Archive of SID

مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ٦ شماره ٣ صفحه های ١١١ تا ١٢٠ (١٣٨٤)

تعیین روابط فیلوژنتیکی برخی نژادگان های انار ایران با استفاده از نشانگرهای ملکولی ISSR[1]

PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS AMONG SOME IRANIAN POMEGRANATE ACCESSIONS REVEALED BY INTER-SIMPLE SEQUENCE REPEAT (ISSR) MARKERS

سیروس قبادی، مرتضی خوشخوی و بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی[2]

چکیده

روابط فیلوژنتیکی بیست و چهار نژادگان انار ایران با استفاده از نشانگرهای ملکولی ISSR مورد بررسی قرارگرفت. در این بررسی پس از استخراج DNA و بهینه سازی شرایط آزمایش، شش آغازگر ISSR به صورت انفرادی و ترکیبی مورد استفاده قرارگرفتند. در مجموع ١٧٣ قطعه افزوده شد که ٦٧ قطعه از آن ها در بین نژادگان ها چند شکل بودند. ماتریس تشابه تشکیل و با استفاده از الگوریتم جاکارد در نرم افزار NTSYS Ver. 2.02 دندروگرام گروه بندی ارقام ترسیم شد. در دندروگرام به دست آمده در ضریب تشابه ٦٥٪، ارقام مورد مطالعه در پنج گروه جای گرفتند که ١٩ رقم آن ها یک گروه مستقل را تشکیل می دادند. با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می رسد که نشانگر ملکولی ISSR به دلیل تولید تعداد نوارهای چند شکل بیشتر و همچنین تکرار الگوی باندی، از کارآیی بیشتری برخوردار است. گروه‌بندی به دست آمده در بسیاری از مواقع با ویژگی های مورفولوژیک ارقام مورد بررسی در این پژوهش مطابقت نداشت.

واژه‌های کلیدی: انار، چند شکلی، درختان میوه، گوناگونی ژنتیکی، نشانگرهای ملکولی، ISSR.

مقدمه

از جمله درختان میوه‌ای که از زمان های بسیار قدیم در ایران کشت و کار می‌شده و اهمیت اقتصادی فراوان نیز دارد انار[3] می‌باشد. انار بیشتر در نواحی کویری با شرایط گرم و خشک در روز و هوای به نسبت سرد در شب و خاک‌های شور پرورش داده می‌شود (١). تاکنون طبقه‌بندی ارقام انار از راه بررسی ویژگی های مورفولوژیکی این گیاه در اقلیم‌های مختلف ایران صورت گرفته است که چنین گروه‌بندی به دلیل تأثیر شرایط اقلیمی متفاوت چندان معتبر نیست. این احتمال وجود دارد که در بعضی موارد انتقال یک رقم از ناحیه‌ای به ناحیه دیگر با تغییر نام رقم همراه شده و شناسایی دقیق این ارقام را دچار مشکل ساخته باشد. برای غلبه بر این مشکلات، شناسایی علمی‌تر و تشخیص دقیق‌تر ارقام انار الزامی به نظر می رسد (٣). با توجه به پیشرفت‌های زیادی که درکاربرد فنون‌های مولکولی برای تشخیص روابط فیلوژنتیک و گروه بندی تاکسونومیکی گیاهان زراعی و باغی (٣، ٨) صورت گرفته به نظر می‌رسد استفاده از این روش‌ها به تهیه شناسه ارقام گوناگون انار در ایران و همچنین طبقه‌بندی تاکسونومیکی آن ها کمک شایانی نماید.

١- تاریخ دریافت: ٨٣/٤/١٦ تاریخ پذیرش: ٨٤/٤/٢٢

٢- به ترتیب مربی بخش علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان (اکنون دانشجوی دکتری بخش علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز)، استاد بخش علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز و دانشیار بخش بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان, اصفهان, جمهوری اسلامی ایران.

٣- *Punica granatum* L.

www.SID.ir

Archive of SID

با توجه به گروه بندی هایی که با استفاده از نشانگر ISSR درتشخیص و جداسازی ارقام خیلی نزدیک به هم در درختان میوه مانند انگور (۱۰) و مرکبات (۵) صورت گرفته است و همچنین پژوهش هایی که با استفاده ار دیگر نشانگرهای مبتنی بر PCR مانند AFLP (۲) و RAPD (۳) در ارقام انار تجارتی ایران صورت گرفته نشان می دهد که با وجود گوناگونی مورفولوژیکی ارقام انار تفاوت های ژنتیکی بین این ارقام زیاد نمی‌باشد و بنابراین برای طبقه‌بندی دقیق‌تر ارقام، نیاز به فنون ها و نشانگرهایی است که هم قطعه های چند شکل[۱] زیاد تولید می کنند و هم تکرار پذیری[۲] بالاتری داشته باشند. از آن جا که تکرارپذیری و سادگی روش از جمله ویژگی‌های لازم برای انتخاب تکنیک نشانگرهای مولکولی می‌باشد، در بررسی های نقشه‌یابی ژنومی[۳] و گروه بندی های فیلوژنتیکی (۱٤، ۱۵)، بیشتر نشانگرهایی مورد نظر خواهند بود که افزون بر آن چه یاد شد، هم هزینه و زمان کمتری نیاز داشته باشند و هم دارای قدرت بیشتر در تولید قطعه های چند شکل و دقت بیشتر در جداسازی گوناگونی های ژنتیکی[٤] باشند.

نشانگر ISSR-PCR از جمله نشانگرهای نیمه تصادفی است که با آغازگرهای بدون جایگاه گزینش ولی دارای نوکلئوتیدهای تکراری مانند (GT)، (AC) و (AG) نسبت به ریزماهواره افزایش می یابد, بنابراین Microsatellite-primed PCR یا MP-PCR نیز نامیده شده است. فن ISSR-PCR نیازمند آگاهی های ابتدایی در مورد توالی ژنوم نیست و الگوهای چند شکلی زیاد و چند جایگاهی[۵] ایجاد می‌نماید. هر نوار تولید شده مربوط به قسمتی از توالی DNA است که با دو ریزماهواره معکوس پوشیده شده است. کاربرد نشانگر ISSR همانند RAPD ساده بوده و نیازمند صرف وقت زیاد نیست، اما تکرارپذیری و دقت آن به دلیل طویل‌تر بودن اندازه آغازگرشان در حد نشانگرهای ریزماهواره می‌باشد. نشانگرهای ISSR بیشتر به صورت نشانگرهای چیره[٦] جدا می شوند و به دلیل فراوانی تکرارهای دو نوکلئوتیدی (CA)، (AC)، (TC)، (CT)، (GA) و (AG) در ژنوم گیاهان قطعات چند شکل بیشتری تولید می‌کنند (۵، ۱٤، ۱۵، ۱۷). به بیان دیگر استفاده از آغازگرهای ISSR با تکرارهای (CA)، (AC)، (TC)، (CT) و (GA) نسبت به دیگر آغازگرهای ISSR دو، سه و چهار نوکلئوتیدی چند شکلی بیشتری نشان می دهند. اگر چه تکرار های (AT) فراوان ترین تکرارهای دو نوکلئوتیدی در گیاهان هستند ولی به طور معمول آغازگرهای ISSR به دلیل Self-annealing برمبنای تکرار (AT) طراحی نمی کنند، چون افزوده نمی شوند. استفاده از آغازگرهای ISSR را با تکرارهای سه و چهار نوکلئوتیدی کمتر از تکرارهای دو نوکلئوتیدی است (۱۵). از نشانگرهای ISSR در انگشت نگاری ژنومی[۷]، گوناگونی ژنتیکی و آنالیز فیلوژنتیکی، نقشه‌یابی ژنوم، مشخص نمودن فراوانی توالی‌های ریزماهواره و بررسی در جمعیت‌های طبیعی و جداسازی گونه‌ها استفاده می‌شود. از این رو پژوهش حاضر به دو منظور انجام شد: الف) استفاده از نشانگرهای ISSR-PCR درتعیین گوناگونی ژنتیکی بیست و چهار نژادگان انار ایرانی و ب) تائید تکرار پذیری آزمایش های بین آزمایشگاهی نشانگرهای ISSR.

مواد و روش‌ها

الف) مواد گیاهی

۱- Polymorphic ۲- Reproducibility ۳- Genome mapping ٤- Genetic variations
۵- Multi-locus ٦- Dominant markers ۷- Genomic fingerprinting

www.SID.ir

Archive of SID

بیست و چهار رقم انار با مزه‌های مختلف شیرین، ملس و ترش بر اساس شباهت‌ها و تفاوت‌های مورفولوژیک آن ها از بین ۷۶۲ رقم و نژادگان تجاری، محلی، وحشی و زینتی موجود در کلکسیون مرکز تحقیقات کشاورزی یزد برای انجام آزمایش ها انتخاب شد (جدول ۱). با استفاده از روش تغییر یافته موری و تامپسون [۱] (۱۱) از برگ های جوان، تازه و سالم نژادگان های[۲] گزیده شده انار، به طور جداگانه DNA استخراج شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز و دستگاه اسپکتروفتومتر (۳، ۱۱) اندازه گیری شد. در این آزمایش سه آغازگر به صورت جداگانه و سه آغازگر به صورت ترکیبی مورد استفاده قرار گرفت. آغازگرهای مورد استفاده دارای توالی‌های هشت مرتبه تکرار (AG)، (GT)، (GA)، (CT) و (GA) بودند (جدول ۲). یکی از آغازگرها در انتهای ′۵ خود ۳ نوکلئوتید گزینش داشت اما سایر آغازگرها دارای یک یا دو نوکلئوتید در انتهای ′۳ خود بودند.

جدول ۱- نام های نژادگان های گزیده شده انارهای ایرانی که در این بررسی استفاده شد.

Table 1. List of selected Iranian accessions of pomegranates used in this study.

کد Code	اسامی محلی نژادگان های انار Local name of accessions		نوع Type			
			زینتی Ornamental	ملس Mild	ترش Sour	شیرین Sweet
1	'Bihasteh Sangan'	'بی هسته سنگان'				x
2	'Pust Siah Yazdi'	'پوست سیاه یزدی'				x
3	'Garach Shahvar'	'گـرچ شهـوار'				x
4	'Tab va Larze'	'تب و لـرز'				x
5	'Bihasteh Ladiz'	'بی هسته لادیـز'				x
6	'Asali Sarvestan'	'عسلی سروستان'				x
7	'Shahvar Shirin'	'شهـوار شیرین'				x
8	'Nabati Ardekan'	'نبـاتی اردکان'		x		
9	'Dokhtar Hamumi Varamin'	'دختر حمومی ورامین'		x		
10	'Galugondeh Niriz'	'گلوگنده نیـریز'		x		
11	'Ameneh Khatuni'	'آمنه خاتـونی'		x		
12	'Tough Gardan'	'طـوق گـردن'		x		
13	'Golabi Hasteriz'	'گلابی هسته ریـز'		x		
14	'Hasibi Mehriz'	'حصیبی مهـریز'		x		
15	'Ardestani Pust Ghermez'	'اردستانی پوست قرمز'			x	
16	'Dabei Sarjangal'	'دبه ای سرجنـگل'			x	
17	'Kalegavi Khorasan'	'کله گاوی خـراسان'			x	
18	'Vahshi Narak Sarvestan'	'وحشی نرک سروستان'			x	
19	'Dom Anberuti'	'دم انبـروتی'			x	
20	'Penjeh Arus Khafr'	'پنجه عروس خفر'			x	
21	'Sabi Bam'	'سابـی بم'			x	
22	'Ardestani Pust Safid'	'اردستانی پـوست سفید'				x
23	'Torsh Maamuli Zabol'	'ترش معمولی زابل'			x	
24	'Golnaz Fars'	'گلناز فارس'	x			

۱- Murray and Thompson ۲- Genotype

www.SID.ir

Archive of SID

ب) استخراج DNA وتجزیه آغازگرها ی ISSR و شرایط واکنش PCR

برای انجام آزمایش های ISSR از آغازگرهای مکمل با توالی‌های ریزماهواره ای همراه با یک، دو و یا سه نوکلئـوتید گزینشی در انتهای'3 و انتهای '5 استفاده شد (جدول ۲). آنزیم *Taq* DNA polymerase و آمیخته نوکلئوتید ها (dNTPs) به همراه بافرهای مربوطه از شرکت Roche تهیه شد. مقدار ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده از هر نژادگان با غلظت ۲۵ نانو گرم در میکرولیتر (۵۰ نانو گرم DNA ژنومی) به ۱۳ میکرولیتر از آمیخته واکنش PCR شامل یک واحد *Taq* DNA polymerase، آغازگر (0.67 µM)، کلرید منیزیم (2 mM)، dNTPs (0.2 mM)، فرمامید (۲٪)، بافر PCR (1 X) و آب دوبار تقطیرشده سترون افزوده شد که در پایان حجم محلول واکنش PCR به ۱۵ میکرولیتر رسید.

جدول ۲- آغازگرهای ISSR مورد استفاده برای ارزیابی تفاوت های بین بیست و چهار نژادگان انارهای ایرانی.

Table 2. The ISSR primers used to assess variation among twenty four Iranian pomegranate accessions.

شماره No.	کد آغازگرها Primer	توالی آغازگرها Sequences (5'-3')	توالی آغازگرها Sequences (5'-3')
1	LK7	5' – $CCA(CT)_8$ - 3'	5' – CCACTCTCTCTCTCTCT - 3'
2	ISSR5	5' – $CCA(AG)_8$ T- 3'	5' – AGAGAGAGAGAGAGAGT - 3'
	ISSR6	5' – $(GA)_8$ C- 3'	5' – GAGAGAGAGAGAGAGAC - 3'
3	ISSR10	5' – $(GT)_8$ A- 3'	5' – GTGTGTGTGTGTGTGTAT - 3'
	ISSR11	5' – $(AG)_8$ YT- 3'	5' – AGAGAGAGAGAGAGAGYT - 3'
4	ISSR11	5' – $(AG)_8$ YT- 3'	5' – AGAGAGAGAGAGAGAGYT - 3'
	ISSR12	5' – $(GA)_8$ YT- 3'	5' – GAGAGAGAGAGAGAGAYT - 3'
5	ISSR11	5' – $(AG)_8$ YT- 3'	5' – AGAGAGAGAGAGAGAGYT - 3'
6	ISSR12	5' – $(GA)_8$ YT- 3'	5' – GAGAGAGAGAGAGAGAYT - 3'

Y= pyrimidine

پس از افزودن یک قطره روغن معدنی سترون آمیخته به دست آمده بی درنگ به مدت یک ساعت تحت واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه ترمال سایکلر اپندورف برای ۳۵ چرخه بر اساس برنامه تناوب دمایی[1] مورد استفاده قرار داده شد. در برنامه تناوب دمایی, آمیخته واکنش ۵ دقیقه در دمای ۹٤ درجه سانتیگراد، سپس ۳۰ ثانیه در۹٤ درجه سانتیگراد، ٤٥ ثانیه در٤٥ درجه سانتیگراد و ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد و درپایان ٦ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد افزوده شد. سپس فرآورده های افزایشی تا انجام الکتروفورز در ٤ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. به هنگام انجام الکتروفورز، به آمیخته واکنش درهر لوله مقدار هم حجم آن بافر بارگـذار[2] فرمامید افزوده شد. مقدار ۵ میکرو لیتر از آمیخته به دست آمده در چاهک‌های ژل پلی‌اکریل آمید ٦٪ واسرشت[3] بارگـذاری شد. نمونه‌ها به مدت دو ساعت با ولتاژ ثابت ۱۰۰ در دستگاه الکتروفورز عمودی Sequencing gel مدل S2 ساخت شرکت Biometra رانده شدند.

۱- Temperature profile ۲- Loading buffer ۳- Denatured gel ٤- Silver staining

www.SID.ir

Archive of SID

پس از پایان مرحله الکتروفورز، ژل به روش نیترات نقره[٤]، ۱۰ دقیقه در اسید استیک ۱۰٪، ۱۰ دقیقه در محلول نیترات نقره ۰/۲٪، ۱۰ ثانیه در آب مقطر دوبار تقطیر شده و ۲ دقیقه در محلول هیدروکسید سدیم ۳٪ و فرمالدهید ۰/۵٪ به ترتیب رنگ آمیزی شد. پس از مشاهده ژل روی Illuminator نوارهای چند شکل از روی آن با اعداد ۰ و ۱ کد گذاری و ماتریس داده ها تشکیل داده شد. محاسبه های آماری وگروه‌بندی ارقام پس از تشکیل ماتریس داده ها برابر با استفاده از ضرایب تشابه جاکارد[۱] ماتریس تشابه انجام و کلاستربندی به روش UPGMA در نرم‌افزار NTSYS Ver. 2.02 صورت گرفت.

نتایج و بحث

الف) افزایش قطعه های چند شکل با آغازگرهای ISSR

تمام آغازگرهای مورد آزمایش در بین دو یا چند رقم چند شکلی نشان دادند و درمجموع ۱۷۳ نوار تولید کردند. ٦۷ نوار از نوارهای تولید شده چند شکل و بقیه یک شکل[۲] بودند. بیشترین قطعه های چند شکل تمام آغازگرهای مورد آزمایش بین دو یا چند رقم چند شکلی نشان دادند و درجمع ۱۷۳ نوار تولید کردند. ٦۷ نوار از نوارهای تولید شده چند شکل و بقیه یک شکل بودند. بیشترین قطعه های چند شکل در ژل مربوط به آغازگر ISSR11 (شکل ۱) و کمترین قطعه های چندش شکل در ژل مربوط به آغازگر ISSR11+ISSR12 بود (شکل ۲). اندازه قطعه های افزوده شده بین ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز متغیر بود. در این آزمایش قطعه های با اندازه بین ۱۵۰ تا ۲۵۰۰ جفت باز برای ثبت کردن[۳] در نظر گرفته شدند. به تقریب در بیشتر نژادگان ها نوارهای چندشکل دیده شد و تعداد قطعه های چند شکل در هر آغازگر به طور متوسط ۱۰ قطعه در نظر گرفته شد (جدول ۳).

ب) روابط فیلوژنتیک بین نژادگان ها

نوارهای چند شکل تولید شده توسط شش آغازگر تک توالی و ترکیبی، بر اساس وجود و یا عدم وجودشان در ژل کد گذاری شدند و با استفاده از نـــرم‌افزار NTSYS Ver. 2.02 و با روش جاکارد، ماتریس تشابه آن ها تشکیل (۹) و دندروگرام مربوط به بیست و چهار نژادگان مورد آزمایش (جدول۱) به روش UPGMA Cluster analysis ترسیم شد (شکل ۳). نتایج به دست آمده از ماتریس تشابه نشان داد که کمترین شباهت ۲۹٪ مربوط به ارقام 'دبه‌ای سرجنگل'، 'کله گاوی خراسان' و 'پوست سیاه یزدی' است و بیشترین شباهت ۹۳٪ بین دو رقم 'دم انبروتی' و 'گلابی هسته ریز' وجود دارد. در دندروگرام ترسیم شده بیست وچهار نژادگان مورد استفاده در چهار گروه قرار گرفتند، گرچه دارای ارزش تشابه درون گروهی یکسان نبودند و به بیان دیگر ارزش تشابه[٤] آن ها بزرگتر از ٦۵٪ بود.

۱- JACCARD ۲- Monomorph ۳- Scoring ٤- Similarity value

www.SID.ir

Archive of SID

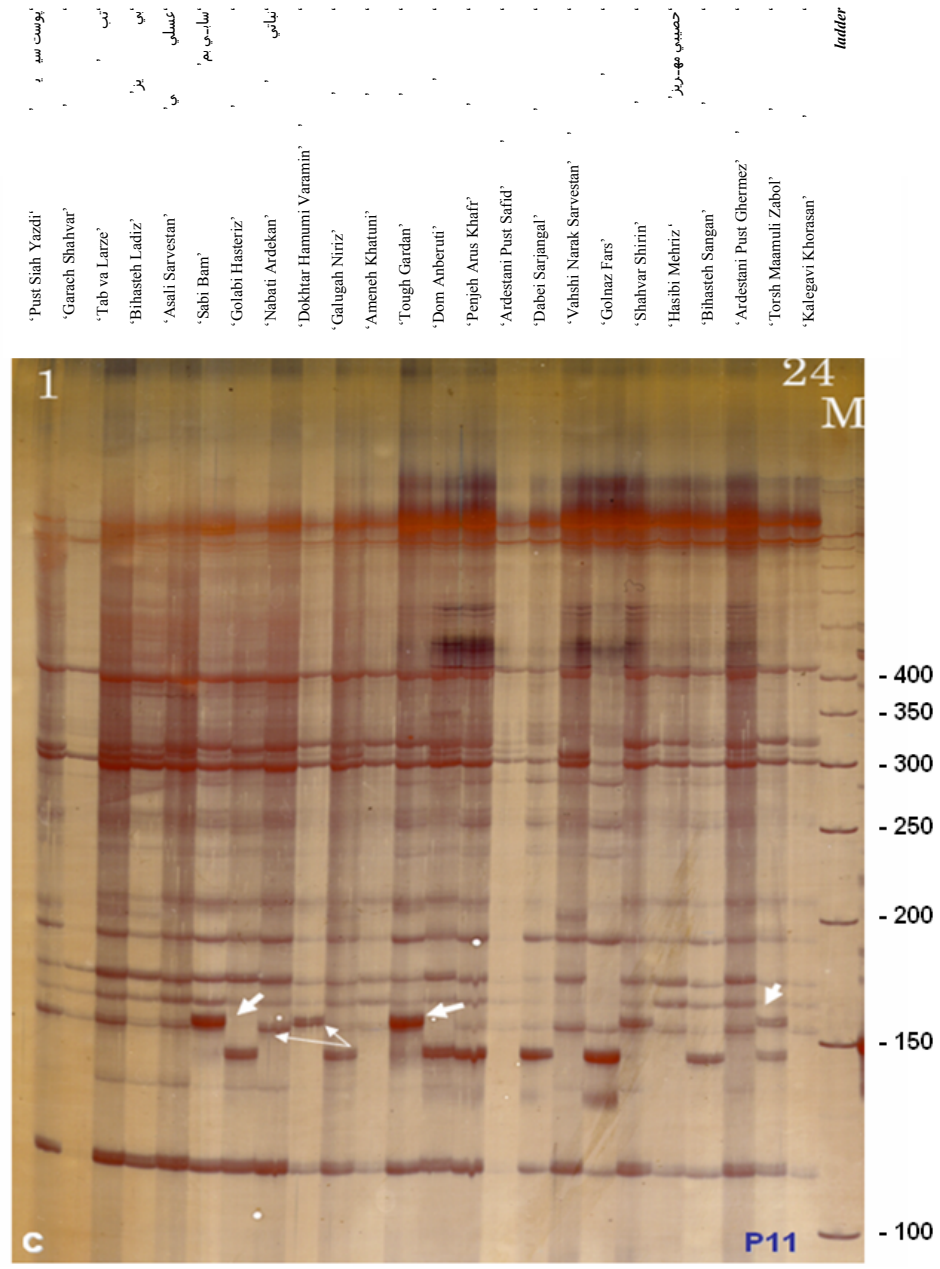

Fig. 1. ISSR-PCR band profiles generated by the primer ISSR 11 with the sequencees 5' – $(AG)_8$ YT- 3' for the Iranian pomegranate accessions included in this study.

شکل ۱- پروفایل قطعه های تولیده شده با آغازگر ISSR 11 با توالی 5' – $(AG)_8$ YT- 3' در نژادگان های انارهای ایرانی مورد استفاده. نوارهای چند شکل با علامت پیکان مشخص شده اند.

www.SID.ir

Archive of SID

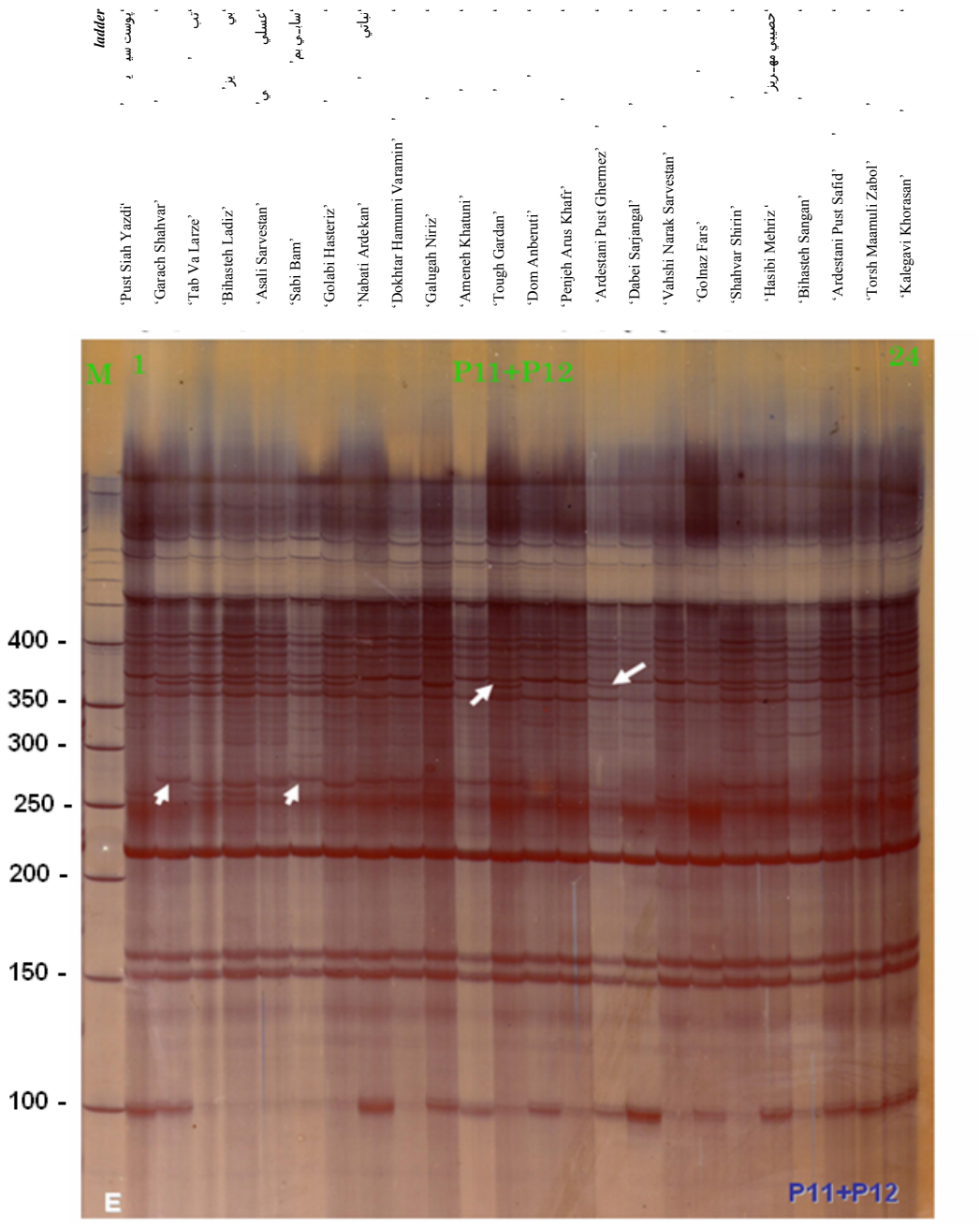

Fig. 2. ISSR-PCR band profiles generated by the primers ISSR 11 and ISSR 12 with the sequences 5' – (AG) $_8$ YT- 3' + 5' – (GA) $_8$ YT- 3'used in pairs for the Iranian pomegranate accessions included in this study.

شکل ۲- پروفایل قطعه های تولیده شده با آغازگر ترکیبی ISSR 11+ ISSR 12 با توالی 5' – (AG) $_8$ YT- 3' + 5' – (GA) $_8$ YT- 3' در نژادگان های انارهای ایرانی مورد استفاده. نوارهای چند شکل با علامت پیکان مشخص شده اند.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳ – اسامی آغازگرها و نژادگان والی های آن ها و تعداد قطعه های چند شکل تولید شده در نژادگان

Number of generated fragments		تعداد قطعه های تولید شده	
آغازگرها Primers	توالی آغازگرها و یا ترکیب آغازگرها Sequences of primers or pairs of primers	کل Total	تعداد قطعه های چند شکل Polymorph fragment no.
LK 7	5' – CCA$(CT)_8$ - 3'	32	10
ISSR 5 + ISSR 6	5' – CCA$(CT)_8$ - 3' + 5' – $(GA_8$ C- 3'	25	8
ISSR 10 + ISSR 11	5' – $(GT)_8$ A- 3' + 5' – $(AG)_8$ YT- 3'	38	13
ISSR 11	5' – $(AG)_8$ YT- 3'	26	16
ISSR 12	5' – $(GA)_8$ YT- 3'	28	14
ISSR 11 + ISSR 12	5' – $(AG)_8$ YT- 3' + 5' – $(GA)_8$ YT- 3'	23	6
	Total جمع کل	173	67
میانگین قطعه های چند شکل در نژادگان های مورد استفاده			
Average number of polymorphic bands among accessions			11.1

انارهای ایرانی مورد استفاده در آزمایش.

Table 3. List of the 6 primers and their sequences that produced polymorphic fragments among the Iranian pomgranate genotypes studied.

Y = Pyrimidine

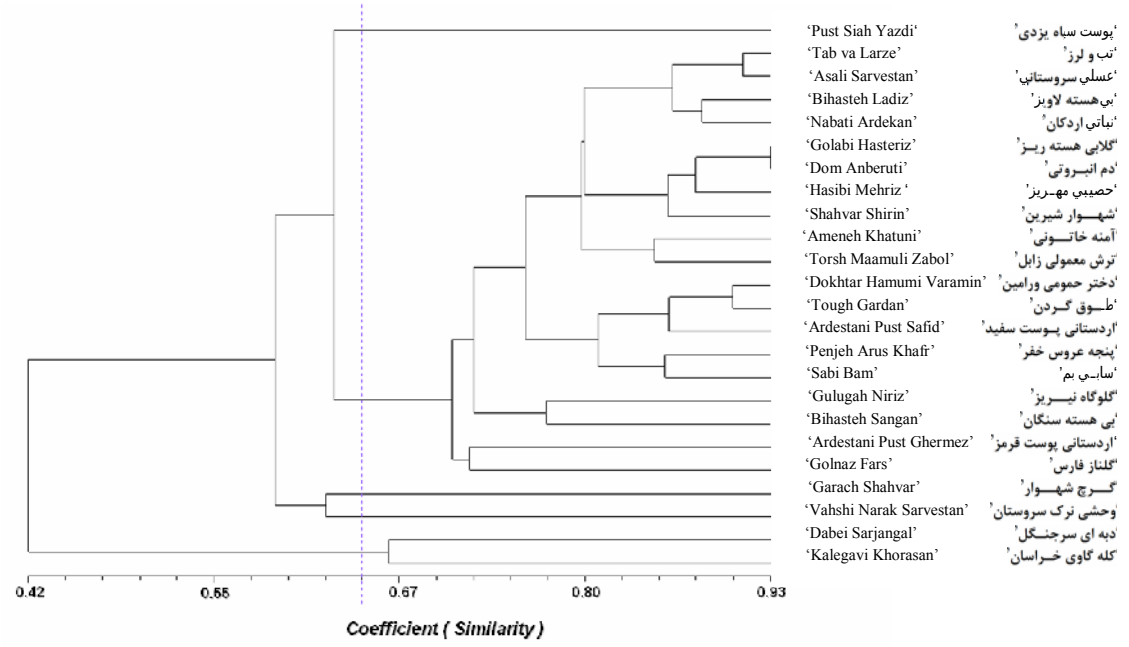

Fig. 3. Dendrogram represents the phylogenetic relationships among 24 Iranian pomegranate accessions.

شکل ۳- دندروگرام بیست و چهار نژادگان انار ایرانی با استفاده از نشانگرهای ISSR و روابط فیلوژنتیک آن ها.

www.SID.ir

Archive of SID

در گروه یک تنها نژادگان های 'دبه ای سر جنگل' و'کله گاوی خراسان' قرار داشتند که ارزش تشابه آن ها در مقایسه با دیگر نژادگان ها ۰/۴۲ بود. در گروه دوم دو نژادگان 'گرچ شهوار' و'وحشی نرک سروستان' با ارزش درون گروهی ۵۸٪ جای گرفتند. از بیست نژادگان های باقیمانده نوزده نژادگان در یک گروه با ارزش تشابه درون گروهی ۰/۶۹٪ و نژادگان 'پوست سیاه یزدی' به تنهایی یک گروه جداگانه را تشکیل داد.

رقم پوست سیاه یزدی که برخلاف ارقام دیگر، دارای رنگ پوست سیاه است به خوبی از نژادگان های دیگر جدا شده است. اگر چه بعضی از گوناگونی های ژنتیکی که باعث تغییر رنگ میوه، شکل میوه، اندازه درخت، شکل درخت و عادت شاخه دهی درخت می شوند و از نظر پدیدگانی[۱] قابل دیدن هستند ممکن است با استفاده از نشانگرهای مولکولی به راحتی قابل تشخیص و قابل توجیه نباشد زیرا در پاره‌ای از مواقع قطعه های DNA افزوده شده با اندازه مشابه به طور کامل شبیه به هم نیستند (۵، ۷، ۱۸). بنابراین در مورد نژادگان های انار مورد استفاده در این پژوهش، نیز می‌توان نتیجه گرفت که وجود قطعه های DNA تک شکل همیشه شباهت کامل بین ارقام را نشان نمی‌دهند. در این موارد با وجود قابل اطمینان بودن نشانگرهای مولکولی مانند SSRs در دسته‌بندی ارقام، باید به ویژگی های مورفولوژیکی نژادگان ها نیز توجه داشت که تغییرهای پس از نسخه‌برداری[۲] و وراثت غیرهسته‌ای برخی از ویژگی ها نیز می‌تواند سبب ناهماهنگی این دو نشانگر شود. در مجموع فن ISSR برای شناسایی ارقام انار مفید است و شاید استفاده از آغازگرهای زیادتر کمک بیشتری برای جداسازی و گروه‌بندی ارقام نماید. این نشانگر در مقایسه با نشانگر RAPD (۳، ۱۳) از دقت و کارآیی بالاتری برخوردار بود و به دلیل چیرگی[۳] و هم چیرگی[۴] بودن و همچنین گوناگونی آللی در مجموع تعداد بیشتری نوار چند شکل تولید نمود که ممکن است مربوط به ایجاد جهش‌های بیشتر در توالی های تکراری نسبت به سایر بخش‌های DNA و یا از دست دادن یا کسب باشد (۶، ۱۶). داشتن آگاهی کافی در مورد مورفولوژی ارقام انار نیز می‌تواند به دسته‌بندی بهتر انارهای کشور کمک کند. با توجه به نتایج این آزمایش و وجود گوناگونی گسترده مورفولوژیکی در بین ۷۶۲ نژادگان انار ایرانی، احتمال نگهداری ژنومی[۵] این نژادگان ها با افزایش رویشی وجود دارد و ممکن است دلیل پایین بودن میزان چند شکلی در بین نژادگان های انار با مورفولوژی متفاوت باشد. به طور معمول در چند شکلی کلونی[۶] تشخیص روشن نوار های چند شکل بسیار دشوار است. در هر صورت ممکن است نبودن چند شکلی مربوط به عوامل دیگری مانند عدم وجود نشانگرهای ملکولی در بخش کوچکی از ژنوم مورد بررسی، استفاده از آغازگرهای ناکافی برای تشخیص و افزایش نواحی چند شکل در ماده ژنتیکی مورد استفاده و یا انتخاب آغازگرهای نا مناسب باشد که از جمله نکاتی هستند که می بایست در آینده در پژوهش بعدی بیشتر مورد بررسی قرار گیرند.

سپاسگزاری

هزینه های انجام این پژوهش از محل اعتبارهای طرح پژوهشی مصوب دانشگاه صنعتی اصفهان تامین شده است که بدینوسیله تشکر و قدردانی می گردد.

۱- Phenotypic ۲- Post-transcriptional modifications ۳- Dominance ۴- Co-dominance
۵- Genome conservation ۶- Clonal polymorphism

www.SID.ir

Archive of SID

منابع REFERENCES

۱- بهزادی شهربابکی، ح. ۱۳۷۷. پراکندگی و گوناگونی ارقام انار در ایران. نشر آموزش کشاورزی. ۷۰ ص.

۲- رحیمی، ت. ۱۳۸۲. روابط ژنتیکی برخی از ارقام انار ایران با استفاده از نشانگر AFLP. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه صنعتی اصفهان. ٦٥ ص.

۳- طالبی بداف، م.، ب. شریف‌نبی و م. بهار. ۱۳۸۲. گوناگونی ژنتیکی برخی از ارقام انار در ایران با استفاده از نشانگرهای RAPD. سومین همایش بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران. دانشگاه فردوسی مشهد. ٣٤٥ ص.

4. Bornet, B. and M. Branchard. 2001. Nonanchored inter–simple sequence repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. Plant Mol. Biol. Rep. 19:209-215.
5. Fang, D.Q. and M.L. Roose. 1997. Identification of closely related *Citrus* cultivars with intersimple sequence repeat markers. Theor. Appl. Genet. 95:408-417.
6. Godwin, I.D., E.A.B. Aitken and L.W. Smith. 1997. Application of inter-simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. Electrophoresis 18:1524-1528.
7. Joshi, S.P., V.S. Gupta, R.K. Aggrawal, P.K. Ranekar and D.S. Brar. 2000. Genetic diversity and phylogentic relationship as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. Theor. Appl. Genet. 100:1311-1320.
8. Kantenty, R.V., X. Zeng, J.L. Bennetzen and B.E. Zehr. 1995. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. Mol. Breed. 1:365-373.
9. Melgarejo, P., V.R. Martinez, et al. 1997. Phenological stages of the pomegranate tree *Punica granatum* L. Annal. App. Biol. 130:135-140.
10. Moreno, S., J.P. Martin and J.M. Ortiz. 1998. Inter-simple sequence repeats PCR for charaterization of closeley related grapevine germplasm. Euphytica 101:117-125.
11. Murray, M.G. and W. F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucl. Acid Res. 8:4321-4325.
12. Prevost, A. and M.J. Wilkinson. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. Theor. Appl. Genet. 98:107-112.
13. Qian,W., S.G. and D.Y. Hong. 2001. Genetic variation within and among population of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. Theor. Appl. Genet. 102:440-449.
14. Ratnaparkhe, M.B., M. Tekeoglu and F.J. Muehlbauer. 1998. Inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters. Theor. Appl. Genet. 97:515-519.
15. Reddy, M.P., N. Sarla and E.A. Siddiq. 2002. Inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euphytica 128:9-12.
16. Reiter, R. 2001. PCR-based marker systems. In: R.L. Phillips and I.K. Vasil (eds.). DNA-Based Markers in Plants, Kluwer Academic Publishers. 9-29.
17. Sankar, A.A. and G.A. Moore. 2001. Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in *Citrus* and extension of genetic linkage map. Theor. Appl. Genet. 102:206-214.
18. Staub, J.E., F.C. Serquen and M. Gupta. 1996. Genetic markers map construction, and their application in plant breeding. HortScience 3:729-739.

www.SID.ir