

Evaluation of genetic diversity of Estahban region fig genotypes based on morphological traits and SCoT molecular markers

Elaheh Ranjbaran

MSc Student, Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran. E-mail address: elahehranjbaran96@gmail.com

Mehdi Rahimi

*Corresponding author. Associate Professor, Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran. E-mail address: mehdi83ra@yahoo.com

Maryam Abdoli Nasab

Assistant Professor, Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran. E-mail address: m.abdolinasab@gmail.com

Hamid Zare

Assistant Professor, Fig Research Station, Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Estahban, Iran. E-mail address: hamidzare777@gmail.com

Mojtaba Kordrostami

Assistant Professor, Department of Plant Breeding, Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute (NSTRI), Karaj, Iran. E-mail address: mkordrostami@aeoi.org.ir

Abstract

Objective

Fig (*Ficus carica*) is a deciduous tree that is grown in arid and semi-arid regions. Figs, as an important crop, have undergone genetic erosion in recent decades due to living and non-living stresses. This study aimed to determine the genetic diversity of genotypes in Estahban using morphological traits and Start Codon Targeted (SCoT) molecular markers.

Materials and methods

In this study, 16 fig genotypes were evaluated in a completely randomized design with three replications based on their morphological traits. Also, their genomic DNA was extracted from leaves and the genotypic diversity of genotypes based on 10 SCoT primers was examined.

Results

Variance analysis showed a significant difference between traits, and cluster analysis based on morphological traits placed the genotypes in five groups. Eight primers amplified a total of 50 polymorphic bands, and SCoT12 and SCoT11 produced the most bands with 13 and 9 polymorphic bands, respectively. The polymorphic information content (PIC) for the SCoT primers varied between 0.3423 and 0.3791 with an average of 0.3595. Cluster analysis by UPGMA and Gower similarity criterion based on SCoT data, 16 fig genotypes were placed in four groups. The grouping based on the Bayesian method placed the genotypes in nine groups, although the genotypes were not differentiated and were a mixture of all nine groups.

Conclusions

The results indicate that the use of the SCoT marker has a high advantage and plays an important role in the differentiation of fig genotypes. In general, it can be said that SCoT molecular markers and morphological traits have shown high diversity among genotypes. In general, the results obtained from this study indicate the existence of high genetic diversity in the germplasm of Estahban fig cultivars, which can be used in breeding programs by protecting this rich germplasm source.

Keywords: Bayesian, Polymorphic, Coefficient of variation.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Ranjbaran E, Rahimi M, AbdoliNasab M, Zare H, Kordrostami M (2023) Evaluation of genetic diversity of Estahban region fig genotypes based on morphological traits and SCoT molecular markers. *Agricultural Biotechnology Journal* 14(4), 45-68.

Agricultural Biotechnology Journal 14(4), 45-68.

DOI: 10.22103/jab.2022.19157.1392

Received: July 22, 2022.

Received in revised form: September 12, 2022.

Accepted: September 13, 2022.

Published online: November 15, 2022

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های انجیر منطقه استهبان بر اساس صفات ریخت‌شناسی و


نشانگرهای مولکولی SCoT

الهه رنجبران

دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران. رایانامه: elahehranjbaran96@gmail.com

 مهدی رحیمی


*نویسنده مسئول: دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران. رایانامه: mehdi83ra@yahoo.com

 مریم عبدلی نسب

استادیار، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران. رایانامه: m.abdolinasab@gmail.com

حمید زارع

استادیار، ایستگاه تحقیقات انجیر، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، استهبان، ایران. رایانامه: hamidzare777@gmail.com

 مجتبی کردرستمی

استادیار، گروه اصلاح نباتات، پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی، کرج، ایران. رایانامه: mkordrostami@aeoi.org.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۴/۳۱ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۱/۰۶/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۲۲

چکیده

هدف: انجیر (*Ficus carica*) یک درخت خزان‌کننده می‌باشد که در مناطق خشک و نیمه‌خشک کشت می‌شود. انجیر به‌عنوان یک محصول مهم، در چند دهه اخیر به دلیل بروز تنش‌های زنده و غیرزنده دچار فرسایش ژنتیکی شده است. هدف از این تحقیق

تعیین تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های موجود در استهبان با استفاده از صفات ریخت‌شناسی و نشانگر مولکولی Start Codon Targeted (SCoT) است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، تعداد ۱۶ ژنوتیپ انجیر در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار از لحاظ صفات ریخت‌شناسی آن‌ها ارزیابی گردیدند. همچنین DNA ژنومی آن‌ها از برگ استخراج گردید و تنوع ژنوتیپی ژنوتیپ‌ها بر اساس ۱۰ آغازگر SCoT بررسی شد.

نتایج: تجزیه واریانس تفاوت معنی‌داری بین صفات نشان داد و همچنین تجزیه خوشه‌ای بر اساس صفات ریخت‌شناسی، ژنوتیپ‌ها را در پنج گروه قرار داد. هشت آغازگر در مجموع تعداد ۵۰ نوار چندشکل تکثیر کردند و SCoT12 و SCoT11 به ترتیب با ۱۳ و ۹ نوار چندشکل، بیشترین نوار رو تولید کردند. محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) برای نشانگر SCoT بین ۰/۳۴۲۳ تا ۰/۳۷۹۱ با میانگین ۰/۳۵۹۵ متغیر بود. تجزیه خوشه‌ای به روش جفت گروه بدون وزن با میانگین حسابی و معیار شباهت گاور بر اساس داده‌های SCoT، ۱۶ ژنوتیپ انجیر را در چهار گروه قرار دادند. گروه بندی بر اساس روش بیزی ژنوتیپ‌ها را در نه گروه قرار داد اگرچه ژنوتیپ‌ها تمایز نداشتند و مخلوطی از هر نه گروه بودند.

نتیجه‌گیری: نتایج حاکی از آن است که کاربرد نشانگر SCoT دارای مزیت بالایی بوده و نقش بسزایی در تفکیک و تمایز ژنوتیپ‌های انجیر دارد نشانگر مولکولی SCoT و صفات ریخت‌شناسی تنوع بالایی را میان ژنوتیپ‌ها نشان داده‌اند. نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان‌دهنده وجود تنوع ژنتیکی بالا در خزانه ژنتیکی ارقام انجیر استهبان است که با حفاظت از این منبع غنی می‌توان از آن‌ها در اجرای برنامه‌های به‌نژادی بهره برد.

کلیدواژه‌ها: بیزی، چندشکل، ضریب تغییرات.

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: رنجبران الهه، رحیمی مهدی، عبدلی نسب مریم، زارع حمید، کردرستمی مجتبی (۱۴۰۱) بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های انجیر منطقه استهبان بر اساس صفات ریخت‌شناسی و نشانگرهای مولکولی SCoT. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۴(۴)، ۴۵-۶۸

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant
Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian
Biotechnology Society.



© the authors

مقدمه

انجیر از جنس (*Ficus carica*) با تعداد کروموزوم $2x=2n=26$ است و یک درخت خزان کننده می باشد که در مناطق خشک و نیمه‌خشک کشت می شود (Dalklccedil et al. 2011). در ایران کشت این محصول در مناطقی چون ساوه، ورامین،

دزفول و استهبان که بیشتر این مناطق آب و هوایی خشک و نیمه‌خشک دارند، صورت می‌گیرد و اغلب کشاورزان به کشت رقم سبز که رقمی تجاری محسوب شده می‌پردازند، اما متأسفانه تکثیر فراوان غیرجنسی، آن‌هم در مقیاس وسیع باعث افزایش یکنواختی و در نتیجه بالاتر رفتن خطر آسیب‌پذیری در برابر بیماری‌های مختلف از جمله موزاییک انجیر، آنتراکنوز، شانکر و... شده است. عوامل ژنتیکی و محیطی به صورت ترکیبی، صفات فنوتیپی در یک گیاه را تعیین می‌کنند و نشانگرهای ژنتیکی تفاوت‌های بین موجودات را بیان می‌کنند (Datwyler & Weiblen 2004). براساس آمار فائو تولید سالانه انجیر در ایران در حدود ۱۰۸ میلیون تن می‌باشد و ایران بعد از ترکیه، مصر، مراکش، الجزایر در رتبه پنجم قرار دارد (FAOSTAT 2020). بیشترین سطح زیر کشت در ایران مربوط به استان فارس است. میوه‌ی انجیر حاوی مقادیر زیادی ترکیبات فنلی، فلاوونوئیدی و آنتوسیانینی است که مهمترین آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌باشند (Ghorbani et al. 2019). از سوی دیگر، استفاده از تکنیک‌های مولکولی در سال‌های اخیر جهت مطالعه موجودات بومی و حفاظت‌شده، کاربرد گسترده‌ای یافته است (Askari et al. 2010; Mohammadabadi 2017). میزان اطلاعات به‌دست‌آمده از این تکنیک‌های ژنتیکی، یکی از پارامترهای قابل ارزیابی برای مطالعه جمعیت‌های مختلف و درک تفاوت‌های ژنتیکی بین جمعیت‌ها است (Mohammadifar et al. 2014; Mohammadifar & Mohammadabadi 2018). همچنین، مطالعه نژادهای مختلف با استفاده از تکنیک‌های مولکولی بسیار مهم و برای طبقه‌بندی آن‌ها مفید است (Mohammadabadi et al. 2017). حفاظت باید بر اساس دانش عمیقی از منابع ژنتیکی نژادهای خاص باشد، لذا تلاش برای شناسایی و تعیین خصوصیات ژنتیکی نژادهای مختلف بسیار اهمیت دارد (Ghasemi et al. 2010; Mohammadabadi et al. 2021). تنوع ژنتیکی یک عنصر اساسی برای پیشرفت ژنتیکی، حفظ جمعیت‌ها، تکامل و سازگاری به شرایط محیطی متغیر و مختلف می‌باشد (Askari et al. 2008; Mohammadifar & Mohammadabadi 2012). ارتباط فیلوژنتیک گونه‌های *Ficus* در مصر با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD و نشانگرهای ISSR مورد بررسی قرار گرفته و نتایج نشان داد که استفاده از این نشانگرهای مولکولی یک روش ایده‌آل برای بهبود و حفاظت از منابع ژنتیکی گیاهی است (Hadia et al. 2008). در مطالعه‌ای از نشانگرهای مولکولی ISSR برای شناسایی ژنتیکی و همچنین رابطه فیلوژنتیک بین ارقام و گونه‌های *Ficus* موجود در شرق هندوستان استفاده شد. تجزیه خوشه‌ای براساس نشانگرها ژنوتیپ‌ها را در چهار گروه قرار داد. همچنین نتایج تجزیه خوشه‌ای براساس نشانگر و صفات باهم مطابقت داشتند (Rout & Aparajita 2009). در مطالعه‌ای، تنوع ژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های انجیر که از شش منطقه مختلف استان ایلام بودند، براساس نشانگرهای RAPD و ISSR بررسی شدند. تجزیه خوشه‌ای با روش جفت گروه بدون وزن با میانگین حسابی و براساس نشانگرهای RAPD و ISSR در فاصله ژنتیکی ۰/۴۵، ژنوتیپ‌ها را 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 (Gheitarani et al. 2020). مطالعات دیگری هم توسط محققین دیگر نیز بر روی انجیر برای بررسی تنوع ژنتیکی براساس صفات مورفولوژیکی و همچنین نشانگرهای مولکولی در کشورهای مختلف انجام شده است (Khadari et al. 1995; Mohammadabadi et al. 2017).

De Masi et al. 2005; Saddoud et al. 2005; Sadder & Ateyeh 2006; Saddoud et al. 2007; Akbulut et al. 2009; Aradhya et al. 2010; Chatti et al. 2010; Zeynel et al. 2011; Hssaini et al. 2020). به موجب کاهش خطر آسیب پذیری، ابتدا کارشناسان به جمع‌آوری منابع خزانه ژنتیکی پرداخته و این منبع باید شامل ژنوتیپ‌های مطلوب و همچنین شامل ارقام متنوع باشند تا به عنوان والدین نسل بعد برای برنامه‌های اصلاحی خود استفاده شوند (Li et al. 2006). از مهم‌ترین عوامل حفظ گیاه در برابر شرایط نامناسب اقلیمی و آفات و بیماری‌ها، متنوع بودن ارقام است. متنوع بودن ژن‌ها و فاصله روابط فیلوژنتیکی یکی از نیازهای اولیه اصلاح گونه‌های گیاهی است (Behera et al. 2008).

در به‌نژادی گیاهی نشانگرهایی برتر هستند که دارای وراثت پذیری بالا بوده و پیوستگی نزدیک با ژن‌های مورد مطالعه داشته باشند و همینطور قابل رؤیت و ثبت باشند. جهت شناسایی والدین مطلوب و تولید واریته‌های هیبرید، از روش‌های شناسایی مختلفی چون ریخت‌شناختی، نشانگرهای بیوشیمیایی و نشانگرهای مولکولی استفاده می‌شود (Kumar 1991). در چند دهه اخیر استفاده از نشانگرهای مبتنی بر DNA رواج بیشتری پیدا کرده است. این نشانگرها به طور قطع تنوع ارقام را نشان می‌دهند و همچنین به شناسایی آن‌ها سرعت بخشیده است. این نشانگرها مکمل کار به‌نژادگران بوده و باعث افزایش دقت و سرعت پیدایش مراحل اصلاح شده است (Nadeem et al. 2018). محققان طی تحقیقاتی بر روی شش رقم تجاری انجیر تازه با رنگ متفاوت نشان دادند که میوه‌های رقم میشن بالاترین میزان سطح پلی فنل، فلاونوئید و آنتوسیانین و آنتی‌اکسیدان را دارند. نتایج حاصل از این تحقیق، مصرف میوه‌های کاملاً رسیده را توصیه می‌کند و همین‌طور توصیه شده که ترکیبات شیمیایی گیاهی مانند کاروتنوئیدها، مواد معدنی و پتانسیل سلامتی میوه انجیر باید بیشتر مورد بررسی قرار گیرد (Jiang et al. 2013).

طی بررسی دیگری که بر روی انجیر ارقام پیوس و سبز در منطقه کازرون انجام شد، نتایج نشان داد که نوع گرده بر میزان فنل کل، طول میوه، میزان آنتوسیانین و فلاونوئید و رنگ میوه تاثیر بسزایی داشته و توصیه شده از برکوهی به خصوص بر اوگیزی استفاده شود. همچنین طی این بررسی میزان آنتوسیانین و TSS با یکدیگر همبستگی مثبتی نشان دادند (Jiang et al. 2013). تنوع ژنتیکی انجیر طی بررسی دیگری در استان فارس با استفاده از نشانگر ملکولی RAPD مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که تنوع بالایی بین ارقام انجیر وجود دارد و با حفظ این منابع می‌توان در برنامه‌های به‌نژادی آینده از آن بهره برد (Jiang et al. 2013). بررسی تنوع فیتوشیمیایی، بیوشیمیایی و مولکولی انجیر با استفاده از نشانگر ISSR در بررسی دیگری در منطقه آذربایجان انجام گرفت. نتایج منجر به شناسایی ارقام مناسب با بالاترین فاصله ژنتیکی شد و آن ارقام را برای برنامه‌های اصلاحی آینده پیشنهاد کردند. همچنین نتایج حاصل از آنالیزهای فیتوشیمیایی و بیوشیمیایی در قالب طرح کاملاً تصادفی نشان داد که میزان TSS، TA، pH، ویتامین ث، آنتوسیانین کل و آنتی‌اکسیدان در سطح ۱٪ معنی‌دار هستند (Jiang et al. 2013). نشانگر SCoT از جمله نشانگرهای مبتنی بر DNA است که براساس شناسایی مناطق حفاظت شده اطراف کدون آغازین (ATG) است. عملکرد این نشانگر مانند RAPD و ISSR می‌باشد. یعنی براساس تک‌شکل و چندشکل بودن، از یکدیگر تمایز

داده می شوند و همچنین روشی ساده، سریع و مقرون به صرفه می باشد. از نشانگرهای غالب می توان برای تجزیه بالک، بررسی تنوع و نقشه یابی ژنتیکی، تهیه نقشه های QTL استفاده می شود (Kumar 1991; Luo et al. 2011). با توجه به اهمیت شناسایی و گروه بندی خزانه ژنتیکی، در این تحقیق، تنوع ۱۶ رقم انجیر با استفاده از صفات ریخت شناسی و بیوشیمیایی و مولکولی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

مواد گیاهی: مواد ژنتیکی این پژوهش، ۱۶ ژنوتیپ مختلف انجیر (جدول ۱) بود که در مرکز تحقیقات کشاورزی شهرستان استهبان در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین جمع آوری برگ گیاهان در مرحله رویشی در اوایل و اواسط بهار ۱۴۰۰ انجام گرفت و برگ های تازه پس از برداشت به منظور استخراج DNA در فویل و در ازت مایع قرار گرفتند و به آزمایشگاه منتقل گردیدند. در این مطالعه ۱۲ صفت اندازه گیری شدند که عبارتند از: طول برگ، آنتوسیانین میوه، مقدار قند، کلروفیل a، b و کل، کارتنوئید، طول و قطر دمبرگ، باز شدن میوه، وزن تر تک میوه و میزان مواد جامد محلول. صفات آنتوسیانین میوه، مقدار قند، باز شدن میوه، وزن تر تک میوه و میزان مواد جامد محلول در انتهای فصل رشد بر روی میوه ها اندازه گیری شدند و صفات طول برگ، کلروفیل a، b و کل، کارتنوئید، طول و قطر دمبرگ هم در اواسط مرحله رشدی بر روی برگ ها انجام شدند.

برای اندازه گیری آنتوسیانین ابتدا پوست میوه جدا شد و از قسمت گوشت میوه به اندازه ۰/۱ g برداشته و در هاونگ به خوبی ساییده شد و ۳ میلی لیتر متانول اسیدی به آن اضافه گردید. سپس به مدت ۲۴ ساعت در یخچال و در تاریکی قرار داده شد و در نهایت در طول موج ۵۵۰ نانومتر مقدار جذب با استفاده از اسپکتوفتومتر خوانده شد و بر اساس معادله استاندارد آنتوسیانین محاسبه گردید (Beck & Lord 1988). میزان مواد جامد محلول (TSS) با رفرکتومتر دستی (Refractometr, Protoble) بر اساس واحد بریکس اندازه گیری گردید (Hoehn et al. 2003). میزان قند بر اساس روش سومورگی در طول موج ۶۰۰ نانومتر و برحسب mg/w محاسبه شد (سومورگی ۱۹۵۲). اندازه گیری کلروفیل های a و b و کل به روش آرنون (Arnon 1949) و کاروتنوئید کل به روش پرایس و هندری (Price & Hendry 1991) انجام گرفت.

استخراج DNA ژنومی: استخراج DNA از نمونه های برگ های جوان ژنوتیپ های انجیر با استفاده از روش دلاپورتا (Dellaporta et al. 1983) با اندکی تغییرات در آزمایشگاه دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته (کرمان) انجام گرفت. پس از استخراج DNA، کیفیت نمونه ها با الکتروفورز ژل آگارز ۲ درصد و کمیت با استفاده از روش اسپکتروفتومتری تعیین شد. برای انجام واکنش زنجیره ای پلیمرز از ۱۰ آغازگر SCoT که در مطالعات محققین دیگر تعداد باند و تنوع خوبی نشان داده بودند، استفاده شد (جدول ۲).

جدول ۱. نام ارقام انجیر مورد مطالعه

Table 1. List of studied genotypes of Figs

کد ژنوتیپ Genotype No.	نام ژنوتیپ Genotype name	کد ژنوتیپ Genotype No.	نام ژنوتیپ Genotype name
R1	برگ چناری Brag Chenari	R9	متی Matty
R2	شاه انجیر خودمونی Shah Anjir	R10	متی خربزه‌ای Matty Kharbozeh
R3	سبز Sabz	R11	رونو Rono
R4	پیوس سبز Payvas Sabz	R12	اتابکی Atabaki
R5	پیوس سیاه Payvas Siah	R13	کشکی سیاه Kashki Siah
R6	گیلاسی سبز Gilasi Sabz	R14	گیلاسی سیاه Gilasi Siah
R7	شاه انجیر مرواریدی Shah Anjir Morvaridi	R15	سیاه Siah
R8	سان پدرو بنفش San Pedro	R16	کله گربه‌ای Kalleh Gorbeh

جدول ۲. مشخصات آغازگر SCoT مورد استفاده در این مطالعه

Table 2. Specifications of SCoT primer used in this study

ردیف Row	آغازگر Primers	توالی Sequence	دمای اتصال Annealing temperature	% GC content	درصد GC
1	SCoT1	5'-CAACAATGGCTACCACCA-3'	48	50	
2	SCoT10	5'-CAACAATGGCTACCAGCC-3'	50	56	
3	SCoT11	5'-AAGCAATGGCTACCACCA-3'	48	50	
4	SCoT12	5'-ACGACATGGCGACCAACG-3'	52	61	
5	SCoT16	5'-ACCATGGCTACCACCGAC-3'	52	61	
6	SCoT21	5'-ACGACATGGCGACCCACA-3'	52	61	
7	SCoT28	5'-CCATGGCTACCACCGCCA-3'	55	67	
8	SCoT35	5'-CATGGCTACCACCGGCC-3'	57	72	
9	SCoT37	5'-CAATGGCTACCACTAGCC-3'	50	56	
10	SCoT48	5'-ACAATGGCTACCACTGGC-3'	50	56	

تکثیر DNA: واکنش زنجیره‌ای پلی مرز در حجم ۱۰ میکرولیتر انجام شد و غلظت نهایی DNA ژنومی ۴۰-۵۰ نانوگرم،

dNTP با غلظت نهایی ۰/۲ mM، MgCl₂ با غلظت نهایی ۲ mM، آنزیم Taq پلیمرز با غلظت ۱ Unit، بافر PCR با

غلظت نهایی 1X، آغازگر با غلظت نهایی 0.5 μM استفاده شدند. چرخه حرارتی شامل ۴ دقیقه واسرشته سازی اولیه در ۹۴°C،

سپس ۳۵ چرخه بصورت ۳۰ ثانیه واسرشته سازی در ۹۴°C، ۴۵ ثانیه در دمای اتصال آغازگر (بسته به آغازگر متفاوت بود، جدول

۲)، ۲ دقیقه مرحله بسط در دمای ۷۲°C و ۵ دقیقه بسط انتهایی در دمای ۷۲°C بود. الکتروفورز محصولات PCR و آشکار سازی

نوارها روی ژل آگارز ۲٪ انجام شد و برای عکس برداری نوارها، از دستگاه ژل داک (Bio-Rad) استفاده شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها: آمار توصیفی با نرم افزار PAST نسخه ۴ و تجزیه واریانس طرح کاملاً تصادفی با نرم افزار

SAS نسخه ۹/۴ انجام شد تا وجود تفاوت معنی‌دار بین ژنوتیپ‌های انجیر آزمون شود. اجزای واریانس (واریانس ژنوتیپی، محیطی

و فنوتیپی) از طریق امید ریاضی میانگین مربعات طرح کاملاً تصادفی و براساس معادلات زیر محاسبه گردید و درصد واریانس

ژنوتیپی و محیطی از کل واریانس یا همان واریانس فنوتیپی محاسبه گردید.

$$\text{رابطه ۱)} \quad \sigma_e^2 = Ms_e = \text{واریانس محیطی}$$

$$\text{رابطه ۲)} \quad \sigma_g^2 = \frac{Ms_g - Ms_e}{r} = \text{واریانس ژنوتیپی}$$

$$\text{رابطه ۳)} \quad \sigma_p^2 = \sigma_g^2 + \sigma_e^2 = \text{واریانس فنوتیپی}$$

ضریب تغییرات فنوتیپی از طریق آمار توصیفی و از تقسیم انحراف معیار بر میانگین صفت بر حسب درصد به دست آمده در حالی که ضریب تغییرات طرح آماری از تقسیم جذر میانگین مربعات خطا برای صفت مورد نظر در طرح آزمایشی بر میانگین بر حسب درصد به دست می آید. ضریب تغییرات فنوتیپی مقدار تنوع در جمعیت را نشان می دهد و هرچه بیشتر باشد بهتر است در حالی که ضریب تغییرات طرح آزمایشی دقت آزمایش و کاهش عوامل خطا در طرح را نشان داده و هرچه کمتر باشد، بهتر است. برای شناسایی جمعیت‌های مورد مطالعه و گروه‌بندی جمعیت‌های مشابه از نظر کلیه صفات اندازه‌گیری شده از تجزیه خوشه‌ای استفاده شد. روش‌های مختلف ارزیابی و روشی که ضریب همبستگی کوفنتیک بالاتر و همچنین دندروگرام آن حالت زنجیره‌ای (Chaining effect) نداشت، انتخاب گردید. همچنین از روش بیشترین گسیختگی در فاصله ادغام خوشه‌ها برای برش و تعیین تعداد گروه‌ها استفاده شد. امتیازدهی نوارها در ژل بر اساس صفر و یک (صفر، عدم وجود نوار و یک، وجود نوار) صورت گرفت. تعداد نوارهای تکثیر شده، تعداد نوارهای چندشکل و درصد چندشکلی برای هر آغازگر بدست آمد و ماتریس صفر و یک به دست آمده برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها و همچنین برآورد شاخص‌ها مورد استفاده قرار گرفت. محتوای اطلاعات چندشکل (Polymorphism Information Content) (Botstein et al. 1980)، هتروزیگوسیتی مورد انتظار (Expected heterozygosity) (Liu 1998)، شاخص نشانگری (Marker Index)، نسبت چندگانه موثر (Effective Multiplex Ratio) و میانگین هتروزیگوسیتی (Mean heterozygosity) (Powell et al. 1996) و قدرت تشخیص نشانگر (Tessier et al. 1999) با استفاده برنامه آنالین iMCE (Amiryousefi et al. 2018) محاسبه شدند. تعداد آلل موثر، شاخص شانون (Shannon 2001) و تنوع ژنی نی (Nei 1972) با استفاده از نرم افزار POPGEN نسخه ۱/۳۱ تعیین گردید (Yeh 1999). جهت گروه‌بندی ژنوتیپ‌های انجیر ابتدا تفاوت‌ها و مشابهت ژنوتیپ‌های انجیر بر اساس معیارهای متفاوت تشابه تهیه و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از روش‌های مختلف حداقل واریانس وارد، دورترین همسایه‌ها، UPGMA، متوسط فاصله بین و درون خوشه‌ها، مرکزی، میانه‌ای و نزدیک‌ترین همسایه‌ها رسم شد و از بین آن‌ها روش خوشه‌ای که بیشترین ضریب همبستگی کوفنتیک را داشت و همچنین دندروگرام آن حالت زنجیره‌ای (Chaining effect) نداشت، انتخاب گردید. همچنین از روش بیشترین گسیختگی در فاصله ادغام خوشه‌ها برای برش و تعیین تعداد گروه‌ها استفاده شد. دندروگرام با استفاده از نرم افزار PAST (Hammer et al. 2001) رسم شد. برای شناسایی ساختار جمعیت در ژنوتیپ‌های انجیر مورد مطالعه از نرم‌افزار Structure (Pritchard et al. 2000) استفاده شد. برای انتخاب سطح بهینه K، برای هر K ابتدا ۱۰۰۰۰ تکرار و به دنبال آن ۱۰۰۰۰ تکرار زنجیره مارکو مونت کارلو (MCMC) بر اساس مدل مخلوط از K = 2 تا K = 10 با سه تکرار انجام شد و سپس بهترین

K با استفاده از نرم افزار HARVESTER STRUCTURE (Earl & vonHoldt 2012) و بر اساس روش ΔK (Evanno et al. 2005) شناسایی شد.

نتایج و بحث

فنوتیپی: به دلیل اینکه هدف از مطالعه جمعیت‌های ژنتیکی مقایسه ژنوتیپ‌ها از نظر میزان تفاوت‌های موجود می‌باشد، به این ترتیب می‌توان از دامنه تغییرات داده‌ها برای مقایسه اولیه بین ارقام مورد مطالعه استفاده نمود و یک دید کلی از میزان تفاوت‌های موجود پیدا کرد. امار توصیفی از جمله حداقل، حداکثر و دامنه تغییرات صفات مورد مطالعه در جدول ۳ نشان داده شده است. پارامتر ضریب تغییرات یکی از مهمترین و با ارزش‌ترین شاخص‌های برآورد تنوع در جمعیت‌ها بوده و به دلیل این که این معیار تحت تأثیر واحد اندازه‌گیری صفت و یا دامنه تغییرات آن قرار نمی‌گیرد و از این نظر از معیارهای دیگر تنوع نظیر دامنه تغییرات اهمیت بیشتری دارد و می‌توان با اعتماد بیشتری گزینش‌های مطلوب را برای اصلاح صفاتی که ضریب تغییرات بالاتری دارند، انجام داد. بررسی ضرایب تغییرات فنوتیپی صفات نشان داد که صفت کلروفیل b و به دنبال آن کاروتنوئید و کلروفیل a بیشترین ضریب تغییرات فنوتیپی را دارا بودند. بنابراین می‌توان از این صفات در به نژادی استفاده نمود و گزینش‌های مؤثری در بین ژنوتیپ‌های انجیر مورد مطالعه جهت بهبود و اصلاح این صفات انجام داد. همچنین کمترین ضریب تغییرات فنوتیپی مربوط به صفات طول برگ و قطر میوه بود و اصلاح این صفت نسبت به صفات دیگر از طریق گزینش در جمعیت مورد مطالعه با موفقیت کمتری همراه خواهد بود. با توجه به مقادیر ضریب تغییرات فنوتیپی بین صفات مشاهده می‌شود که تنوع مطلوبی در بین صفات برای اکثر آن‌ها وجود دارد و می‌توان از آن‌ها در بهبود ژنوتیپ‌های انجیر مورد مطالعه استفاده نمود (جدول ۳). نتایج تجزیه واریانس طرح کاملاً تصادفی برای کلیه صفات مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری را در سطح ۰/۰۱ بین ژنوتیپ‌های انجیر نشان داد (جدول ۴). ضریب تغییرات طرح کاملاً تصادفی بین ۸/۹۴ درصد برای قطر میوه تا ۵۱/۲۶ درصد برای کلروفیل b متغیر بود که نشان دهنده دقت مناسب آزمایش می‌باشد و خطای ناشی از اجرای آزمایش در حد قابل قبول است. جهت تعیین میزان تنوع موجود در صفات مختلف، اقدام به محاسبه ضریب تغییرات فنوتیپی گردید. کمترین ضریب تغییرات فنوتیپی مربوط به صفت طول برگ (۱۶/۳۱) و بیشترین آن مربوط به صفت کلروفیل b (۱۱۷/۵۷) بود و بقیه صفات در این بین قرار داشتند. بنابراین دلیل تنوع زیاد این صفت می‌تواند شرایط محیطی و همچنین زمینه متفاوت ژنتیکی ژنوتیپ‌ها باشد.

جدول ۳. آمار توصیفی صفات مورد مطالعه در ژنوتیپ‌های انجیر

Table 3. Descriptive statistic of studied traits in fig genotypes

صفات Traits	آماره توصیفی Discriptive statistic					
	مینیمم Min	ماکزیمم Max	دامنه Range	میانگین Mean	انحراف معیار Stand. dev	ضریب تغییرات (%) Coeff. Var (%)
قند suger	0.354	0.791	0.437	0.573	0.155	26.961
آنتوسیانین میوه Anthocyanin	0.345	6.377	6.031	2.068	1.765	85.340
طول برگ Leaf length	19.500	35.933	16.433	28.157	4.591	16.305
قطر میوه Fruit diameter	19.733	34.800	15.067	28.881	4.906	16.987
دم انجیر Fig tail	4.033	16.167	12.133	8.367	3.689	44.092
باز شدن میوه Fruit opening	3.600	14.300	10.700	6.653	3.159	47.477
وزن تر Fresh weight	4.433	29.663	25.230	15.793	6.708	42.476
مواد جامد محلول TSS	1.667	6.333	4.667	3.406	1.260	37.004
کلروفیل a Cla	0.007	0.139	0.132	0.076	0.043	56.737
کلروفیل b Clb	0.005	0.327	0.321	0.100	0.117	117.569
کلروفیل کل Total Cl	0.068	0.357	0.288	0.176	0.091	51.893
کاروتنوئید Carotenoid	0.001	0.011	0.010	0.004	0.003	68.625

میزان تنوع موجود در صفت طول برگ و به دنبال آن قطر میوه کمتر از بقیه صفات بوده است و بنابراین این صفات مورد توجه به‌نژادگر قرار نمی‌گیرند. ولی بقیه صفات دارای تنوع خوبی بوده و می‌تواند مورد توجه واقع شود و انتخاب جمعیت‌ها بر اساس این صفات منجر به بهبود این صفات شده ولی صفات دیگر با ضریب تغییرات پایین از شانس کمتری جهت انتخاب برخوردار هستند (جدول ۴). در جدول ۵ نتایج اجزای واریانس برای صفات مورد مطالعه بر اساس طرح کاملاً تصادفی نشان داده شده است. نتایج نشان داد که درصد اجزای واریانس برای صفات مورد مطالعه در بین ژنوتیپ‌های انجیر مورد مطالعه برای صفات مختلف بین ۶۱ تا ۹۷ درصد می‌باشد و این نشان می‌دهد که تنوع قابل ملاحظه‌ای بین ژنوتیپ‌ها وجود دارد و می‌توان از آن برای انتخاب ژنوتیپ برتر استفاده نمود. همچنین برای بعضی صفات تنوع درون ژنوتیپ نیز مشاهده می‌شود که از نتایج درصد اجزای واریانس

برای منبع تغییر خطا قابل مشاهده می‌باشد و تنوع درون ژنوتیپ برای صفات طول برگ، مواد جامد محلول و دم انجیر بالای ۳۰ درصد می‌باشد و از این لحاظ می‌توان درون ژنوتیپ انجیر نیز به دنبال تنوع و انتخاب افراد برتر بود.

جدول ۴. تجزیه واریانس طرح کاملاً تصادفی صفات مورد مطالعه در ژنوتیپ‌های انجیر

Table 4. Analysis of variance of completely randomized design of studied traits in fig genotypes

میانگین مربعات Mean Squire						درجه آزادی	منابع تغییرات
باز شدن میوه Fruit opening	دم انجیر Fig tail	قطر میوه Fruit diameter	طول برگ Leaf lenght	آنتوسیانین میوه Anthocyanin	قند suger	df	S.O.V
29.93**	40.83**	72.21**	63.24**	9.34**	0.071**	15	ژنوتیپ genotype
1.48	5.51	6.68	10.10	0.92	0.0049	32	خطا Error
18.29	28.01	8.94	11.29	26.46	13.65		ضریب تغییرات (%) Coeff. Var (%)

میانگین مربعات Mean Squire						درجه آزادی	منابع تغییرات
کاروتنوئید Carotenoid	کلروفیل کل Total Cl	کلروفیل b Clb	کلروفیل a Cla	مواد جامد محلول TSS	وزن تر Fresh weight	df	S.O.V
0.000025**	0.0249**	0.041**	0.0056**	4.77**	135.01**	15	ژنوتیپ genotype
0.0000017	0.0021	0.0026	0.000049	0.81	13.59	32	خطا Error
31.29	25.77	51.26	9.21	26.37	23.34		ضریب تغییرات (%) Coeff. Var (%)

** : معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

** : significant at the 1% probability level.

نتایج تجزیه خوشه‌ای داده‌های مربوط به صفات مورد ارزیابی با روش UPGMA و معیار فاصله اقلیدوسی (شکل ۱) نشان داد که کمترین فاصله ژنتیکی (۵/۳۱) بین ژنوتیپ‌های ۱۲ و ۱۵ وجود داشت و بیشترین فاصله ژنتیکی (۲۰/۶۲) بین ژنوتیپ‌های ۱ و ۲ بود. ژنوتیپ‌های انجیر براساس بیشترین گسیختگی در فاصله ادغام آن‌ها به پنج گروه تقسیم شدند که درصد صحت گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با تجزیه تابع تشخیص ۹۴ درصد بود. همانطور که در شکل ۱ دیده می‌شود ژنوتیپ‌های انجیر در پنج گروه اصلی قرار گرفتند که گروه اول شامل ژنوتیپ‌های ۲ و ۱۶، گروه دوم شامل ژنوتیپ‌های ۵ و ۷، گروه سوم شامل ژنوتیپ‌های ۱، ۴، ۸، ۱۰، ۱۲، ۱۳، ۱۴ و ۱۵، گروه چهارم شامل ژنوتیپ ۳، و در نهایت ژنوتیپ‌های ۶، ۹ و ۱۱ در گروه پنجم قرار گرفتند. همان طور که

عنوان شد ژنوتیپ‌های انجیر به دلیل پایه‌های ژنتیکی متفاوت یا سایر عوامل محیطی در دسته‌های کاملاً جدا قرار گرفته و می‌تواند توجیه‌کننده این باشد که صفات مورفولوژیکی قادر به تعیین این تمایزند. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای نشان‌دهنده تفاوت جمعیت‌های هر گروه با سایر جمعیت‌های گروه‌های دیگر و شباهت و قرابت جمعیت‌های داخل هر گروه می‌باشد. دلیل تفاوت جمعیت‌های گروه‌ها باهم می‌تواند به علت تفاوت در ساختار ژنتیکی یا تاثیر سایر عوامل محیطی بر روی صفات باشد. در مطالعات دیگر بر روی انجیر نیز مشخص شد که صفات مورفولوژیکی به خوبی توانستند ژنوتیپ‌های انجیر را گروه‌بندی کنند و تنوع بالایی آن‌ها را نشان دهند (Fateh & Ali 2010; Benettayeb et al. 2017; Doolatian et al. 2017; Abdelsalam et al. 2019).

جدول ۵. برآورد اجزای واریانس منابع تغییرات طرح کاملاً تصادفی صفات مورد مطالعه

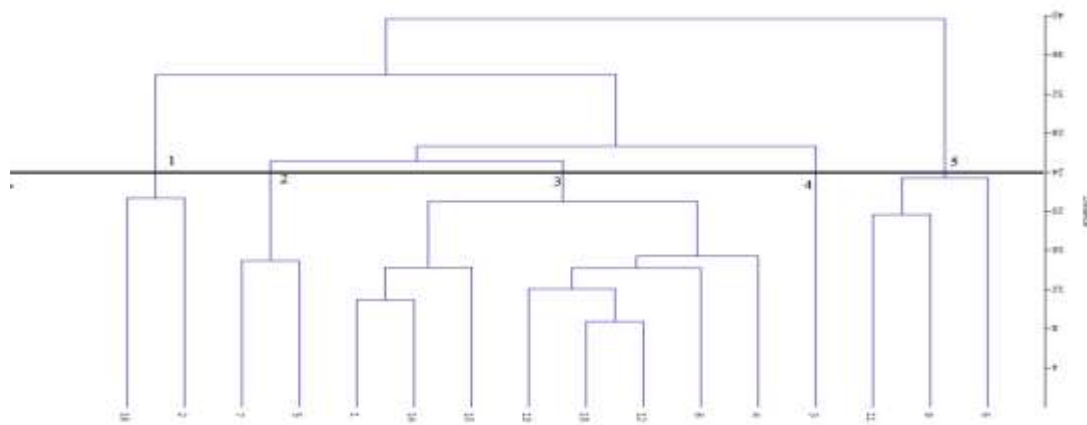
Table 5. Estimation of the components of variance of the sources of changes in the completely random design of the studied traits

صفات trait	منابع تغییرات Mean Square			
	ژنوتیپ genotype		خطا Error	
	اجزای واریانس Variance component	درصد percentage	اجزای واریانس Variance component	درصد percentage
suger قند	0.022033	81.80693	0.0049	18.19307
Anthocyanin آنتوسیانین میوه	2.806667	75.31306	0.92	24.68694
Leaf lenght طول برگ	17.71333	63.68648	10.1	36.31352
Fruit diameter قطر میوه	21.84333	76.58058	6.68	23.41942
Fig tail دم انجیر	11.77333	68.11958	5.51	31.88042
Fruit opening باز شدن میوه	9.483333	86.50046	1.48	13.49954
Fresh weight وزن تر	40.47333	74.86282	13.59	25.13718
TSS مواد جامد محلول	1.32	61.97183	0.81	38.02817
Cl _a کلروفیل a	0.00185	97.42015	0.000049	2.579853
Cl _b کلروفیل b	0.0128	83.11688	0.0026	16.88312
Total Cl کلروفیل کل	0.0076	78.35052	0.0021	21.64948
Carotenoid کاروتنوئید	7.77E-06	82.04225	0.0000017	17.95775

مطالعه مولکولی: در این پژوهش از ده آغازگر SCoT استفاده شد و از بین آن‌ها هشت آغازگر چندشکلی نشان دادند و

در مجموع ۵۱ نوار تکثیر کردند که ۵۰ نوار چندشکل بودند و میانگین مکان‌های چندشکل به ازای هر آغازگر برای نشانگرهای SCoT معادل ۶/۲۵ بدست آمده است (جدول ۶). از بین آغازگرهای مورد استفاده در نشانگر SCoT، آغازگر SCoT12 و SCoT11 به ترتیب با تعداد ۱۳ و ۹ نوار بیشترین تعداد نوار و آغازگرهای SCoT37 با دو نوار و SCoT48 با تعداد سه نوار

کمترین تعداد را داشتند (جدول ۶). در صد چند شکلی بدست آمده در جمعیت‌های انجیر از ۶۶/۶۷ در صد برای SCoT37 تا ۱۰۰ درصد برای بقیه نشانگرها متغییر بود. متوسط درصد چندشکلی به دست آمده در این تحقیق ۹۵/۸۳ درصد بود (جدول ۶).



شکل ۱. دندروگرام تجزیه خوشه‌ای براساس صفات زراعی در ژنوتیپ‌های انجیر با روش UPGMA و معیار فاصله اقلیدسی

Figure 1. Dendrogram of cluster analysis based on agronomic traits in fig genotypes by UPGMA method and Euclidean distance

میزان اطلاعات چند شکل (PIC) معادل تنوع ژنتیکی بوده و قدرت تفکیک یک نشانگر را به واسطه تعداد آلل‌های چندشکل و فراوانی نسبی این آلل‌ها در جمعیت تحت مطالعه نشان می‌دهد (Botstein et al. 1980). محتوای اطلاعات چندشکل، به تفکیک برای هر یک از آغازگرهای مورد مطالعه محاسبه و نتایج مربوطه در جدول ۶ ارائه شد. محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) در این تحقیق برای نشانگر SCoT بین ۰/۳۴۲۳ تا ۰/۳۷۹۱ و میانگین محتوای اطلاعات چندشکل ۰/۳۵۹۵ بود (جدول ۶). بالاترین میزان PIC در آغازگر SCoT11 با مقدار ۰/۳۷۹۱ تعیین شد که نشان‌دهنده کارایی بالای این آغازگر در تمایز ژنوتیپ‌های مورد استفاده در این تحقیق می‌باشد. همچنین هتروزیگوسیتی مورد انتظار (H) در این تحقیق برای نشانگرهای SCoT بین ۰/۴۱۸۹ تا ۰/۴۹۹۱ و میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار ۰/۴۶۲۶ بود (جدول ۶).

جدول ۶. مشخصات و شاخص‌های مطالعه آغازگرهای SCoT مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های انجیر

Table 6. Characteristics and study indices of SCoT primers used in the study of genetic diversity of fig genotypes

قدرت تشخیص Discriminating power	هتروزایگوسیتی مورد انتظار Expected heterozygosity	محتوای اطلاعات چندشکل Polymorphism Information Content	تعداد نوار چند شکلی Polymorphism band	تعداد کل نوار Total band	درصد چندشکلی Polymorphism percentage	نام آغازگرها Primers
0.8528	0.4747	0.3542	5	5	100.00	SCoT1
0.9123	0.4189	0.3791	9	9	100.00	SCoT11
0.8605	0.4688	0.3570	13	13	100.00	SCoT12
0.8842	0.4512	0.3651	6	6	100.00	SCoT16
0.8335	0.4841	0.3497	7	7	100.00	SCoT21
0.8528	0.4747	0.3542	5	5	100.00	SCoT35
0.9093	0.4297	0.3745	2	3	66.67	SCoT37
0.7340	0.4991	0.3423	3	3	100.00	SCoT48
0.8549	0.4626	0.3595	6.25	6.38	95.83	میانگین Average

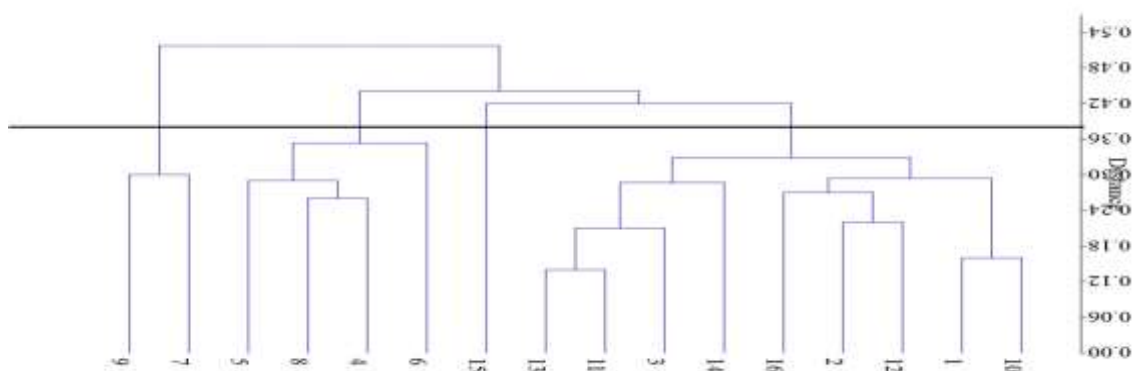
تنوع ژنی نی Nei diversity	شاخص شانون Shanon index	تعداد آلل موثر Effective allele	میانگین هتروزایگوسیتی Mean heterozygosity	نسبت چندگانه موثر Effective Multiplex Ratio	شاخص نشانگری Marker Index	نام آغازگرها Primers
0.32	0.49	1.53	0.0059	1.9375	0.0115	SCoT1
0.26	0.41	1.39	0.0029	2.6875	0.0078	SCoT11
0.30	0.47	1.47	0.0023	4.8750	0.0110	SCoT12
0.30	0.47	1.46	0.0047	2.0625	0.0097	SCoT16
0.32	0.49	1.53	0.0043	2.8750	0.0124	SCoT21
0.32	0.48	1.53	0.0059	1.9375	0.0115	SCoT35
0.28	0.46	1.40	0.0134	0.6250	0.0084	SCoT37
0.36	0.53	1.67	0.0104	1.5625	0.0162	SCoT48
0.31	0.47	1.50	0.0062	2.3203	0.0111	میانگین Average

بالاترین میزان H در آغازگر SCoT48 با مقدار ۰/۴۹۹۱ تعیین شد که نشان‌دهنده کارایی بالای این آغازگر در تمایز ژنوتیپ‌های مورد استفاده در این تحقیق می‌باشد. در مطالعه بر روی گیاهان دیگر میانگین مقادیر PIC برای مارکرهای SRAP و SCoT به ترتیب ۰/۳۵ و ۰/۳۰ بود (Golkar & Mokhtari 2018). نتایج این مطالعه با مطالعه بر روی گیاه گلرنگ (Golkar & Mokhtari 2018) و گیاه گلرنگ (Talebi et al. 2018) مقایسه شد و نشان داد که نشانگر SCoT در این مطالعه قادر به مطالعه تنوع ژنتیکی و تمایز جمعیت‌ها مثل آن مطالعات بوده است. به منظور تعیین کارایی نشانگرها در بروز چندشکلی، شاخص نشانگری (MI) محاسبه شد. بیشترین میزان (MI) در نشانگر SCoT برای آغازگر SCoT48 (۰/۰۱۶۲) و کمترین میزان برای آغازگر SCoT11 (۰/۰۰۷۸) بود (جدول ۶). همچنین میانگین هتروزایگوسیتی در نشانگر SCoT بین ۰/۰۲۳ تا ۰/۰۱۳۴ متغیر بود. آغازگرهای SCoT37 و SCoT48 به ترتیب با ۰/۰۱۳۴ و ۰/۰۱۰۴ واحد دارای بیشترین میانگین هتروزایگوسیتی (H_{avp}) بودند که کارایی بالا این آغازگرها را در بروز چندشکلی نشان می‌دهد (جدول ۶). نسبت چندگانه موثر که بیانگر تعداد جایگاه‌های ژنی چندشکل موجود در یک ژرمپلاسم می‌باشد بین ۰/۶۲۵۰ برای نشانگر SCoT37 تا ۴/۸۷۵ برای

SCoT12 متغیر بود. همچنین قدرت تشخیص (D) نشانگر که می‌تواند تمایز دو فرد را بهتر نشان دهد و هر نشانگری که قدرت تشخیص بیشتری داشته باشد این خصوصیت را دارا است، بین ۰/۷۳۴۰ برای نشانگر SCoT48 تا ۰/۹۱۲۳ برای SCoT11 متغیر بود.

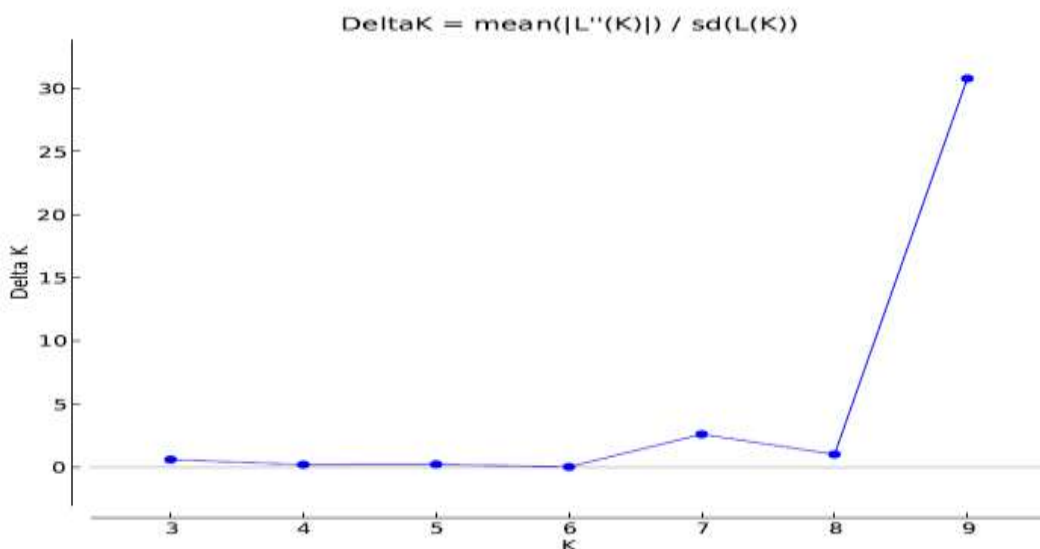
یکی از مهمترین شاخص‌ها برای ارزیابی تنوع ژنی در بین ارقام و جمعیت‌ها، شاخص تنوع ژنی نی می‌باشد. برآورد شاخص نی نشان داد که میزان تنوع ژنی از ۰/۲۶ تا ۰/۳۶ در بین آغازگرهای SCoT متغیر بود و میانگین آن در جمعیت مورد مطالعه برابر با ۰/۳۱ بود (جدول ۶). آغازگر SCoT48 با مقدار ۰/۳۶ بیشترین تنوع ژنی نی را نشان داد. آغازگر SCoT11 کمترین میزان تنوع ژنی نی را نشان داد. ضریب یا شاخص شانون بیانگر میزان چندشکلی در بین ژنوتیپ‌ها است. در این تحقیق میانگین ضریب شانون برای نشانگر SCoT برابر با ۰/۴۷ بود که نشان دهنده تنوع متوسط در توده‌های مورد بررسی است. آغازگرهای SCoT48، SCoT1 و SCoT21 به ترتیب دارای بیشترین مقدار شاخص شانون بودند، این نشان می‌دهد که آغازگرهای مورد اشاره می‌تواند تنوع ژنتیکی درون جمعیتی را بهتر توجیه کند و آغازگر SCoT11 دارای کمترین شاخص شانون می‌باشد (جدول ۶). همچنین تعداد آلل موثر از ۱/۳۹ تا ۱/۶۷ متغیر بود و میانگین آن در جمعیت مورد مطالعه برابر با ۱/۵۰ بود (جدول ۶).

تجزیه خوشه‌ای براساس نشانگرهای SCoT با استفاده از روش UPGMA و معیار تشابه گاور (Gower) با ضریب کوفنتیک ۰/۷۳ بهترین روش گروه‌بندی از بین روش‌های مورد بررسی براساس ضریب کوفنتیک و نداشتن حالت زنجیره‌ای دندروگرام بود و میزان تشابه بین ارقام براساس ضریب گاور از ۰/۱۴ تا ۰/۷۶ متغیر بود. با توجه به مقادیر تشابه بین ژنوتیپ‌ها می‌توان نتیجه‌گیری کرد که تلاقی بین ژنوتیپ‌هایی که کمترین تشابه را دارند (ژنوتیپ ۱۱ و ۱۳)، بهترین نتیجه را در دستیابی به هیبریدها و یا دستیابی به حداکثر تفکیک در نسل‌های پس از F_1 خواهد شد. براساس روش UPGMA و برش نمودار، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در چهار گروه قرار گرفتند (شکل ۲). بیشترین شباهت بین ژنوتیپ‌های ۱۰ و ۹ با تشابه ۰/۷۶ بود و کمترین تشابه هم بین ژنوتیپ‌های ۱۱ و ۱۳ با مقدار تشابه ۰/۱۴ بود. در گروه اول ژنوتیپ‌های ۷ و ۹، در گروه دوم ژنوتیپ‌های ۴، ۵، ۶ و ۸، در گروه سوم ژنوتیپ ۱۵ و بقیه ژنوتیپ‌ها در گروه چهارم قرار گرفتند. بنابراین، با انجام دورگ‌گیری بین ژنوتیپ‌های دور از هم، که از خوشه‌های با فاصله زیاد انتخاب شده‌اند امکان رسیدن به نتایج مطلوب افزایش می‌یابد. در مطالعه‌ای که پیا و همکاران (Piya et al. 2014) بر روی هشت جمعیت مختلف و ۱۲ فرد از هر جمعیت انجام دادند، از مناطق مختلف آمریکا جمع‌آوری شده بودند، نشان دادند که این افراد براساس نشانگرهای SSR در سه گروه مختلف قرار گرفتند و تنوع خوبی نشان دادند. در مطالعه حاضر، ساختار جمعیت بر اساس مدلی که در نرم افزار استراکچر پریچارد و همکاران (Pritchard et al. 2000)، ارائه شده است، تعیین شد. بر این اساس تعداد گروه مناسب برای جمعیت با استفاده از داده‌های به دست آمده برای تعداد گروه‌های از دو تا ۱۰ انتخاب و با استفاده از harvester structure website for best k تعداد نه زیر گروه برای این جمعیت‌ها انتخاب گردید (شکل ۳).



شکل ۲. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های انجیر با UPGMA و ضریب گاور براساس نشانگرهای SCoT

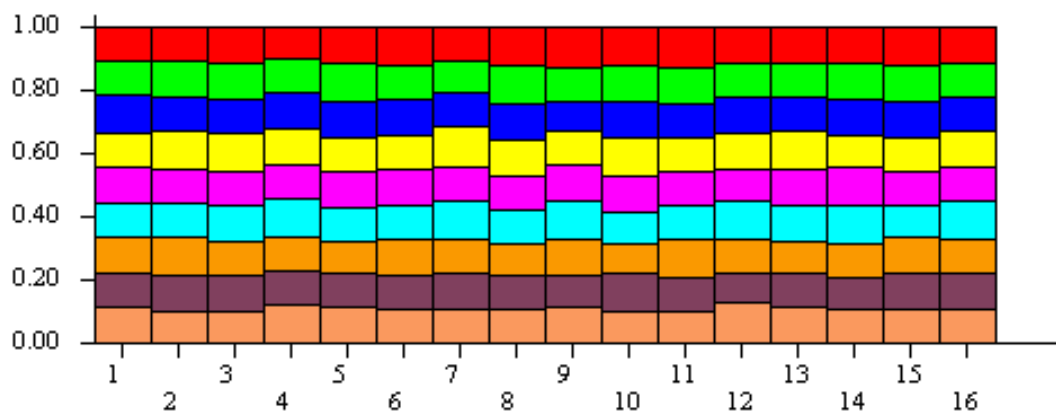
Figure 2. Dendrogram obtained from cluster analysis of fig genotypes with UPGMA and Gower coefficient based on SCoT markers



شکل ۳. تعیین زیرگروه‌ها با استفاده از Structure Harvester

Figure 3. Determining subgroups using Structure Harvester

نتایج تجزیه خوشه‌بندی بر مبنای مدل، بر اساس شاخص آماری بیزی، به منظور پی بردن به ساختار فاصله‌ای جمعیت‌ها و با فرض اینکه مدل تبار از نوع مخلوط و مدل فراوانی آلی از نوع پیوسته باشد و نیز با فرض $K=2$ تا $K=10$ (K نشان دهنده‌ی تعداد جمعیت است) نشان داد که در ژرم‌پلاسم موجود نه جمعیت وجود دارد که بر مبنای ژنوتیپ و ژنوم آن‌ها بطور کامل این ژنوتیپ‌ها از هم تفکیک نشده‌اند (شکل ۴) و در نه گروه قرار گرفتند اگرچه گروه‌ها به طور کامل تمایز نداشته‌اند و ژنوتیپ‌ها مخلوطی از همه گروه‌ها هستند و همه ژنوتیپ‌ها به صورت مخلوط می‌باشند. بر اساس نتایج گروه بندی بیزی، ساختار جمعیت به نه زیر گروه تقسیم شد و با نتایج تجزیه خوشه‌ای نشانگرها و تجزیه خوشه‌ای صفات ریخت‌شناسی نتایج مشابه‌ای را نشان داد.



شکل ۴. ساختار جمعیتی ژنوتیپ‌های انجیر با استفاده از رویکرد خوشه‌بندی بیزی توسط نرم افزار STRUCTURE
Figure 4. Demographic structure of fig genotypes using Bayesian clustering approach by STRUCTURE software

نتایج این بررسی حاکی از وجود تنوع بالا در بین جمعیت‌های انجیر مورد بررسی است. با توجه به اینکه جمعیت‌ها از مناطق و همچنین پایه‌های ژنتیکی مختلفی هستند و از لحاظ صفات باهم تفاوت دارند، لذا وجود تنوع ژنتیکی تایید کننده این مطلب می‌باشد که اختلافات جمعیت‌ها تنها به واسطه اثر محیطی نمی‌باشد، بلکه توسط عوامل ژنتیکی و همچنین اثر متقابل ژنوتیپ و محیط نیز کنترل می‌شوند. همچنین انتخاب براساس نشانگرهای مولکولی یک روش سریع در برنامه اصلاحی بوده و اطلاعات ژنتیکی بدست آمده از نشانگرهای مولکولی در برنامه‌های اصلاحی نقش مهمی را ایفا می‌کند، بنابراین برای انتخاب ژنوتیپ و جمعیت برتر که دارای ارزش بالایی در برنامه‌های به‌نژادی هستند، علاوه بر صفات، استفاده از نشانگرهای SCOT به دلیل عدم نیاز به اطلاعات قبلی در مورد توالی‌های هدف در مقایسه با نشانگرهای SSR بهتر و آسان‌تر است و بنابراین می‌تواند به‌طور موثر جهت مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های انجیر استفاده شوند. گروه‌بندی جمعیت‌های انجیر با داده‌های مولکولی تا حد زیادی با گروه‌بندی با صفات زراعی و همچنین روش بیزی هم‌خوانی داشتند. جمعیت‌های دیلمان-گیلان و ایلان-قم برای صفات تعداد برگ بیشترین مقدار را داشتند و همچنین با توجه به مقدار بالای صفات مرتبط با آن که در افزایش تولید نقش دارند برای کشت در این منطقه توصیه می‌شوند و می‌توان با بررسی این جمعیت‌ها در مناطق مختلف ژنوتیپ برتر را پیدا نمود.

در مطالعه‌ای با استفاده از نشانگر RAPD و صفات، ژنوتیپ‌های انجیر بر اساس روابط ژنتیکی در ۱۲ گروه با تنوع بالا قرار گرفتند (Ali-Shtayeh et al. 2014). بررسی ارقام انجیر با استفاده از ۲۴ آغازگر SSR و تجزیه و تحلیل UPGMA بر اساس ماتریس تشابه، ژنوتیپ‌های انجیر را به دو گروه اصلی تقسیم کرد (Teoman et al. 2017). تنوع ژنتیکی ۲۲ نمونه انجیر را با شش آغازگر ISSR ارزیابی شدند و دندروگرام با استفاده از ضریب Li/Dice و Nei به دست آمد و نمونه‌های مورد بررسی به

چهار 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 (Ganopoulos et al. 2015). در مطالعه‌ای دیگر تنوع ژنتیکی ۱۹ نمونه انجیر را با استفاده از ۱۳ آغازگر ISSR، ۱۹ آغازگر RAPD و ۱۳ آغازگر SSR بررسی شدند و تمام آغازگرها ۲۵۸ نوار تولید کردند که بیشترین مکان چندشکلی مربوط به آغازگر RAPD بود. تجزیه و تحلیل خوشه‌ای برای هر سه نشانگر انجام شد و میانگین شباهت‌های ژنتیکی به ترتیب ۰/۷۸۷، ۰/۷۱۷ و ۰/۷۴۹ به‌دست آمد که به‌ترتیب متعلق به ISSR، RAPD و SSR بود (Ikegami et al. 2009).

نتیجه‌گیری: نتایج ارزیابی ژنوتیپ‌های انجیر بر اساس نشانگرهای مورفولوژیکی و نشانگر SCoT نشان دادند که تنوع ژنتیکی بالایی در بین ژنوتیپ‌های بررسی شده وجود دارند که می‌توانند مواد ژنتیکی مناسب برای پژوهش‌های اصلاحی این گیاه در آینده باشند. آغازگرهای استفاده شده ۵۰ نوار چندشکل روی ژنوتیپ‌ها ایجاد کردند و نشان دادند اطلاعات کافی برای تشخیص و تفکیک ژنوتیپ‌ها را از یکدیگر فراهم کرده‌اند. در جمعیت‌هایی که جریان ژنی بیشتر باشد، شباهت ژنی بیشتر بوده، بیشترین شباهت بین ژنوتیپ‌های ۱۱ و ۱۳ با تشابه ۰/۶۸۱۸ بود و به لحاظ ژنتیکی کنار یکدیگر قرار گرفتند. همچنین کمترین تشابه هم بین ژنوتیپ‌های ۹ و ۱۰ با مقدار تشابه ۰/۰۵ بود. به‌طور کلی انجیرهای ایران تنوع ژنتیکی و چندشکلی بالایی را نشان دادند. تاکسون‌های 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.

سپاسگزاری: از پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان به خاطر حمایت مالی، معنوی و همکاری در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود. همچنین از داوران محترم به خاطر ارائه نظرهای ساختاری و علمی سپاسگزاری می‌شود.

منابع

عسکری ناهید، باقی‌زاده امین، محمدآبادی محمدرضا (۱۳۸۹). مطالعه تنوع ژنتیکی در چهار جمعیت بز کرکی راینی با استفاده از نشانگرهای ISSR. مجله ژنتیک نوین ۵، ۴۹-۵۶.

محمدی‌فر آمنه، فقیه ایمانی سیدعلی، محمدآبادی محمدرضا، سفلائی محمد (۱۳۹۲) تأثیر ژن TGFb3 بر ارزش‌های فنوتیپی و ارثی صفات وزن بدن در مرغ بومی استان فارس. مجله بیو تکنولوژی کشاورزی ۵(۴)، ۱۳۶-۱۲۵.

محمدی فر آمنه، محمدآبادی محمدرضا (۱۳۹۰). کاربرد نشانگرهای ریزماهواره برای مطالعه ژنوم گوسفند کرمانی. مجله علوم دامی

ایران ۴۲ (۴) ۳۳۷-۳۴۴.

References

- Abdelsalam NR, Awad RM, Ali HM et al. (2019) Morphological, pomological, and specific molecular marker resources for genetic diversity analyses in fig (*Ficus carica* L.). HortScience 54, 1299-1309.
- Akbulut M, Ercisli S, Karlidag H (2009) RAPD-based study of genetic variation and relationships among wild fig genotypes in Turkey. Genet Mol Res 8, 1109-1115.
- Ali-Shtayeh MS, Jamous RM, Zaitoun SYA et al. (2014) Genetic diversity of the Palestinian fig (*Ficus carica* L.) collection by pomological traits and RAPD markers. Am J Plant Sci 2014.
- Amiryousefi A, Hyvönen J, Poczai P (2018) iMEC: Online marker efficiency calculator. Appl Plant Sci 6, Article number e01159, 01154 pages.
- Aradhya MK, Stover E, Velasco D et al. (2010) Genetic structure and differentiation in cultivated fig (*Ficus carica* L.). Genetica 138, 681-694.
- Arnon DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol 24, 1.
- Askari N, Baghizadeh A, Mohammadabadi M (2008) Analysis of the genetic structure of Iranian indigenous Raeni Cashmere goat populations using microsatellite markers. Biotechnol 2, 1-4.
- Askari N, Baghizadeh A, Mohammadabadi MR (2010) Study of genetic diversity in four populations of Raeini cashmere goat using ISSR markers. Mod Genet J 5, 49-56 (In Persian).
- Beck N, Lord E (1988) Breeding system in *Ficus carica*, the common fig. II. Pollination events. Am J Bot 75, 1913-1922.
- Behera TK, Gaikward AB, Singh AK et al. (2008) Relative efficiency of DNA markers (RAPD, ISSR and AFLP) in detecting genetic diversity of bitter melon (*Momordica charantia* L.). J Sci Food Agric 88, 733-737.
- Benettayeb Z, Bencheikh M, Setti B et al. (2017) Genetic diversity of Algerian fig (*Ficus carica* L.) cultivars based on morphological and quality traits. Indian J Horticult 74, 311-316.
- Botstein D, White RL, Skolnick M et al. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics 32, 314-331.

- Chatti K, Baraket G, Abdelkrim AB et al. (2010) Development of molecular tools for characterization and genetic diversity analysis in Tunisian fig (*Ficus carica*) cultivars. *Biochem Genet* 48, 789-806.
- Dalkcedil Z, Mestav HO, Kocata H (2011) Genetic diversity of male fig (*Ficus carica caprificus* L.) genotypes with random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Afr J Biotechnol* 10, 519-526.
- Datwyler SL, Weiblen GD (2004) On the origin of the fig: phylogenetic relationships of Moraceae from ndhF sequences. *Am J Bot* 91, 767-777.
- De Masi L, Castaldo D, Galano G et al. (2005) Genotyping of fig (*Ficus carica* L) via RAPD markers. *J Sci Food Agric* 85, 2235-2242.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol Biol Rep* 1, 19-21.
- Doolatian L, Khodayari H, Mohammadi A (2017) The genetic diversity survey of the *Ficus* 1. genus in Iran using inter simple sequence repeats markers. *Plant Genet Res* 4, 51-62.
- Earl DA, vonHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour* 4, 359-361.
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol* 14, 2611-2620.
- FAOSTAT (2020) Statistical databases. In: Food and Agriculture Organization of the United Nations, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>, (Accessed March, 2022).
- Fateh A, Ali F (2010) Assessment of genetic diversity among some southern Tunisian fig (*Ficus carica* L.) cultivars based on morphological descriptors. *Jordan J Agric Sci* 5, 1-16.
- Ganopoulos I, Kalivas A, Kavroulakis N et al. (2015) Genetic diversity of Barbary fig (*Opuntia ficus-indica*) collection in Greece with ISSR molecular markers. *Plant Gene* 2, 29-33.
- Ghasemi M, Baghizadeh A, Abadi M (2010) Determination of genetic polymorphism in Kerman Holstein and Jersey cattle population using ISSR markers. *Aust J Basic Appl Sci* 4, 5758-5760.
- Gheitarani B, Erfani-Moghadam J, Fazeli A (2020) Evaluation of genetic diversity among some common fig using RAPD and ISSR molecular markers. *Plant Genet Res* 6, 43-54.
- Ghorbani A, Hasanpour H, Ercisli S (2019) Variation on biochemical, phytochemical and genetic diversity of fig (*Ficus carica*) from East Azerbaijan province. *J Iran Plant Ecophysiol Res* 13, 16-28.

- Golkar P, Mokhtari N (2018) Molecular diversity assessment of a world collection of safflower genotypes by SRAP and SCoT molecular markers. *Physiol Mol Biol Plants* 24, 1261-1271.
- Hadia HA, El-Mokadem HE, El-Tayeb H (2008) Phylogenetic relationship of four *Ficus* species using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *J Appl Sci Res* 4, 507-514.
- Hammer Ø, Harper D, Ryan P (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4, 9pp.
- Hoehn E, Gasser F, Guggenbühl B et al. (2003) Efficacy of instrumental measurements for determination of minimum requirements of firmness, soluble solids, and acidity of several apple varieties in comparison to consumer expectations. *Postharvest Biol Technol* 27, 27-37.
- Hssaini L, Hanine H, Razouk R et al. (2020) Assessment of genetic diversity in Moroccan fig (*Ficus carica* L.) collection by combining morphological and physicochemical descriptors. *Genet Resour Crop Evol* 67, 457-474.
- Ikegami H, Nogata H, Hirashima K et al. (2009) Analysis of genetic diversity among European and Asian fig varieties (*Ficus carica* L.) using ISSR, RAPD, and SSR markers. *Genet Resour Crop Evol* 56, 201-209.
- Jiang L, Shen Z, Zheng H et al. (2013) Noninvasive evaluation of fructose, glucose, and sucrose contents in fig fruits during development using chlorophyll fluorescence and chemometrics. *J Agric Sci Technol* 15, 333-342.
- Khadari B, Lashermes P, Kjellberg F (1995) RAPD fingerprints for identification and genetic characterization of fig (*Ficus carica* L.) genotypes. *J Genet Breed* 49, 77-85.
- Kumar H (1991) Cytogenetics of safflower. In: *Developments in Plant Genetics and Breeding*. Elsevier. pp. 251-277.
- Li J, Pei G, Pang H et al. (2006) A new method for RAPD primers selection based on primer bias in nucleotide sequence data. *J Biotechnol* 126, 415-423.
- Liu BH (1998) *Statistical genomics: Linkage, mapping and QTL analysis*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Luo C, He X-h, Chen H et al. (2011) Genetic diversity of mango cultivars estimated using SCoT and ISSR markers. *Biochem Syst Ecol* 39, 676-684.
- Mohammadabadi M (2017) Inter-simple sequence repeat loci associations with predicted breeding values of body weight in Kermani sheep. *Genet Third Millenn* 14, 4383-4390.

- Mohammadabadi M, Bordbar F, Jensen J et al. (2021) Key genes regulating skeletal muscle development and growth in farm animals. *Animals* 11, e835.
- Mohammadabadi M, Esfandyarpoor E, Mousapour A (2017) Using inter simple sequence repeat multi-loci markers for studying genetic diversity in Kermani sheep. *J Res Dev* 5, e154.
- Mohammadifar A, Faqih Imani SA, Mohammad Abadi MR et al. (2014) The effect of TGF β 3 gene on phenotypic and breeding values of body weight traits in Fars native fowls. *Agric Biotechnol J* 5, 125-136 (In Persian).
- Mohammadifar A, Mohammadabadi M (2012) Application of microsatellite markers for a study of Kermani sheep genome. *Iran J Anim Sci* 42, 337-344 (In Persian).
- Mohammadifar A, Mohammadabadi M (2018) Melanocortin-3 receptor (mc3r) gene association with growth and egg production traits in Fars indigenous chicken. *Malays Appl Biol* 47, 85-90.
- Nadeem MA, Nawaz MA, Shahid MQ et al. (2018) DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnol Equip* 32, 261-285.
- Nei M (1972) Genetic distance between populations. *The American Naturalist* 106, 283-292.
- Piya S, Nepal MP, Butler JL et al. (2014) Genetic diversity and population structure of sickleweed (*Falcaria vulgaris*; Apiaceae) in the upper Midwest USA. *Biol Invasions* 16, 2115-2125.
- Powell W, Morgante M, Andre C et al. (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2, 225-238.
- Price A, Hendry G (1991) Iron-catalysed oxygen radical formation and its possible contribution to drought damage in nine native grasses and three cereals. *Plant Cell Environ* 14, 477-484.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959.
- Rout GR, Aparajita S (2009) Genetic relationships among 23 *Ficus* accessions using inter-simple sequence repeat markers. *J Crop Sci Biotechnol* 12, 91-96.
- Sadder M, Ateyyeh A (2006) Molecular assessment of polymorphism among local Jordanian genotypes of the common fig (*Ficus carica* L.). *Sci Hortic* 107, 347-351.
- Saddoud O, Chatti K, Salhi-Hannachi A et al. (2007) Genetic diversity of Tunisian figs (*Ficus carica* L.) as revealed by nuclear microsatellites. *Hereditas* 144, 149-157.
- Saddoud O, Salhi-Hannachi A, Chatti K et al. (2005) Tunisian fig (*Ficus carica* L.) genetic diversity and cultivar characterization using microsatellite markers. *Fruits* 60, 143-153.
- Shannon CE (2001) A mathematical theory of communication. *ACM SIGMOBILE Mobile Computing and Communications Review* 5, 3-55.

- Talebi R, Nosrati S, Etminan A et al. (2018) Genetic diversity and population structure analysis of landrace and improved safflower (*Cartamus tinctorious* L.) germplasm using arbitrary functional gene-based molecular markers. *Biotechnol Biotechnol Equip* 32, 1183-1194.
- Teoman S, Meryem I, Erturk U et al. (2017) Assessment of genetic relationship among male and female fig genotypes using simple sequence repeat (SSR) markers. *Not Bot Horti Agrobot Cluj Napoca* 45, 172-178.
- Tessier C, David J, This P et al. (1999) Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. *Theoretical and Applied Genetics* 98, 171– 177.
- Yeh FC (1999) POPGENE (version 1.3. 1). Microsoft Window-Bases Freeware for Population Genetic Analysis. <http://www.ualberta.ca/~fyeh/>.
- Zeynel D, Gonca G, nver-Dalklccedil et al. (2011) Genetic diversity of male fig (*Ficus carica caprificus* L.) genotypes with random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Afr J Biotechnol* 10, 519-526.