

ارزیابی تنوع ژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های انجیر با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR

بتول قیطرانی^۱، جواد عرفانی مقدم^{۲*} و آرش فاضلی^۳

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

۲- دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام

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

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۰۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۰۸)

چکیده

انجیر (*Ficus carica* L.) یکی از مهم‌ترین گونه‌های میوه، متعلق به خانواده موراسه (Moraceae) است و به‌طور گسترده‌ای در ایران گسترش یافته است. در این مطالعه، تنوع ژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های انجیر که از شش منطقه مختلف استان ایلام جمع‌آوری شده بودند بر اساس نشانگرهای RAPD و ISSR بررسی شد. در مجموع ۷۳ و ۲۹ آلل به ترتیب از ۱۴ آغازگر RAPD (با اندازه ۳۵۰ تا ۲۵۰۰ جفت‌باز) و ۵ آغازگر ISSR (با اندازه ۱۵۰ تا ۲۵۰۰ جفت‌باز) به دست آمد. تعداد آلل‌های مشاهده شده برای آغازگرهای RAPD از ۱ (OPA-03) تا ۹ (OPA-09 و UBC-429) با میانگین ۵/۲۱ آلل در هر مکان به دست آمد. همچنین تعداد آلل‌های مشاهده شده برای آغازگر ISSR از ۳ (UBC-807) تا ۸ (UBC-810 و UBC-414) با میانگین ۵/۸ آلل در مکان ثبت شد. بیشترین و کمترین مقدار شاخص شانون (I) به ترتیب متعلق به آغازگرهای UBC-429 (۲/۱۸) و OPA-03 (۰/۱۲) بود. ضریب همبستگی ژنتیکی جاکارد در بین ژنوتیپ‌ها بر اساس داده‌های RAPD از ۰/۱۲ تا ۰/۷۳ و برای داده‌های ISSR از ۰/۰۷ تا ۱ ثبت شد. تجزیه خوشه‌ای با روش UPGMA بر اساس داده‌های نشانگرهای RAPD و ISSR، ژنوتیپ‌ها را در فاصله ژنتیکی ۰/۴۵، به شش گروه اصلی تقسیم کرد. نتایج کلی نشان داد تنوع ژنتیکی بالایی در بین ژنوتیپ‌های انجیر وجود دارد که در طبقه‌بندی، استفاده از منابع ژنتیکی و برنامه‌های به‌نژادی انجیر اهمیت دارد.

واژگان کلیدی: آلل، تنوع ژنتیکی، ضریب همبستگی، منابع ژنتیکی

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: j.erfani@ilam.ac.ir

مقدمه

کشور ایران به لحاظ وسعت زیاد و شرایط اقلیمی بسیار متنوع، جزء مراکز مهم انتشار و پراکنش بسیاری از گونه‌های گیاهی است. انجیر خوراکی (*Ficus carica*) از خانواده Moraceae و یکی از میوه‌های مهم نیمه‌گرمسیری است که تنوع وسیعی در نمونه‌های مختلف کشت‌شده در کشور وجود دارد (Rashidi and Noureddini, 2011). این خانواده ۱۴۰۰ گونه دارد که در ۴۰ جنس گروه‌بندی شده‌اند و جنس *Ficus* خود شامل ۷۰۰ گونه می‌باشد (Mahdavian et al., 2008). انجیر در ایران، در اغلب جنگل‌های شمالی و سواحل دریای مازندران، آذربایجان، اصفهان، فارس، خوزستان و خراسان پراکندگی دارد (Jafari et al., 2015).

با توجه به اهمیت اقتصادی و تغذیه‌ای انجیر و به‌منظور بررسی و تعیین تنوع ژنتیکی ارقام آن، اقدام به جمع‌آوری و ایجاد کلکسیون از ژرم‌پلاسم‌های موجود در ایران در دانشکده کشاورزی تهران گردیده است (Mahdavian et al., 2008). با این حال، بهره‌برداری مؤثر از تنوع ژنتیکی گیاهی به‌عنوان یک راه‌کار کلیدی برای ایجاد پایداری بلند مدت در سیستم‌های تولید در کشاورزی از طرف جامعه جهانی پذیرفته شده است. هم‌چنین، تفاوت‌های بین ژن یا توالی DNA می‌تواند توسط نشانگرهای مولکولی آشکار شود و از این نشانگرها می‌توان برای تعیین ژن، بررسی تنوع ژنتیکی و کروموزومی استفاده کرد و در نهایت برای صفات مورد نظر نقشه ژنتیکی تهیه کرد (Zhang et al., 2006). نشانگرهای مولکولی ابزار قدرتمندی برای مطالعه‌ی ساختار ژنتیکی جمعیت‌های گیاهی هستند (Zhang et al., 2006). نشانگرهای مولکولی یک ابزار قدرتمند برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌ها بوده و بر خلاف نشانگرهای مورفولوژیک، نشانگرهای مولکولی با ثبات هستند و توسط اثرات محیطی پوشیده نمی‌شوند (Ali-Shtayeh et al., 2014; MirMohammadi and Golkar, 2019). فراوانی بالای نشانگرهای مولکولی از نظر تعداد و تنوع بالای ساختاری آن‌ها بخشی دیگر از مزایای نشانگرها در تشخیص هویت، تعیین تنوع ژنتیکی گونه‌ها و بررسی روابط خویشاوندی گیاهان

به‌شمار می‌رود (MirMohammadi Maibody and Golkar, 2019). نشانگرها در کشف اطلاعات بیشتر در مورد حفظ کلکسیون‌های ذخایر ژنتیکی گیاهی، تشخیص واریته‌ها، مکان‌یابی و تعیین تعداد ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمک می‌کنند. در سال‌های اخیر از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR به‌عنوان ابزار قدرتمندی برای شناسایی چندشکلی، مطالعه تنوع و روابط ژنتیکی در گیاهان استفاده شده است (Karimi Shahri et al., 2011). بازاریار و همکاران (Baziar et al., 2013) تنوع ژنتیکی ۱۱ ژنوتیپ انجیر بر اساس نشانگر RAPD بررسی کردند و نتایج نشان داد تنوع زیادی در نمونه‌های مطالعه شده وجود دارد.

در پژوهش‌های دیگری، تنوع ژنتیکی چندین نمونه انجیر بر اساس نشانگر SSR بررسی شد و نتایج نشان داد تنوع قابل‌توجهی در نمونه‌های مطالعه شده وجود دارد (Costa et al., 2015; Essid et al., 2015). صالحی‌حناچی و همکاران (Salhi-Hannachi et al., 2006) تنوع ژنتیکی ۳۵ نمونه انجیر (*F. carica*) را با استفاده از نشانگر RAPD مورد ارزیابی قرار دادند و تنوع ژنتیکی قابل‌توجهی در میان نمونه‌های مورد مطالعه مشاهده کردند. در پژوهشی، ایکگامی و همکاران (Ikegami et al., 2009) تنوع ژنتیکی ۱۹ نمونه انجیر را با استفاده از نشانگرهای ISSR، RAPD و SSR بررسی کردند. نتایج نشان داد که بیشترین مکان چندشکلی مربوط به نشانگر RAPD بود. نشانگر RAPD، یک نشانگر مولکولی مبتنی بر PCR است و برای تجزیه ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها به‌ویژه جمعیت‌هایی که مطالعات زیادی بروی آن‌ها انجام نگرفته، به‌کار می‌رود. این نشانگر دارای کاربرد بسیار گسترده‌ای در زیست‌شناسی مولکولی گیاهی می‌باشد (Cheghamirza et al., 2002). هم‌چنین نشانگر ISSR که با استفاده از آغازگرهای نیمه‌اختیاری شامل واحدهای تکراری از توالی بازهای DNA طراحی شده است در مطالعات تاکسونومیک و فیلوژنتیکی کاربرد وسیعی دارد (Ghorbani et al., 2013). نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR به‌دلیل ایجاد چندشکلی بالا در الگوی باندهای سادگی کاربرد، هزینه اندک و عدم نیاز به داشتن اطلاعات

مورد استفاده قرار گرفتند که در نهایت ۱۴ آغازگر RAPD و ۵ آغازگر ISSR قابلیت تکثیر آلل و بیشترین چندشکلی را در نمونه‌های انتخابی انجیر نشان دادند و در این پژوهش برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ۳۰ نمونه انجیر مورد استفاده قرار گرفتند. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر DNA (۱۰ نانوگرم در میکرولیتر)، ۱ میکرولیتر آغازگر (۱۰ پیکومول در میکرولیتر)، ۸ میکرولیتر PCR Master Mix (2X) تهیه شده از شرکت یکتا تجهیز آزما (۳ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۱/۶ میلی‌مولار DNTPs و آنزیم Taq 0.2 Units/ μ l) و ۶ میکرولیتر آب استریل با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Cycler, Bio Rad, Hercules, CA, U.S.A) انجام گرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از برنامه شیب دمایی انجام گرفت و شامل این مراحل بود: یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای $94^{\circ}C$ به مدت پنج دقیقه و به دنبال آن ۳۵ چرخه که هر چرخه شامل مرحله واسرشت‌سازی در دمای $94^{\circ}C$ به مدت یک دقیقه، مرحله اتصال (دمای $38^{\circ}C$ برای آغازگر RAPD و دمای $48^{\circ}C$ برای آغازگر ISSR) به مدت یک دقیقه و مرحله تکثیر در دمای $72^{\circ}C$ به مدت دو دقیقه و در نهایت تکثیر نهایی در دمای $72^{\circ}C$ به مدت ۷ دقیقه ادامه یافت. بعد از انجام واکنش، به محصول PCR، ۵ میکرولیتر لودینگ بافر اضافه و در نهایت ۱۵ میکرولیتر محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد به مدت ۱۲۰ دقیقه با ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز گردید. رنگ‌آمیزی ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید انجام و بعد از آبشویی با آب مقطر توسط دستگاه مستندسازی ژل تصویربرداری و باند حاصله به صورت صفر و یک نام‌گذاری شد و با استفاده از برنامه NTSYS-pc و POPGEN32 تجزیه گردید. ماتریس تشابه نمونه‌ها توسط نرم‌افزار NTSYS-pc با استفاده از ضریب تشابه جاکارد انجام و برای بررسی روابط خویشاوندی و ترسیم کلاستر از روش UPGMA استفاده گردید. تعداد آلل، تعداد آلل مؤثر، شاخص اطلاعاتی شانون، شاخص هتروزیگوتی با استفاده از برنامه POPGEN32 برآورد شد.

اولیه از توالی DNA هدف، به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی در درون و بین گونه‌ها مورد توجه قرار گرفته‌اند (Aalami and Karami, 2016). از نشانگرهای RAPD و ISSR برای بررسی تنوع و ژنتیک جمعیت گونه‌های گیاهی که اطلاعاتی در مورد توالی ژنوم آن‌ها در دسترس نیست، استفاده می‌شود (Bihamta *et al.*, 2009). ایران به لحاظ وسعت زیاد و شرایط اقلیمی بسیار متنوع، جزء مراکز مهم انتشار و پراکنش بسیاری از گونه‌های گیاهی است. انجیر یکی از گیاهان بومی ایران و یکی از محصولات مهم میوه برای کشت و کار در مناطق نیمه‌گرمسیری است. انجیر در مناطق غربی ایران و در استان ایلام دارای ژنوتیپ‌های متعددی است و تعداد زیادی از درختان انجیر با زمینه ژنتیکی متنوع در این مناطق وجود دارد و ارزیابی خویشاوندی ژنتیکی بر اساس نشانگرهای مولکولی و انتخاب نمونه‌های متنوع می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی این محصول اهمیت داشته باشد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام انجام شد. در این پژوهش، تنوع ژنتیکی بین ۳۰ نمونه از ژنوتیپ‌های انجیر (*F. carica*) که از مناطق مختلف استان ایلام جمع‌آوری شده بود، بر اساس نشانگرهای RAPD و ISSR مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). نمونه‌های انجیر از باغات موجود در هر منطقه جمع‌آوری و در هر منطقه حداقل فاصله برای دو نمونه انجیر ۱۷۰۰ متر بوده است. نمونه‌های برگگی از نمونه‌های مذکور در اواسط فصل بهار از برگ جوان جمع‌آوری و به فریزر $-80^{\circ}C$ منتقل شد. استخراج DNA ژنومی از برگ گیاهان با روش CTAB تغییر یافته انجام شد (Murray and Thompson, 1980). کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و الکتروفورز DNA در ژل آگارز با غلظت ۰/۸ درصد مشخص گردید. به منظور انتخاب آغازگرهایی که دارای بیشترین چندشکلی در نمونه‌های مورد مطالعه انجیر باشند به ترتیب ۲۵ و ۱۷ آغازگر RAPD و ISSR در سه نمونه انجیر

جدول ۱- ژنوتیپ‌های مورد بررسی انجیر و محل جمع‌آوری آنها

Table 1. Genotypes of fig and their collection location

ژنوتیپ	منطقه جمع‌آوری	ژنوتیپ	منطقه جمع‌آوری	ژنوتیپ	منطقه جمع‌آوری
Genotype	Collection area	Genotype	Collection area	Genotype	Collection area
1	آسمان‌آباد Asman Abad	11	سرابله Sarableh	21	قلاجیه Ghalajeh
2	آسمان‌آباد Asman Abad	12	ایوان Eyvan	22	آسمان‌آباد Asman Abad
3	آسمان‌آباد Asman Abad	13	سرابله Sarableh	23	ایلام Ilam
4	ایوان Eyvan	14	ایوان Eyvan	24	چوار Chavar
5	ایوان Eyvan	15	ایوان Eyvan	25	چوار Chavar
6	سرابله Sarableh	16	ایلام Ilam	26	ایلام Ilam
7	سرابله Sarableh	17	قلاجیه Ghalajeh	27	ایلام Ilam
8	آسمان‌آباد Asman Abad	18	قلاجیه Ghalajeh	28	چوار Chavar
9	آسمان‌آباد Asman Abad	19	قلاجیه Ghalajeh	29	چوار Chavar
10	سرابله Sarableh	20	قلاجیه Ghalajeh	30	ایلام Ilam

نتایج و بحث

نتایج نشان داد تمام آغازگرهای مورد استفاده چندشکلی را در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه نشان می‌دهند و در مجموع ۷۳ قطعه از آغازگرهای نشانگر RAPD و ۲۹ قطعه از آغازگرهای نشانگر ISSR بر روی ژل آگارز مشخص شد. تنوع بالایی میان نمونه‌های مختلف مشاهده شد و نتایج به‌دست آمده از این بخش اطلاعات کافی برای تشخیص و تفکیک ژنوتیپ‌ها را از یکدیگر فراهم نمود. تعداد کل باند برای هر آغازگر RAPD از ۱ تا ۹ باند و برای آغازگر ISSR از ۳ تا ۸ باند و محدوده اندازه قطعات تولید شده نیز برای آغازگر RAPD از ۳۵۰ تا ۲۵۰۰ و برای ISSR از ۴۰۰ تا ۱۵۰۰ جفت‌باز متغیر بود. الگوی تکثیر آغازگرهای UBC-43 (RAPD) و UBC-814 (ISSR) در شکل ۱ نشان داده شده است. بیشترین تعداد آلل برای نشانگر RAPD، مربوط به آغازگر UBC-429 و OPA-09 (۹ آلل) و کمترین تعداد برای آغازگر

OPA-03 (۱ آلل) به‌دست آمد. هم‌چنین بیشترین تعداد آلل برای نشانگر ISSR، مربوط به آغازگر UBC-810 و UBC-814 (۸ آلل) و کمترین تعداد برای آغازگر UBC-807 (۳ آلل) به‌دست آمد. میانگین تعداد آلل مشاهده شده برای نشانگرهای RAPD و ISSR به‌ترتیب ۵/۲۱ و ۵/۸ آلل برآورد شد (جدول ۲). ضریب شانون (I) یکی دیگر از معیارهای تنوع ژنتیکی است که این ضریب برای کل آغازگرهای RAPD، به‌طور متوسط ۱/۰۲ و برای آغازگرهای ISSR، ۱/۱۹ ثبت شد. آغازگرهای UBC-429 و OPA-03 به‌ترتیب دارای بیشترین و کمترین مقدار این شاخص در بین نشانگر RAPD بودند. هم‌چنین آغازگرهای UBC-810 و UBC-807 نیز بیشترین و کمترین تنوع ژنتیکی را در بین آغازگرهای ISSR نشان دادند.

میزان اطلاعات چندشکلی، یکی از شاخص‌های مهم جهت مقایسه آغازگرهای مختلف از لحاظ قدرت آنها

تعداد نمونه مورد مطالعه می‌باشد (Botstein *et al.*, 1980). در پژوهشی، بازیار و همکاران (Baziar *et al.*, 2013) برای ارزیابی تنوع ژنتیکی انجیر با استفاده از ۱۶ آغازگر RAPD، در کل ۲۳۲ نوار را گزارش کردند که تعداد ۱۶۷ نوار آن چندشکل بود. صالح (Saleh, 2013) به منظور تعیین دقت، تکرارپذیری از روش‌های RAPD و IRAP برای تعیین تنوع ژنتیکی در ۱۰ ژنوتیپ *F. sycomorus* L. که در مناطق ساحلی سوریه رشد کرده بودند استفاده کرد. برای این منظور از ۳۶ آغازگر RAPD استفاده شد که ۳۵۲ باند ایجاد شد که ۲۵۲ قطعه چندشکل بود. هم‌چنین ۲۲ آغازگر IRAP (تک یا ترکیبی) که ۱۷۸ باند را تولید کرد و ۱۵۱ قطعه چندشکل بودند. در تحقیق آن‌ها نشانگر IRAP کارآمدتر از نشانگر RAPD بود.

برای تفکیک ژنوتیپ‌ها می‌باشد. نتایج نشان داد بیشتر آغازگرهای استفاده شده، دارای شاخص PIC بالایی بوده و بیانگر کارایی آن‌ها در تفکیک ژنوتیپ‌ها از همدیگر هستند (جدول ۲). آغازگر UBC-429 مربوط به نشانگر RAPD، بالاترین مقدار محتوای اطلاعات چندشکلی (۰/۷۵) را به خود اختصاص داد. هم‌چنین آغازگر UBC-810 مربوط به نشانگر ISSR، بالاترین مقدار محتوای اطلاعات چندشکلی (۰/۶۶) و آغازگر UBC-807 کمترین محتوای اطلاعات چندشکلی (۰/۲۲) را دارا بود. بالا بودن درصد چندشکلی در میان آغازگرهای استفاده شده می‌تواند بیانگر بالا بودن تنوع ژنتیکی در بین نمونه‌های انتخابی انجیر باشد. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) یکی از معیارهای ارزیابی قدرت تمایز نشانگرها و معیار دقیق‌تری از میزان تنوع هر ژن را بیان می‌کند که مستقل از

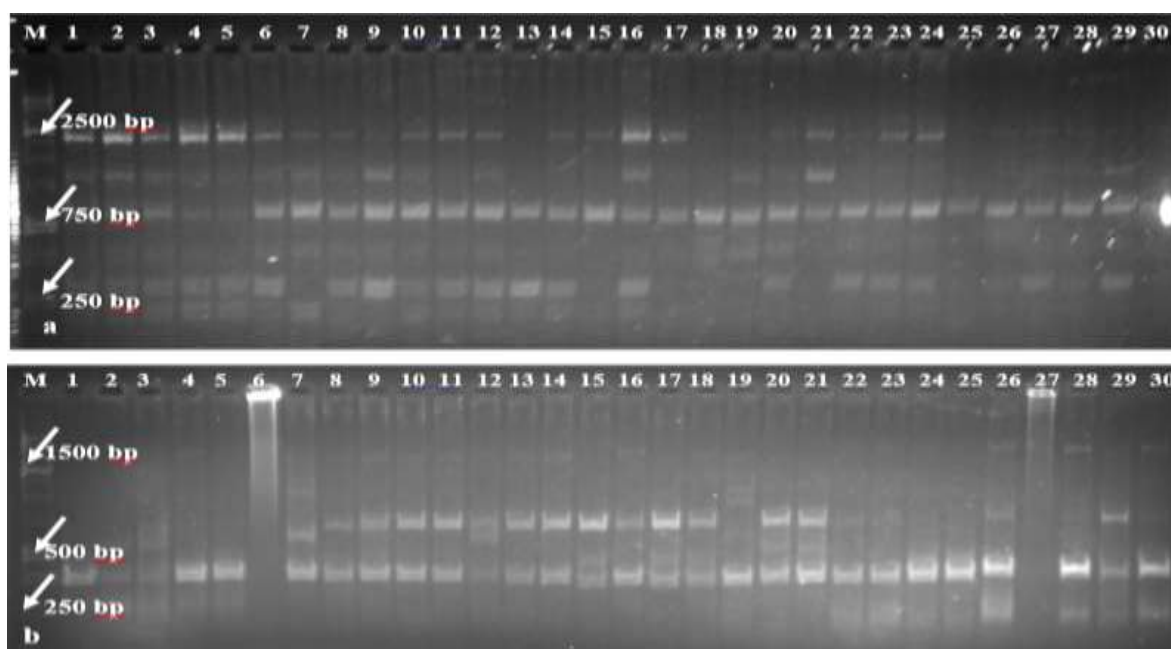
جدول ۲- شاخص‌های ژنتیکی آغازگرهای RAPD و ISSR در ژنوتیپ‌های انجیر

Table 2. Genetic parameters of RAPD and ISSR primers in fig genotypes

نشانگر	نام آغازگر	توالی (5'-3')	Na	Ne	I	H	PIC
Marker	Primer name	Sequence (5'-3')					
RAPD	OPA-01	CAG GCC CTT C	3	1.76	0.26	0.17	0.51
RAPD	OPA-02	TGC CGA GCT G	6	3.88	1.10	0.65	0.53
RAPD	OPA-03	AGT CAG CCA C	1	0.57	0.12	0.06	0
RAPD	OPA-05	AGG GGT CTT G	5	3.45	1.00	0.62	0.55
RAPD	OPA-09	GGG TAA CGC C	9	6.63	2.06	1.33	0.70
RAPD	OPA-13	CAG CAC CCA C	3	2.23	0.60	0.41	0.43
RAPD	OPA-16	AGC CAG CGA A	3	1.83	0.35	0.22	0.46
RAPD	OPA-17	GAC CGC TTG T	4	2.92	0.96	0.61	0.49
RAPD	OPA-18	AGG TGA CCG T	7	4.44	1.03	0.61	0.50
RAPD	OPB-06	TGC TCT GCC C	5	3.66	1.04	0.68	0.55
RAPD	UBC-43	AAA ACC GGG C	6	4.89	1.53	1.06	0.68
RAPD	UBC-292	AAA CGA CCC G	8	5.24	1.26	0.76	0.57
RAPD	UBC-691	AAA CCA GGC G	4	2.84	0.83	0.52	0.46
RAPD	UBC-429	AAA CCT GGA C	9	6.77	2.18	1.41	0.75
میانگین	-	-	5.21	3.65	1.02	0.65	0.51
Average							
ISSR	UBC-807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	3	1.68	0.26	0.14	0.22
ISSR	UBC-810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	8	5.43	1.65	1.00	0.66
ISSR	UBC-814	CTC TCT CTC TCT CTC TA	8	5.74	1.56	1.02	0.65
ISSR	UBC-827	ACA CAC ACA CAC ACA CG	4	3.24	1.08	0.72	0.52
ISSR	UBC-811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	6	4.55	1.40	0.92	0.62
میانگین	-	-	5.8	4.12	1.19	0.76	0.53
Average							

Na: تعداد آلل مشاهده شده؛ Ne: تعداد آلل مؤثر؛ I: شاخص شانون؛ H: شاخص هتروزیگوتی؛ PIC: محتوای اطلاعات چندشکلی

Na: Number of observed allele; Ne: Number of effective allele; I: Shannon index; H: Heterozygosity index; PIC: Polymorphic information content



شکل ۱- الگوی بانندی آغازگر UBC-43 (a) و آغازگر UBC-814 (b) در ۳۰ نمونه انجیر (به ترتیب از چپ به راست)
Figure 1. Electrophoretic pattern of UBC-43 (a) and UBC-814 (b) primers in 30 fig samples (left to right, respectively)

واریته‌های تجاری استفاده شود. بر این اساس در این تحقیق جهت ارزیابی نشانگرها از تنوع ژنی، شاخص PIC و شاخص شانون استفاده شد. تنوع ژنی که اغلب هتروزیگوسیتی مورد انتظار نامیده می‌شود، احتمال متفاوت بودن دو آلل انتخاب شده به‌طور تصادفی از دو فرد را نشان می‌دهد و فاصله ژنتیکی تفاوت بین دو موجود است و می‌تواند به‌وسیله اختلاف آللی توصیف شود (Nei, 1973). در این مطالعه، میانگین تنوع ژنی برآورد شده برای کل ژنوتیپ‌ها ۰/۷۶ به‌دست آمد. آغازگر UBC-429 با ۱/۴۱ و آغازگر OPA-03 با ۰/۰۶ به ترتیب بیشترین و کمترین میزان تنوع ژنی را نشان دادند. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) یکی از معیارهای ارزیابی قدرت تمایز نشانگرها و معیار دقیق‌تری از میزان تنوع هر ژن را بیان می‌کند که مستقل از تعداد نمونه مورد مطالعه می‌باشد (Botstein *et al.*, 1980).

تجزیه خوشه‌ای: جهت گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها، ماتریس تشابه بین ژنوتیپ‌ها با استفاده از روش جاکارد بر اساس داده‌های RAPD و ISSR به‌دست آمد و میزان تشابه بین نمونه‌ها از ۰/۳۳ تا ۰/۸۰ متغیر بود. تجزیه خوشه‌ای انطباق خوبی با ماتریس فاصله داشت که منعکس‌کننده

گانوپولوس و همکاران (Ganopoulos *et al.*, 2015) به بررسی تنوع ژنتیکی ۲۲ نمونه ژنوتیپ انجیر یونان با استفاده از ۶ آغازگر ISSR پرداختند که در کل ۵۷ باند مشاهده شد که ۵۰/۲۱ درصد نوارهای مشاهده شده چندشکل بودند و بیانگر کارایی آغازگرهای مورد استفاده بود. صالحی حناچی و همکاران (Salhi-Hannachi *et al.*, 2006) تنوع ژنتیکی ۳۵ رقم انجیر را با استفاده از ۴۴ آغازگر RAPD مورد ارزیابی قرار دادند و تنوع ژنتیکی قابل توجهی در میان نمونه‌های *F. carica* مورد مطالعه مشاهده شد. دولیان و همکاران (Doolatian *et al.*, 2017) تنوع ژنتیکی ۲۳ نمونه انجیر از چند گونه مختلف را بر اساس ۶ آغازگر ISSR، ارزیابی کردند و در مجموع ۸۳ نوار تکثیر شد که از این تعداد، ۷۵ نوار چندشکل بود. نتایج این محققین نشان داد نشانگر ISSR، در آشکارسازی تنوع ژنتیکی درون گونه و مطالعه جریان ژنی جمعیت‌های انجیر دارای کارایی بالا می‌باشد.

ارزیابی تنوع ژنتیکی یک جزء مهم در شناسایی ژرم‌پلاسم و حفظ آن‌ها است. نتایج به‌دست آمده از تنوع ژنتیکی در سطح DNA به کمک نشانگرهای مولکولی می‌تواند برای طراحی برنامه‌های اصلاحی مؤثر و توسعه ژنتیکی

ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های انجیر که توسط دندروگرام نشان داده شده است ۱۲ خوشه با تنوع بالا را مشخص کردند. تئومان و همکاران (Teoman et al., 2017) در پژوهشی، ۴۷ رقم انجیر را با استفاده از ۲۴ آغازگر SSR ارزیابی نمودند. تجزیه و تحلیل UPGMA بر اساس ماتریس تشابه، ژنوتیپ‌های انجیر را به دو گروه اصلی تقسیم کرد. گانوپولوس و همکاران (Ganopoulos et al., 2015) تنوع ژنتیکی ۲۲ نمونه انجیر را با ۶ آغازگر ISSR ارزیابی کردند و دندروگرام با استفاده از ضریب Nei و Li/Dice به‌دست آمد و نمونه‌های مورد بررسی به ۴ گروه تقسیم شدند. جای گرفتن نمونه‌های یک منطقه در دو گروه مستقل و نمونه‌های مناطق مختلف در یک گروه بیانگر این مطلب است که عامل جغرافیایی نمی‌تواند به‌عنوان یک فاکتور اصلی در این زمینه قرار گیرد. در پژوهشی ایکگامی و همکاران (Ikegami et al., 2009) تنوع ژنتیکی ۱۹ نمونه انجیر را با استفاده از ۱۳ آغازگر ISSR، ۱۹ آغازگر RAPD و ۱۳ آغازگر SSR بررسی کردند. تمام آغازگرها ۲۵۸ باند تولید کردند که بیشترین مکان چندشکلی مربوط به آغازگر RAPD بود. تجزیه و تحلیل خوشه‌ای برای هر ۳ نشانگر انجام شد و میانگین شباهت‌های ژنتیکی به‌ترتیب ۰/۷۸۷، ۰/۷۱۷ و ۰/۷۴۹ به‌دست آمد که به‌ترتیب متعلق به ISSR، RAPD و SSR بود.

آزمون تجزیه عامل‌ها با استفاده داده‌های RAPD و ISSR انجام شد که در مجموع ۳ عامل نزدیک به ۵۷/۵۹ درصد از واریانس کل را توجیه کردند (جدول ۳). گروه‌بندی بین ژنوتیپ‌ها با استفاده از دو عامل اصلی که به‌ترتیب ۴۵/۶۴ و ۶/۰۷ درصد از واریانس کل را توجیه کرده بودند، به‌دست آمد.

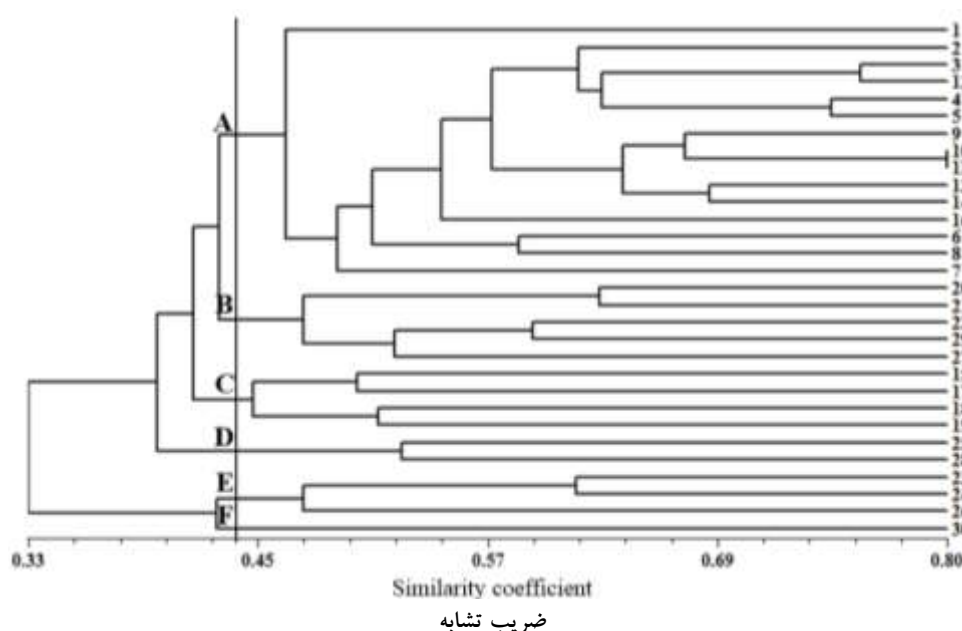
با توجه به داده‌های به‌دست آمده (شکل ۳) بر اساس مؤلفه‌های اول و دوم، ژنوتیپ‌های ۲، ۳، ۴، ۵، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۶ و ۲۹ در گروه اول (A) قرار گرفتند که در صفاتی نظیر طول و عرض برگ، تعداد لوب ۳ تایی در برگ، عمق لوب (۵ سانتی‌متر)، وجود کرک در

ضریب همبستگی کوفتیک (r = ۰/۸۲) است. دو آنالیز درجه متنوعی از ارتباط نمونه‌های انجیر را آشکار کردند. ارتباط میان ۳۰ نمونه انجیر بر اساس مقدار تشابه ژنتیکی جاکارد به‌وسیله تجزیه خوشه‌ای با روش UPGMA تعیین شد (شکل ۲). دندروگرامی که از ماتریس تشابه جاکارد RAPD و ISSR، در فاصله‌ی ۰/۳۳ تا ۰/۸۰ با ضریب تشابه ۰/۴۵ به‌دست آمد ژنوتیپ‌ها را به شش گروه اصلی تقسیم کرد. گروه اول (A) با ۱۵ ژنوتیپ بیشترین درصد فراوانی را داشته است که ژنوتیپ‌های متعلق به این گروه در صفاتی مانند تعداد لوب در برگ (۳ لوب)، قطر دم‌برگ، داشتن کرک در برگ، طول میوه، قطر میوه، درصد رطوبت میوه، طول روزنه، مواد جامد محلول، تاریخ بیدار شدن گیاه و حساس بودن به ترکیب‌های مشترک بودند. گروه دوم (B) با داشتن ویژگی‌هایی مانند درصد رطوبت و ماده خشک تقریباً یکسان، ضخامت گوشت، رنگ گوشت قرمز و طول روزنه شباهت داشتند. گروه سوم (C) نیز در صفاتی مانند تعداد لوب (۴ تایی)، قطر دم‌برگ (۰/۴ سانتی‌متر)، قطر میوه، کم‌دانگی و ضخامت روزنه شبیه بودند. گروه D دارای صفات شبیه به هم مانند طول گوشت داخلی میوه (۲ سانتی‌متر)، قطر میوه، ضخامت گوشت، رنگ قرمز در گوشت و ضخامت روزنه بودند. گروه E نیز در صفات قطر دم‌برگ (۰/۵ سانتی‌متر) و رطوبت بالا در میوه مشترک بودند و آخرین گروه (F) دارای ویژگی‌های طول و عرض برابر برگ، بدون لوب و بدون کرک در برگ بودند. با توجه به اینکه ارقام دورتر تفاوت ژنتیکی بیشتری دارند، بنابراین انجام تلاقی بین ارقام دورتر، در صورتی که دارای صفات تکمیل‌کننده یکدیگر باشند می‌تواند کارایی تولید هیبرید و امکان ایجاد هتروزیس را بیشتر نماید. با این‌حال استفاده از نشانگرهای بیشتر سطوح بیشتری از ژنوم را پوشش می‌دهد و می‌توان انتظار داشت که با تعداد آغازگرهای بیشتر گروه‌بندی کامل‌تری در تفکیک ژنوتیپ‌ها به‌دست آید (Aalami and Karami, 2016). علی‌شتایه و همکاران (Ali-Shtayeh et al., 2014) در مطالعه خود با استفاده از نشانگر RAPD و صفات پومولوژی، بر اساس روابط

ضخامت گوشت، قرمز رنگ بودن گوشت و ضخامت روزنه شبیه هم بودند و در گروه چهارم (D) ژنوتیپ‌های ۲۴ و ۳۰ با داشتن ویژگی‌هایی مانند ضخامت روزنه، مواد جامد محلول بالا (۲۲ درجه بریکس) و حساس بودن به ترکیدگی در یک گروه قرار گرفتند. گانوپلوس و همکاران (Ganopoulos *et al.*, 2015) با ارزیابی تعداد ۶ آغازگر مربوط به نشانگر ISSR در انجیر نتیجه گرفتند که عامل اول و دوم در مجموع ۴۲/۶۳ در صد از واریانس کل را توجیه می‌کند.

برگ، طول میوه، ضخامت گوشت و داشتن ترکیدگی مشترک بودند.

نمونه‌های ۱، ۶، ۱۵، ۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۰، ۲۱ و ۲۷ با داشتن ویژگی‌های مشترک قطر دمبرگ (۰/۴ سانتی‌متر)، وجود کرک در برگ، طول گوشت داخلی میوه، قطر میوه، رطوبت بالا (۸۰ درصد)، ضخامت گوشت، ضخامت روزنه (۰/۲ سانتی‌متر) و تاریخ بیدار شدن گیاه در گروه دوم (B) جای گرفتند. همچنین، نمونه‌های ۲۲، ۲۳، ۲۵، ۲۶ و ۲۸ در گروه سوم (C) با داشتن صفات عمق لوب ۵ سانتی‌متری در برگ، رطوبت ۷۰ درصدی در میوه،



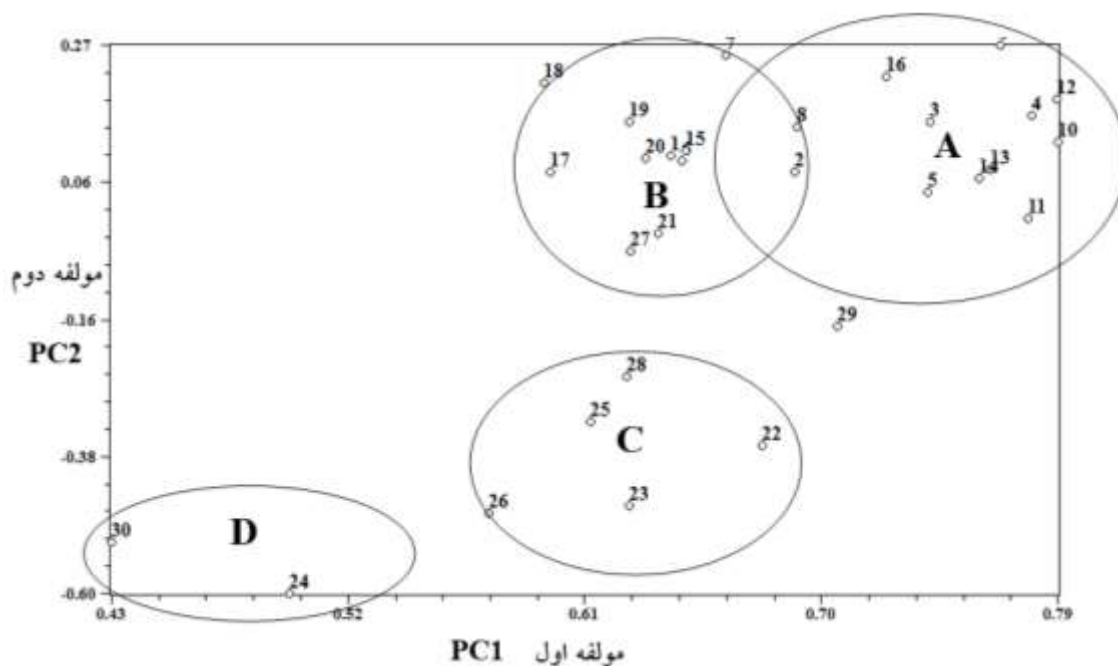
شکل ۲- دندروگرام به دست آمده از تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضرایب تشابه جاکارد و روش UPGMA با استفاده از داده‌های نشانگرهای RAPD و ISSR

Figure 2. Dendrogram obtained from cluster analysis based on Jaccard's similarity coefficients and UPGMA method using RAPD and ISSR markers

جدول ۳- مقادیر ویژه، واریانس و واریانس تجمعی سه عامل اصلی با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR

Table 3. Eigenvalues, variance and cumulative variance for three major components based on RAPD and ISSR markers

عامل	مقادیر ویژه	واریانس (%)	واریانس تجمعی (%)
Component	Eigen values	Variance (%)	Cumulative variance (%)
1	13.69	45.64	45.64
2	1.82	6.07	51.72
3	1.46	4.86	56.59



شکل ۳- تجزیه به عامل‌های اصلی ژنوتیپ‌های انجیر بر اساس ماتریس تشابه جاکارد با استفاده از نشانگرهای RAPD و

ISSR

Figure 3. Principal component analysis for fig genotypes based on Jaccard's similarity coefficient using RAPD and ISSR markers

اصلاحی این گیاه در آینده باشند. واکنش PCR با ۱۴ آغازگر RAPD و ۵ آغازگر ISSR در ۳۰ ژنوتیپ انجیر نشان داد که آغازگرهای استفاده شده، باندهای چندشکل روی ژنوتیپ‌ها ایجاد کردند و در مجموع ۱۰۲ باند روی ژل آگارز مشخص شدند. نتایج به دست آمده از این بخش، اطلاعات کافی برای تشخیص و تفکیک ژنوتیپ‌ها را از یکدیگر فراهم کردند.

هم‌چنین بندهایی و همکاران (Bendhifi et al., 2013) نیز با ارزیابی تعداد ۱۰ آغازگر مربوط به نشانگر RAPD در انجیر دریافتند که عامل اول و دوم در مجموع ۹۲/۵۸ درصد از واریانس کل را توجیه می‌کند.

نتایج ارزیابی ژنوتیپ‌های انجیر بر اساس نشانگرهای RAPD و ISSR در پژوهش حاضر نشان دادند که تنوع ژنتیکی بالایی در بین ژنوتیپ‌های بررسی شده وجود دارند که می‌توانند مواد ژنتیکی مناسب برای پژوهش‌های

References

- Aalami, A. and Karami, N. (2016). The study of genetic diversity in Iranian rice cultivars using ISSR, IRAP and REMAP markers. *Journal of Crop Breeding*, 8: 41-51 (In Persian).
- Ali-Shtayeh, M.S., Jamous, R.M., Zaitoun, S.Y.A., Mallah, O.B. and Mubaslat, A.K. (2014). Genetic diversity of the palestinian fig (*Ficus carica* L.) collection by pomological traits and RAPD markers. *American Journal of Plant Sciences*, 5: 1139-1155.
- Baziar, G., Shahsavar, A.R. and Jafari, M. (2013). Evaluation of genetic diversity on fig (*Ficus carica caprificus* L.) in Fars province using morphological characteristics and RAPD markers. *1th National Electronic Conference on New Topics in Gardening Science*, Jahrom University of Agricultural Engineering Association, Jahrom, Iran (In Persian).
- Bendhifi, M., Baraket, G., Zourgui, L., Souid, S. and Salhi-Hannachi, A. (2013). Assessment of genetic diversity of Tunisian Barbary fig (*Opuntia ficus indica*) cultivars by RAPD markers and morphological traits. *Scientia Horticulturae*, 158: 1-7.

- Bihamta, M.R., Naserian-Khiabani, B. and Zamani, M.J.** (2009). *Molecular Markers in Plant Genetics and Biotechnology*. University of Tehran Press (UTP), Tehran, IR (In Persian).
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick M. and Davis, R.W.** (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, **32**: 314-331.
- Cheghamirza, K., Koveza, O., Konovalov, F. and Gostimsky, S.** (2002). Identification of RAPD markers and their use for molecular mapping in pea (*Pisum sativum* L.). *Cellular and Molecular Biology Letters*, **7**: 649-656.
- Costa, F., Marchese, A., Mafrica, R., Di Vaio, C., Ferrara, G., Fretto, S., Quartararo, A., Marra, F.P., Mennone, C., Vitale, F., Reale, S. and Caruso, T.** (2015). Genetic diversity of fig (*Ficus carica* L.) genotypes grown in southern Italy revealed by the use of SSR markers. *Acta Horticulturae*, **1173**: 75-80.
- Doolatian, L., Khodayari, H. and Mohammadi, A.** (2017). The genetic diversity survey of the *Ficus* l. genus in Iran using inter simple sequence repeats markers. *Plant Genetic Researches*, **4(1)**: 51-62 (In Persian).
- 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.
- Ganopoulos, I., Kalivas, A., Kavroulakis, N., Xanthopoulou, A., Mastrogrianni, A., Koubouris, G. and Madesis, P.** (2015). Genetic diversity of Barbary fig (*Opuntia ficus-indica*) collection in Greece with ISSR molecular markers. *Plant Gene*, **2**: 29-33.
- Ghorbani, T., Cheghamirza, K. and Arji, E.** (2013). Evaluation of genetic diversity in pomegranate using morphological traits and molecular markers. *Journal of Agricultural Biotechnology*, **5**: 111-127 (In Persian).
- 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**: 201-209.
- Jafari, N., Naderi, P. and Ebrahimzadeh, M.A.** (2015). Evaluation of phenolic content, total flavonoid and survey of antioxidant activity of leaves of *Ficus carica* and *Pterocarya fraxinifolia* trees using spectrophotometry and high performance liquid chromatograph methods. *Iranian Journal of Plant Biology*, **7**: 1-16 (In Persian).
- Karimi Shahri, M.R., Dehvari, V., Hajian Shahri, M. and Mokhtarian, A.** (2011). Genetic diversity of some grapevine cultivars of Khorasan Razavi province based on RAPD and ISSR markers. *Journal of Seed and Plant Improvement*, **28**: 159- 172 (In Persian).
- 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).
- MirMohammadi Maibody, S.A.M. and Golkar, P.** (2019). Application of DNA molecular markers in plant breeding. *Plant Genetic Researches*, **6(1)**: 1-30 (In Persian).
- Murray, M.G. and Thompson, W.F.** (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, **8**: 4321-4326.
- Nei, M.** (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **70**: 3321-3323.
- Rashidi, A. and Nouredini, M.** (2011). Hypoglycemic effect of the aromatic water of leaves of *Ficus carica* in normal and streptozotocin induced diabetic rats. *Pharmacologyonline*, **1**: 372-379.
- Saleh, B.** (2013). Genetic diversity in *Ficus sycomorus* L. species (Moraceae) using RAPD and IRAP markers. *Agriculture*, **59**: 120-130.
- Salhi-Hannachi, A.M.E.L., Chatti, K., Saddoud, O., Mars, M., Rhouma, A., Marrakchi, M. and Trifi, M.** (2006). Genetic diversity of different Tunisian fig (*Ficus carica* L.) collections revealed by RAPD fingerprints. *Hereditas*, **143**: 15-22.

- Teoman, S., Meryem, I.P.E.K., Erturk, U., Tangu, N.A., Durgut, E., Barut, E., Ercisli, S. and Ipek, A.** (2017). Assessment of genetic relationship among male and female fig genotypes using simple sequence repeat (SSR) markers. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, **45**: 172-178.
- Zhang, P., Dreisigacker, S., Buerkert, A., Alkhanjari, S., Melchinger, A.E. and Warburton, M. L.** (2006). Genetic diversity and relationships of wheat landraces from Oman investigated with SSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **53**: 1351-1360.

Evaluation of Genetic Diversity among Some Common Fig Using RAPD and ISSR Molecular Markers

Batol Gheitarani¹, Javad Erfani-Moghadam^{2,*} and Arash Fazeli³

1- Former M.Sc. Student, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran

2- Associate Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran

3- Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran

(Received: February 24, 2019 – Accepted: August 30, 2019)

Abstract

The common fig (*Ficus carica* L.), one of the most important fruit species, belongs to Moraceae family and is widely distributed in Iran. In this study, genetic variations among some genotypes of common fig collected from six different regions of Ilam province (Iran) were evaluated based on RAPD and ISSR markers. A total of 73 and 29 alleles were produced by 14 RAPD (with their sizes ranging from 350 to 2500 bp) and 5 ISSR (with their sizes ranging from 150 to 1500 bp) primers, respectively. The number of observed alleles for RAPD primers ranged from 1 (OPA-03) to 9 (OPA-09 and UBC-429), with an average of 5.21 alleles per locus. Also, the number of observed alleles for ISSR primers ranged from 3 (UBC-807) to 8 (UBC-810 and UBC-414), with an average of 5.8 alleles per locus. The highest and lowest values of Shannon's information index (I) was observed in the UBC-429 (2.18) and OPA-03 (0.12) primers, respectively. The Jaccard's genetic similarity coefficient ranged from 0.12 to 0.73 among genotypes based on RAPD data, while for ISSR it was recorded from 0.07 to 1. Also, based on RAPD and ISSR data at a similarity coefficient of 0.45, the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) cluster analysis divided the genotypes into six major groups. As a conclusion, there is a high genetic variability among fig genotypes, which is an important consideration for classification, utilization of germplasm resources and breeding programs of fig.

Keywords: Allele, Genetic variations, Similarity coefficient, Genetic resources

*Corresponding Author, E-mail: j.erfani@ilam.ac.ir