مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۶، شماره ۶، سال ۱۳۸۴ (۱۳۷۹-۱۳۷۳)

روابط ژنتیکی برخی از ارقام انار (*Punica granatum* L.) ایران با استفاده از نشانگر AFLP

تورج رحیمی[۱]، بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی[۲]، بهرام شریف نبی[۳]و سیروس قبادی[۴]
۱، ۲، ۳، ٤، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار، استادیار و مربی دانشگاه صنعتی اصفهان
تاریخ پذیرش مقاله ۸۳/۱۱/۲۱

خلاصه

روابط ژنتیکی ۱۱ ژنوتیپ کاملاً نزدیک انار ایران با استفاده از نشانگر AFLP مورد ارزیابی قرار گرفت.۱۰ ترکیب آغازگری روی ارقام انتخاب شده و همچنین ترکیب آغازگری E+AGA بعلاوه M+CGA برای تشخیص روابط ژنوتیپ های انار در دو منطقه اصفهان و یزد با اسامی مشابه مورد استفاده قرار گرفت. بیشترین شباهت بین ارقام دبه ای بم و دختر حمومی (۷۹/۱ درصد) و کمترین شباهت بین ارقام پوست سیاه و آمنه خاتونی (۲۰/۳ درصد)وجود داشت. پس از برش خوشه بندی داده های حاصل از AFLP در فاصله ٠/٦٤، هفت رقم در دو گروه جای گرفتند و چهار رقم باقیمانده هر کدام یک گروه را تشکیل دادند. علی رغم سطح چند شکلی پایین در ارقام مورد ارزیابی، تفاوت هایی در الگوی نواربندی در بین ژنوتیپ های با اسامی مشابه و همچنین در بین دو منطقه جغرافیایی مشاهده گردید.

واژه‌های کلیدی: AFLP، انار، روابط ژنتیکی

مقدمه

شناخت تنوع ژنتیکی و طبقه بندی ذخایر توارثی، یک امر زیر بنایی و بنیادی برای طراحی موفق برنامه های به نژادی بوده و در آسان نمودن مدیریت حفظ و نگهداری مجموعه‌های ژنتیکی[۱] نقش بسزایی دارد (۳). پیشرفت در زمینه فناوری نشانگرهای DNA، به‌نژادگران و محققین ژنتیک گیاهی را در غلبه بر بسیاری از مشکلات موجود در زمینه طبقه‌بندی و حفاظت ذخایر ژنتیکی گیاهی کمک کرده است (۳).

انار (*Punica granatum* L.) درخت میوه‌ای است که از دیر باز در ایران کشت می‌شده است. ایران یکی از بزرگترین تولید کنندگان انار در دنیا است و دارای متنوع ترین ارقام انار می باشد بطوری که بیش از ۷۶۰ رقم انار از استان های مختلف کشور توسط بهزادی شهر بابکی جمع آوری شده است(۱).

هم اکنون طیف وسیعی از روش های انگشت نگاری DNA مانند DAF، SSR، RAPD و AFLP که مبتنی بر PCR می باشند، مورد استفاده قرار می‌گیرند (۵). AFLP ترکیبی از RFLP و PCR است که قطعات برش یافته توسط آنزیم‌های برشی را بطور تصادفی تکثیر می‌کند (۱۲).

بواسطه کارایی، تکرارپذیری و قابلیت اعتماد بالای روش AFLP، این روش کاربردهای عملی بسیاری دارد (۱۲). در بیشتر گیاهان چند شکلی‌های AFLP شناسایی شده و از آنها برای مطالعات ژنتیکی در گیاهان استفاده گردیده است(۱۳). از مهمترین کاربردهای نشانگرهای AFLP، مطالعه تنوع، تجزیه مجموعه‌های ژنتیکی، تجزیه فاصله ژنتیکی و بررسی ژنتیک فرد، شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفت موردنظر، ایجاد نقشه های نشانگری،همسانه‌سازی ژن‌ها، تجزیه فیلوژنی و تکامل، شناسایی واریته‌ها و مطالعه ژنتیک جمعیت (۶)، بررسی انگشت‌نگاری

مکاتبه کننده:بدرالدین ابراهیم سید طباطبائی
E-mail: Sayedt@cc.iut.ac.ir

1. Germplasm

Archive of SID
www.SID.ir

RNA با استفاده از الگوی cDNA (۱۰) و همچنین بررسی چند شکلی تک نوکلئو تیدی[1] (۷) می‌باشد.

اطلاعات مورد استفاده در بررسی روابط ژنتیکی ارقام انار ایران، تا کنون خصوصیات مورفولوژیکی بوده است که به دلیل متغیر بودن در شرایط اقلیمی متفاوت و نیز انتشارات غیر علمی محلی، چندان معتبر نمی‌باشد. بنابراین، به نظر می رسد استفاده از روش‌های مولکولی برای طبقه بندی و تعیین شناسنامه ارقام متنوع انار در ایران مطلوب‌تر است.

طالبی (۱۳۸۱) تنوع ژنتیکی ۲۸ رقم انار ایرانی از کلکسیون مرکز تحقیقات کشاورزی استان یزد را با استفاده از نشانگر RAPD قرار داد (۴). روش AFLP به دلیل میزان بالای تکثیر قطعات و قدرت وضوح بالاتر نسبت به نشانگر RAPD اطلاعات بیشتری از ساختار ذخایر ژنتیکی این گیاه برای پیشبرد برنامه های به نژادی، ارائه می دهد (۶). در این پژوهش کارایی روش AFLP در بررسی چند شکلی ارقام انار مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهي

یازده رقم انار شامل پوست سیاه، شهوار شیرین، آمنه خاتونی، تب و لرز، اردستانی پوست سفید، بی هسته خفر، دم انبروتی، پنجه عروس خفر، دبه ای بم، دختر حمومی و خفری پوست قرمز از بین ارقام موجود در کلکسیون مرکز تحقیقات کشاورزی استان یزد انتخاب گردید. انتخاب ارقام براساس شباهت ها و تفاوت های موجود در بین آنها که بر اساس نشانگر RAPD، توسط طالبی (۱۳۸۱) دسته‌بندی شده بودند (۴) صورت گرفت. برای بررسی ژنوتیپ های با اسامی مشابه در مناطق مختلف، تعداد پنج ژنوتیپ از ارقام آمنه خاتونی و پوست سیاه از کلکسیون مرکز تحقیقات کشاورزی استان های یزد و اصفهان انتخاب گردید.

استخراج DNA

استخراج DNA ژنومی طبق روش موری و تامسون که توسط طالبی (۱۳۸۱) تغییر یافته، صورت گرفت که مراحل آن به شرح زیر است، مقدار نیم گرم برگ از هر نمونه در حضور ازت مایع پودر گردید، سپس مقدار پنج میلی لیتر از بافر استخراج

(Sodium EDTA ۲۰ میلی‌مول، Tris-HCl (pH ۸ ۱۰۰ میلی‌لیتر، NaCl ۱/۴ میلی‌مول، CTAB (W/V) ۲٪، β-mercaptoethanol ۰/۲٪) به هر نمونه اضافه شده و مخلوط گردید. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. خالص‌سازی DNA به روش کلروفرم – ایزوآمیل الکل صورت گرفت و سپس به اندازه ۰/۶ حجم محلول به آن ایزوپروپانل خالص سرد اضافه گردید. لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند تا DNA در کف لوله رسوب گردد. رسوب محتوی DNA دوبار با اتانول ۷۰٪ شستشو داده شده و سپس رسوب حاصله خشک گردید. به DNA رسوب داده شده هر نمونه ۷۰۰ میکرولیتر آب مقطر دوبار استریل افزوده شده و نمونه‌ها به مدت یک شب در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید تا توده DNA داخل آب مقطر حل شود. مقدار ۳ میکرولیتر (۱۰ mg/ml) RNaseA به هر نمونه اضافه گردید و لوله به مدت یک ساعت در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. هم حجم محلول داخل هر نمونه کلروفرم – ایزوآمیل الکل(۲۴:۱) افزوده شد و مخلوط حاصل به مدت ۲ دقیقه در ۱۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. خالص سازی DNA به روش کلروفرم – ایزوآمیل الکل دوباره تکرار گردید و پس از برداشت نهایی به لوله جدید انتقال یافت. به اندازه ۰/۱حجم نمونه استات سدیم سه مولار (۴/۸ pH) و دو حجم اتانول خالص سرد به هر نمونه افزوده شد. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شده و رسوب حاصله با اتانول ۷۰٪ دوبار شستشو داده شد و در شرایط آزمایشگاه خشک گردید. DNA استخراج شده از نمونه‌ها تا زمان اندازه‌گیری مقدار و کیفیت آنها در ۲۰ – درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. کمیت و کیفیت DNA با استفاده از طیف جذبی آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ۵۳۰ Beckman DU و روش ژل آگارز اندازه‌گیری شد.

تکنیك AFLP

انجام واکنش AFLP ۴۰ بر اساس روش ووس و همکاران (۱۹۹۵) صورت گرفت (۱۲). به منظور برش DNA از آنزیم‌های

1. Single Nucleotide Polymorphism

Archive of SID

www.SID.ir

*Eco*RI و *Tru*9I (ایزوشیزومر[1] *Mse*I) استفاده گردید، مراحل انجام واکنش به ترتیب زیر می‌باشد:

برش DNA ژنومي

اجزاء واکنش میکرولیتری عبارت بود از ۵ میکرولیتر DNA (۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر)، ۴ میکرولیتر بافرOPA[2] (۱۰۰ µl استات منیزیم ۵۰ mM، ۲۵۰ µl استات پتاسیم ۲۵۰ mM، ۵۰ µl Tris-HCl ۵۰ mM که با آب مقطر به حجم ۱۰۰۰ µl رسانده شد) ۰/۵ میکرولیتر آنزیم برشی *Eco*RI (۱۰ واحد در میکرولیتر)،۰/۵ میکرولیتر آنزیم برشی *Tru*9I (۱۰ واحد در میکرولیتر). این واکنش در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۲ ساعت به طول انجامید.

اتصال آداپتور:

بدلیل کاهش فعالیت آنزیم‌ها در اثر زمان طولانی مرحله برش به هر نمونه برش خورده ۱/۲۵ واحد از آنزیم‌های برشی *Eco*RI و *Tru*9I اضافه گردید. برای تهیه آداپتور EcoRI از آغازگرهای رفت (۳َ- CTCGTAGACTGCGTACC -۵َ) و برگشت (۳َ-AATTGGTACGCAGTCTAC -۵َ) و برای تهیه آداپتور MseI از آغازگرهای رفت (۳َ-GACGATGAGTCCTGAG-۵َ) و برگشت (۳َ- TACTCAGGACTCAT-۵َ) استفاده شد.

اجزاء واکنش اتصال شامل ۴۰ میکرولیتر DNA برش خورده، یک میکرولیتر آداپتور EcoRI (۵ پیکو مول)، یک میکرولیتر آداپتور MseI (۵۰ پیکومول)، یک میکرولیتر بافر OPA، یک میکرولیتر از آنزیمهای برشی *Eco*RI و *Tru*9I (۱/۲۵ واحد در میکرولیتر) و یک میکرولیتر T4-DNA لیگاز (۵ واحد در میکرولیتر) بودند. این واکنش در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت به طول انجامید.

تکثیر پیش انتخابي

قبل از انجام این مرحله، DNA حاصل از مراحل برش و اتصال به نسبت ۵:۱ رقیق گردید. در این مرحله آغازگرهای بدون نوکلئوتید اضافی در انتهای ۳َ آغازگر، E000 (۳َ- GACTGCGTACCAATTC -۵َ) و M000 (۳َ- GATGAGTCCTGAGTAA -۵َ) استفاده شد. برنامه PCR به صورت ۳۰ چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه‌سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۶۰ثانیه بود. اجزاء واکنش ۲۵ میکرولینری برای تکثیر پیش انتخابی شامل ۳ میکرولیتر DNA حاصل از مرحله اتصال، یک میکرولیتر آغازگر M000 (۵۰ نانوگرم)، یک میکرولیتر آغازگر E000 (۵۰ نانوگرم)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰ برابر)، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط نوکلئوتیدی (۱۰ میلی‌مول)، ۰/۲ میکرولیتر *Taq* پلی مراز (۵ واحد در میکرولیتر) و ۱۶/۸ میکرولیتر آب مقطر استریل بودند. ترموسایکلر Ependorf مدل Mastercycler-gradiant مورد استفاده قرار گرفت. جهت تایید مراحل انجام روش، ۴ میکرولیتر از محصولات این مرحله با دو میکرولیتر بافر نمونه‌گذاری مخلوط و روی ژل آگارز ۰/۷ درصد TAE و با ولتاژ ۸۰ ولت به مدت ۲۰ دقیقه الکتروفورز گردید. مشاهده نوار اسمیر روی ژل بعد از رنگ آمیزی توسط اتیدیوم بروماید تحت نور ماوراء بنفش معیاری برای اجرای موفق روش تا این مرحله تلقی گردید.

تکثیر انتخابي

در این مرحله DNA حاصل از تکثیر پیش انتخابی به میزان ۲۰ برابر با آب مقطر استریل رقیق گردید و بعنوان الگو در واکنش مورد استفاده قرار گرفت. برنامه PCR شامل سه قسمت بود: قسمت اول شامل یک چرخه ۹۴ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه)، ۶۵ درجه سانتی گراد (۳۰ ثانیه) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۶۰ ثانیه). قسمت دوم شامل ۱۲ چرخه ۹۴ درجه سانتی گراد (۳۰ ثانیه)، ۶۵ درجه سانتی گراد (۳۰ ثانیه) و ۷۲ درجه سانتی گراد (۶۰ ثانیه) که در هر چرخه به میزان ۰/۷ درجه سانتی گراد از دمای اتصال کاهش می‌یافت[3]. قسمت سوم شامل ۲۳ چرخه ۹۴ درجه سانتی گراد (۳۰ ثانیه)، ۵۶ درجه سانتی گراد (۳۰ ثانیه) و ۷۲ درجه سانتی گراد (۶۰ ثانیه). اجزاء واکنش ۱۰ میکرولیتری تکثیر انتخابی عبارت بود از ۱/۵ میکرولیتر DNA حاصل از تکثیر پیش انتخابی، ۲ میکرولیتر از آغازگرهای انتخابی (۳باز) +E و (۳باز) +M (۳۰ نانوگرم)، یک

1. Isoschizomer
2. ONEPhoreAll Buffer
3. Touch down

Archive of SID

www.SID.ir

میکرولیتر بافر PCR (۱۰ برابر)، ۰/۲۵ میکرولیتر مخلوط نوکلئوتیدی (۱۰میلی مول)، ۰/۱ میکرولیتر *Taq* پلی مراز (۵ واحد در میکرولیتر) و ۳/۱۵ میکرولیتر آب مقطر استریل. ۱۰ ترکیب آغازگری مورد استفاده در جدول شماره ۱ آمده است.

جدول ۱- توالی و ترکیب آغازگرهای واکنش انتخابی (توالی ارائه شده بر اساس بازهای انتخابی انتهای ۳´ آغازگر می باشد)

۱	E (ACG)- M(CTC)	۶	E (AAA)- M(CAC)
۲	E (ACT)- M(CCC)	۷	E (AAC)- M(CTG)
۳	E (AGA)- M(CGA)	۸	E (AAG)- M(CTA)
۴	E (AGC)- M(CTC)	۹	E (AAT)- M(CGT)
۵	E (ATT)- M(CAC)	۱۰	E (ACA)- M(CCC)

تك رشته‌اي كردن قطعات تكثير شده

به منظور واسرشت سازی قطعات تکثیر شده، فراورده های حاصل از تکثیر انتخابی را با حجمی مساوی ۱۰ میکرولیتر از بافر نمونه گذاری فرم آمید[1] (فرم آمید ۹۶٪، EDTA ۱۰ میلی مول، برمو فنول بلو[2] و زیلن سیانول[3]) مخلوط و پس از ۳ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد سریعاً روی یخ قرار داده شد.

الکتروفورز DNA

به منظور مشاهده الگوی نواری، محصولات PCR ژل پلی اکریل آمید ۷ درصد واسرشت تهیه گردید. سپس الکتروفورز مقدماتی (بدون نمونه گذاری) به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط ولتاژ ۲۰۰ ولت و دمای الکتروفورز ۵۰ – ۴۵ درجه سانتی گراد صورت گرفت. الکتروفورز فراورده های PCR در ولتاژ ثابت ۲۰۰ ولت و مدت زمان ۱۱۰ دقیقه و دمای ژل در طول الکتروفورز ۵۰ – ۴۵ درجه سانتی گراد صورت گرفت. پس از الکتروفورز، رنگ آمیزی با نیترات نقره انجام شد و از ژل عکس برداری گردید (شکل ۲).

تجزیه داده ها

پس از انجام روش AFLP وجود و عدم وجود نوار با اعداد صفر و یک برای ارقام مورد مطالعه مشخص گردید. پس از تشکیل ماتریس تشابه، تجزیه داده ها با استفاده از نرم افزار NTSYS-pc ver ۲/۰۲ به طریق تجزیه خوشه ای انجام گرفت.

نتایج و بحث

در این تحقیق ۱۰ ترکیب آغازگری روی ۱۱ رقم انار انتخاب شده مورد ارزیابی قرار گرفت. آغازگر های به کار رفته در مجموع ۱۸۷۰ نوار تولید کردند که در محدوده ۵۰ تا ۸۰۰ جفت بازی قرار داشتند. به طور میانگین تعداد نوار در آغازگر ۱۸/۷ و متوسط آن در رقم ۱۷ بود. متوسط تعداد نوار چند شکل در آغازگر ۷ بدست آمد. ماتریس تشابه براساس ضریب تشابه جاکارد و تجزیه خوشه ای با استفاده از روش UPGMA انجام گرفت (شکل ۱). بیشترین تشابه بین ارقام دبه ای بم و دختر حمومی با ضریب تشابه ۷۹/۱ درصد و کمترین تشابه بین ارقام پوست سیاه و آمنه خاتونی با ضریب تشابه ۲۰/۳ درصد بدست آمد. پس از برش خوشه بندی داده‌های حاصل از AFLP در فاصله ژنتیکی ۰/۶۴ هفت رقم در دو گروه جای گرفتند و چهار رقم باقیمانده هر کدام یک گروه را تشکیل دادند.

گروه اول: ارقام تب ولرز، بی هسته خفر، دم انبروتی و اردستانی پوست سفید شامل دو زیر گروه الف) تب و لرز، بی هسته خفر، دم انبروتی و ب) اردستانی پوست سفید

گروه دوم: ارقام دبه‌ای بم، دختر حمومی و خفری پوست قرمز شامل دو زیر گروه الف) دبه‌ای بم، دختر حمومی ب) خفری پوست قرمز

ارقام پوست سیاه، شهوار شیرین، پنجه عروس خفر و آمنه خاتونی هر کدام در یک گروه جداگانه قرار گرفتند.

رابطه منطقی بین داده‌های حاصل از آنالیز مولکولی و داده‌های مورفولوژیک به دلیل تاثیر عوامل محیطی و ماهیت نیمه تصادفی بودن نشانگر مولکولی AFLP وجود نداشت. طالبی (۱۳۸۱) نیز عدم تطابق گروه‌بندی ارقام انار بر اساس نشانگر RAPD با صفات مورفولوژیک را بیان نموده است (۴). در مطالعه‌ای در گندم مشخص شده است که توزیع نشانگرهای AFLP در این گیاه در نزدیک نواحی سانترومری متمرکز می‌باشد (۱۴)، این موضوع می‌تواند دلیلی برای عدم تطابق داده‌های مولکولی و مورفولوژیک باشد.

1. Dye Formamide
2. Bromophenol Blue
3. Xylen Cyanole

Archive of SID

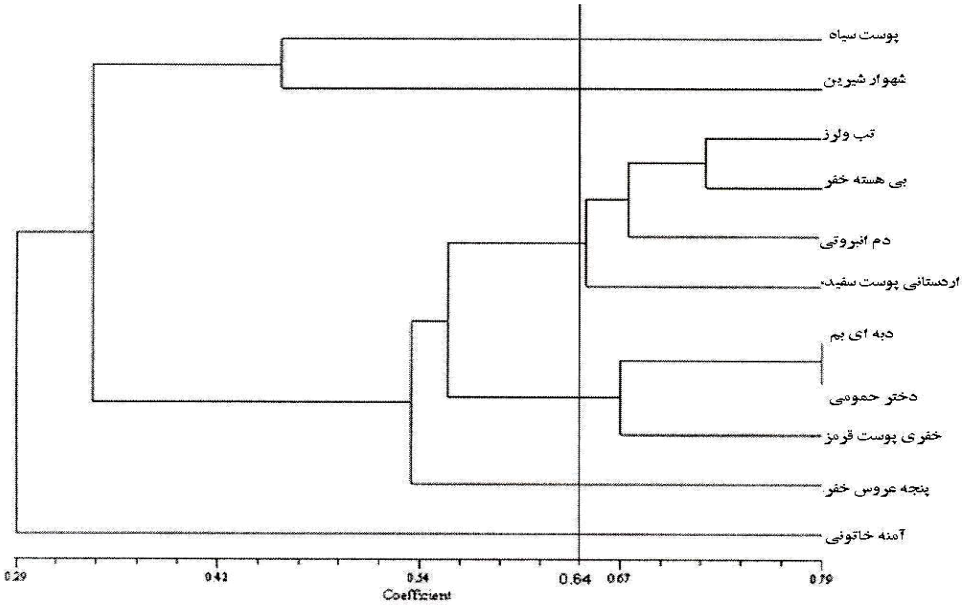
www.SID.ir

جمع آوری ۷۶۰ رقم انار از مناطق مختلف کشور نشان دهنده تنوع گسترده این محصول در ایران می باشد لذا سطح چند شکلی پایینی در ارقام مورد ارزیابی بدست آمد. طالبی نیز با تاکید بر این موضوع علت پایین بودن تنوع ژنتیکی ارقام را مربوط به تکثیر رویشی می‌داند (۴). تنوع ژنتیکی پایین این ارقام می تواند مربوط به تکثیر رویشی آنها باشد، زیرا انار به وسیله قلمه و پا جوش تکثیر می‌شود و گیاهانی که از این طریق به وجود می‌آیند یکنواختی ژنتیکی دارند، مگر اینکه تغییراتی مانند جهش در طول رشد درخت، آنها را از یکدیگر متمایز نماید که به عنوان دو رقم جداگانه معرفی گردند، اگر چه این گیاهان ممکن است فاصله ژنتیکی چندانی نداشته باشند (۴). در مطالعه‌ای که روی شناسایی و انگشت نگاری ژنتیکی بعضی گونه‌های درختان میوه مناطق معتدله با استفاده از نشانگرهای DNA انجام شده، چنین نظری تایید گردیده است (۱۶). ظاهراً سطح تنوع بالای چند شکلی در بین ارقام و عدم تنوع درون ارقام به خاطر تکثیر رویشی است (۱۶).

برخی ارقام عمده تجاری تعدادی از گونه های درختان میوه مانند سیب ، حاصل جهش های رویشی هستند (۱۶).

شکل۱- دندروگرام ۱۱ رقم انار براساس داده های حاصل از نشانگر AFLP گروه بندی ارقام بر اساس داده های AFLP با گروه بندی حاصل از RAPD که توسط طالبی (۱۳۸۱) ارائه شده، تفاوتها و تشابهاتی دارد. ارقام پوست سیاه و پنجه عروس خفر در روش AFLP مانندRAPD به تنهایی در یک گروه جداگانه قرار گرفتند. بنابراین با توجه به خصوصیات ظاهری رقم پوست سیاه و زینتی بودن رقم پنجه عروس و صرف نظر از مبدا جغرافیایی آنها می توان نتیجه گرفت که این ارقام در سطح DNA نیز با سایر ارقام تفاوت معنی داری دارند.

قرار گرفتن ارقام دختر حمومی و دبه ای بم در روش RAPD و AFLP در یک گروه نشان دهنده تشابه ژنتیکی این دو رقم می باشد. تفاوت هایی در نتایج RAPD و AFLP وجود دارد که می تواند مربوط به مسائل تکنیکی، تعداد زیاد لوکوس در AFLP، پوشش ژنومی نشانگر و اشتباه در امتیاز بندی باشد. تفاوت در نتایج RAPD و AFLP واشیرا و همکاران (۲۰۰۱) و فردیناندز و همکاران (۲۰۰۲) نیز گزارش شده است. گروه بندی ارقام انار بر اساس داده های AFLP تعداد نوار چند شکل بیشتری را نسبت به داده های RAPD نشان می دهد. تعداد نوارهای تکثیر شده به ازای هر آغازگر AFLP ده برابر بیشتر در مقایسه با تعداد نوارهای تکثیر شده هر آغازگر RAPD می باشد. فردیناندز و همکاران نیز این نتایج را در گیاه برومو گراس گزارش کردند(۸).



شکل۱- دندروگرام ۱۱ رقم انار براساس داده های حاصل از نشانگر AFLP

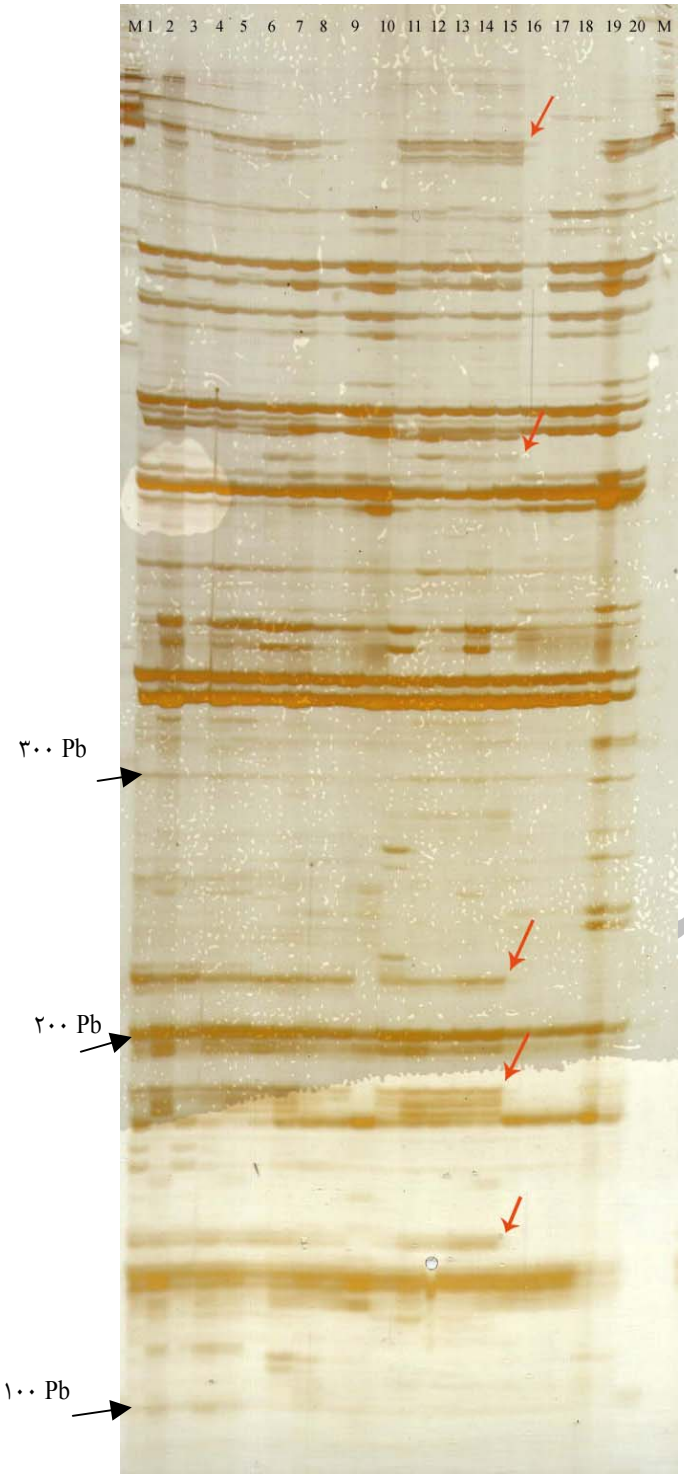
Archive of SID
www.SID.ir

موقعیت قطعات RAPD و AFLP در ژنوم انار ناشناخته است و پوشش ژنومی هر یک از این نشانگرها می‌تواند با یکدیگر متفاوت باشد، در نتیجه امکان برآورد دامنه وسیعی از فاصله ژنتیکی بین ارقام وجود خواهد داشت. هر چند که نشانگر AFLP در مقایسه با RAPD اطلاعات بیشتری برای ارزیابی روابط ژنتیکی بین افراد در اختیار قرار می‌دهد، اما به نظر می‌رسد هر دو نشانگر برای گروه‌بندی و برآورد روابط ژنتیکی ارقام انار می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند. ولی نشانگر AFLP بدلیل تکرارپذیری، ارزیابی تعداد مکان بیشتر در یک ژل و قابلیت اعتماد بالای آن بهتر است در مطالعات بعدی مورد توجه قرار گیرد.

بررسي ژنوتيپ‌هاي با اسامي مشابه در مناطق مختلف

الگوی نواربندی ارقام با اسامی مشابه پس از انجام آزمون AFLP بوسیله ترکیب آغازگری E+AGA و M+CGA نشان داد که در بین ژنوتیپ‌های یک رقم و همچنین بین دو منطقه جغرافیایی تفاوت وجود دارد (شکل ۲). علت این تفاوت‌ها می‌تواند به نوع تکثیر انار و تغییرات سوماکلونال[1] در گیاهان مربوطه باشد (۱). گرده افشانی انار به دو طریق خود گرده افشانی و دگر گرده افشانی صورت می‌گیرد، اما به دلیل شکل خاص گل ممکن است که میزان خودگشنی در آن بیشتر باشد (۱). مقدار کم دگرگشنی ممکن است باعث این تفاوت ژنتیکی در بین ژنوتیپ‌های با اسامی مشابه در مناطق مختلف باشد.

ارزیابی تنوع ژنتیکی به روش تکثیر گیاهان بستگی دارد، گونه‌هایی مانند انار که با تکثیر رویشی زیاد می‌شوند، تنوع بسیار کمی را در طی نسل‌ها نشان می‌دهند و تغییرات ژنتیکی اندکی بوسیله تغییرات سوماکلونال در این گیاهان ایجاد می‌گردد. با توجه به اینکه در آزمون AFLP فقط بخشی از ژنوم هسته‌ای استفاده شده است، این احتمال وجود دارد که تعدادی از صفات متنوع در انار وراثت مادری داشته باشند. بنابراین درک بهتر این تفاوت‌ها در الگوی نواری ژنوتیپ‌های فوق نیاز به مطالعات بیشتر و منظور نمودن وراثت مادری در آن دارد.



شکل ۲- الگوی نواری ژنوتیپ‌های با اسامی مشابه در دو منطقه اصفهان و یزد (M مارکر bp ۱۰۰، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ رقم پوست سیاه یزد، ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ رقم پوست سیاه اصفهان، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴ و ۱۵ رقم آمنه خاتونی یزد و ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹ و ۲۰ رقم آمنه خاتونی اصفهان)

1. Somaclonal variation

Archive of SID

www.SID.ir

منابع مورد استفاده **REFERENCES**

۱. بهزادی شهر بابکی، ح.۱۳۷۷. پراکندگی و تنوع ارقام انار در ایران، نشر اموزش کشاورزی.
۲. ستاری، ح. ۱۳۸۰. کشت بافت و ریز افزایی انار مینیاتوری، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز.
۳. شاهسواران، ا. ۱۳۸۰. کاربردهای بیوتکنولوژی گیاهی و اهمیت آن برای کشور، شبکه تحلیلگران تکنولوژی ایران.
۴. طالبی، م. ۱۳۸۱. تنوع ژنتیکی ارقام انار ایران بر اساس تجزیه و تحلیل RAPD، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان.
5. Money, T., S.,Reader, J. L., Qu, R. P.,Dunford, & G., Moore. 1996. AFLP- based mRNA fingerprinting, Nucl. A. Res., 24,2616-2617.
6. Muller, U. G. & L. Wolefenbager. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting, Tree,14, 389-394,.
7. Nicod, J.C. & C. R., Largiader. 2003. SNPs by AFLP (SBA) : a rapid SNP isolation strategy for non-model organisms, Nucl. A. Res.,31, 389-394.
8. Ferdinandez, Y. & B. Coulman. 2002. Evaluating genetic variation and relationships among two bromograss species and their hybrid using RAPD and AFLP markers, Euphytica, 125, 281-291.
9. Rohlf, F. J..1998. NTSYS-pc Numerical taxonomy and Multivariate analysis system, Exeter software, setauket, New York.
10. Savolkool, P. H. M., H. J. M. Aarts, J. Dehass, L. Dijkshoorn, B. Duim, M. Otsen, J. L. W. Rademaker, L. Schouls & J.A. Lenstra.1999. Amplified Fragment Length Polymorphism analysis: the state an art, Clin. Micr., 37, 3083-3091.
11. Soleimani, V. D., B. R. Baum, & D. A. Johnson.2002. AFLP and pedgree-based genetic diversity estimates in modern cultivars of durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. durum (Desf.) Husn.), Theor. Appl. Genet., 104, 350-357.
12. Vos , P. , R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, D. L. Theo van, M. Hornes, A. Frijers, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper & M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting , Nucl. A. Res., 23, 4407-4414.
13. Wachira, F., J. Tanaka & Y. Tanaka. 2001. Genetic variation and differentiation in tea (*Caqmellia sinensis*) germplasm revealed by RAPD and AFLP variation, J. of Hort. Sci. & Biotech., 76, 557-563.
14. Wunsch, A. & J. I. Hormoza. 2002. Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers, Euphytica, 125,59-67.

Archive of SID

www.SID.ir