

بررسی تنوع ژنتیکی انار (*Punica granatum L.*) با استفاده از صفات مورفولوژیک و نشانگرهای

مولکولی

طیبه قربانی¹، کیانوش چقامیرزا^{2*}، عیسی ارجی⁴

1- دانش آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات دانشگاه رازی

2- استادیار اصلاح نباتات دانشگاه رازی

3- گروه پژوهشی بیوتکنولوژی مقاومت به خشکی

4- عضو هیات علمی مرکز تحقیقات کشاورزی استان کرمانشاه

تاریخ دریافت: 1390/7/25، تاریخ پذیرش: 1391/3/22

چکیده

در این تحقیق به منظور بررسی تنوع ژنتیکی انارهای استان کرمانشاه، تعداد 44 ژنوتیپ انار جمع آوری شده از 6 منطقه در استان کرمانشاه استفاده شد. ژنوتیپ‌ها با استفاده از داده‌های حاصل از 48 صفت مورفولوژیک و به روش تجزیه خوشه‌ای گروه‌بندی شدند. تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های انار مورد مطالعه با استفاده از دو نشانگر DNA چند شکل تکثیر شده تصادفی (RAPD) و بین توالی‌های تکراری ساده (ISSR) نیز ارزیابی گردید. توسط 20 آغازگر RAPD تعداد 183 باند تولید شد که میزان چند شکلی متوسط آنها 51/37 درصد بود. تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها را بر اساس نشانگرهای مورفولوژیک به چهار گروه و نشانگرهای RAPD به هفت گروه مجزا تقسیم نمود که در برخی موارد با گروه‌بندی مورفولوژیکی انطباق داشت و ضریب کوفتیک به دست آمده 0/996 بود. در مجموع 114 باند نیز توسط 17 آغازگر ISSR تولید شد که متوسط چند شکلی 37/71 درصد بود. تجزیه خوشه‌ای بر اساس نشانگر ISSR ژنوتیپ‌ها را به هفت گروه مجزا تقسیم کرد که تا حدودی با گروه‌بندی آنها براساس صفات مورفولوژیک و نشانگرهای RAPD انطباق داشت و مقدار ضریب کوفتیک 0/992 بود. با بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های انار با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR ضمن مشخص شدن وضعیت ژنتیکی آنها مشاهده شد که ژنوتیپ‌های متفاوت در گروه‌های جداگانه دسته بندی شده و همچنین ژنوتیپ‌های یک منطقه به گروه‌های مختلفی راه یافتند. نتایج حاصل از این تحقیق حاکی از این بود که استان کرمانشاه دارای ذخایر غنی و تنوع بالای ژنتیکی گیاه انار است که این مسئله می‌تواند به نوعی تاییدی بر نظر دانشمندان باشد که ایران را خاستگاه و موطن اصلی انار می‌دانند.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، انار، نشانگرهای مورفولوژیک، RAPD و ISSR.

مقدمه

کاربرد بسیار گسترده ای در زیست شناسی مولکولی گیاهی می باشد (Cheghamirza et al., 2002). یکی دیگر از نشانگرهای DNA، نشانگر ISSR² است که با استفاده از آغازگرهای نیمه اختیاری شامل واحدهای تکراری از توالی بازهای DNA می باشند، به دست می آید. توارث این نشانگر به صورت غالب - مغلوبی است و در مطالعات تاکسونومیکی و فیلوژنتیکی کاربرد وسیعی دارد (Cheghamirza, 2004).

در بررسی تنوع ژنتیکی برخی از ژنوتیپ های انار با استفاده از تجزیه کلاستر بر اساس شش صفت مورفولوژیک، ژنوتیپ ها در دو گروه اصلی شیرین ها یا کم اسیدها و ترش و ملس ها یا پر اسیدها قرار گرفتند. هریک از این گروه ها نیز به دو زیر گروه شامل ژنوتیپ های دانه درشت و دانه متوسط تا کوچک تقسیم بندی شدند (Zamani, 1990). اغلب ژنوتیپ های انار موجود در ایران بر اساس نام محلی و خصوصیات مورفولوژیک جمع آوری و در کلکسیون انار مرکز تحقیقات کشاورزی یزد کشت شد (Behzadi Shahrabaki, 1998). برای اولین بار به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ های انار در ایران با استفاده از نشانگرهای RAPD تعداد 28 ژنوتیپ انار مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از ماتریس تشابه نشان داد که کمترین شباهت (29/2%) مربوط به دو ژنوتیپ دم ابروتی و پوست سیاه یزدی می باشد.

انار (*Punica granatum* L.) با تعداد کروموزوم های $2n=2x=16$ و مقدار دگرگشنی 55 درصد، بومی ایران و رشته کوه های هیمالیا در شمال هندوستان است که از دوران باستان در نواحی مدیترانه ای آسیا، آفریقا و اروپا کشت می شده است (Morton, 1987). ایران دارای غنی ترین ذخایر ژنتیکی انار در جهان می باشد که به طور عمده در مناطق کویری از جمله استان های یزد، مرکزی، سیستان و بلوچستان، خراسان جنوبی و در منطقه غرب در استان کرمانشاه مورد کشت و کار قرار می گیرد. ایران مرکز تنوع انار و به احتمال زیاد مرکز پیدایش آن نیز می باشد (Sarkhosh et al., 2006). لازمه تعیین وضعیت ذخایر ژنتیکی و تشخیص شرایط گیاهان مبنی بر رو به انقراض بودن یا نبودن آنها، بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان در نواحی مختلف می باشد. یکی از روش های بررسی تنوع ژنتیکی استفاده از خصوصیات ظاهری و مورفولوژیکی گیاه می باشد، اما مهمترین و بهترین ابزار بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین روابط خویشاوندی و فیلوژنی استفاده از نشانگرهای DNA می باشد (Cheghamirza, 2004). یکی از پرکاربردترین نشانگرهای DNA، نشانگر RAPD¹ می باشد که برای تجزیه ساختار ژنتیکی جمعیت ها به ویژه جمعیت هایی که مطالعات زیادی بر روی آنها انجام نگرفته، بکار می رود. این نشانگر دارای

2- Inter Simple Sequence Repeat

1- Random Amplified Polymorphic DNA

ژنتیکی انار در این استان می تواند از اهمیت بالایی برخوردار باشد. لذا هدف تحقیق حاضر مطالعه ی تنوع ژنتیکی انار از مناطق مختلف استان کرمانشاه به کمک نشانگرهای مورفولوژیک و مولکولی بود.

مواد و روش ها

مواد گیاهی

به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی انار، 44 ژنوتیپ از شش منطقه در استان کرمانشاه جمع آوری گردید (جدول 1).

اندازه گیری صفات مورفولوژیک

حالت های تظاهراتی 48 صفت مورفولوژیک مربوط به ویژگی های درختی، برگ، گل و میوه با توجه به دستورالعمل ملی آزمون های تمایز، یکنواختی و پایداری در انار که توسط کمیته فنی ثبت ارقام گیاهی (Meidani *et al.*, 2008) ارائه شده است، امتیاز دهی و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

مطالعات مولکولی

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی در سطح مولکول DNA از 20 آغازگر RAPD و 17 آغازگر ISSR استفاده شد (جدول 2). با توجه به درختی بودن نمونه ها و بالا بودن میزان مواد بازدارنده، برای استخراج DNA از نمونه های برگگی از روش ورابی و همکاران (Vroh Bi *et al.*, 1996) استفاده شد.

در دندروگرام حاصله در حد تشابه 72 درصد، 22 ژنوتیپ در 5 گروه جای گرفتند و 6 ژنوتیپ باقیمانده هر کدام یک گروه مستقل را تشکیل دادند (Talebi Badaf *et al.*, 2003). در مطالعه - ای تنوع ژنتیکی تعدادی از ژنوتیپ های انار به کمک نشانگرهای RAPD ارزیابی شد و دامنه ی تغییرات ضریب تشابه ژنتیکی در بین ژنوتیپ ها از 30% تا 80% متفاوت بود (Zamani *et al.*, 2006). بررسی روابط ژنتیکی برخی از ارقام انار ایران با استفاده از نشانگر AFLP، نشان داد که علی رغم سطح چندشکلی پایین در ارقام مورد ارزیابی، تفاوت هایی در اندازه قطعات AFLP مورد ارزیابی وجود دارد (Rahimi, 2003). در بررسی تنوع ژنتیکی 6 توده بومی انار در چین، مشخص شد که درصد چند شکلی از 62/5% تا 86/11% متغیر است. این توده های بومی انار تفاوت معنی داری از نظر تنوع ژنتیکی نشان دادند (Yuan *et al.*, 2007). در بررسی تنوع ژنتیکی انار در تونس مشخص شد که در میان ژرم پلاسما انارهای این منطقه تفاوت ژنتیکی و فنوتیپی معنی داری از نظر صفاتی چون اندازه ی میوه، رنگ و ویژگی های آب میوه وجود دارد (Mars *et al.*, 1999). در مطالعه ای، پلی مورفیسم میان برخی ژنوتیپ های انار ایرانی به کمک نشانگر RAPD بررسی شد، بالاترین و پائین ترین مشابهت بین ژنوتیپ ها به ترتیب 0/89 و 0/29 گزارش شد (Sarkhosh *et al.*, 2006). با توجه به گستره کشت و کار انار در مناطق مختلف استان کرمانشاه، بررسی تنوع موجود در ذخایر

جدول 1- ژنوتیپ‌های انار جمع آوری شده به تفکیک مناطق مختلف.

Table 1- Collected pomegranate genotypes sorted by different regions.

کدهای اختصاص یافته به نمونه ها Codes assigned to samples	تعداد نمونه جمع آوری شده The number of samples collected	شهرستان Township
P1- P14	14	پاوه Paveh
K1- K5	5	منطقه ریجاب (دالاهو) Rijab (Dalahoo)
S1- S5	5	منطقه پیران (سرپل ذهاب) Piran (sarpol e zahab)
A1- A3	3	منطقه اناره (گیلان غرب) Anareh (Gilan e gharb)
G1- G7	7	منطقه گلین (گیلان غرب) Golin (Gilan e gharb)
H1- H10	10	منطقه گره بان (هرسین) Gareh ban (Harsin)
	44	تعداد کل نمونه‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌های مورفولوژیکی شامل تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی با استفاده از نرم افزار NTSYS ver: 2.0 انجام گرفت. همچنین برای تجزیه تابع تشخیص نرم افزار SPSS مورد استفاده قرار گرفت. برای به دست آوردن داده‌های مولکولی، پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با آغازگرهای RAPD و ISSR، حضور و عدم حضور هر نوار با اعداد 1 و 0 برای تمامی نمونه‌ها تعیین شد. برای به دست آوردن دندروگرام از نرم افزار MVSP ver: 3.131 و برای تجزیه به مؤلفه‌های اصلی از نرم افزار NTSYS استفاده شد. جهت انجام تجزیه واریانس ژنتیکی نرم افزار Genealex و برای تابع تشخیص نرم افزار SPSS 16.0 مورد استفاده قرار گرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز طبق روش ویلیامز و همکاران (1990) با حجم مخلوط واکنش 25 میکرولیتر شامل $MgCl_2$ (3/2 میلی مولار)، dNTP (10Mm) (0/5 میکرومول)، Primer (2/5 میکرومول)، Taq DNA Polymerase (یک واحد)، DNA (30 نانوگرم) در دستگاه ترموسایکلر CORBETT Research انجام گرفت. برای تفکیک باندهای تکثیر شده DNA، الکتروفورز ژل آگارز 1/2 درصد در بافر TAE 1X با ولتاژ 80 ولت به مدت یک ساعت انجام شد.

جدول 2- فهرست آغازگرهای RAPD و ISSR مورد استفاده در تحقیق حاضر

Table 2 - List of RAPD and ISSR primers used in current research

آغازگرهای ISSR				آغازگرهای RAPD			
ISSR primers				RAPD primers			
ردیف	نام	توالی 3' به 5'	دمای اتصال	ردیف	نام	توالی 3' به 5'	دمای اتصال
Row	Name of primers	Sequence 5' to 3'	Annealing Temperature	Row	Name of primers	Sequence 5' to 3'	Annealing Temperature
53	UBC-880	(GGAGA) ₃	40	40	OPC07	GTCCCGACGA	40
52	UBC-112	(GACA) ₄	40	40	T19	GTCCGTATGG	40
55	UBC-856	(ACAC) ₄ Y*G	40	40	E10	GGTGACTGTG	40
58	UBC-864	(ACTG) ₄	31	40	E17	CTACTGCCGT	40
56	UBC-855	(AC) ₈ YT	40	40	U11	AGACCCAGAG	40
54	UBC-818	(CA) ₈ G	40	40	UBC28	CCGGCCTTAA	40
58	UBC-820	(GT) ₈ C	40	40	A7	GAAACGGGTG	40
42	UBC-854	(TC) ₈ R**G	40	35	AB1	CCGTCGGTAG	40
54	UBC-856	(AC) ₈ YA	40	40	C9	CTCACCGTCC	40
58	UBC-873	(ATG) ₆	40	40	C16	CACACTCCAG	40
52	UBC-868	(GAA) ₆	37	40	T9	CACCCCTGAG	40
51	UBC-841	(GACAC) ₄	40	40	OPC04	CCGCATCTAC	40
53	UBC-807	(AG) ₈ T	40	40	E19	ACGGCGTATG	40
59	UBC-809	(AG) ₈ G	40	40	OPC08	TGGACCGGTG	40
37	UBC-810	(TGGA) ₄	40	40	U17	ACCTGGGGAG	40
52	UBC-884	(AG) ₇	40	40	OPC15	GACGGATCAG	40
47	UBC-825	(AC) ₈ T	37	40	E7	AGATGCAGCC	40
			40	40	OPC10	TGTCTGGGTG	40
			40	40	E16	GGTGACTGTG	40
			31	40	UBC75	GAGGTCCAGA	40

* Pyrimidine, ** Purine

نشان داد که ژنوتیپها بر اساس صفات مورد بررسی در فاصله اقلیدسی 10 در چهار گروه مجزا قرار می‌گیرند (شکل 1). گروه اول شامل سه نمونه از منطقه گلین گیلان غرب و یک نمونه از منطقه اناره گیلان غرب بود. این نمونه‌ها از

نتایج و بحث

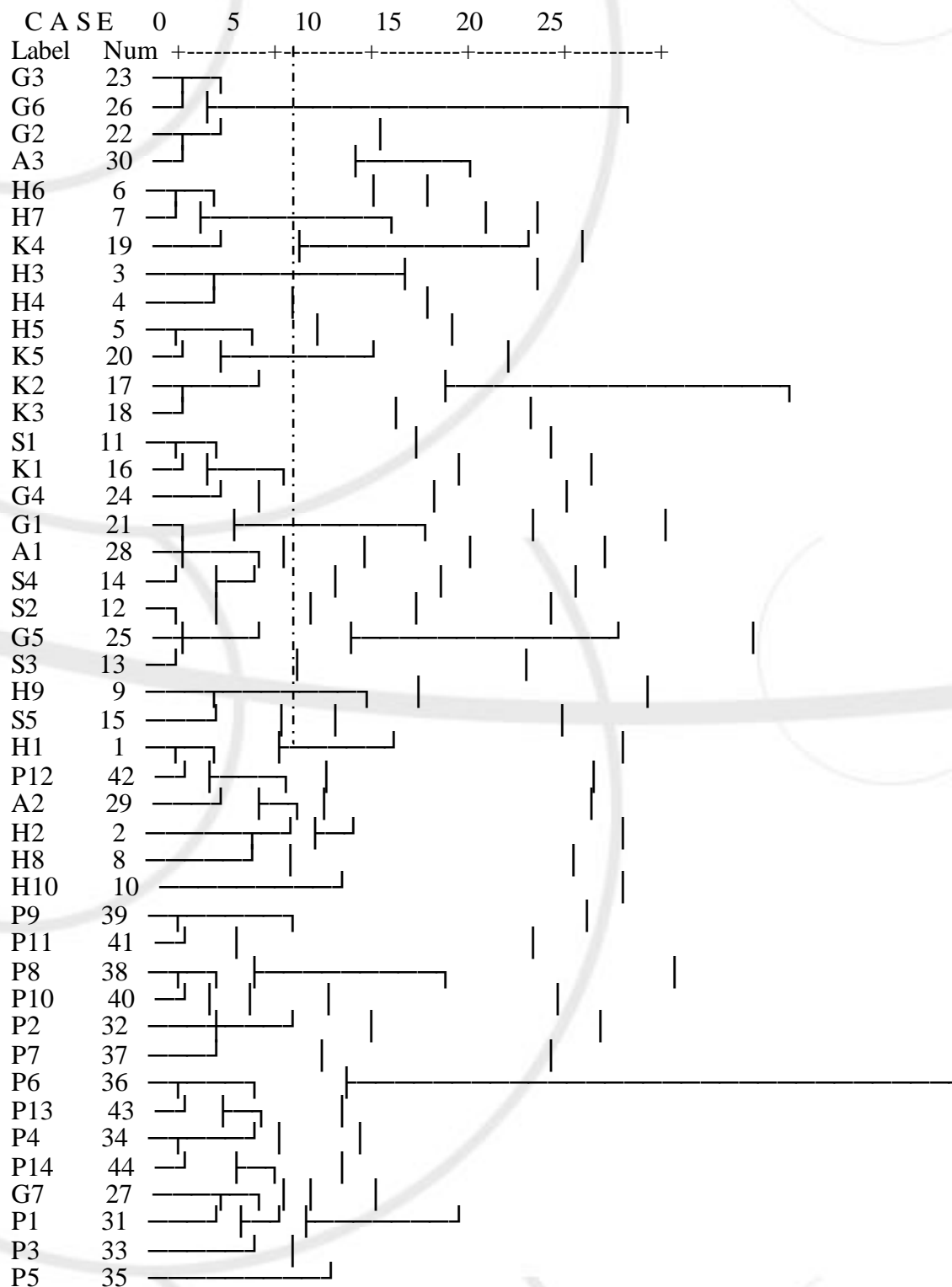
تجزیه و تحلیل داده‌های مورفولوژیک

تجزیه خوشه‌ای

نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای داده‌ها با استفاده از روش Ward و ضریب تشابه جاکارد

منطقه‌ای به منطقه‌ی دیگر باشد. البته نمونه‌های مربوط به منطقه پاوه اکثراً در یک گروه قرار گرفتند به عبارت دیگر در این منطقه طبقه‌بندی ژنتیکی مورفولوژیکی نمونه‌ها با طبقه‌بندی جغرافیایی تا حدود زیادی تطابق نشان داد. در گزارش‌هایی جهت گروه‌بندی 24 ژنوتیپ انار از منطقه ساوه (Zamani, 1990) و برای دسته‌بندی نمودن 138 ژنوتیپ گردوی مناطق مختلف کشور (Hagh Jooyan *et al.*, 2005) از روش تجزیه خوشه‌ای و تابع تشخیص استفاده نموده‌اند. برای کاهش داده‌ها جهت شفاف‌سازی روابط بین دو یا تعداد بیشتری خصوصیت و شکستن واریانس کل خصوصیات اصلی به تعداد محدودی از مؤلفه‌های جدید غیر وابسته، تجزیه به مؤلفه‌های اصلی داده‌ها بر اساس ماتریس واریانس کوواریانس انجام گرفت. بر اساس محور اول و دوم حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، پراکندگی ژنوتیپ‌ها مورد بررسی قرار گرفت که اولین مؤلفه 15/46 و مؤلفه دوم 10/06 درصد از تغییرات کل را توجیه نمودند. با توجه به این نمودار ژنوتیپ‌ها به 5 گروه تقسیم شدند (شکل 2).

نظر صفات تیپ درخت، رنگ حبه، جنسیت گل (تک جنسی یا دو جنسی بودن) و نسبت طول دمبرگ به رگبرگ میانی مشابه و همگی از منطقه گرم گیلانغرب بودند. گروه دوم شامل پنج نمونه از منطقه گره بان و چهار نمونه از منطقه ریجاب بود. این نمونه‌ها از نظر صفات تیپ درخت، رنگ حبه، نسبت طول خامه به پرچم و نسبت طول دمبرگ به رگبرگ میانی مشابه و مربوط به مناطق معتدل بودند. هفده نمونه گروه سوم شامل پنج نمونه از منطقه گره بان، یک نمونه از شهرستان پاوه، دو نمونه از منطقه اناره و پنج نمونه از منطقه پیران (سرپل ذهاب)، یک نمونه از منطقه ریجاب و سه نمونه از منطقه گلین بود. البته نمونه‌های متعلق به این گروه مربوط به مناطق متفاوت آب و هوایی بودند که از نظر صفات سطح چوب، وجود خار، موقعیت گل، محل تشکیل گل، نسبت طول خامه به پرچم و رنگ دانه با هم مشابه بودند. چهارده نمونه‌ی گروه چهارم شامل سیزده نمونه از شهرستان پاوه و یک نمونه از منطقه گلین بود، که از نظر ویژگی‌های تیپ درخت، رنگ دمبرگ، جنسیت گل و زمان رسیدن یکسان بودند. قرار گرفتن نمونه‌ها در این چهار گروه جداگانه نشان داد که انارهای این مناطق از نظر مورفولوژیکی با هم متفاوتند. بر اساس نتایج به دست آمده دسته‌بندی ژنتیکی مورفولوژیکی نمونه‌های مورد مطالعه با تقسیم‌بندی جغرافیایی آنها تطابق چندانی نداشت که می‌تواند نشان دهنده عدم تاثیر شرایط محیطی بر صفات مورفولوژیک مورد بررسی یا انتقال ژنوتیپ‌ها از

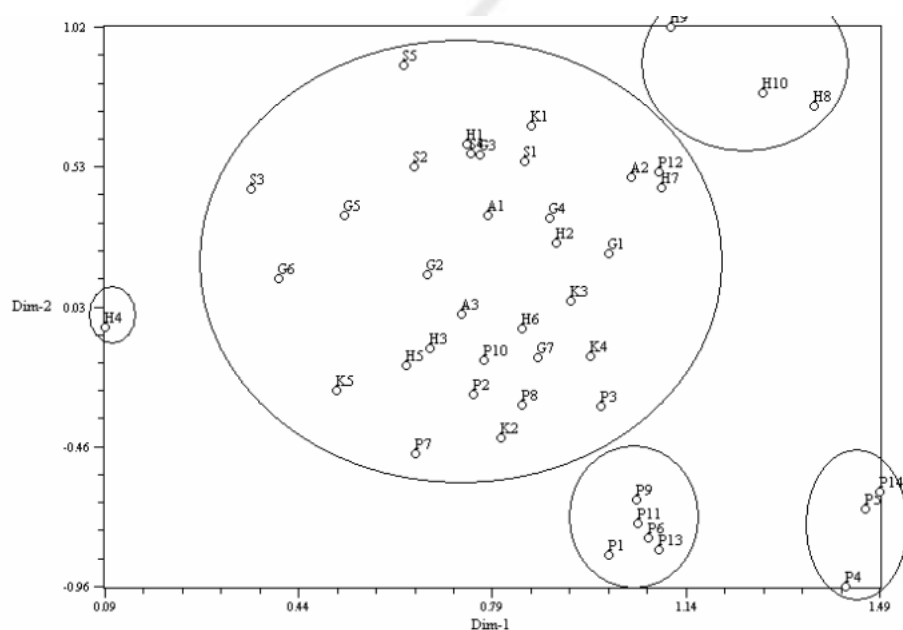


شکل 1- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای 44 ژنوتیپ انار بر اساس صفات مورفولوژیک مورد بررسی با استفاده از روش Ward.

Figure 1 - Dendrogram generated by cluster analysis using of 44 pomegranate genotypes based on studies morphological traits using the Ward method.

تجزیه خوشه‌ای به همراه برخی نمونه‌های H و K در یک گروه بود. همچنین نمونه‌های H8، H9 و H10 در یک گروه قرار گرفتند که این نتایج با نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای نسبتاً مطابقت داشت. سایر نمونه‌ها نیز در یک گروه بزرگتر قرار گرفتند که در تجزیه خوشه‌ای نیز اغلب در گروه‌های نزدیک به هم جای داشتند.

طبق نتایج بدست آمده اغلب نمونه‌های پایه در دو گروه جدا از سایر نمونه‌ها جای گرفته‌اند و نمونه P12 که در تجزیه خوشه‌ای جدا از دیگر نمونه‌های پایه قرار گرفته بود در این تجزیه نیز جدا از دیگر نمونه‌های پایه در یک گروه جدا و پرت قرار داشت. نمونه H4 از هرسین در یک گروه جداگانه قرار گرفته که در



شکل 2- نمودار پراکنش دو بعدی ژنوتیپ‌ها با استفاده از صفات مورفولوژیک بر اساس ماتریس واریانس کوواریانس.

Figure 2 - Diagram of two-dimensional distribution of genotypes using morphological characters based on the variance covariance matrix.

3500 جفت باز متغیر بود. تعداد باندها در هر آغازگر از 5 تا 12 باند متغیر بود (شکل 3). درصد چند شکلی برای هر آغازگر بین 20% مربوط به آغازگر UBC28 و OPC15 تا 87/5% مربوط به آغازگر E10 بود. متوسط تعداد کل باندها و متوسط باندهای چند شکل برای هر آغازگر به ترتیب 9/15 و 4/7 بود. به منظور

نتایج حاصل از داده‌های مولکولی
نتایج حاصل از نشانگر RAPD

نتایج حاصل از 20 آغازگر RAPD مورد استفاده به طور خلاصه در جدول 3 آورده شده است. در مجموع 183 باند توسط این نشانگر تولید شد که از بین آنها تعداد 94 (51/37 درصد) چند شکلی نشان دادند. اندازه باندها بین 300 تا

برخی موارد نیز تفاوت‌هایی دیده شد بعنوان مثال گروه دوم بر خلاف گروه‌بندی مورفولوژیکی است و شامل A2 و G2 می‌باشد. که می‌تواند مربوط به تاثیر شرایط متفاوت اقلیمی بر صفات ظاهری ژنوتیپ‌ها باشد، در حالی که نشانگر RAPD تحت تاثیر محیط قرار نمی‌گیرد (Justus *et al.*, 2004; Newton and Groham, 1994). از طرفی نشانگر RAPD نسبت به صفات مورفولوژیک اطلاعات بیشتری از ژنوم در اختیار قرار می‌دهد به همین دلیل تعداد گروه‌ها و شاید دقت گروه‌بندی آن بیشتر باشد (Wen *et al.*, 2004). این نتایج با آزمون متل تایید گردید که در این آزمون میزان همبستگی پیرسون بین ماتریس ضریب تشابه جاکارد حاصل از نشانگر RAPD و ماتریس حاصل از داده‌های مورفولوژیک بررسی شد. همبستگی به دست آمده بسیار معنی دار بود ($r = -0/149$) که دلالت بر وجود همبستگی بین ماتریس ضرایب تشابه حاصل از نشانگرهای RAPD و داده‌های مورفولوژیک دارد، البته میزان ضریب همبستگی در آزمون متل در اغلب موارد حتی در زمانیکه بسیار معنی دار هم باشد کوچک است و بندرت مقدار آن منفی است (Mantel, 1967). در بررسی تعداد 102 رقم زیتون با استفاده از 45 نشانگر RAPD (Besnard *et al.*, 2001) و در مطالعه تعداد 40 رقم زیتون با استفاده از 34 نشانگر RAPD (Sanchez-cortes *et al.*, 2001)، وجود همبستگی معنی دار بین اطلاعات به دست آمده

بررسی محتوای اطلاعاتی چند شکلی نشانگرها از پارامترهایی مانند قدرت تفکیک، شاخص مارکری، درصد چندشکلی، نسبت چند شکلی مؤثر و محتوای اطلاعاتی چند شکلی استفاده شد (جدول 3). در رابطه با RAPD، بالاترین شاخص مارکری 1/52 و مربوط به آغازگر U17، بیشترین نسبت چند شکلی مؤثر 6/4 به دست آمد که مربوط به آغازگرهای OPC07 و U17 بود. بیشترین قدرت تفکیک 21/46 و مربوط به آغازگر OPC10 و بالاترین محتوای اطلاعاتی پلی مورفیسم 0/28 به دست آمد که مربوط به آغازگر T19 بود. این نتایج نشان دهنده کارایی این آغازگرها در بررسی تنوع ژنتیکی نمونه های مورد مطالعه می باشد.

نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس نشانگر RAPD

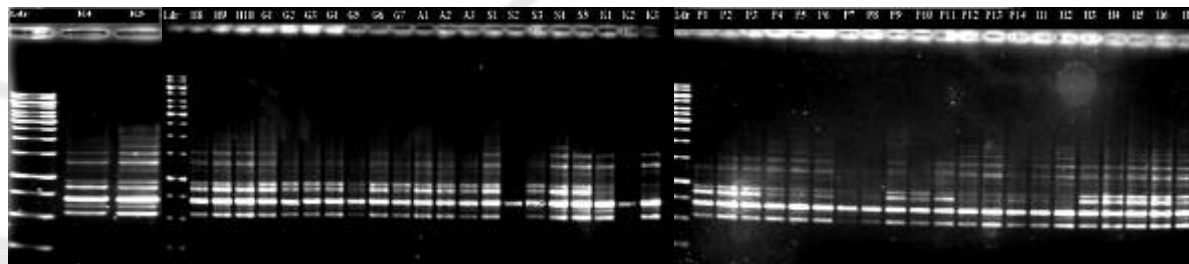
نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضریب تشابه جاکارد ژنوتیپ‌ها را به 7 گروه تقسیم نمود (شکل 4). جهت تعیین تعداد مطلوب خوشه از روش تجزیه واریانس مولکولی استفاده شد (جدول 4). ضریب کوفتیک برای ضریب تشابه جاکارد 0/996 بود که برآزش خوب بین دندروگرام و ماتریس شباهت اصلی را نشان می‌دهد. گروه‌بندی مورفولوژیک و گروه‌بندی بر اساس نشانگر RAPD در اغلب موارد با هم تطابق نشان دادند. بطوریکه گروه اول شامل ژنوتیپ‌های S2، S3، S5 و G5 است که با گروه‌بندی مورفولوژیکی مطابقت داشت. البته در

از نشانگرهای مولکولی و مورفولوژیک را گزارش نمودند.

جدول 3- خصوصیات آغازگرهای RAPD مورد استفاده در ژنوتیپ های انار.

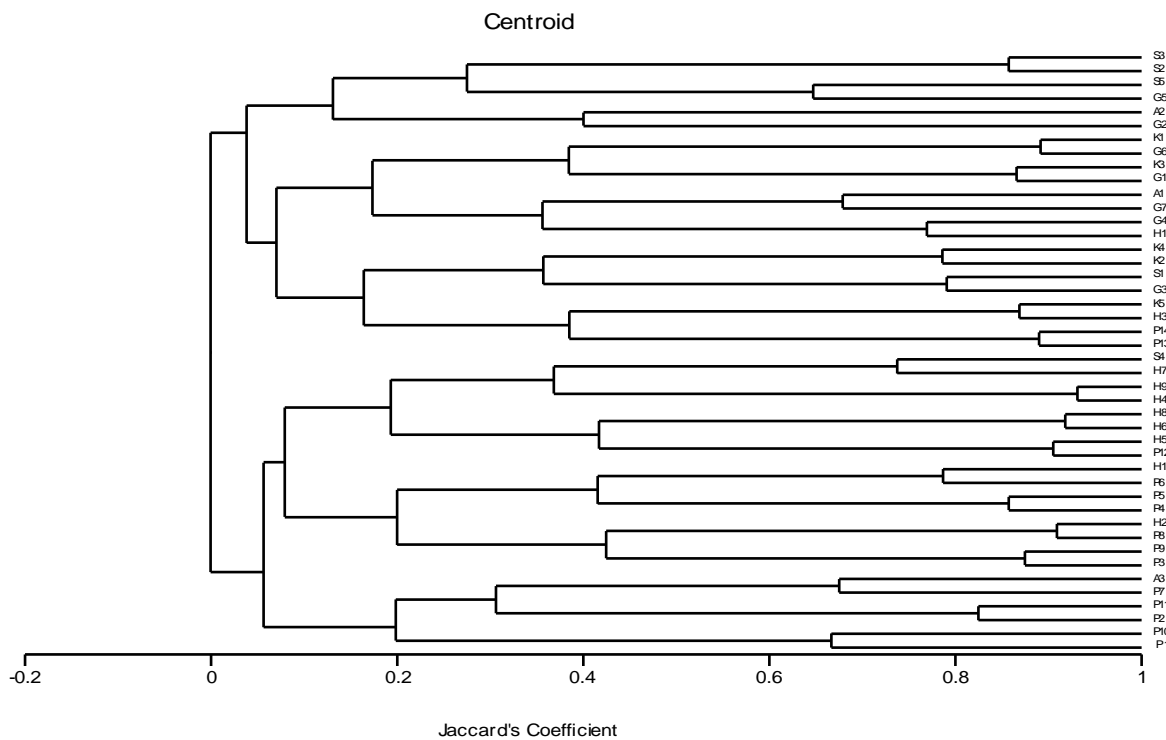
Table 3 - Characteristics of RAPD primers used in Pomegranate genotypes.

ردیف Row	نام آغازگر Name of primer	تعداد کل تکثیر شده The total number of amplified fragments	تعداد چند شکل The number of polymorphic fragments	درصد چند شکلی Percentage of polymorphism	شاخص مارکری marker Index	نسبت چند شکلی مؤثر Effective polymorphisms ratio	قدرت تفکیک Resolution power	محتوای اطلاعاتی چند شکلی Polymorphic information content
1	OPC07	10	8	80	1.05	6.4	18	0.16
2	T19	8	6	75	1.29	4.5	0.5	0.28
3	E10	8	7	87.5	1.43	6.13	12.68	0.23
4	E17	11	3	27.27	0.10	0.82	18.08	0.12
5	U11	5	4	80	0.52	3.2	8.94	0.16
6	UBC28	10	2	20	0.01	0.40	17.64	0.03
7	A7	6	3	50	0.24	1.5	10.64	0.16
8	AB1	10	4	40	0.13	1.6	19.08	0.08
9	C9	11	6	54.55	0.44	3.27	18.6	0.13
10	C16	7	5	71.43	0.85	3.57	11.68	0.24
11	T9	10	5	50	0.25	2.5	18.86	0.10
12	OPC04	8	5	62.5	0.34	3.13	14.86	0.11
13	E19	10	3	30	0.09	0.9	15.36	0.10
14	OPC08	6	2	33.3	0.05	0.67	9.5	0.07
15	U17	10	8	80	1.52	6.4	1578	0.24
16	OPC15	10	2	20	0.02	0.4	18.86	0.06
17	E7	11	7	63.64	0.54	4.45	19.08	0.12
18	OPC10	12	7	58.33	0.66	4.08	21.46	0.16
19	E16	10	3	30	0.05	0.9	19.28	0.06
20	UBC75	10	4	40	0.16	1.6	18.62	0.10
کل Total	-	183	94	-	9.75	56.42	307.5	2.73
میانگین Means	-	9.15	4.7	51.37	0.49	2.82	15.37	0.14



شکل 3- الگوی بانندی نشانگر RAPD در 44 نمونه انار مربوط به آغازگر A7.

Figure 3 - Band patterns of RAPD markers in 44 samples of pomegranate using primer A7.



شکل 4- دندروگرام حاصل از نشانگر RAPD بر اساس ضریب تشابه جاکارد برای 44 ژنوتیپ انار.

Figure 4 - Dendrogram of RAPD markers based on Jaccard's similarity coefficient for 44 genotypes of pomegranate.

جدول 4- تجزیه واریانس مولکولی بر اساس دندروگرام حاصل از نشانگر RAPD در 44 ژنوتیپ انار.

Table 4 - Analysis of molecular variance based dendrogram of RAPD markers for 44 genotypes of pomegranate.

ϕ	درصد واریانس کل % Of total variance	واریانس اجزا Variance components	مجموع مربعات Sum of squares	درجه آزادی Degrees of freedom	منبع تغییر Source of variation
	23%	2.947	166.981	6	بین جمعیت‌های داخل گروه‌ها Between populations within groups
* $\phi_{ST}=0.233$	77%	9.704	359.042	37	داخل جمعیت‌ها Within populations
		12.650	526.023	43	کل Total

سطح احتمال $> 0/01$ (Probability level < 0.01)؛ F^* استاندارد (*Standard F)

نتایج حاصل از نشانگر ISSR

از تعداد 20 آغازگر ISSR مورد استفاده، 17 آغازگر چندشکلی نشان دادند. نتایج حاصل از هر آغازگر به طور خلاصه در جدول 5 نشان داده شده است. در مجموع 114 باندها توسط این نشانگر تولید شد که از بین آنها تعداد 43 باندها اندازه بین 300 تا 2200 جفت باز چند شکل بود. تعداد باندها در هر آغازگر از 3 تا 11 باندها متغیر بود (شکل 5). درصد چند شکلی برای هر آغازگر بین 20% مربوط به آغازگرهای UBC820 و UBC873 تا 67% مربوط به آغازگرهای UBC880، UBC856 و UBC825 و به طور متوسط 37/71% بود. متوسط تعداد کل باندها و متوسط باندهای چند شکل برای هر آغازگر به ترتیب 5/7 و 2/53 بود. در میان نشانگرهای ISSR بیشترین درصد چند شکلی مربوط به آغازگر UBC880، UBC856 و UBC825 به مقدار 66/67 درصد بود. بالاترین شاخص مارکری 0/59 و مربوط به آغازگر UBC880، بیشترین نسبت چند شکلی مؤثر 2/67 به دست آمد که مربوط به آغازگر UBC880 و UBC825 بود. بیشترین قدرت تفکیک 21/16 و مربوط به آغازگر UBC807 و بالاترین محتوای اطلاعاتی پلی مورفیسم 0/22 به دست آمد که مربوط به آغازگر UBC880 بود (جدول 5). با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه نشانگر RAPD چند شکلی بیشتر و محتوای اطلاعاتی بالاتری را نسبت به نشانگر ISSR نشان داد.

نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس

نشانگر ISSR

نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضریب تشابه جاکارد ژنوتیپ‌ها را به 7 گروه تقسیم نمود (شکل 6). جهت تعیین تعداد مطلوب خوشه از روش تجزیه واریانس مولکولی استفاده شد (جدول 6). ضریب کوفتیک برای ضریب تشابه 0/992 بود که نشان دهنده برآزش خوب بین دندروگرام و ماتریس شباهت اصلی می‌باشد. گروه‌بندی بر اساس نشانگر ISSR با گروه‌بندی توسط نشانگر RAPD تا حدود اندکی با هم تطابق نشان دادند که این شاید به دلیل تکثیر مناطق متفاوتی از ژنوم انار توسط روشهای RAPD و ISSR باشد. تفاوت‌های موجود در نتایج به دست آمده هم چنین می‌تواند به دلیل کم بودن تعداد نشانگرهای ISSR پلی مورف و عدم توانایی این نشانگر در تولید قطعات از نواحی متفاوت ژنومی نمونه‌های مورد مطالعه انار باشد. آزمون منتل نتایج به دست آمده را تایید می‌نماید که در این آزمون میزان همبستگی پیرسون بین ماتریس‌های ضریب تشابه جاکارد حاصل از نشانگرهای RAPD و ISSR بررسی گردید. همبستگی به دست آمده بسیار معنی دار بود ($r = 0/471$) که دلالت بر وجود همبستگی بین نتایج حاصل از نشانگرها دارد. در نتیجه می‌توان گفت که هر دو نشانگر نتایج یکسانی را نشان داده‌اند یا به عبارت دیگر ارزیابی مشابهی از روابط ژنتیکی توسط هر دو گروه نشانگر آشکار شده است. در بررسی گوناگونی ژنتیکی 20 نمونه

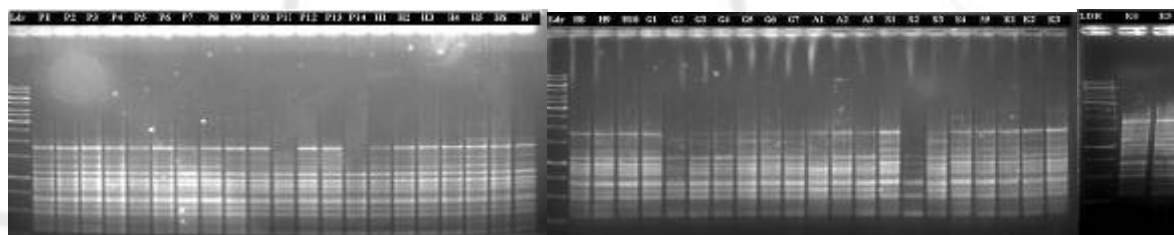
همبستگی بین الگوی تنوع نشان داده شده توسط نشانگر ISSR و داده‌های مورفولوژیک می باشد. در گزارشی تنوع ژنتیکی توده‌های بومی نخود زراعی با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR و صفات مورفولوژیک بررسی شد و با انجام آزمون متل نتیجه مشابهی حاصل گشت (Fazeli, 2008).

مختلف نارون اصفهان با استفاده از 10 آغازگر RAPD و 16 آغازگر ISSR، اعلام شد که هر دو نشانگر نتایج یکسانی را نشان داده‌اند (Seid Tabatabaei et al., 2007). همچنین میزان همبستگی پیرسون بین ماتریس ضریب تشابه جاکارد حاصل از نشانگر ISSR و ماتریس حاصل از داده‌های مورفولوژیک بسیار معنی دار بود ($r = -0/086$) که نشان دهنده ی وجود

جدول 5- خصوصیات آغازگرهای ISSR مورد استفاده در ژنوتیپ های انار.

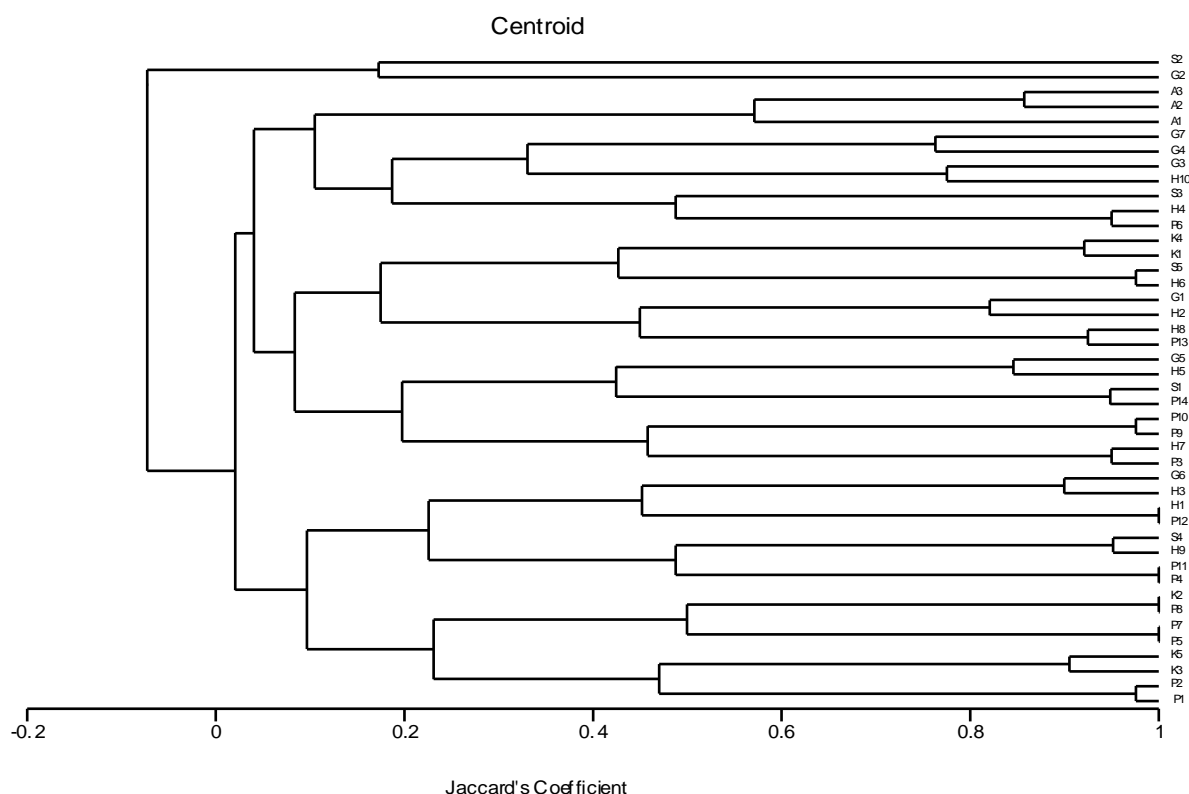
Table 5 - Characteristics of ISSR primers used in pomegranate genotypes.

ردیف Row	تعداد کل تعداد کل	تعداد چند	شاخص مارکری marker Index	نسبت چند شکلی مؤثر Effective polymorp hisms ratio	قدرت تفکیک Resolution power	محتوای اطلاعاتی چند شکلی Polymorphic information content
1	6	4	0.59	2.6	10.14	0.22
2	7	2	0.05	0.57	13.14	0.09
3	3	2	0.06	1.33	5.86	0.05
4	5	3	0.01	0.57	12	0.01
5	3	1	0.03	0.33	5.72	0.08
6	4	2	0.06	1	7.72	0.06
7	5	1	0.001	0.2	9.96	0.01
8	6	2	0.06	0.67	11.36	0.09
9	4	2	0.07	1	7.68	0.07
10	5	1	0.001	0.2	9.96	0.01
11	8	3	0.11	1.13	15.04	0.10
12	7	4	0.17	2.29	13.42	0.08
13	11	5	0.15	2.27	21.16	0.07
14	8	3	0.08	1.13	15.34	0.07
15	4	2	0.12	1	7.36	0.12
16	7	2	0.01	0.57	12	0.01
17	6	4	0.3	2.67	11.1	0.11
کل	114	43	2.14	20.82	216.18	1.38
Total میانگین Means	5.7	2.53	0.13	1.22	10.95	0.08



شکل 5- الگوی بانندی نشانگر ISSR در 44 نمونه انار مربوط به آغازگر UBC807.

Figure 5 - The band pattern of ISSR primers in 44 samples of pomegranate using primer UBC807.



شکل 6- دندروگرام حاصل از نشانگر ISSR بر اساس ضریب تشابه جاکارد برای 44 ژنوتیپ انار.

Figure 6 - dendrogram derived from ISSR markers based on Jaccard's similarity coefficient for 44 genotypes of pomegranate.

آزمایش مشاهده شد که ژنوتیپ‌های یک منطقه در گروه‌های مختلفی جای گرفتند که ناشی از تفاوت ژنوتیپ‌های درون هر منطقه است و یا اینکه در ایجاد کلکسیون‌ها و یا در هنگام جابجایی ژنوتیپ‌ها ممکن است اختلاط و یا

نتیجه گیری

بررسی خصوصیات مورفولوژیکی گیاه انار و گروه‌بندی 44 ژنوتیپ با استفاده از داده‌های به دست آمده از این خصوصیات و بدون هیچ اطلاعی از خصوصیات ژنتیکی انجام شد. در این

بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های انار با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR وضعیت ژنتیکی آن‌ها را مشخص کرد. بطوری که ژنوتیپ‌های متفاوت را در گروه‌های جداگانه قرار داد.

اشتباه بوجود آمده باشد. بعلاوه نتایج نشان داد که نشانگر RAPD بدلیل محتوای اطلاعاتی نسبتا بالا (PIC=0/14) برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌های انار یک تکنیک موثر و مفید است. نتیجه بدست آمده با نتایج Zamani *et al.* (2006) مطابقت داشت.

جدول 6- تجزیه واریانس مولکولی بر اساس دندروگرام حاصل از نشانگر ISSR برای 44 ژنوتیپ انار.

Table 6 - Analysis of molecular variance dendrogram based on ISSR markers for 44 genotypes of pomegranate.

ϕ	درصد واریانس		مجموع مربعات Sum of squares	درجه	
	کل % Of total variance	واریانس اجزا Variance components		آزادی Degrees of freedom	منبع تغییر Source of variation
$\phi_{ST}=0.392$	%39	1.674	77.087	6	بین جمعیت‌های داخل گروه‌ها Between populations within groups
	%61	2.590	95.845	37	داخل جمعیت‌ها Within populations
		4.264	172.932	43	کل Total

سطح احتمال $> 0/01$ (Probability level < 0.01)

ژنوتیپ‌ها از یک منطقه به منطقه دیگر هم همین موضوع مورد توجه بوده است. در نتیجه باید در جمع آوری ژنوتیپ‌ها و احداث کلکسیون‌های انار دقت کافی اعمال گردد. در مجموع تکنیک‌های RAPD و ISSR جهت شناسایی ژنوتیپ‌های انار مفید به نظر می‌رسند. نتایج حاصل از این تحقیق حاکی از این بود که استان کرمانشاه دارای ذخایر غنی و تنوع بالای ژنتیکی گیاه انار است که می‌توان با بررسی‌های بیشتر به ثبت این ژنوتیپ‌ها در کلکسیون انار اقدام نمود. در تحقیق حاضر آشکار شدن چند شکلی قابل

به دلیل اینکه بررسی صفات مورفولوژیک در سطح وسیعی (ویژگی‌های درختی، برگ، گل و میوه) انجام شد و با توجه به اینکه نشانگرهای مولکولی استفاده شده کل ژنوم را پوشش داده و چند شکلی را در کل ژنوم بررسی می‌کنند (Justus *et al.*, 2004)، همبستگی میان نشانگرهای مولکولی و صفات مورفولوژیک معنی‌دار بود. با توجه به نتایج می‌توان گفت که نام گذاری ژنوتیپ‌های انار که از قدیم الایام کشت و کار می‌شده است با تاکید بر خصوصیات کمی و کیفی میوه بوده است و در انتقال

قبول بین ژنوتیپ‌های انار، می‌تواند به نوعی تایید و موطن اصلی انار می‌دانند (Zamani *et al.*, 2006).
کننده نظر دانشمندانی باشد که ایران را خاستگاه

منابع

- Behzadi Shahrabaki H (1998). Diversity and variation of Pomegranate in Iran. Agriculture instruction. Agricultural Education Publications, 265 pages.
- Besnard G, Baradat P, Berville A (2001). Genetic relationship in the olive (*Olea europaea* L.) reflect multilocal selection of cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 102: 251-258.
- Cheghamirza K, Koveza O, Konovalov F, Gostimsky S (2002). Identification of RAPD markers and their use for molecular mapping in pea (*pisum sativum* L.). *Cellular & Molecular Biology Letters* 7: 649-655.
- Cheghamirza K (2004). Molecular Mapping of qualitative and quantitative traits loci in Pea. Ph.D. Thesis. Moscow State University, Russia.
- Fazeli F (2008). Study of chickpea genetic variation using of molecular markers. MSc thesis. Razi University.
- Hagh Jooyan R, Ghareh Yazi B, Shariat Panahi M. S, Khalighi A (2005). Study of walnut genetic variation of Iran using of morphologic markers. *Research and performance in agriculture and gardening* 69: 22-30.
- Justus M, Esther M, Kahangi W, Fusao M (2004). Genetic characterization of cultivated bananas and plantains in Kenya by RAPD markers. *Scientia Horticulturae* 99: 9-20.
- Mantel NA (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27:209-220.
- Mars M, Marrakchi M (1999). Diversity of Pomegranate (*Punica granatum* L.) germplasm in Tunisia. *Genetic Resources and Crop Evolution* 46:461-467.
- Meidani R. A, Lahiji F, Hemati M (2008). National instruction of differentiation, tedium and stability in Pomegranate. Technical Committee of Plant Variety Record.
- Morton J (1987). *Fruits of Warm Climates*. Miami FL, USA. 352-355.
- Newton C, Groham A (1994). PCR. Bois Scientific Publishers. Oxford, UK. PP: 161.
- Rahimi T (2003). Study of genetic relationship among some Pomegranates of Iran using of AFLP marker. MSc thesis. Isfahan University of Technology.
- Saker M. M, Youssef S. S, Abdallah N. A, Bashandy H. S, El Sharkawy A. M (2005). Genetic analysis of some Egyptian rice genotypes using RAPD, SSR and AFLP. *African Journal of Biotechnology* 4: 882-890
- Sanchez-cortes F, Bandes M. L, Paz S, Iniguez A, Lacer G (2001). Molecular characterization of olive cultivars using RAPD markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 126: 7-12.
- Sarkhosh A, Zmani Z, Fatahi R, Ebadi A (2006). RAPD Markers reveal polymorphism among some Iranian Pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes. *Science Direct, Scientia Horticulturae* 111:24-29.
- Seid Tabatabaei B A, Rahim Malek M, Talebi Badaf M, Yamchi A, Etemedi N, Mobli M (2007). Study of elm-tree genetic variation of Esfahan using of RAPD and ISSR markers. *Sciences and Technics of Gardening*. 4: 213- 224
- Talebi Badaf M, Bahar M, Sharif Nabi B (2003). Study of pomegranate genetic variation using of RAPD markers. 3th Iran Biotechnology Congress. 345- 346.
- Vroh Bi I, Hraventg L, Chandelier A, Mergeai G, Du Jardin P (1996). Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by use of activated charcoal during DNA extraction. *Plant Breeding* 115: 205-206.

- Wen X. P, Pang X. M, Deng X. X (2004). Characterization of genetic relationships of *Rosa roxburghii* Tratt and its relatives using morphological traits, RAPD and AFLP markers. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 79: 189-196.
- Williams J.G.K, Kubelik A.R, Livak K.J, Rafalski J.A, Tingey S.V (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
- Yuan Z, Yin Y, Qu J, Zhu L, Li Y (2007). Population Genetic Diversity in Chinese Pomegranate (*Punica granatum* L.) Cultivars Revealed by Fluorescent-AFLP Markers. *J Genet Genomics*. 2007 Dec; 34: 1061-71.
- Zamani Z (1990). Study of Pomegranate morphologic traits of Saveh. MSc thesis. Tehran University.
- Zamani Z, Sarkhosh A, Moghadam M. F, Ebadi A (2006). Study of pomegranate genetic variation using of RAPD markers. *Agriculture Science of Iran* 37: 865-873.

Evaluation of genetic diversity in pomegranate using morphological traits and molecular markers

Ghorbani T.¹, Cheghamirza K.^{*2&3}, Arji E.⁴

1. MSc of Plant Breeding, Razi university.
2. Assistant Professor of Plant Breeding, Razi University.
3. Research Group of Drought Resistance Biotechnology.
4. Research Center of Agriculture, Kermanshah.

Abstract

To study pomegranate genetic variation in Kermanshah province, 44 pomegranate samples were collected from six different regions. In overall 48 morphologic traits were evaluated. Cluster analysis based on morphological traits grouped samples in four clusters. To study pomegranate genetic variation in molecular level, RAPD and ISSR markers were used. Totally 183 bands were amplified by 20 RAPD primers, 94 of them were polymorphic with average polymorphism percentage of 51.37. Cluster analysis arranged samples in 7 clusters which often were conformed to morphologic results. Coffenetic coefficient was 0.996. An overall 114 bands were produced by 17 ISSR primers, among them 43 bands were polymorphic with average percent polymorphism of 37.71. Cluster analysis arranged samples in 7 clusters which often were conformed to the result of morphologic and RAPD analysis. This research determined the genetic situation of pomegranates and showed that different genotypes were placed in different groups. Results of present research showed that Kermanshah province is a major genetic resource of pomegranate. The results can support the ideas that Iran is motherland of pomegranate.

Keywords: *genetic variation, pomegranate, morphological markers, ISSR, RAPD.*

* Corresponding Author: Cheghamirza K. Tel: 0831-8323733

Email: cheghamirza@yandex.ru