Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 53, No 2, Summer 2022 (465-477)
DOI: 10.22059/ijhs.2021.320719.1909

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۵۳، شمارهٔ ۲، تابستان ۱۴۰۱ (ص ۴۷۷-۴۶۵)

نشریه پژوهشی:

ارزیابی تنوع ژنتیکی فندق با استفاده از نشانگر ISSR و رتروترانسپوزون در منطقه املش

مریم یوسفی[۱]، محمد محسن‌زاده گلفزانی[۲*] و حبیب اله سمیع‌زاده لاهیجی[۳]
۱، ۲ و ۳. دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و استاد، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۲۶ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۹/۳)

چکیده

در این تحقیق تنوع ژنتیکی ۶۳ ژنوتیپ فندق با استفاده از ۱۰ آغازگر ISSR، دو نشانگر رتروترانسپوزون و هفت آغازگر ترکیبی ISSR و رتروترانسپوزون مورد ارزیابی قرار گرفتند که از هفت آغازگر ترکیبی فقط سه آغازگر باندهای واضح و مشخصی را نشان دادند و سایر آغازگرها باندی تشکیل نشد. پانزده آغازگر مورد استفاده در این مطالعه، توانستند در مجموع ۱۱۶ باند چند شکل ایجاد کنند. آغازگر UBC822 با تعداد ۱۴ باند بیشترین و آغازگر UBC814 با تعداد ۳ باند کمترین تعداد نوار چندشکل را ایجاد کردند. میزان اطلاعات چند شکلی آغازگرها بین ۰/۱۸ تا ۰/۴۴ و شاخص نشانگر از ۰/۵۰ تا ۱۱/۳۱ متغیر بود. تجزیه به مختصات اصلی نشان داد سه مولفه اول توانستند در مجموع ۳۷/۱۲ درصد از واریانس کل را توجیه کنند. تجزیه خوشه‌ای به روش COMPLETE، ۶۳ ژنوتیپ مورد مطالعه را در هفت گروه قرار داد، که به ترتیب در هر گونه ۸، ۱۳، ۷، ۳، ۳، ۱۳، ۱۶ ژنوتیپ قرار داده شدند. صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای توسط تابع تشخیص کانونی به روش خطی فیشر با ۸۱ درصد برآورد شد. در مجموع، آغازگرهای UBC822، UBC813 و Tos2 و ترکیب آغازگر TOS1+TOS2 می‌توانند به‌عنوان آغازگرهای مفید و مطلوب برای تفکیک ژنوتیپ‌های فندق معرفی شوند.

واژه‌های کلیدی: تجزیه تابع تشخیص، تجزیه خوشه‌ای، ضریب اطلاعات چندشکلی، *Corylus avellana* L.

Assessment of genetic diversity in *Corylus avellana* L. by ISSR marker and retrotransposon in Amlash region

Maryam Yosefi[1], Mohammad Mohsenzadeh Golfazani [2*] and Habibollah Samizadeh Lahiji[3]
1, 2, 3. M.Sc. Student, Assistant Professor and Professor, Department of Agricultural Biotechnolog, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
(Received: Mar. 16, 2021 - Accepted: Nov. 24, 2021)

ABSTRACT

In this study, the genetic diversity of 63 hazelnut genotypes was evaluated using 10 ISSR primers, two retrotransposon markers and seven combined ISSR and retrotransposon primers, which of the seven combined primers, only three showed scorable bands and other primers did not form a band. The 15 primers used in this study were able to create a total of 116 polymorphic bands. The UBC822 produced the highest number of polymorphic bands with 14 bands, the UBC814 with 3 bands had the least number of bands. The polymorphic information content and marker index of primers ranged from 0.18 to 0.44 as well as 0.50 to 11.31 respectively. Principal coordinate analysis showed that the first three components were able to explain a total of 37.12% of the total variance. COMPLET cluster analysis divided 63 studied genotypes into seven groups, which were 8, 13, 7, 3, 3, 13, 16 genotypes, respectively. The accuracy of grouping obtained from cluster analysis was confirmed by the Fisher linear focal detection function with 0.81 percent. Overall, primers UBC822, UBC813, TOS-2 and TOS-1+TOS2 can be introduced as useful and desirable for separation of genotypes and cultivars of hazelnut.

Keywords: *Corylus avellana* L., diagnostic function analysis, cluster analysis, polymorphic information content.

* Corresponding author E-mail: mohsenzadeh.mohamad@guilan.ac.ir

مقدمه

فندق گیاهی تک پایه، ناهمرس و خودناسازگار است که گرده‌افشانی آن توسط باد صورت می‌گیرد. خودناسازگاری در آن از نوع اسپورفیتیک بوده و توسط یک ژن یا چندین آلل S کنترل می‌گردد (Mehlenbache *et al*., 1997). برگ های درخت فندق پهن و نوک تیز، با دو ردیف دندانه به رنگ سبز می باشد. مهم ترین ترکیب شناخته شده دارویی فندق ماده آنتی توموری با نام تجاری Taxal است که برای درمان انواع سرطان‌ها به‌کار می‌رود، این ماده در قسمت های مختلف درخت فندق مخصوصا در برگ تجمع پیدا می‌کند (Ozdemir & Akinci, 2004). آنچه از دست نوشته‌های چینی‌ها برآمده است، قدمت فندق به بیش از (۸۰۰۰-۵۰۰۰) سال قبل از میلاد برمی‌گردد. این گیاه بومی اروپا، آسیای صغیر و قفقاز است (Di Nunzio, 2019). ولی مکان و زمان اهلی‌سازی فندق مشخص نیست اگرچه قبلا توسط رومی‌ها کشت می‌شد (Boccacci & Botta, 2009). در سراسر جهان در مناطقی با آب‌وهوای معتدل کشت می‌شود و از نظر اقتصادی رتبه چهارم در بین مغزها بعد از بادام، گردو و بادام‌هندی را دارد (Martins *et al*., 2009). فندق به صورت درخت یا درختچه‌ای پهن برگ و برگ ریز بوده که تکثیر آن به صورت غیرجنسی می باشد (Enescu *et al*., 2016). تعداد کروموزوم‌های جنس کوریلوس 2x=2n=22 می‌باشد (Silvestri *et al*., 2021). تاکنون بیش از ۴۰۰ رقم فندق معرفی شده است (Mehle *et al*., 2019). کشورهای اصلی تولیدکننده فندق در جهان، ترکیه، ایتالیا، اسپانیا، آمریکا، یونان و ایران می‌باشند (Yesiloglu & Sauk, 2020). سطح برداشت فندق در جهان بیش از ۶۶۰ هزار هکتار می‌باشد (Krol & Gantner, 2020). فندق مناطق نیمه گرمسیری را ترجیح می‌دهد و کاشت فندق در ایران محدود به مناطق گیلان، مازندران، اردبیل، گلستان و قزوین و استان‌های سواحل دریای خزر می باشد که این مناطق بارندگی و رطوبت نسبی بالایی دارند که سبب رشد و عملکرد خوب فندق می شود (Amini-Nouri & Ziarati, 2015). منطقه اشکورات (استان گیلان) به عنوان منطقه اصلی تولید فندق در ایران شناخته شده است به طوری‌که بیش از ۸۰ درصد سطح زیر کشت فندق به این منطقه تعلق می‌گیرد (Houshyarfard, 2020). فندق تنها میوه‌ای است که بیست اسیدآمینه ضروری بدن را دارا می‌باشد (Crews *et al*., 2005). تنوع ژنتیکی بیانگر تفاوت‌ها و تنوع ژن‌ها در درون یک گونه است. نشانگرهای مولکولی ابزارهایی توانمند در جهت شناسایی ارقام و بررسی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها هستند (Russell *et al*., 1997). این نشانگرها کاربردهای زیادی در زمینه انگشت‌نگاری، یافتن روابط خویشاوندی بین گونه‌ها، تجزیه و تحلیل فیلوژنیک، انتخاب دقیق والدین مناسب جهت تولید دورگ‌های قوی دارند (Ren & Timko, 2001). در بین نشانگرهای مبتنی بر PCR، نشانگرهای ISSR (نواحی بین توالی‌های تکراری ساده) توسط محققان برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. نشانگر ISSR توسط PCR و با استفاده از توالی‌های مرکزی ریزماهواره به‌عنوان آغازگر، همراه با چند نوکلئوتید انتخابی در انتهای ´۳ یا ´۵ به‌عنوان لنگرهایی داخل مناطق غیر تکراری مجاور تکثیر می‌شوند (Qiang *et al*., 2008). نشانگر ISSR یک تکنیک ساده، سریع و نیمه تصادفی و از تکرارپذیری و چندشکلی بالایی برخوردار است و در دامنه وسیعی از گیاهان کاربرد دارد که می‌توان گفت این نشانگر قدرت خوبی در آشکارسازی تنوع ژنتیکی دارد (Reddy *et al*., 2002). مطالعات نشان داده اند که ISSR فراوان‌تری نشانگرهای مولکولی هستند که به‌طور گسترده در سراسر ژنوم گیاهی توزیع شده اند و برای ارزیابی تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. Martins *et al*. (2014)، استفاده از نشانگرهای ISSR برای بررسی تنوع ژنتیکی در گیاهان مختلف استفاده شده است (Razi *et al*., 2019; Henareh *et al*., 2018; Nezamivand Chegini *et al*., 2016; Rajabi *et al*., 2022 Vahdani Kia *et al*., 2021). با استفاده از نشانگرهای ISSR و AFLP تنوع ژنتیکی ۲۶ رقم بین‌المللی و ۳۲ گونه فندق (۱۳ژنوتیپ وحشی و ۱۹گونه باغی) در پرتغال مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند، این آغازگرها توانستند ارقام، نژادهای محلی و تیپ وحشی را به خوبی تفکیک کنند. Mohammadzedeh *et al*. (2014)، در مطالعه‌ای تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های فندق با استفاده از صفات موروفولوژی و نشانگرهای

مولکولی ISSR و RAPD مورد ارزیابی قرار دادند، این آغازگرها توانستند تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها را نشان دهند. Öztürk *et al.* (2017)، به بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی ۴۰۲ ژنوتیپ فندق با استفاده از نشانگرهای تکرار توالی ساده (SSR) پرداختند. در مطالعه‌ای دیگر تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ های فندق با استفاده از صفات مورفولوژی و نشانگر مولکولی ISSR روی ژنوتیپ‌های محلی فندق در شمال اسپانیا انجام گرفت، که تنوع زیادی بین ژنوتیپ‌های محلی نسبت به ارقام شناخته شده مشاهده شد (Ferreira *et al*., 2010). رتروترانسپوزون‌ها یا ترانسپوزون‌هایی که به واسطه یک RNA حدواسط منتقل می‌گردند، شامل آن دسته از عناصر متحرک می‌باشد که ابتدا از روی توالی DNA آن‌ها RNA ساخته می‌شود سپس به‌کمک آنزیم رونوشت بردار معکوس از روی RNA، DNA قابل انتقال به مکان جدید بدست می‌آید. این عناصر قابل انتقال بخش بزرگی از ژن‌های یوکاریوتی را اشغال می‌کنند (Feschotte & Pritham, 2007). رتروترانسپوزونها عناصری پراکنده، متحرک و قابل انتقال می‌باشند و در ژنوم جدید بدون برش از عنصر اصلی درج می‌شوند (Kalendar, 2011). رتروترانسپوزون (LTR) بیشتر ژنوم ذرت را تشکیل می‌دهند. برای بررسی تنوع ژنتیکی ژرم پلاسم ذرت از رتروترانسپوزون IRAP استفاده شد. پنج رتروترانسپوزون LTR (هاک، تکای، اوپی، جی، گراند) بر اساس تعداد کپی آن‌ها در ژنوم ذرت انتخاب شدند. این نشانگرها برای شناسایی شباهت‌های ژنتیکی ذرت مورد استفاده قرار گرفتند (Ghonaim *et al*., 2020). در پژوهشی از رتروترانسپوزون‌های IRAP وREMAP برای ارزیابی تنوع ژنتیکی گندم ترکی و گندم اسرائیلی استفاده شده است. این مارکرها تنوانستند تنوع ژنتیکی این دو گونه از گندم‌ها را نشان دهند (Vuorinen *et al*., 2018). در پژوهشی از دو نشانگر رتروترانسپوزون (SCoT و IRAP) برای بررسی تنوع ژنتیکی ۵۰ گونه پسته وحشی از مناطق جغرافیایی مختلف ایران استفاده شد (Sorkheh *et al*., 2016). ارزیابی تنوع ژنتیکی نخود با استفاده از دو نشانگر iPBS-retrotransposon و ISSR انجام شد، هردو نشانگر توانستند به‌خوبی تنوع بین ژنوتیپ‌های نخود را مشخص نمایند (Andeden *et al*., 2013).

تاکنون تنوع ژنتیکی فندق با استفاده از نشانگرهای مولکولی و نشانگرهای مورفولوژی در منطقه سمام املش صورت نگرفته است و از آنجایی‌که نشانگرهای ISSR و رتروترانسپوزون مناسب برای تنوع ژنتیکی هستند و قسمت اعظم ژنوم را پوشش می‌دهند و می‌توانند همزمان نواحی ژنی و غیر ژنی را بررسی کنند، لذا در این تحقیق به منظور تعیین تنوع ژنتیکی فندق از آغازگر مولکولی ISSR و آغازگر رتروترانسپوزون و همچنین ترکیب دو آغازگر فوق استفاده شد تا با گروهبندی ژنوتیپ‌ها، افراد یکنواخت در داخل یک گروه و افراد متفاوت از هم در گروه‌های مختلف دسته‌بندی شوند تا اطلاعاتی از روابط ژنتیکی آن‌ها داشته باشیم تا از نقطه نظر این نشانگرها نیز وضعیت تنوع ژنتیکی این ژنوتیپ‌ها بررسی شود. از طرفی آغازگرهای که کارآیی بالایی در تمایز ژنوتیپ‌های فندق مورد مطالعه در این تحقیق را داشتند جهت استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های فندق معرفی می‌گردد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری برای اجرای این پژوهش در ییلاقات املش صورت گرفت. ابتدا چهار منطقه به نام روستاهای مربو، ملکوت، امام و سیاه خولک انتخاب شدند و در هر منطقه چهار باغ و در هر باغ چهار عدد درخت به‌طور تصادفی انتخاب شدند که ارقام این درختان مشخص نبود (جدول ۱).

جدول ۱. مشخصات مناطق نمونه برداری شده برای بررسی تنوع ژنتیکی فندق.

Table 1. Specifications of sampled areas to study the genetic diversity of hazelnut.

Row	Area Name	Number of genotypes sampled	Longitude	latitude	Height
1	Morabu	16	50° 1′ 59.240″	36° 52′ 38.354″	1507
2	Malakot	15	50° 4′ 11.488″	36° 51′ 45.949″	1399
3	Omum	16	50° 4′ 13.960″	36° 53′ 29.760″	1734
4	Syakholak	16	50° 5′ 47.241″	36° 52′ 10.129″	1463

نمونه‌برداری در بهار سال ۱۳۹۹ از درختان دارای برگ‌های سالم انجام شد و بلافاصله به وسیله فویل در مخزن ازت مایع قرار گرفتند و تا زمان استخراج DNA به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد در دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان منتقل شدند.

استخراج DNA از بافت برگی به روش Murray & Thompson (1980) با اندکی تغییر انجام گرفت. به‌طور خلاصه ۲۰۰ میلی‌گرم بافت برگی که با استفاده از نیتروژن مایع در هاون به خوبی پودر شده بود در داخل میکروتیوپ‌های ۱/۵ میلی‌گرم ریخته شدند، در این استخراج از بافر 2% CTAB و بافر CTAB ۱٪ و بافر High soult TE استفاده شد. بعد از استخراج کمیت و کیفیت DNA ژنومی از طریق اسپکتوفتومتری (نانودراپ) در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و نیز الکتروفورز ژل آگارز یک درصد تعیین گردید.

در این پژوهش از ۱۰ آغازگر ISSR و ۲ آغازگر رتروترانسپوزون ساخت شرکت Generay و ۷ آغازگر ترکیبی استفاده شد که از این میان آغازگرهای ترکیبی (UBC815+UBC826، TOS-2+TOS-1، TOS-1+UBC812) باندهای واضحی را نشان دادند اما ترکیب آغازگرهای UBC817+UBC814، UBC813+UBC816، UBC811+ UBC821، UBC826 +UBC813 باندی را نشان ندادند (جدول۲). به‌منظور انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) مخلوط ۱۲ میکرولیتری شامل ۶ میکرولیتر کیت آماده سیناکلون، ۰/۳ میکرومول آغازگر، DNA با غلظت ۳۰ تا ۴۰ نانوگرم و ۴ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر استفاده شد. سپس نمونه‌ها به خوبی مخلوط شدند، چرخه حرارتی PCR توسط دستگاه ترموسایکلر مدل Biorad انجام شد. واسرشته سازی اولیه DNA ژنومی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، در ادامه ۳۵ سیکل که هر سیکل شامل ۳۰ ثانیه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای واسرشته سازی، ۳۰ ثانیه برای مرحله اتصال آغازگر بسته به دمای اتصال (TM) آغازگر (جدول ۲)، ۳۰ ثانیه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای گسترش DNA جدید (مرحله بسط) و ۷ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای گسترش نهایی و در نهایت نگه‌داری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بود. پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای مشاهده الگوی باندی ژنوتیپ‌ها از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد. برای رنگ‌آمیزی از ماده Safe stain و برای عکسبرداری از دستگاه ژل داک با نور uv استفاده شد. الگوی نواری بر اساس وجود (یک) و یا عدم وجود (صفر) نمره‌دهی شدند (شکل ۱). داده‌های حاصل به صورت یک ماتریس ۱۱۶×۶۳ وارد نرم‌افزار Excel شد که در آن ۶۳ تعداد ژنوتیپ فندق و ۱۱۶ تعداد نوار چندشکل مشاهده شده بود. در این تحقیق جهت محاسبه درصد چندشکلی، تعداد باندهای چند شکل بر تعداد کل باندها تقسیم شد. برای ارزیابی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای مولکولی، از میزان اطلاعات چند شکلی (Polymorphism Information Content) که بر اساس رابطه یک استفاده شد (Mohsenzadeh Golfazani *et al*., 2012, 2016):

$$PIC = ۱ - \sum pi^۲ \qquad (۱)$$

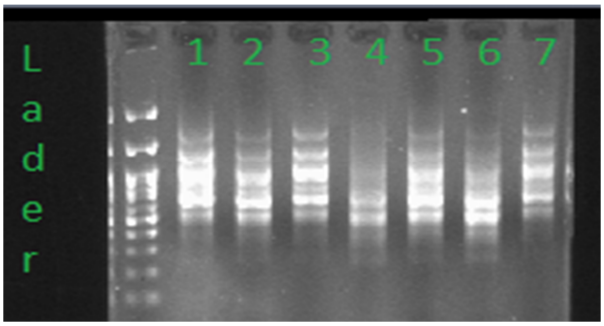
در این رابطه p برابر با فراوانی آلل i ام هر جایگاه ژنی برای ژنوتیپ‌ها است. شاخص نشانگری (Index Marker MI=) که بیانگر میزان چند شکلی بوده و می‌تواند به عنوان شاخصی جهت برآورد کارایی یک نشانگر در یک ژرم پلاسم ناشناخته استفاده گردد، با استفاده از رابطه MI=PIC×EMR بدست آمد. نسبت چندگانه موثر (EMR= Ratio Multiplex Effective) که بیانگر تعداد جایگاه‌های ژنی چند شکل موجود در یک ژرم‌پلاسم می‌باشد، بر اساس رابطه ($EMR=n_p\times\beta$) محاسبه شد که در این رابطه، (n_p) تعداد کل نوارهای چند شکل و (β) نسبت تعداد نوار چندشکل به تعداد کل نوار می‌باشد (Powell *et al*., 1996) تعیین تنوع ژنتیکی شاخص شانون، نی و تعداد آلل از نرم POPGEN نسخه ۱/۳۲ استفاده شد. همچنین جهت ارزیابی آغازگرها، فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌ها، رسم نمودار خوشه‌ای و میزان تنوع بین ژنوتیپ‌ها از نرم‌افزار NTSYSpc 2.02 استفاده شد. به منظور مشخص کردن بهترین روش محاسبه خوشه‌بندی نمونه‌ها و ضریب شباهت، ضریب کوفنتیک برای هرروش محاسبه شد. ماتریس تشابه براساس ضریب تطابق ساده و تجزیه خوشه‌ای بر مبنای COMPLETE انجام و دندروگرام رسم شد. جهت تجزیه به مختصات اصلی از نرم‌افزار GenStat نسخه ۱۲ و جهت تجزیه تابع تشخیص از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ استفاده شد.

نتایج و بحث

در این پژوهش با استفاده از ۱۵ ترکیب آغازگری در مجموع امتیازدهی ۱۳۶ نوار را نتیجه داد که از بین آن‌ها ۱۱۶ نوار چند شکل بودند. نمونه الگوی باندی DNA های تکثیر شده از ژنوتیپ‌های فندق در شکل ۱ نشان داده شده است. از بین آغازگرهای مورد استفاده، آغازگر UBC822 با تعداد ۱۵ نوار بیشترین تعداد نوار و آغازگرUBC814 با تعداد ۵ نوار کمترین تعداد را داشتند (جدول ۲). همچنین تعداد ۱۴ نوار چندشکلی برای آغازگر UBC822 بیشترین تعداد نوار چندشکلی و تعداد ۳ نوار برای آغازگر UBC814 کمترین تعداد مشاهده شد و میانگین مکان‌های چند شکل به‌ازای هر آغازگر معادل ۷/۷۳ به‌دست آمده است. درصد چندشکلی بدست آمده در ژنوتیپ‌ها از ۶۰ درصد برای UBC814 تا ۱۰۰ درصد برای TOS-1، UBC816، UBC821، TOS-1+TOS-2 و UBC815+ UBC826 متغیر بود. میانگین درصد چندشکلی به‌دست آمده در این تحقیق (۸۴/۱۳)، تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌ها را توجیه می‌کند (جدول ۲).

میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) یکی از معیارهای مهم برای مقایسه نشانگرهای مختلف مولکولی از لحاظ قدرت تمایز آن‌ها است. مقدار بالای این شاخص، دلالت بر چند شکلی زیاد در یک جایگاه نشانگری دارد که در جداسازی و تفکیک ژنوتیپ‌ها نقش زیادی دارد. از این‌رو، نشانگرهای با PIC بالا برای تمایز ژنوتیپ‌هایی با خویشاوندی نزدیک مفید هستند (Santhosh *et al*., 2009). بالاترین میزان PIC در آغازگر TOS-2، TOS-1+TOS-2، UBC813 به ترتیب به میزان ۰/۴۴ و ۰/۴۳ و ۰/۴۳ تعیین شد که کارایی بالای این آغازگرها در تمایز ژنوتیپ‌های مورد استفاده در این تحقیق و همچنین سودمندی این آغازگرها را برای بررسی تنوع ژنتیکی فندق نشان می‌دهد و به دلیل میزان بالای PIC برای ارزیابی تنوع ژنتیکی فندق مفید خواهند بود. از طرف دیگر ترکیب آغازگر TOS-1+UBC812 به میزان ۰/۱۸ با کمترین میزان شاخص PIC توانایی قابل قبولی در جداسازی ژنوتیپ‌ها نداشت. PIC در این تحقیق بین ۰/۱۸ تا ۰/۴۴ و میانگین محتوی اطلاعات چند شکل ۰/۳۲ بود. برای تعیین کارایی نشانگرها در بروز چندشکلی، شاخص نشانگری (MI) و نسبت چندگانه موثر (EMR) محاسبه شد. بیشترین میزان EMR برای آغازگر UBC822 ۱۳/۰۷ و کمترین میزان برای آغازگر UBC817 ۳/۱۲ بود (جدول ۳).

میزان MI بین ۰/۵ تا ۱۱/۳۱ متغیر بود. آغازگر UBC826+UBC815 دارای بیشترین MI بود که کارایی بالا این آغازگر را در بروز چندشکلی نشان می‌دهد. در پژوهشی که تنوع ژنتیکی نخود با استفاده از دو آغازگر رتروترانسپوزون iPBS-retrotranspozon و ISSR انجام شد در کل ۱۳۶ باند از ۱۰ آغازگر ISSR که ۱۳۵ مورد از آن چندشکل بودند در حالی که رتروترانسپوزون دیگر دارای ۱۳۰ باند چندشکل بود و متوسط میزان اطلاعات چندشکلی برای هردو نشانگر ۰/۹۱ بود (Andeden *et al*., 2013).



شکل ۱. الگوی باندی حاصل از تکثیر نتایج DNA فندق با استفاده آغازگر UBC811، شماره یک تا ۷ به ترتیب ژنوتیپ‌های فندق مورد استفاده بود، خط کش مولکولی (Gene Ruler TM 100bp DNA Ladder, fermentas) باندهای ۱۰۰ تا ۱۵۰۰ bp نشان داد.

Figure 1. Band pattern obtained from amplification of hazelnut DNA results using UBC811 primer, 1 to 7 respectively hazelnut genotypes studied, Lader (Gene RulerTM 100bp DNA Ladder, fermentas) (100- 1500 bp)

جدول ۲. آغازگرهای مورد استفاده، توالی، دمای اتصال (TM)، درصد چند شکلی، تعداد باند، تعداد باند چند شکلی برای بررسی تنوع ژنتیکی فندق

Table 2. Primers used, sequence, connection temperature (TM), polymorphic percentage, number of bands, number of polymorphic bands the genetic diversity of hazelnut.

Row	Initiator name	Connection temperature	Total number of bands	Number of polymorphic bands	Polymorphic percentage	Starting sequence 3′→5′
1	TOS-1	50.74	8	8	100	TCTTGGGAATAGTCCCACA
2	TOS-2	44.72	9	8	88	TGTTGAATAGTTCCACATT
3	UBC811	43.21	10	7	70	GAGAGAGAGAGAGAGAC
4	UBC812	42.07	10	8	80	GAGAGAGAGAGAGAGAA
5	UBC813	42.02	7	5	71	CTCTCTCTCTCTCTCTT
6	UBC814	40.97	5	3	60	CTCTCTCTCTCTCTCTA
7	UBC815	43.17	10	9	90	CTCTCTCTCTCTCTCTG
8	UBC816	47.22	8	7	100	CACACACACACACACAT
9	UBC817	47.52	8	5	62	CACACACACACACACAA
10	UBC821	44.86	7	7	100	TCTCTCTCTCTCTCTCG
11	UBC822	44.15	15	14	93	TCTCTCTCTCTCTCTCC
12	UBC826	49.56	11	7	63	ACACACACACACACACC
13	TOS-1+TOS-2	44.72	10	10	100	TCTTGGAATAGTCCCACA TGTTGAATAGTTCCACATT
14	TOS-1+UBC812	42.07	7	6	85	TCTTGGAATAGTCCCACA GAGAGAGAGAGAGAGAA
15	UBC826+UBC815	43.17	11	11	100	ACACACACACACACACC CTCTCTCTCTCTCTCTG
Total	-	-	136	116	1262	-
Average	-	44.67	9	7.73	84.13	-

در مطالعه‌ای تنوع ژنتیکی پسته وحشی توسط دو نشانگر رتروترانسپوزون (ScoT و IRAP) مورد بررسی قرار گرفت، میانگین PIC برای نشانگر IRAP و SCoT به‌ترتیب برابر با ۰/۳۲ و ۰/۴۸ بود و نشان داد که نشانگر SCoT برای ارزیابی تنوع ژنتیکی پسته وحشی مناسب‌تر از نشانگر IRAP می‌باشد (Sorkheh *et al*., 2016). یکی از مهمترین شاخص‌ها، برای ارزیابی تنوع ژنی در بین ژنوتیپ‌ها و جمعیت‌ها، شاخص تنوع ژنی نی می‌باشد (Nei 1972). برآورد شاخص نی نشان داد که میزان تنوع ژنی بین ۰/۱۸ تا ۰/۴۲ متغیر بود و آغازگر UBC813 بیشترین تنوع ژنی و آغازگرهای UBC812، UBC826 و UBC821 کمترین تنوع ژنی را نشان دادند. میانگین تنوع ژنی در جمعیت مورد مطالعه ۰/۲۶ بود. ضریب شانون میزان پلی‌مورفیسم در بین ژنوتیپ‌ها را بیان می‌کند (Shannon, 1948). در این تحقیق میانگین ضریب شانون ۰/۳۸ می‌باشد که نشان‌دهنده تنوع خوب در ژنوتیپ‌های مورد بررسی است. آغازگرهای UBC813، UBC814 و TOS-1+TOS-2 دارای بیشترین شاخص شانون بودند، این نشان‌دهنده این است که آغازگرهای فوق می‌توانند تنوع ژنتیکی درون جمعیتی را بهتر توجیه کنند و آغازگر UBC812 و UBC821 دارای کمترین شاخص شانون می‌باشد (جدول ۳). در همین راستا مطالعه‌ای براساس ۱۳ مکان نشانگری روی ۴۰ ژنوتیپ وحشی فندق در شمال اسپانیا انجام شد ۹۱ آلل مختلف شناسایی شد و میانگین میزان چندشکلی ۰/۶۹ برآورد شد (Campa *et al*., 2011). در مطالعه‌ای تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم فندق از شمال اسپانیا با استفاده از صفات مورفولوژیکی و نشانگرهای ISSR صورت گرفت، که در این مطالعه ۶۶ باند چند شکل تولید شد میانگین شاخص شانون در این تحقیق برابر با ۰/۸۰ برآورد شد (Ferreira *et al.,* 2010). در پژوهشی به بررسی تنوع ژنتیکی ارقام وحشی و طبیعی فندق توسط نشانگرهای مولکولی ISSR و AFLP صورت گرفت که این تحقیق مقدار محتوی اطلاعات چندشکلی و نسبت چندگانه موثر و شاخص نشانگری برای آغازگر ISSR به ترتیب برابر با ۰/۳۵ و ۲۱/۸۶ و ۷/۴۹ و برای آغازگر AFLP به‌ترتیب برابر با ۰/۳۶ و ۲۱/۴۸ و ۷/۸۴ بود (Martins *et al*., 2014).

نتایج تجزیه به مختصات اصلی شامل مقادیر ویژه، واریانس نسبی و واریانس تجمعی مولفه‌ها در جدول ۴ نشان داده شده است. تجزیه به مختصات اصلی (PCOA) بر اساس ماتریس تشابه تطابق ساده (SM) انجام شد.

جدول ۳. نسبت چندگانه موثر (EMR)، شاخص نشانگری (MI)، محتوی اطلاعات (PIC)، تعداد آلل موثر، تنوع ژنی نی و شاخص شانون در جایگاه ISSR و رتروترانسپوزون در ژنوتیپ‌های فندق مورد مطالعه.

Table 3. Multiple effective ratio (EMR), marker index (MI), information content (PIC), number of effective alleles, reed gene diversity and Shannon index at ISSR and retrotransposon position.

Row	Primer name	EMR	PIC	MI	Nei gene diversity	Number of effective alleles	Shannon Index
1	TOS-1	8	0.29	2.32	0.29	1.53	0.42
2	TOS-2	7.1	0.43	3.05	0.26	1.39	0.39
3	UBC811	4.9	0.29	1.42	0.21	1.34	0.31
4	UBC812	6.4	0.31	1.98	0.18	1.31	0.27
5	UBC813	3.57	0.43	1.53	0.42	1.53	0.61
6	UBC814	1.8	0.28	0.5	0.31	1.56	0.45
7	UBC815	8.1	0.39	3.15	0.22	1.37	0.32
8	UBC816	8	0.29	2.32	0.24	1.42	0.36
9	UBC817	3.125	0.25	0.78	0.25	1.43	0.37
10	UBC821	7	0.24	1.68	0.19	1.3	0.28
11	UBC822	13.07	0.38	4.96	0.31	1.55	0.46
12	UBC826	4.45	0.32	1.42	0.18	1.31	0.29
13	TOS-1+ TOS-2	10	0.44	4.4	0.31	1.53	0.46
14	TOS-1+UBC812	5.14	0.18	0.92	0.26	1.41	0.34
15	UBC826 + UBC815	11	0.31	11.31	0.28	1.51	0.41
Average	-	6.78	0.32	2.78	0.26	1.43	0.38

میزان واریانس نسبی هر مولفه نشان‌دهنده اهمیت آن مولفه در واریانس کل است و به صورت درصد بیان می‌شود. در این تجزیه، ۱۵ مولفه اول توانستند مجموعا ۷۷/۸۸ درصد از واریانس کل را توجیه کنند (جدول۴). سه مولفه اول توانستند مجموعا ۳۷/۱۲ درصد از واریانس کل را توجیه کنند. مطابق انتظار مولفه اول بیشترین سهم را در توجیه تغییرات دارا می‌باشد. از این میان مولفه اول ۱۸/۷۷ درصد و مولفه دوم ۱۰/۶۵ و مولفه سوم ۷/۷۰ درصد بود. بنابراین تعداد صفات یا باندها به تعداد زیادی مولفه کاهش یافته و انتخاب آغازگرها به خوبی انجام گرفته است و این موضوع نشان می‌دهد که نشانگرهای ISSR و دو آغازگر رتروترانسپوزون مورد استفاده در قسمت‌های مختلف ژنوم پراکنده هستند و این بهترین حالت در بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از داده‌های مولکولی است، به دلیل اینکه نشانگرهای مولکولی از کروموزوم‌های مختلف انتخاب شده و توزیع مناسب و یکنواخت در ژنوم دارد.

فاصله ژنتیکی بین دو موجود به معنی تفاوت قابل توجیه بین آن دو موجود با استفاده از تنوع آللی است. به عبارت دیگر فاصله ژنتیکی بیانگر میزان تفاوت‌های ژنی بین جمعیت‌ها یا گونه‌ها است که با استفاده از برخی کمیت‌های عددی قابل اندازه‌گیری می‌باشد. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس نمره‌دهی صفر و یک انجام شد. تجزیه خوشه‌ای به روش COMPLETE و اندازه‌گیری سه ضریب تشابه تطابق ساده، جاکارد و دایس، نشان داد که گروه‌بندی براساس ضریب تشابه تطابق ساده با ضریب کوفنتیک ۰/۸۷ بهترین روش گروه‌بندی از بین روش‌های مورد بررسی بود.

جدول۴. مقادیر ویژه، واریانس نسبی و درصد تجمعی برای ۱۵ مولفه اول در ژنوتیپ‌های گیاه فندق مورد مطالعه.

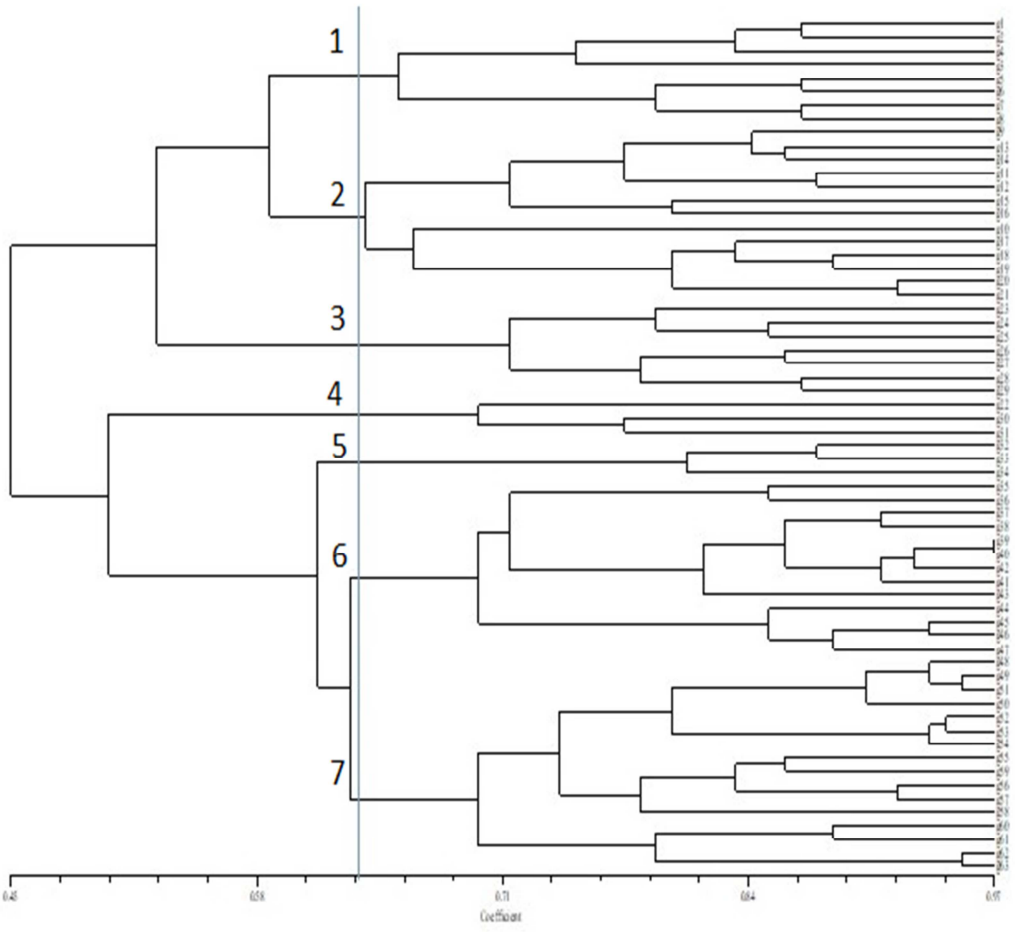
Table 4. Eigenvalues, relative variance and cumulative percentage for 15 component in hazelnut genotypes studied.

Component	Percentage of variance	Eigenvalues	Cumulative percentage
1	4.05	18.77	18.77
2	2.3	10.65	29.42
3	1.66	7.7	37.12
4	1.39	6.43	43.55
5	1.11	5.16	48.71
6	0.98	4.54	53.25
7	0.92	4.26	57.51
8	0.89	4.13	61.64
9	0.67	3.14	64.78
10	0.55	2.55	67.33
11	0.54	2.53	69.86
12	0.52	2.43	72.29
13	0.42	1.98	74.27
14	0.42	1.95	76.22
15	0.35	1.66	77.88

گروه‌بندی بر اساس ضریب تشابه با ترسیم خط برش در فاصله (۰/۶۴)، ۶۳ ژنوتیپ مورد مطالعه را در ۷ کلاستر قرار داد (شکل ۲). گروه‌های یک تا هفت به ترتیب شامل ۸، ۱۳، ۷، ۳، ۱۳ و ۱۶ ژنوتیپ بودند. آغازگرهای مورد استفاده توانستند تمامی ژنونیپ‌ها را به‌خوبی از هم جدا و شناسایی

کنند. ژنوتیپ‌ها از بخش‌های مختلف ییلاقات املش شامل روستاهای مربو، ملکوت، امام و سیاه خولک جمع‌آوری شدند. طبق دندروگرام دو ژنوتیپ 1G و 63G بیشترین تفاوت را از همدیگر دارند. در این گروه‌بندی گروه اول به دو زیرگروه تقسیم شده است که زیرگروه اول شامل ژنوتیپ‌های 1G، 2G، 4G و 3G از باغات منطقه اول(مربو) هستند. دو ژنوتیپ 1G و 2G در این زیرگروه که در کنار یکدیگر قرار گرفته‌اند شباهت بسیار زیادی دارند از لحاظ عددی هم شباهت کاملا مشخص می باشد به این صورت که این دو ژنوتیپ مقدار عددی آن ها ۸۷/۲۵ می باشد. اما ژنوتیپ 4G و 3G شباهت کمتری نسبت به آن دو ژنوتیپ دارند، و مقدار عددی آن‌ها نیز به ترتیب ۰/۷۶ و ۰/۸۴ می‌باشد که نشان‌دهنده تفاوت این دو ژنوتیپ است. اما ژنوتیپ 4G و 3G شباهت کمتری نسبت به آن دو ژنوتیپ دارند، زیر گروه دوم شامل ژنوتیپ های 5G، 6G، 7G و 8G که برای یک باغ می باشند، دو ژنوتیپ 5G و 6G و همینطور دو ژنوتیپ 7G و 8G در این زیرگروه شباهت بسیار زیادی دارند، این نشان‌دهنده این است که در این باغ ژنوتیپ‌ها بسیار به همدیگر نزدیک هستند و تنوع ژنتیکی کمی وجود دارد، و دلیل این امر این است که گروه اول از ژنوتیپ 1G تا ژنوتیپ 8G برای دو باغ نزدیک به هم می‌باشد.

گروه دوم شامل دو زیرگروه می‌باشد که زیرگروه اول شامل ژنوتیپ‌های 9G، 13G، 14G، 11G، 12G، 15G و 16G می‌باشد، این ژنوتیپ‌ها نیز برای منطقه اول (مربو) می‌باشند و زیرگروه دوم شامل ژنوتیپ‌های 10G، 17G، 18G، 19G، 20G و 21G که به غیر از ژنوتیپ 10G بقیه ژنوتیپ‌ها برای باغ اول در منطقه ملکوت است.



شکل ۲. دندروگرام ترسیم شده بر اساس روش COMPLETE و ماتریس تشابه تطابق ساده برای ۶۳ ژنوتیپ فندق مورد مطالعه
Figure 2. Dendrogram drawn based on COMPLETE method and simple similarity matrix for 63 hazelnut genotypes studied.

باتوجه به اینکه در این گروه نمونه‌گیری در مربو از قدیمی‌ترین باغ (اولین باغی که کاشت فندق در آن صورت گرفت) انجام شد به همین دلیل این ژنوتیپ‌ها به ژنوتیپ‌های دیگر در مربو (گروه اول) شباهتی ندارند و در گروه جداگانه‌ای قرار گرفته‌اند، اما به ژنوتیپ‌های منطقه ملکوت شباهت دارند و دلیل آن ممکن است به این خاطر باشد که وقتی نمونه‌گیری در باغ اول در ملکوت صورت گرفت درختان فندق ظاهری تنومند داشتند یعنی این درختان از خیلی سالیان پیش از پاجوش‌های قدیمی‌ترین باغ مربو استفاده کرده‌اند، ژنوتیپ 10G شباهت بسیار زیادی به ژنوتیپ‌های باغ اول در ملکوت دارد و مقدار عددی آن ۰/۶۷ می باشد و همچنین ژنوتیپ 17G (فاصله ۰/۸۱) که از منطقه ملکوت انتخاب شده بود شباهت کمتری نسبت به ژنوتیپ‌های 18G و 19G (فاصله ۰/۸۷) داشت، به این معنی است که در منطقه ملکوت تنوع بین باغ‌ها وجود دارد. دلیل این امر، باتوجه به اینکه درختان ظاهری جوان داشتند و تازه کاشته شده بودند (پاجوش درختان این باغات یکسان نبودند و تنوعی از درختان هستند)، کشاورزان این منطقه نهال فندق را از ارقام مطلوب انتخاب کرده و با این کار به فندق‌هایی با ارقام مطلوب دست می‌یابند. گروه سوم شامل دو زیرگروه می‌باشد زیرگروه اول شامل ژنوتیپ‌های ۲۳G، ۲۴G و ۲۵G و زیرگروه دوم شامل ژنوتیپ‌های ۲۶G، ۲۷G، ۲۸G و ۲۹G که ژنوتیپ ۲۳G شباهت کمتری با بقیه ژنوتیپ‌ها در منطقه دوم داشت، ژنوتیپ ۲۲G، ۳۰G و ۳۱G که متعلق به منطقه دوم (ملکوت) بودند اما در گروه چهارم قرار گرفتند که در این گروه دو ژنوتیپ ۳۰G و ۳۱G شباهت زیادی داشتند و ژنوتیپ ۲۲G شباهت کمتری نسبت به این دو ژنوتیپ داشت، در هنگام نمونه‌برداری از منطقه دوم سعی شد از درختان با ظاهر جوان و سالم استفاده شود و بعضی از درختان (به مدت یک سال کاشت شده بودند) هم در نمونه‌گیری انتخاب شدند. در نتیجه در منطقه ملکوت تفاوت بالای در گروه‌بندی حاصل از دندروگرام دیده شد. ژنوتیپ ۳۲G که متعلق به منطقه ملکوت بود اما در گروه پنجم در کنار دو ژنوتیپ ۳۳G و ۳۴G که از منطقه امام بودند قرار گرفت در این گروه نیز دو ژنوتیپ ۳۳G و ۳۴G بسیار به همدیگر نزدیک بودند و ژنوتیپ ۳۲G که برای منطقه دیگ بود به این دو ژنوتیپ شباهت زیادی داشت. گروه ششم که شامل ژنوتیپ‌ها ۳۵G، ۳۶G، ۳۷G، ۳۸G، ۳۹G، ۴۰G، ۴۲G، ۴۱G، ۴۳G، ۴۴G، ۴۵G، ۴۶G و ۴۷G بودند که دارای دو زیرگروه می‌باشد زیرگروه اول نیز خود به دو شاخه دیگر تقسیم شده است، شاخه اول شامل ژنوتیپ‌های ۳۵G و ۳۶G که بسیار به همدیگر نزدیک بوده و شاخه دیگر شامل ژنوتیپ‌های ۳۷G، ۳۸G، ۳۹G، ۴۰G، ۴۲G، ۴۱G و ۴۳G هستند که از این میان ژنوتیپ‌های ۳۹G و ۴۰G شباهت بسیار زیادی داشتند، زیرگروه دوم شامل ژنوتیپ‌های ۴۴G، ۴۵G، ۴۶G و ۴۷G و از یک باغ می‌باشند و مطابق انتظار شبیه همدیگر هستند، ژنوتیپ ۴۸G که متعلق به منطقه امام بود در گروه هفتم در کنار ژنوتیپ‌های سیاه‌خولک قرار گرفت و معنی و مفهوم آن این است که این ژنوتیپ بسیار متفاوت از ژنوتیپ‌های منطقه امام بوده و به دلایل مختلف از جمله نزدیکی این دومنطقه نسبت به مناطق دیگر ممکن است دلیل این امر باشد گروه هفتم که بزرگ‌ترین گروه در بین گروه‌ها می‌باشد، ژنوتیپ‌های این گروه متعلق به منطقه چهارم (سیاه‌خولک) می‌باشد با توجه به ویژیگی‌های ظاهری گیاه که درختانی تنومند بودند و زمان کاشت آن‌ها به ۲۰ تا ۳۰ سال قبل برمیگردد و کشاورزان این منطقه نهال‌های فندق را از یک جا تهیه کرده واین باعث نزدیکی ارقام فندق شده است، این گروه شامل دو زیرگروه می‌باشد که زیرگروه دوم دارای ژنوتیپ کمتری نسبت به زیرگروه اول است ، در این گروه ژنوتیپ ۴۹G و ۶۳G بیشترین تفاوت را دارند و همچنین ژنوتیپ‌های ۴۹G، ۵۱G و ۵۲G، ۵۳G و ۵۵G، ۵۹G و ۵۶G، ۵۷G و ۶۰G، ۶۱G و ۶۲G و ۶۳G بیشترین شباهت را دارند. با توجه توضیحات، برخی از ژنوتیپ‌ها از لحاظ جغرافیایی در مناطق مختلف بودند اما توانستند در یک گروه قرار بگیرند. در واقع تطابق واضحی بین تنوع ژنتیکی و تنوع جغرافیایی مشاهده نشد. طبق دندروگرام افراد مشابه در یک گروه، و افراد متفاوت در گروه‌های مختلف قرار گرفتند. صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه

خوشه‌ای توسط تابع تشخیص کانونی به روش خطی فیشر ۰/۸۱ برآورد شد. به این ترتیب می‌توان نتیجه گرفت که تابع تشخیص تقسیم ژنوتیپ‌ها در هفت گروه به وسیله تجزیه‌ای خوشه‌ای را تایید می‌نماید. Erdogan *et al*. (2010)، با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD تنوع ژنتیکی ۱۸ رقم فندق ترکی را مورد ارزیابی قرار دادند، که در آن تجزیه خوشه‌ای براساس داده‌های مولکولی به روش UPGMA با ضریب دایس صورت گرفت، دندروگرام ترسیم شده ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را در دو گروه اصلی قرار داد و این افراد توانستند تنوع بین ارقام فندق ترکی را مشاهده نمایند. Mohammadzedeh *et al*. (2014)، در مطالعه‌ای تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های فندق با استفاده از صفات موروفولوژی و نشانگرهای مولکولی ISSR و RAPD، مورد ارزیابی قرار دادند، ژنوتیپ‌ها از نظر فنوتیپی متنوع بودند این آغازگرها توانستند تنوع ژنتیکی بین ژنونیپ‌ها را نشان دهند. دندروگرام تولید شده بر اساس هر دو داده مولکولی دو خوشه اصلی با تنوع بالا بین ژنوتیپ‌ها را نشان داد، نتایج نشان داد که ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از یکدیگر فاصله داشته و برخی از آن‌ها ممکن بود به عنوان ارقام جدید یا به‌عنوان والدین مستقیما در برنامه‌های تولیدمثل مفید باشند. Ozturk *et al*. (2017)، به بررسی تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی ژنوتیپ‌های فندق با استفاده از نشانگرهای تکرار SSR پرداختند. از ۳۰ نشانگر SSR استفاده شد. تجزیه تحلیل ژنوتیپ‌های فندق نشان داد که آن‌ها در سه زیرمجموعه قرار می‌گیرند، بنابراین تجزیه و تحلیل دندروگرام، مختصات اصلی و ساختار جمعیت نشان داد که آن‌ها از ژن مشترک برخوردار بودند. در پژوهشی که با استفاده از آغازگر SSR برای بررسی ارقام فندق در مناطق جغرافیایی مختلف جهان انجام شد طبق تجزیه و تحلیل، دندروگرام چندین گروه را بر اساس خاستگاه جغرافیایی ارقام نشان داد و نتایج مشخص کرد که فندق های پرورشی از چندین گروه ژنتیکی تشکیل شده‌اند (Gurcan *et al*., 2017). در مطالعه‌ای که در شمال پرتغال انجام شد ۱۴ ژنوتیپ قدیمی فندق و یک عدد فندق ترکی توسط سه آزمایشگر (باتلر، میرویلا، لانگ از اسپانیا) انتخاب شد و با استفاده از آغازگرهای ISSR و RAPD تنوع ژنتیکی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. دندروگرام ایجاد شده توسط این دو آغازگر ژنوتیپ‌ها را در دو خوشه اصلی گروه‌بندی کرد، اولین خوشه که شامل همه ژنوتیپ‌های فندق پرتغالی بود به چهار زیرگروه تقسیم شد و خوشه دوم فقط شامل فندق ترکی بود. در این تحقیق مشاهده شد که رابطه خوبی بین توزیع ژنوتیپ‌های فندق پرتغالی و منشاء جغرافیایی آن‌ها وجود دارد (Martins *et al*., 2009). Felbinger *et al*. (2020)، برای تایید اصالت ارقام فندق از ۱۶ آغازگر RAPD برای بررسی تنوع ارقام مختلف فندق استفاده کردند. از شاخص شباهت جاکارد برای ایجاد دندروگرام استفاده شد، آن‌ها بیان داشتند که این روش برای شناسایی ارقام ناشناخته فندق مناسب است.

نتیجه‌گیری کلی

درختان مورد استفاده در پژوهش حاضر از ارقام بومی بود و اطلاعاتی از چگونگی پراکنش آنها موجود نبود. از انجائیکه استفاده از نشانگرهای مورفولوژی برای شناسایی ارقام فندق کاری بسیار دشوار است، بنابراین از نشانگرهای مولکولی در مطالعه حاضر استفاده شد. نتیجه این پژوهش نشان داد که تنوع ژنتیکی بالایی در بین ژنوتیپ‌های فندق در چهار منطقه ییلاقات سمام املش وجود دارد. عوامل مختلفی می‌تواند باعث به‌وجود آمدن این تنوع ژنتیکی شود که مهم‌ترین آن‌ها این است که در این مناطق کاشت فندق به بیش از ۲۰ تا ۳۰ سال قبل برمی‌گردد به این صورت که قبلا هیچ درخت فندقی در این مناطق وجود نداشت و برای تهیه نهال فندق از باغات مختلف مناطق دیگر استفاده شد. همچنین کاشت فندق در مناطق مورد مطالعه اغلب از طریق پاجوش و از مناطق دیگر صورت گرفت و کشاورزان این مناطق برای افزایش نهال‌های فندق از پاجوش‌های باغات و مناطق دیگر استفاده می‌کنند و در این مطالعه هم نمونه برداری طوری انجام شد که درختان از لحاظ مورفولوژیکی تفاوت داشتند که این تفاوت از طریق نتایج تجزیه خوشه‌ای و گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای تائید شد. البته

امروزه با توجه به ارزش اقتصادی فندق باغداران سعی بر افزایش ارقام مطلوب دارند. باتوجه به اینکه نشانگرهای به‌کارگرفته شده در این پژوهش چند شکلی قابل قبولی را نشان دادند می‌توان در تحقیقات آینده روی ارقام مختلف فندق از آن‌ها استفاده کرد. آغازگرهای TOS-1+TOS-2 و TOS-2 و UBC813 با داشتن بالاترین مقدار PIC، بهترین شاخص‌های نشانگری و مقادیر بالای تعداد آلل موثر، شاخص شانون، تنوع ژنی نی به عنوان آغازگرهای برتر جهت بررسی تنوع ژنتیکی در این پژوهش معرفی شدند. به طور کلی با توجه به نتایج این پژوهش به نظر می‌رسد آغازگرهای ISSR و رتروترانسپوزون می‌توانند به‌عنوان یک روش مولکولی ساده مبتنی بر PCR و نسبتا مطمئن و قابل اعتماد در تعیین سطح تنوع ژنتیکی در فندق به کار روند. همچنین از انجائیکه تا اکنون از نشانگرهای رتروترانسپوزون برای بررسی تنوع ژنتیکی گیاه فندق استفاده نشده است، می توان استفاد هاز این نشانگر را برای پژوهش‌های آینده در فندق پیشنهاد نمود.

REFERENCES

1. Amini-Nouri, F. & Ziarati, P. (2015). Chemical composition of native hazelnut (*Corylus avellana* L.) varieties in Iran, association with ecological conditions. *Bioscience & Biotechnology Research Asia*, 12 (3), 2053-60.
2. Andeden, E. E., S Baloch, F., Derya, M., Kilian, B., & Özkan. H. (2013). iPBS-Retrotransposons-based genetic diversity and relationship among wild annual Cicer species, *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 22 (4), 453-66.
3. Balik, H., I. (2021). Bioactive Compounds and Fatty Acid Composition of New Turkish Hazelnut Cultivars, *International Journal of Fruit Science*, 21 (1), 106-114.
4. Campa, A., Trabanco, N., Pérez-Vega, E., Rovira, M., & Ferreira, J. J. (2011). Genetic relationship between cultivated and wild hazelnuts (*Corylus avellana* L.) collected in northern Spain, *Plant Breeding*, 130 (3), 360-66.
5. Crews, C., Hough, P., Godward, J., Brereton, P., Lees, M., Guiet, S., & Winkelmann, W. (2005). Study of the main constituents of some authentic hazelnut oils, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (12), 4843-52.
6. Enescu, CM, Durrant, T.H., Rigo, D., & Caudullo, G. (2016). Corylus avellana in Europe: distribution, habitat, usage and threats, *European Atlas of Forest Tree Species*, 54, 86-87.
7. Erdogan, V., Koksal, Ilhami, A., & Aygun, A. (2010). Assessment of genetic relationships among Turkish hazelnut (*Corylus avellana* L.) cultivars by RAPD markers, *Romanian Biotechnological Letters*, 15 (5): 591-601.
8. Felbinger, C., Kutzsche, F., Mönkediek, S., & Fischer, M. (2020). Genetic profiling: Differentiation and identification of hazelnut cultivars (*Corylus avellana* L.) using RAPD-PCR, *Food Control*, 107, 106791.
9. Ferreira, J.J., Garcia-González, C., Tous, J., & Rovira, M. (2010). Genetic diversity revealed by morphological traits and ISSR markers in hazelnut germplasm from northern Spain, *Plant Breeding*, 129, 435-441.
10. Feschotte, C., & Pritham, E. J. (2007). DNA transposons and the evolution of eukaryotic genomes, *Annual Review* of *Genetics*, 41: 331-368.
11. Ghonaim, M., Kalendar, R., Barakat, H., Elsherif, N., Ashry, N., & Schulman, A.H. (2020). High-throughput retrotransposon-based genetic diversity of maize germplasm assessment and analysis, *Molecular Biology Reports*, 47, 1589-1603.
12. Henareh, M., Abdollahi Mandoulakani, B., & Dursun, A. (2018). Association analysis of morphological traits in tomato using ISSR markers, *Iranian Journal of Horticultural Science,* 49 (1), 171-181. (in Farsi)
13. Houshyarfard, M. (2020). Survey on Etiology and Distribution of Dieback/Decline of Hazelnuts (*Corylus avellana* L.) in Northern Iran, *Journal of Nuts*, 11 (3), 245-256.
14. Kalendar, R. (2011). The use of retrotransposon-based molecular markers to analyze genetic diversity, *Ratarstvo I Povrtarstvo,* 48(2), 261-274.
15. Katarzyna, K., & Gantner, M. (2020). Morphological Traits and Chemical Composition of Hazelnut from Different Geographical, *Agriculture*, 10 (9), 375.
16. Martins, S., Silva, A.P., Santos, A.A., & Carnide, V. (2009). Diversity in hazelnut using RAPD and ISSR markers. In *VII International Congress on Hazelnut,* 845, 145-150.

17. Martins, S., Simões, F., Matos, J., Paula Silva, A., & Carnide, V. (2014). Genetic relationship among wild, landraces and cultivars of hazelnut (*Corylus avellana*) from Portugal revealed through ISSR and AFLP markers, *Plant Systematics and Evolution*, 300, 1035-1046.
18. Mehle, N., Nejc, J., Miro, M., Miklavc, J., Matko, B., Rot, M., Ferlež Rus, A., Brus, R., & Dermastia, M. (2019). Phytoplasmas associated with declining of hazelnut (*Corylus avellana*) in Slovenia, *European Journal of Plant Pathology*, 155, 1117-1132.
19. Mehlenbacher, S. A. (1997). Revised dominance hierarchy for S-alleles in *Corylus avellana* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 94, 360-366.
20. Mohammadzedeh, M., Fattahi, R., Zamani, Z., & Khadivi-Khub, A. (2014). Genetic identity and relationships of hazelnut (*Corylus avellana* L.) landraces as revealed by morphological characteristics and molecular markers, *Scientia Horticulturae*, 167, 17-26.
21. Mohsenzadeh Golfazani, M., Mohammad, F., Hasani Kumleh S.H. & Samizadeh Lahiji H. (2016). Grouping of some canola genotypes in various drought stress treatment in Germination Stages based on multivariate statistical methods. *Iranian Journal of Seed Sciences and Research*, 3 (2), 53-65. (in Farsi).
22. Mohsenzadeh Golfazani, M., Samizade lahiji, H., Alami, A., Shoayi Deylami, M. & Talesh Sasani S. (2012). Study of Genetic Diversity of Flue-Cured Tobacco (*Nicotiana Tabacum* L.) Genotypes using ISSR and Retrotransposon Markers. *Iranian Journal of Field Crop Science,* 43 (2), 371-380. (in Farsi).
23. Murray, M.G., & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA, *Nucleic Acids Research*, 8 (19), 4321-4326.
24. Nei, M. (1972). Genetic distance between populations, *The American Naturalist*, 106, 283-92.
25. Nezamivand Chegini, M., Samizadeh Lahiji, H., Ramezani Malakroodi, M., & Mohsenzadeh Golfazani, M. (2016). Assessment of genetic diversity among four olive cultivars using morphological markers, *Journal of Applied Crop Breeding,* 3 (2), 201-214. (in Farsi)
26. Ozdemir, F. & Akinci, I. (2004). Physical and nutritional properties of four major commercial Turkish hazelnut varieties. *Journal of Food Enginering*, 63 (3), 341-347.
27. Öztürk, S. C., İrfan Balık, H., Kayalak Balık, S., Kızılcı, G., Duyar, O., Doğanlar, S., & Frary, A. (2017). Molecular genetic diversity of the Turkish national hazelnut collection and selection of a core set, *Tree Genetics and Genomes*, 13, 113.
28. Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., & Rafalski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis, *Molecular Breeding*, 2, 225-238.
29. Qiang, L.I., Qing-Chang, L., Hong, Z., Dai-Fu, M.A., Xin, W., Xue-Qin, L., & Yu-Ping, W. (2008). Genetic diversity in main parents of sweetpotato in China as revealed by ISSR markers, *Acta Agronomica Sinica*, 34, 972-977.
30. Rajabi, A., Samizadeh Lahiji, H., & Mohsenzadeh Golfazani, M. (2022). Assessment of genetic diversity in Citrus sinensis by ISSR marker and retrotransposon, *Journal of Plant Production,* 29 (2), 119-139. (in Farsi)
31. Razi, M., Amiri, M., Darvishzadeh, R., Doulati Baneh, H., & Martinez Gomez, P. (2019). Evaluation of genetic diversity in local cultivars and genotypes of grape (*Vitis vinifera*) using ISSR Markers, *Iranian Journal of Horticultural Science, 5*0 (1), 197-207. (in Farsi)
32. Reddy, M., Pradeep, N., & Siddiq, E.A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding, *Euphytica*, 128, 9-17.
33. Ren, N., & Timko, M. P. (2001). AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild Nicotiana species, *Genome*, 44, 559-571.
34. Russell, J.R., Fuller, J.D., Macaulay, M., Hatz, B.G., Jahoor, A., Powell, W., & Waugh, R. (1997). Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs, *Theoretical and Applied Genetics*, 95, 714-722.
35. Santhosh, W.G., Shobha, D. & Melwyn, G.S. (2009). Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers, *Scientia Horticulturae*, 120, 411-17.
36. Shannon, C. E. (1948). A mathematical theory of communication, *The Bell System Technical Journal*, 27, 379-423.
37. Silvestri, C., Bacchetta, L., Bellincontro, A., & Cristofori, V. (2021). Advances in cultivar choice, hazelnut orchard management, and nut storage to enhance product quality and safety: an overview, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101, 27-43.
38. Sorkheh, K., Amirbakhtiar, N., & Ercisli, S. (2016). Potential Start Codon Targeted (SCoT) and Inter-retrotransposon Amplified Polymorphism (IRAP) Markers for Evaluation of Genetic Diversity and Conservation of Wild Pistacia Species Population, *Biochemical Genetics*, 54, 368-387.

39. Vahdani Kia, F. S., Samiezadeh lahiji, H., Zahravi, M. & Mohsenzadeh Golfazani, M. (2021). Evaluating genetic diversity of some wheat genotypes using SSR and ISSR molecular markers. *Cereal Research*, 11 (1), 43-54. (in Farsi)
40. Vuorinen, A. L., Kalendar, R., Fahima, T., Korpelainen, H., Nevo, E., & Schulman, A. H. (2018). Retrotransposon-based genetic diversity assessment in wild emmer wheat (*Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*), *Agronomy*, 8, 107.