



Scan online to view this article

Distinctive Analysis of Qualitative Traits of Hazelnut Germplasm in Northwestern Iran using ATG Start Codon Region Genetic Marker (SCoT)

Mehran Ochi-Ardabili¹, Hassan Nourafcan^{2*}, Hassanali Naghdi Badi^{3,4}, Nasser Mohebalipour⁵, Ardeshir Qaderi⁶

1. Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Miyaneh Branch, Islamic Azad University, Miyaneh, Iran
2. Department of Horticulture, Medicinal Plants and Organic Products Research Center, Miyaneh Branch, Islamic Azad University, Miyaneh, Iran
3. Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Shahed University, Tehran, Iran
4. Medicinal Plants Research Center, Shahed University, Tehran, Iran
5. Department of Agronomy and Plant Breeding, Miyaneh Branch, Islamic Azad University, Miyaneh, Iran
6. Medicinal Plant Research Center, Institute of Medicinal Plants, ACECR, Karaj, Iran

Abstract

Aim and Background: Assessing the genetic diversity of natural and protected germplasm is one of the most strategic global activities and as the national capital of each country. Over the years, various mutations and crosses have caused the accumulation of some useful genes in this germplasm and can be used as genetic resources in critical situations. Evaluation of diversity based on morphological and phenotypic traits is not stable due to the influence of the environment and the interaction of genotype in the environment. Therefore, the use of DNA-based markers that have high reproducibility. Codon-based DNA amplifier-based markers have recently been used to translate SCoT in plants due to heritability and reproducibility. The aim of this study was to evaluate the genetic diversity of hazelnut genetic germplasms in the forests of the northwest of the Iran by SCoT markers and its accordance to diversity estimates based on national markers of hazelnut differentiation tests.

Materials and Methods: In this study, 77 genotypes from hazelnut forests of Ardabil, Miyaneh and Arasbaran were selected by locating each genotype using GPS. Qualitative traits were evaluated using the national guidelines for uniform differentiation and hazelnut stability tests. After DNA extraction from leaf tissue, their polymorphism diversity was assessed using 15 SCoT-specific primers.

Results: The results showed that the genotypes were classified according to the qualitative traits of differentiation of 17 clusters. Using 15 SCoT markers, 165 polymorphic bands were produced with an average of 11 bands per marker and the average percentage of polymorphisms with an average of 11 bands per marker and the average percentage of polymorphisms for markers 90.2% of genotypes based on these markers in 19 sub-clusters were grouped.

Discussion: Analysis of qualitative traits based on bands created in SCoT showed that markers 3, 5, 11, 12, 18 and 20 had more genetic diversity and that the degree of accordance of genotype grouping based on the SCoT markers was 0.87 on the basis of the Mantel test.

Conclusion: Using two genetic markers, 75% (R^2) of the variety of hazelnut differentiation descriptors can be accessed.

Keywords: SCoT marker, genetic diversity, hazelnut, northwest of Iran, Iau Science.

Corresponding author:

Department of Horticulture, Medicinal Plants and Organic Products Research Center, Miyaneh Branch, Islamic Azad University, Miyaneh, Iran

Email: hassannourafcan@gmail.com



برای مشاهده این مقاله به صورت آنلاین اسکن کنید

تحلیل انطباق پذیری تنوع ژرم پلاسما فندق شمال غرب ایران بر اساس صفات کیفی و نشانگر ژنتیکی ناحیه کدون آغاز ATG (SCoT)

مهران اوچی اردبیلی^۱، حسن نورافکن^{۲*}، حسنعلی نقدی بادی^۳،
ناصر محبعلی پور^۵، اردشیر قادری^۶

۱. گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، واحد میانه، دانشگاه آزاد اسلامی، میانه، ایران
۲. گروه علوم باغبانی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی و محصولات ارگانیک، واحد میانه، دانشگاه آزاد اسلامی، میانه، ایران
۳. گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۴. مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
۵. گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد میانه، دانشگاه آزاد اسلامی، میانه، ایران
۶. علوم کشاورزی و گیاهی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، پژوهشکده گیاهان دارویی، جهاد دانشگاهی، کرج، ایران

چکیده

سابقه و هدف: ارزیابی تنوع ژنتیکی ژرم پلاسما طبیعی و حفاظت شده از راهبردی ترین فعالیت های جهانی و به عنوان سرمایه ملی هر کشور است. به طوری که در طول سالیان متمادی جهش ها و تلاقی های مختلف باعث تجمع برخی ژن های مفید در این ژرم پلاسما شده و می تواند به عنوان ذخایر ژنتیکی در مواقع بحرانی مورد استفاده قرار گیرد. ارزیابی تنوع بر اساس صفات مورفولوژیکی و فنوتیپی به دلیل تأثیر محیط و اثر متقابل ژنوتیپ در محیط پایداری مناسبی ندارد. بنابراین استفاده از نشانگرهای مبتنی بر DNA که تکرارپذیری بالایی دارد. نشانگر مبتنی بر امپلیکون DNA ناحیه شروع کدون برای ترجمه SCoT در گیاهان به دلیل وراثت پذیری و تکرارپذیری، به تازگی مورد استفاده قرار گرفته است. هدف از این پژوهش ارزیابی تنوع ژنتیکی ژرم پلاسماهای ذخیره گاه ژنتیکی فندق در رگه های جنگلی شمال غرب کشور با استفاده از نشانگر مولکولی SCoT و به روش PCR انطباق پذیری آن با تنوع صفات کیفی بر اساس نشانگرهای ملی آزمون های تمایز فندق است.

مواد و روش ها: در این تحقیق ۷۷ ژنوتیپ از جنگل های فندق اردبیل، میانه و ارسباران انتخاب و محل هر ژنوتیپ با استفاده از GPS نشانده گذاری شد. با استفاده از دستورالعمل ملی آزمون های تمایز یکنواخت و پایداری فندق، صفات کیفی ارزش گذاری شد و پس از استخراج DNA از برگ آن ها با استفاده از ۱۵ پرایمر اختصاصی SCoT تنوع پلی مورفیسم آن ها ارزیابی شد. **یافته ها:** نتایج نشان دادند که ژنوتیپ ها از نظر صفات کیفی تمایز به ۱۷ کلاستر طبقه بندی شدند. با استفاده از ۱۵ نشانگر SCoT تعداد نوارهای چند شکل ۱۶۵ نوار با میانگین ۱۱ نوار برای هر نشانگر و میانگین درصد پلی مورفیسم با میانگین ۱۱ نوار برای هر نشانگر و میانگین درصد پلی مورفیسم برای نشانگر ۹۰/۲٪ ژنوتیپ ها بر اساس این نشانگرها در ۱۹ زیر کلاستر گروه بندی شدند.

بحث: آنالیز صفات کیفی بر اساس نوارهای ایجاد شده در SCoT نشان دادند که نشانگرهای ۳، ۵، ۱۱، ۱۲، ۱۸ و ۲۰ دارای تنوع ژنتیکی بیش تر و معنی دار بودند که میزان انطباق گروه بندی ژنوتیپ ها بر اساس SCoT نشانگرها ۰/۸۷ بر اساس آزمون مانتل برآورد گردید.

نتیجه گیری: با استفاده از دو نشانگر ژنتیکی می توان ($R^2=75\%$) از تنوع دیسکریپتورهای تمایز فندق دسترسی پیدا نمود.

واژگان کلیدی: نشانگر SCoT، تنوع ژنتیکی، فندق، شمال غرب ایران، Iau Science.

مقدمه

فندق (*Corylus avellana* L.) یکی از محصولات آجیلی مهم در جهان است. از نظر تولید جهانی، فندق با سطح زیرکشت نزدیک به ۵۹۰ هزار هکتار در رتبه ششم و بعد از

نویسنده مسئول:

مرکز تحقیقات گیاهان دارویی و محصولات ارگانیک، واحد میانه، دانشگاه آزاد اسلامی

پست الکترونیکی: hassannourafcan@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۳۰

مناسب معرفی شده‌اند. چند شکلی‌های هدف‌دار کدون شروع (SCoT) نشانگرهای غالب و قابل تکرار هستند که بر اساس ناحیه حفاظت شده کوتاه در ژن‌های گیاهی اطراف کدون شروع ترجمه ATG هستند و از یک پرایمر ۱۸ نوکلئوتیدی در سنجش‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمرز استفاده می‌کنند و با توجه به دمای اتصال بالاتر (۵۰ درجه سلسیوس) سطوح نوترکیبی کمتری بین نشانگرهای SCoT و ژن‌ویژگی نسبت به نشانگرهای تصادفی مانند RAPD، ISSR یا SSR است (۶) از نشانگرهای SCoT با موفقیت برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و ساختار، شناسایی ارقام و برای نقشه برداری مکان‌های کمی صفت (QTL) و انگشت‌نگاری DNA در گونه‌های مختلف از جمله برنج، نیشکر، انگور، سیب‌زمینی، انبه و بادام‌زمینی استفاده شده است (۷). طراحی پرایمر بر اساس منطقه محافظت شده کوتاه در کنار کدون آغاز، یک روش جدید برای تولید نشانگرهای DNA در گیاهان است. در این روش از پرایمرهای ۱۸ کدون آغازگر هدف‌مند در واکنش PCR استفاده می‌شود. آمپلیکون‌های PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز استاندارد تفکیک می‌شوند. این روش در برنج با استفاده از مجموعه متنوعی از ژنوتیپ‌ها و جمعیت کراس‌ها مورد تأیید قرار گرفته است. قابلیت تکرار با استفاده از نمونه‌های تکراری و انجام PCR در روزهای مختلف با نشانگر SCoT امکان‌پذیر است (۶).

این مطالعه‌ها با استفاده از ۱۶ پرایمر RAPD با آنالیز RAPD-PCR انجام شده است. برای ارزیابی آسان‌تر، این که کدام آغازگر باید برای تأیید یکی از ارقام استفاده شود، الگوی نواریندی به ستون‌های کنار هم به صورت مقایسه‌ای منتقل می‌شود و پس از کدگذاری حضور و عدم حضور نوار به روش ترسیم درخت شباهت برای طبقه‌بندی سریع نمونه‌ها، تمام نتایج در یک ماتریس ۰ و ۱ گنجانده شده‌اند تا برای ایجاد یک دندروگرام روی شاخص شباهت جاکارد اعمال شود که می‌تواند به عنوان ابزار ارزیابی دیگری برای شناسایی ارقام ناشناخته فندق استفاده شود (۸،۹).

نشانگرهای هدف‌دار کدون (SCoT^۵) به‌طور کلی قابل تولید هستند اما موارد استثنایی نشان داده که طول آغازگر و دمای اتصال، تنها عوامل تعیین‌کننده قابلیت تولید مجدد نیستند. این روش می‌تواند همراه با نشانگرهای مورد مطالعه

محصولاتی چون بادام هندی، گردو، بادام، شاه‌بلوط و پسته قرار دارد. ترکیه با حدود ۷۵٪ تولید جهانی، به‌عنوان بزرگترین تولیدکننده و صادرکننده فندق در جهان شناخته می‌شود و پس از آن ایتالیا (۱۳٪)، ایالات متحده آمریکا (۴٪)، آذربایجان، اسپانیا، گرجستان و ایران قرار دارند. ایران به‌دلیل اقلیم مساعد می‌تواند در آینده به‌عنوان یکی از تولیدکنندگان مهم این محصول در جهان مطرح باشد (۲،۱).

تنوع ژنتیکی مهم‌ترین ابزار برای اصلاح گیاهان زراعی و باغی است. از بین روش‌های مختلف در خصوص مطالعه تنوع ژنتیکی، نشانگرهای مولکولی که نتایج آن تکرارپذیر باشد مورد توجه است. این نشانگرها که اغلب برای ارزیابی تنوع ژنتیکی گونه‌های مختلف درختان به‌کار می‌رود، انواع مختلفی دارند (۲). نشانگرهای مولکولی، از جمله چند شکلی قطعات حاصل از برش (RFLP^۱) و نشانگرهای چندشکلی قطعات DNA تکثیریافته تصادفی (RAPD^۲)، ابزارهای اولیه برای مطالعه ژنتیکی گیاهان هستند ولی RFLP بسیار پرهزینه و RAPD تکرارپذیری پایینی دارد اما نشانگرهای DNA (از جمله SSR^۳ و SNP^۴)، نشانگرهای به‌نسبت جدیدی هستند که می‌توانند در نقشه‌برداری ژنی استفاده شوند (۳). با استفاده از فناوری نشانگر DNA، دانشمندان می‌توانند روابط بین توالی cDNA شبیه‌سازی شده و ژن‌های مشخص شده کلاسیک را از طریق روش‌های بیوانفورماتیکی کشف کنند. نشانگرهای DNA این امکان را فراهم می‌کنند تا سهم چندین مکان ژنتیکی اساسی به روش QTL mapping در فرآیندهای رشد پیچیده را تشریح کنند (۴). منابع اصلی تنوع ژنوتیپی، اساس و تظاهر آن چند شکلی، از جمله چندشکلی نشانگر است که نه تنها در سطح ریخت‌شناسی بلکه در سطح بیوشیمیایی یا مولکولی نیز خود را نشان می‌دهند. نشانگرهای DNA کاربردهای متعددی در تحقیقات تنوع ژنتیکی گیاهان دارند. این نشانگرها شامل نشانگرهای تکرار توالی ساده ISSR، نشانگرهای پلی‌مورفسم تقویت‌شده مرتبط با توالی SRA و نشانگرهای تکرار توالی ساده (SSR) است (۵). در سال‌های اخیر، جایگزین‌های نشانگرهای مولکولی جدید با چشم‌انداز

¹ Restriction Fragment Length Polymorphism

² Random Amplified Polymorphic DNA

³ Simple Sequence Repeats

⁴ Single Nucleotide Polymorphism

⁵ Start Codon Targeted

برای کاربردهایی مانند تجزیه و تحلیل ژنتیکی و QTL mapping برای صفات کمی استفاده شود (۱۰، ۱۱).

راهبرد اصلاح فعلی بر اساس انتخاب از گیاهان وحشی، تقاضای روز افزون برای اصلاح فندق را برآورده نمی‌کند. نشانگرهای مولکولی ابزار مفیدی برای حمایت از این تلاش‌ها با اصلاح و تکثیر گسترده فندق به شمار می‌روند. در یک مطالعه، نشانگرهای EST-SSR از داده‌های تعیین توالی RNA از سه رقم فندق به‌دست آمده است. مجموعه‌ای از ۴۰ جفت آغازگر به‌طور تصادفی برای تأیید سودمندی آن‌ها بررسی تنوع ژنتیکی در ۱۹ رقم فندق (*C. avellana*) و به‌همراه یک گونه دیگر (*Corylus colurna*) انتخاب شده از این ۴۰ جفت پرایمر، ۲۸ مورد بسیار چند شکل بوده‌اند که دارای مقادیر متوسط هتروزیگوزیتی مشاهده شده، محتوای اطلاعات چند شکل و تعداد آلل‌ها به ترتیب در ۰/۴۵، ۰/۶۷ و ۶/۱۱ بودند (۱۲، ۱۳).

در درختانی مثل فندق ارزیابی صفات کیفی مستلزم گذشت زمان تا رسیدگی میوه است. لذا تعیین صفات مطلوب کیفی قبل از رسیدگی با استفاده از انواع نشانگرها جزو اهداف اصلاحی درختان است. بررسی تنوع ژنتیکی و چندشکلی-های موجود در ناحیه نزدیک به کدون آغاز در فندق‌های بومی و طبیعی ایران انجام نشده است. از آنجایی که هدف از مطالعه فوق بررسی تنوع ژنتیکی در بین ژنوتیپ‌های فندق جنگل‌های طبیعی شمال غرب ایران است با استفاده از نشانگر SCoT و ارتباط آن برای تعیین میزان نشانگر بودن صفات کیفی فندق است.

مواد و روش‌ها

انتخاب ژنوتیپ‌ها

درختان فندق از سه رگه طبیعی واقع در جنگل‌های فندقلوی اردبیل، ارسباران و میانه (استان آذربایجان شرقی) با توجه به تنوع مورفولوژیکی و صفات ظاهری انتخاب و پس از تعیین GPS تهیه نقشه در طول مراجعات متعدد و صفات کیفی بر اساس دستورالعمل ملی آزمون‌های تمایز، یکنواختی و پایداری فندق (۱۴) در کنار دو رقم اصلاح شده داویانا و فرتیل اندازه‌گیری شد. استخراج DNA از برگ‌های درختان انتخابی DNA به روش CTAB استخراج (۱۵) و با استفاده از نانودراپ کیفیت DNA استخراجی تست گردید و

تکثیر بر اساس نشانگرهای SCoT با استفاده از PCR و پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱) انجام شد. پلی‌مورفیسم نوار تشکیل شده توسط محصول PCR در الکتروفورز اگارز ۱ درصد ارزیابی شد.

آنالیز داده‌ها

داده‌های حاصل از مشخصات کیفی

مشخصات کیفی شامل صفات عادت رشد، زمان باز شدن جوانه برگ، زمان باز شدن اولین جوانه گل، سطح مقطع میوه، شکل میوه، زمان باز شدن اولین جوانه ضخامت گریبانک در پایه، کرک دار بودن دم برگ، فشردگی گریبانک، شکل پهنک، شکل راس ماده، سطح مقطع هسته، شکل هسته، جوانه میوه، دندان‌دار بودن گریبانک، طول گریبانک در مقایسه با طول میوه، انحنا خراش پایه میوه، شکل رأس میوه، تاریخ رسیدن میوه بودند. تمایز ابتدا با استفاده از آمار توصیفی تجزیه و تحلیل شده و داده‌ها به روش UPGMA مورد تجزیه کلاستر قرار گرفتند. داده‌های مربوط به حضور (+) و عدم حضور (-) نوارهای پلی‌مورف ژنوتیپ‌های مربوط به نوارهای SCoT نیز به روش Jaccard (۱۶) مورد آنالیز کلاستر قرار گرفت. با توجه به معنی‌داری تأثیر نوارها در گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها آنالیز دیگری بر اساس نوار موثر SCoT به شماره‌های ۲۰، ۱۱، ۵، ۳ و ۱۸ انجام شد. میزان انطباق پذیری گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از نرم-افزارهای آنالیز داده NTsys ver2 و SPSSv22 انجام شد و نشانگر کیفی تمایز به روش آزمون مانتل (۱۷) صورت گرفت.

نتایج

آنالیز کیفی درصد فراوانی تیپ‌های مختلف توصیف‌گرهای ژرم پلاسما فندق ایران در رگه‌های طبیعی ذخیره‌گاه فندق شمال غرب ایران در شکل ۱ ارائه شده است توصیف‌گرهای ژنوتیپ‌های انتخابی دارای انواع مختلفی بودند. بیش‌ترین فراوانی در تیپ رشد درخت از نوع ضعیف، پا جوش‌دهی زیاد، در شکوفه‌دهی دیر، با میوه‌های استوانه‌ای کوتاه و زودرسی میوه‌ها دیده شد، هر چند که تنوع کافی براساس صفات کیفی تمایز در ژنوتیپ‌ها وجود داشت (شکل ۱).

عادت رشد^۶ (TGH)، زمان باز شدن جوانه برگ^۷ (LBD)، زمان باز شدن اولین جوانه گل^۸ (FMBD)، سطح مقطع

^۶ Tree Growth Habit

^۷ Leaf bud bloom date

۱۱، ۱۸، ۶۶ و داویانا هر کدام در زیر کلاستر جداگانه قرار گرفتند.

در این پژوهش از ۱۵ آغازگر ۱۶۵ نوار SCoT قابل اعتماد چند شکل تولید شد. نوار چندشکل در هر آغازگر از ۶ (SCoT9) تا ۱۴ (SCoT21, SCot 12, SCot 5) با میانگین ۱۱ متغیر بودند. درصد نوارهای چندشکل در هر آغازگر از ۵۸/۵ تا ۱۰۰/۰ درصد با میانگین ۹۰/۲ درصد متغیر بود. نمایه (SCoT5) در شکل ۳ نشان داده شده است.

میوه^۹ (NCS)، شکل میوه^{۱۰} (NS)، زمان باز شدن اولین جوانه^{۱۱} (FBD)، ضخامت گریبانک در پایه^{۱۲} (ITBI)، کرک دار بودن دم برگ^{۱۳} (PH)، فشردگی گریبانک^{۱۴} (IP)، شکل پهنک^{۱۵} (LBS)، شکل راس ماده^{۱۶} (SNA)، سطح مقطع هسته^{۱۷} (KCS)، شکل هسته^{۱۸} (KS)، جوانه میوه^{۱۹} (FB)، دنداندار بودن گریبانک^{۲۰} (II)، طول گریبانک در مقایسه با طول میوه^{۲۱} (IL/NL)، انحنای خراش پایه میوه^{۲۲} (CNBS)، شکل راس میوه^{۲۳} (FB)، تاریخ رسیدن میوه^{۲۴} (NMD).

تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های فندق بر اساس صفات کیفی که بر اساس روش استاندارد توصیف‌گر فندق ارزیابی شده بود به روش کلاستر بررسی شد و نتایج آن در شکل ۲ ارائه شده است.

برش دندوگرام در ناحیه ۱۵ واحدی (با توجه به شاخص ویلکس لامبدا) نشان داد که ۷۷ ژنوتیپ مورد مطالعه در ۱۷ زیرکلاستر طبقه‌بندی شدند (شکل ۲). زیر کلاستر اول شامل ژنوتیپ‌های ۶۱، ۶۲، ۵۳، ۵۶، ۵۷، ۴۱، ۴۱، ۱۶، ۴۵، ۱۴، ۵۵، ۳۶، ۵۲، ۵۴، ۴۶، ۷۸، ۷۶، ۱۷، ۵۸، ۲۷، ۱۵ و ۴۲ بودند. زیر کلاستر دوم شامل ژنوتیپ‌های ۱۹، ۴۸، ۴۳، ۹، ۳۹، ۲۱، ۲۴، ۴۷، ۴، ۱۰، ۳۰، ۴۰، ۲۳، ۴۴، ۳۷، ۳۸، ۱، ۴۳، ۷۰، ۷۳، ۲۰، ۵۱، ۳۵، ۵۹، ۶۰، ۲، ۷، ۸، ۶، ۱۲، ۳، ۲۶ و ۵۰ بود. زیر کلاستر سوم نیز ژنوتیپ‌های ۴۹ و ۶۷ را شامل می‌شود. ژنوتیپ‌های ۱۳ و ۵ در زیر کلاستر پنجم قرار گرفته است و زیر کلاستر ششم شامل ژنوتیپ‌های ۲۹، ۳۲ و ۶۵ بود. ژنوتیپ‌های ۲۸ در زیر کلاستر هفتم، ژنوتیپ ۶۴ در زیر کلاستر هشتم و ژنوتیپ‌های ۳۳، ۷۰، ۲۵، فرتیل، ۶۹،

⁸ First Male bud bloom date

⁹ Nut cross section

¹⁰ Nut shape

¹¹ First bud bloom date

¹² Involucre thickness at base of involucre

¹³ Petiol hairness

¹⁴ Involucre pressure

¹⁵ Leaf blade shape

¹⁶ Shape of nut apex

¹⁷ Kernel cross section

¹⁸ Kernel shape

¹⁹ Fruit Bud

²⁰ Involucre Indentation

²¹ Involucre Length Compared to Nut Length

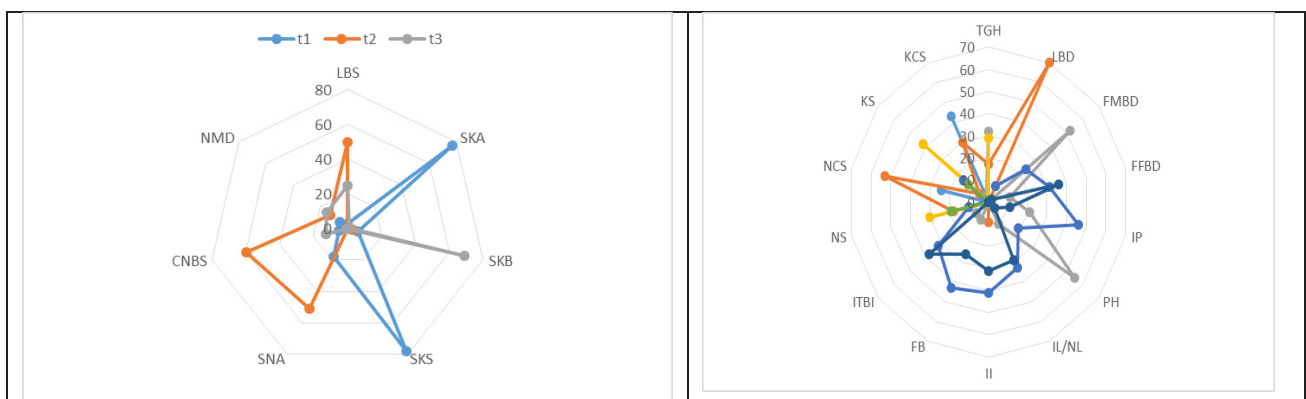
²² Curvature of Nut Basal Scar

²³ Fruit Dud

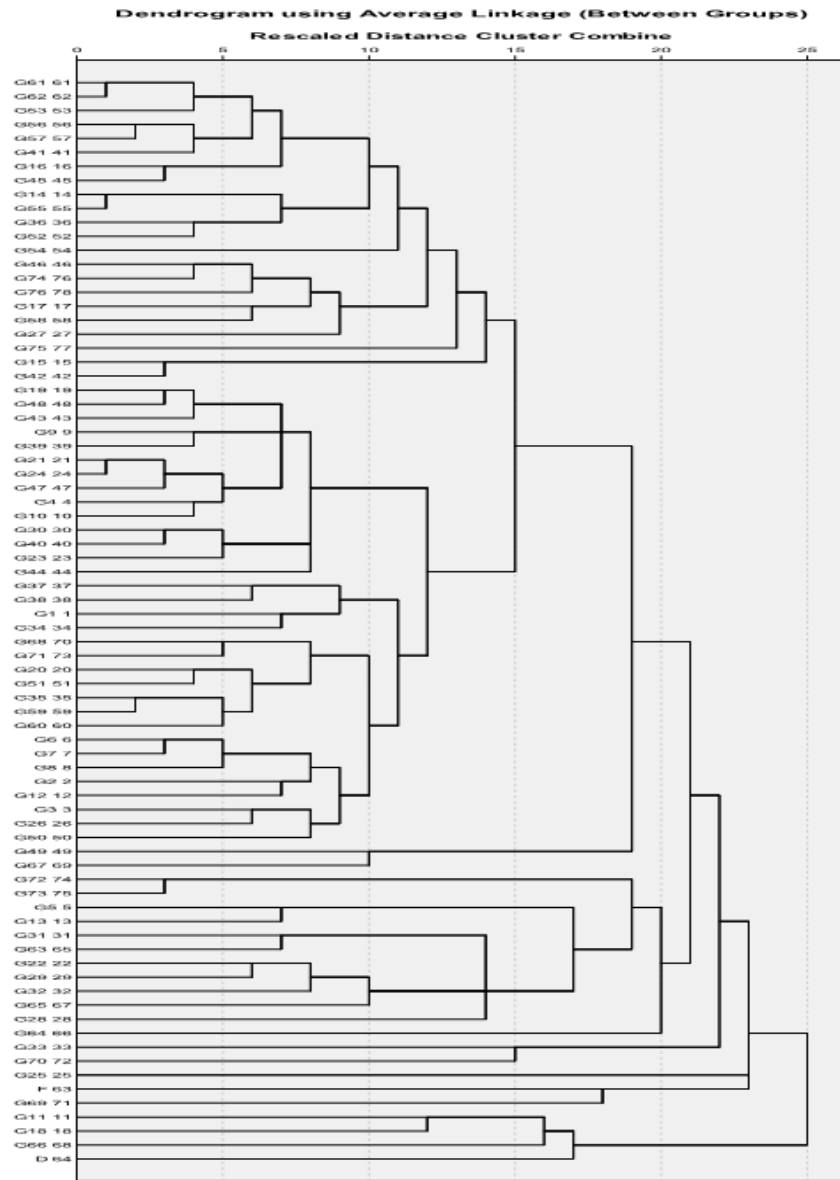
²⁴ Nut Maturity Date

جدول ۱. توالی و مشخصات پرایمرهای SCoT مورد استفاده در مطالعه

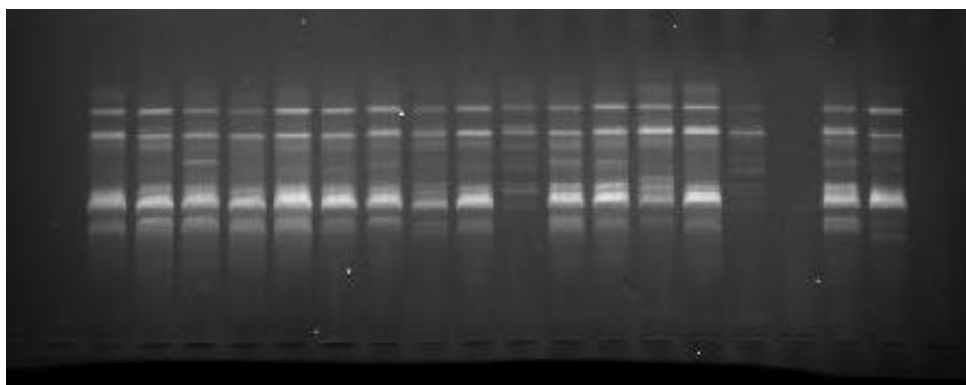
نام نشانگر	توالی پرایمر	Tm (c)	مقدار (%) GC
SCoT3	CAACAATGGCTACCACCG	۵۵/۲	۵۵/۶
SCoT4	CAACAATGGCTACCACCT	۴۵/۵	۵۰
SCoT5	CAACAATGGCTACCACGA	۵۴	۵۰
SCoT6	CAACAATGGCTACCACGC	۵۵/۹	۵۵/۶
SCoT7	CAACAATGGCTACCACGG	۵۵/۲	۵۵/۶
SCoT8	CAACAATGGCTACCACGT	۴۳/۳	۵۰
SCoT9	CAACAATGGCTACCAGCA	۵۴/۳	۵۰
SCoT11	AAGCAATGGCTACCACCA	۵۵/۴	۵۰
SCoT12	ACGACATGGCGACCAACG	۵۹/۸	۶۱/۱
SCoT17	CATGGCTACCACCGGCC	۶۱/۹	۷۲/۲
SCoT18	ACCATGGCTACCACCGCG	۶۱/۵	۶۶/۷
SCoT19	GCAACAATGGCTACCACC	۵۵/۴	۵۵/۶
SCoT20	AACCATGGCTACCACCGC	۵۹/۱	۶۱/۱
SCoT21	CACCATGGCTACCACCAT	۵۵/۶	۵۵/۶
SCoT23	ACCATGGCTACCACGGGC	۶۱/۱	۶۶/۷



شکل ۱. نتایج مقایسه میانگین صفات کیفی مورد مطالعه به روش راداری. درصد فراوانی تیپ‌های مختلف توصیف‌گرهای ژرم پلاسما فنندق ایران بر اساس آزمون‌های ملی تمایز و یکنواختی فنندق



شکل ۲. نتایج گروه‌بندی میانگین صفات کیفی مورد مطالعه به روش کلاستر با استفاده از توصیف‌گرهای کیفی فندق



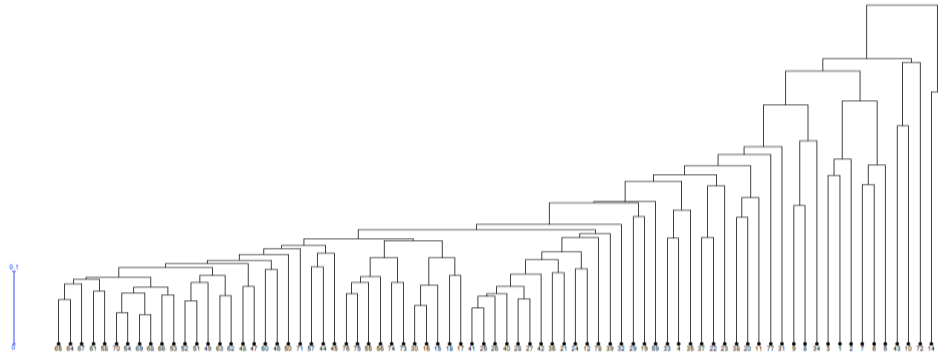
شکل ۳. نتایج الکتروفورز برای نوارهای محصول PCR با استفاده از نشانگر SCoT

ویلیکس لامبدا نشان داد که ژنوتیپ‌ها در ۱۹ کلاستر طبقه‌بندی شدند. کلاستر اول شامل ژنوتیپ‌های ۶۵، ۶۴، ۶۷، ۶۱، ۵۸، ۵۰، ۵۴، ۶۹، ۶۸، ۶۶، ۵۳، ۵۲، ۵۶، ۴۹، ۶۳، ۶۲، ۴۸، ۴۷، ۶۰، ۴۵، ۵۰، ۷۱، ۵۷، ۴۴ و ۴۵ بود. ژنوتیپ‌های

گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از نوارهای ایجاد شده توسط نشانگر SCoT (شکل ۴) به روش کلاستر با فاصله اقلیدسی و ضریب Jaccard در شکل ۳ درج شده است. برش دندوگرام در فاصله ۱/۲ معیار برش براساس نتایج از مون

گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها به روش صفات کیفی (شکل ۲) و نشانگر ژنتیکی (شکل ۴) باعث شد که به منظور استفاده از برآورد تنوع ژنتیکی بر اساس صفات کیفی از طریق نشانگر ژنتیکی انجام گیرد.

۳۰، ۱۶، ۱۵، ۱۸ و ۱۷ در زیر کلاستر سوم قرار داشته و زیر کلاستر چهارم ژنوتیپ‌های ۴۱، ۲۵، ۲۶، ۴۰، ۲۸، ۲۷، ۴۲، ۱۲، ۲۴ را شامل می‌شد. بقیه ژنوتیپ‌ها به تنهایی هرکدام در یک کلاستر جداگانه گروه‌بندی شده بودند.



شکل ۴. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس نشانگر SCoT (SCoT 9,5,12,11,8,20)

جدول ۲. نتایج آزمون کروسکال والیس برای معنی‌داری اثر هر نشانگر در تنوع موجود

SCoT _i	Chi square	P-Value
SCoT ₃	۳۳/۹۸	۰/۴۵
SCoT _{۱۱}	۳۱/۲	۰/۳۴
SCoT _{۱۲}	۴۴/۱/۳	۰/۰
SCoT _{۱۳}	۳۳/۰/۹	۰/۰۴۷۶
SCoT _{۱۴}	۱۹۳/۵۴	۰/۰۰۲۹
SCoT _{۱۷}	۱۱/۷	۰/۳۳
SCoT _{۱۸}	۲۷/۸/۸	۰/۰۰۳۹
SCoT _{۱۹}	۳۳/۱/۹	۰/۰۱۲
SCoT _{۲۰}	۴۲/۸	۰/۰۱۲
SCoT _{۲۱}	۳۲/۸	۰/۰۰۲۹
SCoT _{۲۲}	۱۶/۹	۰/۳۲
SCoT _{۲۳}	۴۳/۸	۰/۰۰۶۶
SCoT _{۲۴}	۳۴/۵	۰/۰۰۳۳
SCoT _{۲۵}	۱۱/۳	۰/۰۳
SCoT _{۲۶}	۱۳۳/۳	۰/۰۰۰۴۵
K.W test	Chi square	P-Value

تحلیل ممیزه بررسی اثر هرکدام از نشانگرها در تبیین تنوع صفات کیفی نشان داد (شکل ۳ برای نمونه) که میزان همبستگی ماتریس مشابه در گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها به روش کلاستر (شکل ۳ و ۴) توسط هریک از نشانگرها به جز SC18، SC11، SC18 و SC20 که نشانگرهای معنی‌دار در تعیین صفات کیفی بودند، تقریباً روند مشابه در گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با صفات کیفی داشت. بدین معنی که نشانگرهای معنی‌دار ذکر شده می‌تواند نشانگر مناسبی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی بر اساس صفات کیفی مناسب باشند.

بحث

شناسایی توصیف‌گرهای کیفی فندق قبل از رسیدگی در برنامه‌های اصلاحی درختان از اهمیت بالایی برخوردار است. در این مسیر استفاده از نشانگرهای مولکولی می‌تواند راهگشا باشد. نشانگرهای مولکولی مورد استفاده درختان

آنالیز ناپارامتری تفاوت ژنوتیپ‌ها بر اساس نوارهای SCoT به روش کروسکال والیس نشان داد (جدول ۱) از بین نشانگرهای SCoT فقط SC3، SC5، SC12، SC11، SC18 و SC20 اختلاف معنی‌داری از نظر مجموع صفات کیفی داشتند. بقیه نشانگرهای مولکولی معنی‌دار نبودند.

میزان ضریب همبستگی تشابه (به روش مانتل) بین گروه‌بندی با صفات کیفی و نشانگرهای مولکولی SCoT ۳۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳ و ۱۸ به میزان ۰/۸۷ درصد و معنی‌دار ($P \leq 0.001$) بود. میزان ضریب تبیین آن ۰/۷۵ برآورد شد که نشان دهنده این است که ۷۵٪ از تنوع ژنوتیپ‌ها بر اساس صفات کیفی توسط نشانگرهای SC3، SC5، SC11، SC20 و SC18 توجیه می‌شوند. این نشانگرها در برآورد ضریب تنوع MI^{۲۵} تاثیر داشته‌اند و بدین معنی که ضریب تنوع در تعیین نشانگرهای موثر در صفات ژنتیکی نقش مهمی دارند.

است اما بررسی ارتباط آن‌ها با توصیف‌گرهای کیفی مطالعه نشده است.

دارای مزایا و معایب خاص خود است. تا به حال از SSR و RAPD در فندق برای بررسی تنوع ژنتیکی استفاده شده

جدول ۳. نتایج آزمون مانتل تست تشابه تنوع بر اساس صفات کیفی و ژنتیکی

Marker	SC3	SC4	SC5	SC6	SC7	SC8	SC9	SC11	SC12	SC17	SC18	SC19	SC20	SC21	SC23	۲۰۱۸+۱۱=۳
Mantel Test	۰/۰	۱۱/۰	۳۵/۰	۵۸/۰	۸۱/۰	۳۳/۰	۳۱/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۸۱/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۵۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۸۱/۰
Significance	۵۰/۰	۳۳/۰	۳۵/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۰/۰	۳۳/۰	۳۰/۰	۳۳/۰	۳۰/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۱۰۰/۰
R Square	۷۱/۰	۳۱/۰	۷۸/۰	۶۰/۰	۳۰/۰	۱۱/۰	۵۰/۰	۷۱/۰	۵۰/۰	۳۰/۰	۶۱/۰	۱۳/۰	۱۳/۰	۱/۰	۶۰/۰	۵۸/۰

دارد، می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر مورد استفاده قرار گیرد. هم‌بستگی مانتل بین تشابه ماتریس تشابه گروه‌بندی بر اساس توصیف‌گرهای کیفی و ماتریس تشابه بر اساس حضور یا عدم حضور نوارهای شکل SCoT به میزان ۰/۸۷ درصد بود که نشان دهنده جایگزینی ۰/۸۷ بین توصیف‌گرهای کیفی و نشانگر مولکولی SCoT است (۲۱،۲۲).

ضریب تبیین ارتباط این دو شاخصه به میزان ۰/۷۶ درصد بود که نشان‌دهنده ممیزه پلی‌مورفیسم صفات کیفی بر اساس نشانگر مولکولی SCoT است که چون تکرارپذیری مناسبی دارد می‌توان از آن برای ارزیابی تنوع صفات کیفی به عنوان یک نشانگر کارا استفاده نمود. پیشتر از نشانگر RAPD برای تنوع ژنتیکی درختان فندق استفاده شده است که به دلیل عدم تکرارپذیری آن امکان استفاده مجدد و قابل اعتماد نیستند. هم‌چنین از نشانگر SSR نیز برای فندق استفاده شده است که به دلیل سخت بودن تکنیک آن باید جایگزین دیگری استفاده شود (۱۷، ۱۸، ۱۹). استفاده از نشانگر SCoT در گیاهانی مثل جاتروپا برنج و کراس‌های حاصل از تلاقی درون گونه استفاده شده و تنوع مناسبی را نشان داده است (۷).

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که از نظر تغییرهای ژنتیکی براساس نشانگر SCoT میزان تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها کم‌تر از تنوع ژنتیکی درون جمعیتی بود که نشانگر تنوع بین درختی بود. بنابراین با توجه به نتایج اخذ شده از مطالعه صفات مورفوفیزیولوژیکی و صفات کیفی و ژنتیکی می‌توان

به‌عنوان یک سیستم نشانگر ساده و جدید، نشانگر هدفمند کدون شروع (SCoT) بر اساس ناحیه حفاظت شده کوتاهی که در کنار کدون شروع (ATG) در ژن‌های گیاهی قرار دارد، ایجاد شد (۱۸). نشانگر SCoT نیازی به اطلاعات توالی ندارد و با ژن‌های عملکردی و صفات مربوطه در ارتباط است (۱۹). در مقایسه با DNA چندشکلی تکثیر شده تصادفی (RAPD)، تکرارهای توالی بین ساده (ISSR) و تکرارهای توالی ساده (SSRs)، SCoT از آغازگرهای طولانی‌تری (۱۸ نوکلئوتیدی) استفاده می‌کند که پلی-مورفیسم‌های بیش‌تری تولید می‌کنند که به‌طور گسترده در مطالعه‌های تنوع ژنتیکی، تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک و برای اصلاح به کمک نشانگر بسیاری از گیاهان استفاده شده است (۱۹،۲۰). با این حال، به دلیل حساس بودن به نسبت به شرایط آزمایشی و پیچیدگی محصولات PCR هنگام استفاده به‌عنوان RAPD و ISSR، نشانگرهای SCoT به ندرت به‌طور مستقیم برای شناسایی گونه‌ها استفاده شده‌اند.

توصیف گروه‌های کیفی فندق به‌عنوان یکی از نشانگرهای مورفولوژیکی ۷۷ ژنوتیپ را بر اساس تجزیه کلاستر به ۱۷ زیر کلاستر تقسیم‌بندی نمود. در حالی که خوشه‌بندی داده‌ها همین ژنوتیپ‌ها بر اساس نشانگر مولکولی SCoT آن‌ها را به ۱۹ زیر کلاستر طبقه‌بندی کرد. SCoT بر اساس پلی-مورفیسم ناحیه حفاظت شده نزدیک ATG را نشان می‌دهد. از آنجایی که این نشانگر فقط با یک پرایمر امپلیکون ناحیه ATG را تشکیل می‌دهد و قابلیت تکرارپذیری بالایی

گفت بین و درون جمعیت‌های فندق تنوع ژنتیکی وجود دارد.

1. Germain, E, 1992. The reproduction of hazelnut (*Corylus avellana* L.): a review. In "III International Congress on Hazelnut 351", pp. 195-210.
2. Leinemann L, Steiner W, Hosius B, Kuchma O, Arenhövel W, Fussi B, Haase B, Kätzel R, Rogge M, Finkeldey R, 2013. Genetic variation of chloroplast and nuclear markers in natural populations of hazelnut (*Corylus avellana* L.) in Germany *Plant J Syst Evol* 299, 369-378.
3. Govindaraj M, Vetriventhan M, Srinivasan M, 2015. Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: an overview of its analytical perspectives. *Genet Res Int* 2015.
4. Bhattacharyya P, Kumaria S, Kumar S, Tandon P, 2013. Start Codon Targeted (SCoT) marker reveals genetic diversity of *Dendrobium nobile* Lindl., an endangered medicinal orchid species. *Gene* 529, 21-26.
5. Zaefizadeh, M. & M. Goliev. 2009. Diversity and Relationships among Durum wheat Landraces (Subconvars) by SRAP and Phenotypic Marker Polymorphism. *Res J Biol. Sci.* 4: 960-966.
6. Bertani RP, Perera F, Joya C, Henriquez DD, Funes C, Chaves S, González V, Welin B, Cuenya M, Castagnaro A, 2021. Genetic diversity and population structure of *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* isolated from sugarcane in Argentina *Plant Pathol.*
7. Bellemou D, Millàn T, Gil J, Abdelguerfi A, Laouar M, 2020. Genetic diversity and population structure of Algerian chickpea (*Cicer arietinum*) genotypes: use of agro-morphological traits and molecular markers linked or not linked to the gene or QTL of interest. *Crop Pasture Sci* 71, 155-170.
8. Garrido-Cardenas JA, Mesa-Valle C, Manzano-Agugliaro F, 2018. Trends in plant research using molecular markers. *Planta* 247, 543-557.
9. Gedil M, Menkir A, 2019. An integrated molecular and conventional breeding scheme for enhancing genetic gain in maize in Africa. *Front Plant Sci* 10, 1430.
10. Agarwal A, Gupta V, Haq SU, Jatav PK, Kothari S, Kachhwaha S, 2019. Assessment of genetic diversity in 29 rose germplasm using SCoT marker. *J King Saud Univ Sci* 31 780-788.
11. Ahmadzadeh F, Flecks M, Rödder D, Böhme W, Ilgaz Ç, Harris DJ, Engler JO, Üzümlü N, Carretero, MA, 2013. Multiple dispersal out of Anatolia: biogeography and evolution of oriental green lizards. *Biol J Linn Soc* 110, 398-408
12. Earl DA, Von Holdt BM, 2012. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet Resour* 4 (2), 359-361.
13. Fideghelli C, De Salvador F, 2008. World hazelnut situation and perspectives. In "VII International Congress on Hazelnut 845", pp. 39-52.
14. Bioversity, F. A. O. CIHEAM. 2008. Descriptors for hazelnut, 6.
15. Schöringhumer, K., Redl, G., & Cichna-Markl, M. 2009. Development and validation of a duplex real-time PCR method to simultaneously detect potentially allergenic sesame and hazelnut in food. *J. Agricultural and Food Chemistry*, 57(6), 2126-2134.
16. Iniesto, E., Jiménez, A., Prieto, N., Cabanillas, B., Burbano, C., Pedrosa, M. M., ... & Linacero, R. (2013). Real Time PCR to detect hazelnut allergen coding sequences in processed foods. *Food chemistry*, 138(2-3), 1976-1981.
17. Leinemann, L., Steiner, W., Hosius, B., Kuchma, O., Arenhövel, W., Fussi, B., ... & Finkeldey, R. (2013). Genetic variation of chloroplast and nuclear markers in natural populations of hazelnut (*Corylus avellana* L.) in Germany. *Plant Systematics and Evolution*, 299(2), 369-378.

18. Mulpuri S, Muddanuru T, Francis G, 2013. Start codon targeted (SCoT) polymorphism in toxic and non-toxic accessions of *Jatropha curcas* L. and development of a codominant SCAR marker *Plant Sci* 207, 117-127.
16. Guo DL, Zhang JY, Liu CH, 2012. Genetic diversity in some grape varieties revealed by SCoT analyses *Mol Biol Rep* 39, 5307-5313.
19. Lombard V, Baril C, Dubreuil P, Blouet F, Zhang D, 2000. Genetic relationships and fingerprinting of rapeseed cultivars by AFLP: consequences for varietal registration *Crop Sci* 40, 1417-1425
20. Mohammadi SA, Prasanna B, 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants—salient statistical tools and considerations. *Crop Sci* 43, 1235-124.
21. Rezazadeh E, Aliabadian M, Darvish J, Ahmadzadeh F, 2020. Diversification and evolutionary history of brush-tailed mice, Calomyscidae (Rodentia), in southwestern Asia. *Org Divers Evo* 20, 155-170.
22. Gupta, V., Jatav, P. K., Haq, S. U., Verma, K. S., Kaul, V. K., Kothari, S. L., & Kachhwaha, S. (2019). Translation initiation codon (ATG) or SCoT markers-based polymorphism study within and across various *Capsicum* accessions: insight from their amplification, cross-transferability and genetic diversity. *J. Genetics*, 98(2), 1-12.