیقاتی زیست شناسی دانشگاه لرستان انجام شد. تعداد ٢٣ نمونه جمعیتی از سه تاکسون متعلق به سرده انجیر از نواحی جغرافیایی مختلف ایران جمع‌آوری گردید. نمونه‌های جمعیتی مورد استفاده قرار گرفته عبارت بودند از: *F. carica* (١١ نمونه)، *F. johannis* (٥ نمونه) و *F. carica* subsp. *rupesteris* (٧ نمونه). شناسایی نمونه‌ها بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی مندرج در فلور ایران (Rechinger, 1963) صورت پذیرفت. نمونه‌های جمع‌آوری شده در هرباریوم گروه زیست شناسی دانشگاه لرستان نگهداری می‌شوند (جدول ١).

استخراج و تکثیر DNA: DNA ژنومی با استفاده از روش CTAB (Murray and Thompon, 1980)، از برگ‌ها جدا شد. الکتروفورز با ژل آگارز برای تعیین کمیت و کیفیت DNA مورد استفاده قرار گرفت. بعد از بهینه‌سازی PCR، از میان آغازگرهای ISSR که قبلا توسط روت و آپاراجیتا (Rout and Aparajita, 2009) روی انجیرهای خوراکی هندوستان استفاده شده بود، شش آغازگر که تکرارپذیری و چندشکلی بیشتری نشان دادند، برای آزمایش‌های بعدی (PCR و الکتروفورز) و تجزیه و تحلیل باندهای حاصله در تحقیق حاضر انتخاب شدند (جدول ٢).

برای انجام PCR از روش رودر و همکاران (Roder *et al.*, 1998) با اندکی تغییرات استفاده شد. واکنش PCR در حجم نهایی ٢٠ میکرولیتر شامل ٢ میکرولیتر از نمونه DNA (٢٠ng/µl)، یک میکرولیتر از هر پرایمر (10 µM)، 10 میکرولیتر Master mix (2x) و ٧ میکرولیتر آب مقطر دوبار استریل انجام شد. کلیه آزمایش‌های PCR در دستگاه PeQSTAR، مدل universal Gradinet انجام شد و پس از پایان آزمایش، نمونه‌ها به فریزر ٢٠- درجه سانتی‌گراد منتقل شد.

چرخه های PCR به شرح این شرایط انجام شد: تکثیر قطعات DNA به صورت یک چرخه مقدماتی شامل واسرشت‌سازی اولیه به مدت ٥ دقیقه در ٩٤ درجه سانتی‌گراد، ٤٠ چرخه شامل واسرشت سازی در دمای ٩٢ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر در دمای بین ٥٦-٤٨ درجه سانتی‌گراد (بسته به نوع آغازگر) به مدت ٤٠ ثانیه، مرحله بسط به مدت ٤٥ ثانیه در دمای ٧٢ درجه سانتی گراد و یک چرخه بسط نهایی به مدت ٧ دقیقه در دمای ٧٢ درجه سانتی‌گراد. محصولات PCR روی ژل آگارز ١/٥ درصد به مدت ٢ ساعت در بافر TBE مورد تفکیک قرار گرفتند. عکسبرداری از باندهای حاصل، با استفاده از DNA safe stain و زیر نور UV صورت گرفت. برای مقایسه اندازه قطعات روی ژل آگارز از شاخص DNA ١٠٠ جفت نوکلئوتیدی استفاده گردید.

جدول ۱- نمونه ها و جمعیت‌های گیاهی مورد استفاده در این پژوهش

Table 1. The plant accessions and specimens used in this study

شماره number	کد نمونه Accession code	نام علمی گونه Scientific name	محل جمع‌آوری Collecting location	ارتفاع محل (m) Altitude (m)
1	FC.mas	*F. carica*	مشهد Mashhad	0988
2	FC.nek	*F. carica*	نکا Neka	0047
3	FC.sar	*F. carica*	ساری Sari	0042
4	FC.bab	*F. carica*	بابل Babol	0002
5	FC.mah	*F. carica*	محمودآباد Mahmoodabad	0025
6	FC.amo	*F. carica*	آمل Amol	0116
7	FC.har	*F. carica*	هرسین Harsin	1547
8	FC.cha	*F. carica*	قایم شهر Ghaemshahr	0050
9	FC.yas	*F. carica*	یاسوج، دنا، سی سخت Yasooj, Dena, Sisakht	1817
10	FC.azn	*F. carica*	ازنا Azna	1834
11	FC.mam	*F. carica*	پلدختر، معمولان Poledokhtar, Maamoolan	0878
12	FR.and	*F. carica* subsp. *rupestris*	اندیمشک، دوکوهه Andimeshk, Dokooheh	0142
13	FR.als	*F. carica* subsp. *rupestris*	خرم آباد Khorramabad	1580
14	FR.dar	*F. carica* subsp. *rupestris*	دره شهر، گردنه کل سفید Darrehshahr, Kalesefid turn	0647
15	FR.pol	*F. carica* subsp. *rupestris*	پلدختر Poledokhtar	0669
16	FR.koh	*F. carica* subsp. *rupestris*	کوهدشت، شیرز Koohdasht, Shirez	1171
17	FR.san	*F. carica* subsp. *rupestris*	سنندج Sanandaj	1401
18	FR.kor	*F. carica* subsp. *rupestris*	خرم آباد Khorramabad	1153
19	FJ.shi	*F. johannis*	شیراز Shiraz	1491
20	FJ.yas	*F. johannis*	یاسوج، دنا، سی سخت Yasooj, Dena, Sisakht	1817
21	FJ.kaz	*F. johannis*	کازرون Kazeroon	0856
22	FJ.est	*F. johannis*	استهبان Estahban	1731
23	FJ.ham	*F. johannis*	همدان Hamedan	2148

جدول ٢- نام و توالی آغازگرهای ISSR مورد استفاده جهت واکنش PCR

Table 2. Name and sequence of ISSR primers used for PCR reaction

شماره No	نام آغازگر Primer name	توالی آغازگر('3-5') Primer Sequence (5'-3)	توالی آغازگر('3-5') Primer Sequence(5'-3)	الگوی تکثیر Amplification pattern
1	$ISSR_1$	(AG)8 T	AGAGAGAGAGAGAGAGT	عدم باندهی No banding
2	$ISSR_2$	$(AG)_8$ C	AGAGAGAGAGAGAGAGC	باندهی مناسب Suitable banding
3	$ISSR_3$	(AC)8 T	ACACACACACACACACT	عدم باندهی No banding
4	$ISSR_4$	$(GA)_8$ A	GAGAGAGAGAGAGAGAA	باندهی مناسب Suitable banding
5	$ISSR_5$	(AC)8 G	ACACACACACACACACG	عدم باندهی No banding
6	$ISSR_6$	(GA)8 T	GAGAGAGAGAGAGAGAT	عدم باندهی No banding
7	$ISSR_7$	$(TG)_8$ A	TGTGTGTGTGTGTGTGA	باندهی مناسب Suitable banding
8	$ISSR_8$	(CT)8 A	CTCTCTCTCTCTCTCTA	عدم باندهی No banding
9	$ISSR_9$	$(GT)_8$ C	GTGTGTGTGTGTGTGTC	باندهی مناسب Suitable banding
10	$ISSR_{10}$	(TG)8 C	TGTGTGTGTGTGTGTGC	عدم باندهی No banding
11	$ISSR_{19}$	(GACAGATA)2	GACAGATAGACAGATA	عدم باندهی No banding
12	$ISSR_{12}$	(GT)8 A	TGTGTGTGTGTGTGTGA	عدم باندهی No banding
13	$ISSR_{13}$	ACA $(TG)_7$	ACATGTGTGTGTGTGTG	باندهی مناسب Suitable banding
14	$ISSR_{14}$	ACG $(GT)_7$	ACGGTGTGTGTGTGTGT	باندهی مناسب Suitable banding
15	$ISSR_{15}$	CAG(CA)7	CAGCACACACACACACA	عدم باندهی No banding
16	$ISSR_{16}$	TGG(AC)7	TGGACACACACACACAC	عدم باندهی No banding
17	$ISSR_{17}$	(GACA)4	GACAGACAGACAGACA	عدم باندهی No banding
18	$ISSR_{18}$	(ACAG)4	ACAGACAGACAGACAG	عدم باندهی No banding

تجزیه و تحلیل داده های حاصل از ISSR-PC : حضور و غیاب هر آلل با کدهای به ترتیب یک و صفر در ماتریس‌های دوتایی وارد شد و داده‌های خام در جداولی که در بسته نرم افزاری *Microsoft Excel* تهیه شده بود، وارد گردیدند. شباهت‌های ژنتیکی بر اساس ضریب شباهت جاکارد و با استفاده از نرم‌افزار *PAUP* به وسیله تحلیل *Neighbour Joining* از روی جدول داده‌ها مورد محاسبه و بررسی قرار گرفت. تحلیل واریانس مولکولی (*AMOVA; Analysis of Molecular Variance*) یک مدل آماری برای اندازه گیری واریانس مولکولی در یک جامعه نمونه است که می‌تواند ورودی آن از داده‌های خام اولیه (جدول *0* و *1*) و یا ماتریس فاصله ژنتیکی باشد. در این تحلیل سهم هر کدام از سطوح (تفاوت بین گونه‌ها، تفاوت بین جمعیت‌ها و تفاوت بین نواحی جغرافیایی) در میزان تنوع مشاهده شده اندازه گیری شد. با استفاده از نرم افزار *Gen ALEX version 6* داده‌ها مورد تجزیه و تحلیل قرار داده شدند.

میزان همبستگی بین فاصله ژنتیکی و جغرافیایی بین جمعیت‌ها (Z_m) با استفاده از آزمون منتل (Mantel,

1967) تعبیه شده در نرم‌افزار Gene AlEx Vesion 6.5 بر اساس فرمول زیر مورد محاسبه قرار گرفت:

رابطه ۱ $$Z_m = \sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{n} g_{ij} \times d_{ij}$$

در این فرمول، g_{ij} و d_{ij} به ترتیب فاصله ژنتیکی و جغرافیایی بین جمعیت های i و j و n نیز کل جمعیت می‌باشد.

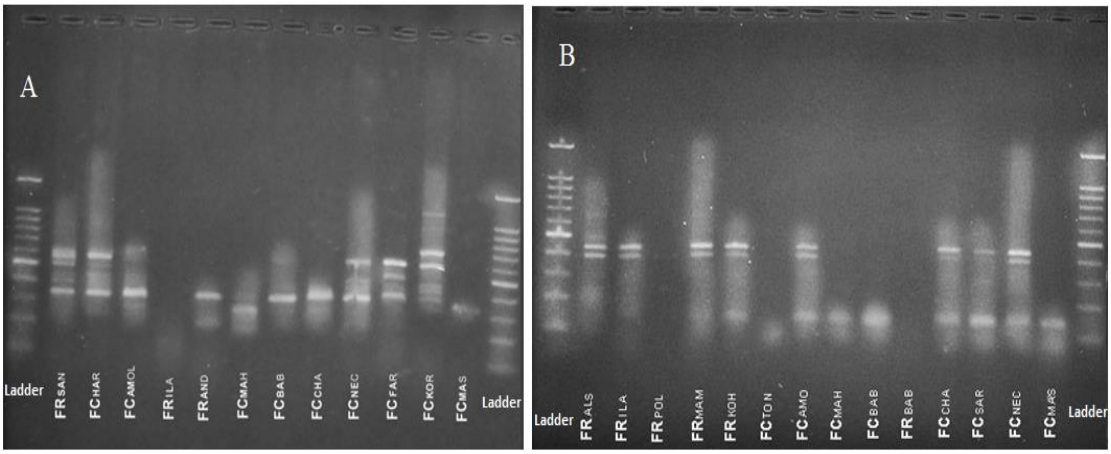
نتایج و بحث

تحلیل‌های حاصل از بررسی شش جفت آغازگر در ۲۳ جمعیت از سه نمونه جمعیتی خودروی *Ficus*، در مجموع تعداد ۸۳ باند ایجاد کرد که از این تعداد، ۷۸ باند پلی مورفیک بودند (شکل ۱).

تعداد باندها برای هر جایگاه آغازگر از ۱۰ تا ۱۷ باند با میانگین ۱۳/۸ محاسبه شد. آغازگر (GT)8C کمترین تعداد باند چندشکل (۱۰) و جفت آغازگر(AG)8C بیشترین تعداد باند چندشکل (۱۷) را ایجاد کردند. بیشترین میزان چندشکلی در جفت آغازگرهای (TG)8A و (GT)8C با میزان ۱۰۰٪ مشاهده شد و کمترین میزان چندشکلی در جفت آغازگرهای ACA(TG)7 و ACG(GT)7 با میزان ۸٦/٦٪ مشاهده گردید. میزان کل چندشکلی مشاهده شده در تمامی آغازگرها حدود ۹٤٪ بود. از میان آغازگرهای استفاده شده، آغازگرهای (AG)8 C، (TG)8 A و (GT)8 C بیشترین چندشکلی را از خود نشان دادند (جدول ۳)، که با نتایج آزمایش روت و آپاراجیتا (Rout and Aparajita, 2009) روی انجیرهای هندوستان مطابقت دارد.

فاصله ژنتیکی در گونه‌های خودرو جنس *Ficus*: ماتریس شباهت بین ۲۳ جمعیت مختلف از تاکسون‌های متعلق به جنس انجیر در ایران با استفاده از ضرایب Dice، Jacard و Simple matching محاسبه شد. به دلیل این که میزان همبستگی (r) مابین دندروگرام و ماتریس تشابه برای ضریب Jacard میزان بالاتری نسبت به دیگر ضرایب تشابه نشان داد، و همچنین تفاوت معناداری بین دندروگرام های رسم شده با ضرایب تشابه مشاهده نگردید، بنابراین تنها به ارائه‌ی دندروگرام رسم شده‌ی حاصل از ضریب تشابه Jaccard اکتفا شد. کمترین فاصله ژنتیکی (۰/٦٦) بین جمعیت‌های *F. carica* هرسین و *F. carica* subsp. *rupestris* سنندج، و بیشترین فاصله (۰/۹٦) هم بین *F. carica* معمولان و *F. carica* آمل مشاهده شد.

دندرو گرام رسم شده حاصل از آنالیز داده‌های ISSR برای ۲۳ جمعیت جنس *Ficus* با استفاده از نرم افزار PAUP به وسیله تحلیل Neigbour Joining، شامل چهار گروه شد (شکل ۲).



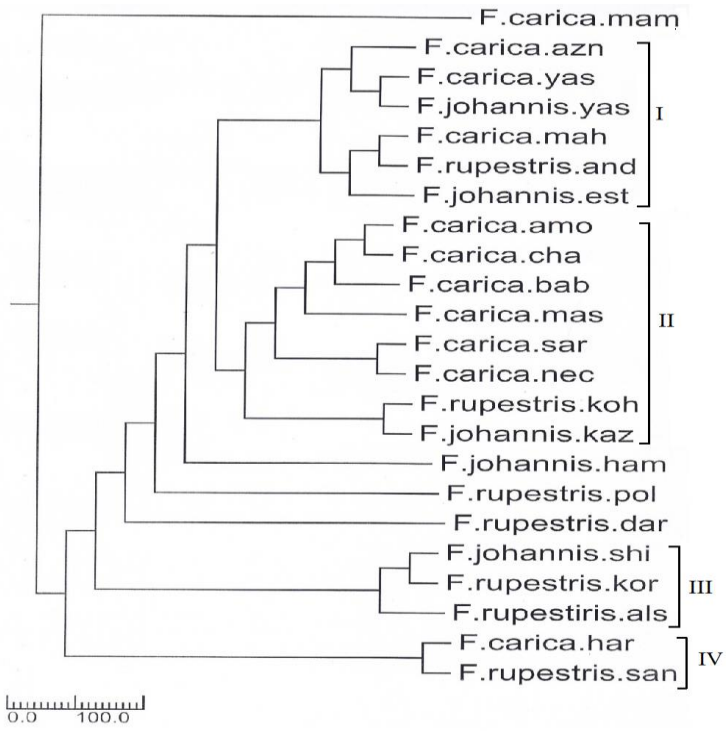
شکل ۱- الگوی باندی حاصل از ISSR-PCR مربوط به آغازگر ISSR9 (شکل A) و آغازگر ISSR2 (شکل B) در ژنوتیپ های *Ficus* روی ژل آگارز 1.5 درصد.

Figure 1. ISSR-PCR banding pattern related to ISSR9 (A) and ISSR2 (B) in *Ficus* genotypes on 1.5 % agarose gel, (100 bp): DNA Ladder

جدول ۳- نام، تعداد کل باندها، تعداد باندهای چند شکل و درصد چند شکلی آغازگرهای ISSR مورد استفاده در ۲۳ جمعیت جنس *Ficus*

Table 3. Name, No. of scored bands, No. of polymorphic bands and polymorphim percent of ISSR primers used in 23 population of genus *Ficus*

نام آغازگر Primer name	توالی آغازگر(5'-3') Primer Sequence (5'-3)	تعداد کل باندها No. of Scored bands	تعداد باند چند شکل No. of Polymorphic bands	درصد چند شکلی Polymorphism (%)
$ISSR_2$	$(AG)_8$ C	17	17	100
$ISSR_4$	$(GA)_8$ A	13	12	92
$ISSR_7$	$(TG)_8$ A	13	13	100
$ISSR_9$	$(GT)_8$ C	10	10	100
$ISSR_{13}$	ACA $(TG)_7$	15	13	86.6
$ISSR_{14}$	ACG $(GT)_7$	15	13	86.6
Total	-	83	78	94



شکل ۲- دندروگرام رسم شده حاصل از آنالیز داده‌های ISSR به وسیله تحلیل Neighbor Joining برای ۲۳ جمعیت جنس *Ficus*

Figure 2. Dendrogram of ISSR data analyzed by Neighbor Joining method for 23 population of the genus *Ficus.*

گروه I شامل جمعیت‌های *F. carica* ازنا، *F. carica* یاسوج، *F. johannis* یاسوج، *F. carica* محمود آباد، *F. rupesteris* اندیمشک و *F. johannis* استهبان می‌باشد. گروه II متشکل از جمعیت‌های *F. carica* آمل، *F. carica* قائم شهر، *F. carica* بابل، *F. carica* مشهد، *F. carica* ساری و *F. carica* نکا، *F. rupesteris* کوهدشت و *F. johannis* کازرون است. گروه III شامل جمعیت-های *F. johannis* شیراز، *F. rupesteris* خرم آباد و *F. rupesteris* الشتر است. گروه IV نیز از جمعیت‌های *F.carica* هرسین و *F. rupesteris* سنندج تشکیل شده است. همانطور که در شکل ۲ ملاحظه می‌شود، هر کدام از سه تاکسون مورد مطالعه با همدیگر ایجاد گروه‌های خواهری نموده‌اند بطوری‌که از گروه‌بندی تاکسونومیکی رایج تبعیت نکرده‌اند که این نتایج با یافته‌های المجالی و همکاران (Almajali *et al.*, 2012) مطابقت دارد. قرار گرفتن جمعیت *F.carica* subsp. *rupesteris* سنندج در

بین جمعیت‌های گونه *F.carica* نشان دهنده تشابه بالای ژنتیکی بین این دو تاکسون است. نمونه جمعیتی *F. carica* معمولان به طور مجزا از سایر جمعیت‌ها قرار گرفته است که احتمالا به دلیل داشتن آلل‌های اختصاصی باشد. جمعیت‌های *F. johannis* همدان، *F. rupesteris* پلدختر و دره شهر چندان قرابتی با بقیه ندارند و بصورت پلی‌تومی در دندروگرام ظاهر شده‌اند. همانطوری که در دندروگرام شکل ۲ مشاهده می‌شود، گروه‌بندی موجود در دندروگرام تناسبی با موقعیت تاکسون‌ها در رده‌بندی‌های تاکسونومیکی موجود و منشا جغرافیایی آنها ندارد.

تحلیل مولفه اصلی (PCoA): تجزیه مختصات اصلی جهت تعیین روابط ژنتیکی بین گونه‌ها استفاده می‌شود. نحوه پراکندگی جمعیت‌ها با استفاده از آزمون تجزیه مختصات اصلی در شکل ۳ نشان داده شده است. از آنجا که به علت محدودیت در گروه‌بندی‌های مواد ژنتیکی، تجزیه خوشه‌ای به تنهایی نمی‌تواند در بررسی تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرد، برای تعیین نحوه پراکنش نشانگرهای ISSR مورد استفاده در ژنوم گونه‌های انجیر، آزمون تجزیه به مولفه‌های اصلی نیز صورت می‌گیرد. گروه بندی صورت گرفته توسط تجزیه مختصات اصلی (PCOA) با گروه بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای (شکل ۲) مطابقت دارد. نتایج حاصل از تحلیل آزمون Mantel نشان داد که فاصله ژنتیکی و فاصله جغرافیایی به نسبت ۳/۸۷% دارای همبستگی هستند. این عدد که از جذر *R2* به دست آمده است، نشانگر این مطلب است که هر چه فاصله جغرافیایی بیشتر شود به میزان ۳/۸۷% انتظار می‌رود که جمعیت‌ها از نظر ژنتیکی از هم دور شوند. به عبارت دیگر هرچه فاصله جغرافیایی بیشتر شود به میزان ۳/۸۷ درصد انتظار می‌رود که جمعیت‌ها از نظر ژنتیکی از هم دور شوند.

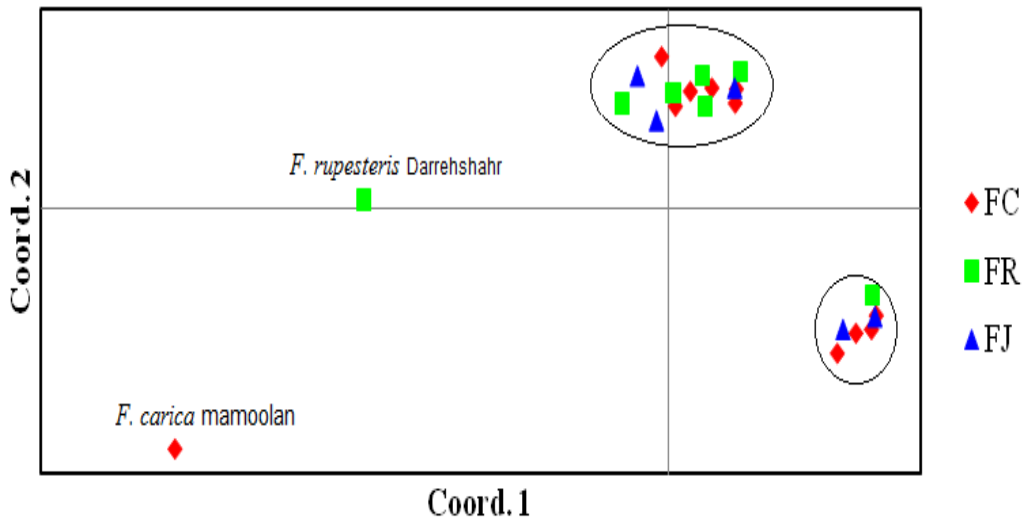
آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA): نتایج حاصل از تحلیل واریانس مولکولی نشان داد تفاوتی مابین تاکسون ها وجود ندارد و بالاترین میزان فاصله‌ی ژنتیکی بین جمعیت‌های درون گونه‌ها است. پس از محاسبه ارزش Est.Var. با استفاده از داده‌های آللی کل ISSR ها، مقدار بالای آن (Est.Var = 1.0) نشان‌دهنده عدم تبعیت تاکسون‌های متعلق به سرده *Ficus* در ایران از موقعیت تاکسونومیکی حال حاضر آنها می‌باشد که به دلیل جریان ژنی بالا می‌باشد (جدول ٤).

با توجه به نتایج به دست آمده، تنوع ژنتیکی این سرده در ایران بالا است. شش جفت آغازگر استفاده شده برای نشانگرISSR قطعات متعددی از DNA با اندازه‌های متفاوت و سطح بالایی از پلی‌مورفیسم را در تمامی جمعیت‌ها نشان داد که نشان‌دهنده پلی‌مورفیسم بالای این نشانگر است. جداسازی جمعیت‌ها بیشتر به لحاظ جغرافیایی صورت گرفت. به نظر می‌رسد که این نشانگر در آشکارسازی تنوعات ژنتیکی درون گونه و مطالعه‌ی جریان ژنی بین جمعیت‌های این گونه کارایی بالایی داشته باشد. در جمعیت‌هایی که جریان ژنی بیشتر است شباهت ژنی بیشتر بوده است. داده‌های ISSR، جمعیت های مربوط به *F. johannis* شیراز و یاسوج و *F. rupesteris* اندیمشک را به طور کامل جدا نکرد که احتمالا به دلیل جریان ژنی بالا بین آنها می‌باشد. نتایج این تحقیق نشان داد که تاکسون‌های متعلق به سرده *Ficus* در ایران از لحاظ قرابت تبارزایشی بسیار به هم نزدیک می‌باشند و ارتباط تولید مثلی و جریان ژنی بین آنها بسیار بالاست. نتایج بدست آمده نشان داد انتخاب نمونه‌های انجیر از مناطق مختلف جغرافیایی ایران، گروه بندی واضحی بر مبنای منشا جغرافیایی آنها بدست نمی‌دهد که موید نتایج ایکگامی و همکاران (Ikegami *et al.*, 2009) می‌باشد. نتایج فوق بیانگر تبادلات گسترده‌ی ژنی از طریق انتشار رویشی در میان مناطق مختلف در ایران می‌باشد که با نتایج آزمایش اسید و همکاران (Essid, *et al.*, 2015) روی نمونه‌های انجیر تونس با استفاده از نشانگرهای SSR، مطابقت کامل دارد.

بیشتر جمعیت‌های *F. johannis* و *F. carica* در خوشه بندی در کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند که می‌تواند دال بر شباهت ژنتیکی بالای دو گونه باشد که این موضوع با

نتایج تحقیقی که توسط المجالی و همکاران (Almajali *et al.*, 2012) انجام گرفت، مطابقت دارد. خالد و همکاران (Khaled *et al.*, 2005)، تنوع ژنتیکی ارقام *F.carica* را با استفاده از نشانگرهای RAPD وISSR مورد بررسی قرار دادند، که تحلیل AMOVA نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بالای جمعیت‌های درون گونه است که منجر به ایجاد جریان ژنی می‌شود. *F.carica* گیاهی است با گرده افشانی مخصوص که از طریق حشرات گرده‌افشانی می‌کند، پرندگان میوه‌های انجیر را می‌خورند و آن را به اطراف انتقال می‌دهند که این دانه‌های پراکنده برای حفظ سطح تشابه بالا کافی است یا اینکه نمونه‌هایی که به هم بسیار شباهت دارند از طریق مهاجرت، اجداد آن‌ها یکی بوده باشد. در جمعیت‌هایی که جریان ژنی بیشتر باشد، شباهت ژنی بیشتر بوده، جمعیت های ازنا و یاسوج شباهت بسیار زیادی را در دندروگرام حاصل داشتند و به لحاظ ژنتیکی کنار یکدیگر قرار گرفتند. در زیر گروه II که جمعیت‌های شمال و شمال شرق ایران در کنار هم قرار گرفته اند، جریان ژنی بیشتر، منجر به شباهت بیشتر این جمعیت ها به یکدیگر شده است. ایکگامی و همکاران (Ikegami *et al.*, 2009) با استفاده از ترکیبی از سه نشانگر ISSR، RAPD و SSR نشان دادند که تنوع ژنتیکی بین ارقام آسیایی و اروپایی انجیر گونه *F. carica* پایین است، که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت ندارد.

بطور کلی انجیرهای ایران تنوع ژنتیکی و پلی‌مورفیسم بالایی را نشان دادند. تاکسون های متعلق به سرده *Ficus* در ایران از لحاظ فیلوژنتیک بسیار به هم نزدیک می‌باشند و ارتباط تولیدمثلی و جریان ژنی بین آنها بسیار بالاست. با توجه به اینکه سرده انجیر از ارزش غذایی و دارویی بالایی برخوردار است، و از طرفی دیگر این گیاه دارای پراکنش بالایی در ایران است، بنابراین استفاده از نشانگرهای مولکولی بیشتر از جمله ژن‌های کلروپلاستی و هسته‌ای برای مطالعه بیشتر، در آینده پیشنهاد می‌شود.



شکل ۳- گروه بندی جمعیت‌های جنس *Ficus* بر اساس آنالیز PCOA. FC: *F. carica*, FR: *F. rupestris* and FJ; *F. johannis*

Figure 3. Grouping of *Ficus* populations based on principal coordinate analysis (PCOA). FC: *F. carica*, FR: *F. rupestris* and FJ; *F. johannis*

جدول ٤- نتایج آنالیز واریانس مولکولی در ۲۳ جمعیت از *Ficus* در ایران (آزمون معنی‌داری: ۱۰۲۳ جایگزینی)

Table 4. Results of analysis of molecular of variance in 23 populations of *Ficus* in Iran (significance test: 1023 permutations)

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی d.f	مجذور مربعات Sum of squares	میانگین مربعات Summary of matches (MS)	واریانس برآورد شده Estimated variance	درصد %
تنوع بین جمعیتی Inter population variation	2	24.588	12.294	0.000	0.000%
تنوع درون جمعیتی Intra population variation	22	453.972	20.635	20.635	100%
کل Total	24	478.560	-	20.635	100%

References

Almajali, D., Abdel-Ghani, A.H. and Migdadi, H. (2012). Evalution of genetic diversity among Jordanian fig germplast accessions by morphological traits and ISSR markers. *Scientia Horticulturae*, **147:** 8-19.

Azizian, D. (2000). *Flora of Iran (Moraceae family)*. Research Institute of Forests and Rangelands Press, No.: **35**, Tehran, Iran (In Persian).

Caliskan, O., Polat, A.A., Celikkol, P. and Bakir, M. (2012). Molecular characterization of autochthonous Turkish fig accessions. *Spanish journal of Agricultural Research,* **10(1)**: 130-140.

Essid, A., Aljane, F., Ferchichi, A. and Hormaza J.I. (2015). Analysis of genetic diversity of Tunisian caprifig (*Ficus carica* L.) accessions using simple sequence repeat (SSR) markers. *Hereditas*, **152**: 1-7.

Guasmi, F., Ferchichi, A., Farés, K. and Touil, L. (2006). Identification and differentiation of *Ficus carica* L. cultivars using inter simple sequence repeat markers. *African Journal of Biotechnology*, **5**: 1370-1374.

Hanafi, M.H., Hanafi, N. and Hanafi, A. (2007). *Fig and Olive (cultivation, holding, yield) and Their Treatment Characters*. Rezghi press. Ghom, Iran (In Persian).

Heikal, A., El-Mokadem, H.E. and El-Tayeb, H.F. (2008). Phylogenetic Relationship of Four *Ficus* Species Using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) and Inter-simple Sequence Repeat (ISSR) Markers. *Journal of Applied Sciences Research*, **4(5)**: 507-514.

Ikegami, H., Nogata, H., Hirashima, K., Awamura, M. and Nakahara, T. (2009). Analysis of genetic diversity among European and Asian fig varieties (*Ficus carica* L.) using ISSR, RAPD, and SSR markers. *Genetic Resources and crop Evolution*, **56(2)**: 201-209.

Judd, C.S., Campbell, E.A., Kellogg, P., Stevens, F. and Donoghue, M.J. (2002). *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*, 2nded. Sinauer Associates press. Sunderland, UK.

Khaled, C. (2005). Comparative analysis of genetic 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.

Mahdavian, M., Lessani, H., Ebadi, A. and Fatah, R. (2008). Morphological study of genetic variation among Iranian figs (*Ficus carica* L.) cultivars. *Pajouhesh & Sazandegi*, **80:** 144-158 (In Persian).

Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, **27**: 209-220.

Milad, S.I., Wahba, L.E. and Barakat, M.N. (2011). Identification of RAPD and ISSR markers associated with flag leaf senescence under warer- stressed conditions in wheat. *Australian Journal of Crop Science*, **5**: 337- 343.

Mozaffarian, V. (2000). *Plant Classification, volum **2**: Dicotyledons*. Amirkabir press. Tehran, IR (In Persian).

Murray, M.G. and Thompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research,* **8(19)**: 4321-4325.

Rechinger, K.H. (1987). *Ficus* (Moraceae) in K.H. Rechinger (ed.) *Flora Iranica* no. 162: 298-300. Akademische Druck und Verlagsanstalt press. Graz, AU.

Rout, G.R. and Aparajita, S. (2009). Genetic Relationships among *23 Ficus* Accessions using Inter simple sequence Repeat Markers. *Journal of crop sciences and Biotechnology*, **12(2)**: 91-96.

Salhi-Hannachi, A., Trifi, M., Zehdi, S., Hedfi, J., Mars, M., Rhouma, A. and Marrakchi, M. (2004). Inter- simple sequence Repeat fingerprints to ass's genetic diversity in Tunisian fig (Ficus Carica L.) germplasm. *Genetic Research crop Evolution*, **51**: 269-275.

Shazdeh Ahmadi, M. and Kharazi, M. (2016). Application of ISSR Molecular Markers for Genetic Diversity Study of Some Tobacco Genotypes. *Journal of Plant Genetics Researches*, **2(2)**: 33-46 (In Persian).

The Genetic Diversity Survey of the *Ficus* L. Genus in Iran using Inter Simple Sequence Repeats Markers

Lida Doolatian[1], Hamed Khodayari[2,*] and Abdelnaser Mohammadi[2]

1- Former M.Sc. Student, Department of Biology, Faculty of Sciences, Lorestan University, Khorramabad, Iran
2- Assistant Professor, Department Department of Biology, Faculty of Sciences, Lorestan University, Khorramabad, Iran

(Received: January 04, 2017 – Accepted: August 21, 2017)

Abstract

Figs as an important product in recent decades due to biotic and abiotic stresses have been faced to genetically erosion. The aim of this study was to determine the genetic diversity of taxa belonged to *Ficus* genus using Inter-simple sequence Repeat markers (ISSR). For this purpose, 23 accessions belonging to the fig genus collected from across the Iran country and genomic DNA was extracted from leaves. Out of 18 ISSR primers pairs, six primers pairs selected and PCR process were achieved for them. A total of 83 bands were produced, of which 78 were polymorphic. Using PAUP software, through Neighbor Joining methods, 23 populations of fig were divided in four groups. Among the primers, (AG) 8 C, (TG) 8 A and (GT) 8 C were identified as the most appropriate primers for using in future studies. Based on the results obtained from the analysis of data from ISSR, 23 populations of *Ficus* were classified into four groups. The results of the analysis of molecular variance (AMOVA) showed that there is no difference between the taxa and the highest genetic distance between populations within species. The results of this study showed that taxa belonging to the *Ficus* genus in Iran are very closely related phylogentically, and the relationship between reproductive and genetic flow is high.

Keywords: Fig, Gene flow, Inter-Simple Sequence Repeats, Iran, Phylogeny

[*] **Corresponding Author, E-mail: Khodayari.h@lu.ac.ir**