نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۶، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۱ ، ص. ۲۷۰-۲۶۳
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 26, No. 3, Fall 2012, P. 263-270
ISSN: 2008 - 4730

بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های انار از هفت منطقه ایران با استفاده از نشانگر AFLP

زهرا نعمتی[1*]- علی تهرانی فر[2]- محمد فارسی[3]- امین میرشمسی کاخکی[4]- سید حسین نعمتی[5]

تاریخ دریافت:۸۹/۶/۲۲
تاریخ پذیرش:۹۱/۳/۲

چکیده

انار یکی از مهمترین گیاهان بومی و تجاری-باغبانی در مناطق بیابانی و نیمه بیابانی ایران محسوب می‌شود. از طرف دیگربه علت تاریخچه طولانی کشت انار در ایران، ژنوتیپ‌ها از مناطق مختلف با تشابه‌های آشکار ولی با نام‌های متفاوت کشت شده‌اند. بنابراین برای مدیریت کارآمد و برنامه‌های اصلاحی آینده، تشخیص دقیق ژنوتیپ‌ها مورد نیاز است. در این پروژه DNA ژنومی ۳۱ ژنوتیپ مختلف انار متعلق به هفت استان ایران، توسط نشانگر مولکولی AFLP، با استفاده از هفت ترکیب آغازگری (EcoRI/MseI) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای حاکی از وجود شباهت بسیار بالا بین ژنوتیپ‌ها مورد مطالعه بود. همچنین، گروه‌بندی به دست آمده در بسیاری از مواقع با صفات مورفولوژیک موجود مطابقت نداشت. نتایج به دست آمده نشان داد که ژنوتیپ‌ها عموماً مستقل از خاستگاه جغرافیایی و نامگذاریشان گروه‌بندی شده‌اند. شاخص تنوع h، تجزیه و تحلیل هماهنگ اصلی (PCoA)، شاخص Gst و تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA)، همگی حاکی از شباهت قابل توجه بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی و میزان نسبتاً پایین تنوع در داخل ژنوتیپ‌های هر منطقه بود. تنوع گسترده انار در ایران و سطح پایین چندشکلی بین این ژنوتیپ‌ها، می‌تواند مربوط به ازدیاد رویشی و نوع گرده‌افشانی این گیاه باشد.

واژه‌های کلیدی: انار، تنوع ژنتیکی، AFLP، ژنوتیپ

مقدمه

انار با نام علمی *Punica granatum* L. متعلق به کوچکترین خانواده گیاهشناسی Punicaceae است. انار درختچه‌ای برگ‌ریز با جثه کوچک، که با اثرات بهبود دهنده سلامتی شناخته شده است (۲۴). انار از جمله گیاهان بومی ایران است و یکی از مهمترین منابع گیاهی ارزشمند محسوب می‌شود. زیرا ایران به عنوان مرکز تنوع و پیدایش اولیه انار شناخته شده است (۸). به علاوه ایران یکی از مهمترین تولیدکنندگان و صادرکنندگان انار در جهان است به طوری که در سال ۲۰۰۵، میزان تولید آن ۶۷۰۰۰۰ تن بوده است (۱۹).

شناسایی، حفاظت و استفاده از منابع ژنتیکی به عنوان یکی از ارزشمندترین ثروت‌های ملی هر کشور از اهمیت خاصی برخوردار است. از سوی دیگر، یکی از اهداف مهم اصلاح این گونه دستیابی به عملکرد منظم همراه با کیفیت بالا می‌باشد. قبل از هر گونه کار اصلاحی شناخت تنوع و ظرفیت ژنتیکی هر گونه گیاهی ضروری است. به علت تاریخچه طولانی کشت انار در ایران، ژنوتیپ‌ها از مناطق مختلف با شباهت‌های زیاد ولی با نام‌های متفاوت قابل مشاهده است. برای پرورش و تجارت ارقام انار و جهت مدیریت کارآمد برنامه‌های به‌نژادی آینده تشخیص دقیق ژنوتیپ‌ها مورد نیاز است (۱۶ و ۱۷).

یکی از راه‌های بررسی تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها و جمعیت‌های انار ایرانی استفاده از نشانگرهای مولکولی می‌باشد در این میان نشانگرهای مولکولی AFLP یکی از کاراترین و قابل اطمینان‌ترین نشانگر مولکولی است که می‌توان به منظور تعیین تنوع ژنتیکی ارقام و گونه‌های درختان میوه به کار برده شود (۲۲).

یوآن و همکاران (۲۴) به منظور بررسی تفاوت‌های ژنتیکی درون و بین جمعیت‌های انار از نشانگرهای AFLP استفاده کردند. هشت ترکیب آغازگری جهت بررسی تنوع ژنتیکی ۸۵ رقم انار از شش جمعیت، به وسیله هشت ترکیب آغازگری، ۱۳۵ تا ۱۸۵ مکان چندشکلی به دست آمد. درصد چندشکلی بین ۶۲/۵ تا ۸۶/۵درصد متغیر بود که نشان دهنده تنوع ژنتیکی بالا در بین ارقام انار بود. نتایج

۱،۲و۵- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: Zahra_nemati@ymail.com)
۳و۴- استاد و استادیار گروه بیوتکنولوژی و به نژادی زراعی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

حاکی از این بود که تنوع ژنتیکی در بین گونه‌ها بیشتر از تنوع ژنتیکی موجود بین جمعیت‌ها است. علاوه بر این آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA) نشان داد که بین جمعیت‌ها از نظر تنوع ژنتیکی تفاوت معنی‌داری وجود دارد. جریان ژنی اندازه گیری شده بین جمعیت‌ها نشان داد که، جریان ژنی ملایمی بین جمعیت‌ها وجود دارد. همه پارامترهای ژنتیکی محاسبه شده نشان دادند که تنوع بالایی در ارقام انار چینی وجود داشت.

جبیر و همکاران (۷) تنوع ژنتیکی موجود در بین ۳۴ رقم انار تونسی را با استفاده از نشانگر AFLP بررسی کردند. در مجموع ۳۲۷ مارکر با میانگین ۵۷/۵ امتیازدهی شد. ماتریس فاصله بین ۰/۱ تا ۰/۸۶ با میانگین ۰/۴۸ متغیر بود. با ترسیم دندروگرام، ۳۴ رقم به درون سه گروه اصلی تقسیم‌بندی شدند. ترسیم دندروگرام بر اساس روش UPGMA ثابت کرد که ارقام عموماً مستقل از خاستگاه جغرافیایی و نام‌گذاریشان گروه‌بندی شدند و خصوصیات مبتنی بر ژنتیک مشترک ارقام، بر خلاف تفاوت‌های فنوتیپی، آنها است. این نتایج قویاً ثابت کرد که رقم زینتی *Florepleno ponoda* از فرم‌های زراعی متفاوت نبود. با در نظر گرفتن خاستگاه جغرافیایی ارقام، برآورد شد که تنوع ژنتیکی پیوسته منحصر به فردی در ژرم پلاسم انار محلی وجود داشت.

این پژوهش با هدف بررسی تنوع و ساختار ژنتیکی برخی از جمعیت‌های انار ایرانی با استفاده از نشانگر AFLP صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در این تحقیق از ۳۱ ژنوتیپ انار که از کلکسیون اصلی انار ایران تهیه شده بودند، استفاده شد. مبدأ ژنتیکی ۳۱ ژنوتیپ انار از استان خراسان (۱۰ ژنوتیپ)، سیستان و بلوچستان (۵ ژنوتیپ)، مازندران (۳ ژنوتیپ)، خوزستان (۳ ژنوتیپ)، آذربایجان‌شرقی (۳ ژنوتیپ)، یزد (۴ ژنوتیپ) و مرکزی (۳ژنوتیپ) بودند (جدول۱).

برگ‌های تازه به ازء هر ژنوتیپ جمع‌آوری و دقیقاً شستشو شدند و پس از پودر شدن با ازت مایع تا زمان استخراج در فریزر $-20^{o}C$ نگهداری گردیدند.

استخراج DNA: غلظت و کیفیت DNA ژنومی در تضمین موفقیت آزمایش‌های نسبتاً طولانی و پرهزینه AFLP نقش دارد. در این مطالعه استخراج DNA ژنومی گیاه انار با استفاده از روش‌های متعددی از جمله دلاپورتا (۳)، دویلی دویل (۴)، سقایی معروف و همکاران (۱۵)، ورو و همکاران (۲۱)، پیرتیلا و همکاران (۱۳) و نیز از کیت (بیونر تهیه شده از شرکت بیونر کره)[1]، به منظور بهینه‌سازی و ارائه روش استخراج مناسب مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به بررسی‌های انجام شده، در نهایت، روش CTAB بر اساس روش پیرتیلا و همکاران (۱۳)، با اندکی تغییرات برای استخراج DNA ژنومی از برگ‌های انار بهینه شد (۲). بررسی کمیت و کیفیت DNAی حاصل، با استفاده از دو روش اسپکتروفتومتری و ژل آگارز صورت گرفت.

جدول ۱- ژنوتیپ های انار مورد استفاده در این مطالعه

ردیف	نام نمونه	طعم	مبدا ژنتیکی
۱	شیرین‌دانه‌سفیدفردوس	شیرین	خراسان
۲	ترش‌شهوارکاشمر	ترش	خراسان
۳	شیشه‌کب	شیرین-ترش	خراسان
۴	مزاریع‌بجستانی‌گناباد	شیرین-ترش	خراسان
۵	دم‌انبروتی	ترش	خراسان
۶	شیرین‌دانه‌قرمزفردوس	شیرین	خراسان
۷	خزربجستانی	شیرین-ترش	خراسان
۸	لیلی‌پوست‌نازک	شیرین-ترش	خراسان
۹	لیلی‌پوست‌کلفت	شیرین-ترش	خراسان
۱۰	ترش‌شهوارفردوس	ترش	خراسان
۱۱	بزمانی‌پوست‌نازک	شیرین-ترش	سیستان و بلوچستان
۱۲	ساوه‌ای‌پوست‌سفید	شیرین-ترش	سیستان و بلوچستان
۱۳	ساوه‌ای‌پوست‌قرمز	شیرین-ترش	سیستان و بلوچستان
۱۴	ملس‌پربارسراوان	شیرین-ترش	سیستان و بلوچستان
۱۵	ملس‌معمولی‌سرجو	شیرین-ترش	سیستان و بلوچستان
۱۶	شکرنارپوست‌کلفت	شیرین	مازندران
۱۷	وحشی‌جنگلی‌قائم‌شهر	ترش	مازندران
۱۸	محلی‌پرندگرگان	شیرین-ترش	مازندران
۱۹	سفیدپوست‌دزفول	ترش	خوزستان
۲۰	ملس‌دانه‌سیاه‌رامهرمز	شیرین-ترش	خوزستان
۲۱	ملس‌پوست‌سرخ‌رامهرمز	شیرین-ترش	خوزستان
۲۲	شیرین‌پوست‌قرمز	شیرین	آذربایجان شرقی
۲۳	شیرین‌پوست‌سفید	شیرین	آذربایجان شرقی
۲۴	ملس پوست نازک	شیرین-ترش	آذربایجان شرقی
۲۵	زاغ یزدی	ترش	یزد
۲۶	ملس یزدی	شیرین-ترش	یزد
۲۷	پوست سیاه ابرندآباد	شیرین	یزد
۲۸	گرج شهوار	شیرین	یزد
۲۹	آقامندلی‌ساوه	شیرین	مرکزی
۳۰	آلک‌شیرین‌ساوه	شیرین	مرکزی
۳۱	آلک‌ساوه(ملس‌ساوه)	شیرین-ترش	مرکزی

آنالیز AFLP: مراحل AFLP بر پایه روش وس و همکارن (۲۰) با کمی تغییرات انجام گردید. DNA ژنومی (۵۰۰ نانوگرم) با ۵ واحد از هر کدام از آنزیم‌های برشی *Eco*RI و *Tru1*I مورد هضم

1- Bioneer

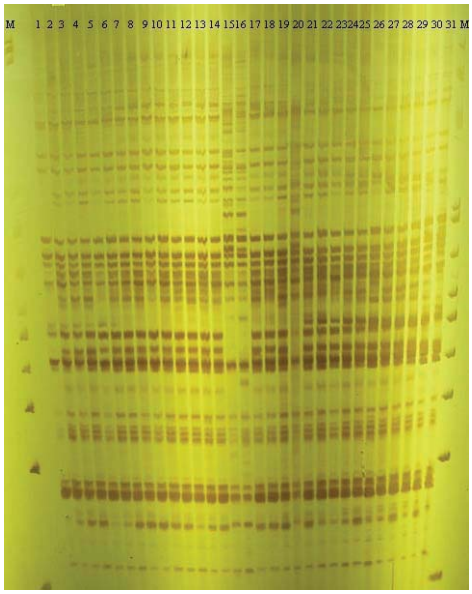
آنزیمی قرار گرفتند. سپس دو نوع آداپتور آنزیم‌های برشی *Eco*RI و *Tru*1I به انتهای قطعات برش خورده ژنومی اتصال یافت. آداپتور *Eco*RI از ترکیب دو آغازگر 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3' و 5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3' آداپتور *Tru*1I از دو ترکیب آغازگری 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3' و 5'-TACTCAGGACTCAT-3' تشکیل شده بودند. مرحله تکثیر پیش‌انتخابی با استفاده از آغازگرهایی با یک نوکلئوتید اضافی در انتهای 3' (5'-GACTGCGTACCAATTCA-3' *Eco*RI و 5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3' *Tru*1I) انجام شد.

انگشت‌نگاری AFLP با استفاده از آغازگرهایی با ۳ نوکلئوتید اضافی در انتهای 3' صورت گرفت. بدین منظور ابتدا از ۳۵ جفت ترکیب آغازگر با استفاده از سه نمونه DNA (دو نمونه نزدیک به هم و یک نمونه دور از لحاظ مورفولوژی) غربال شدند. این ۳۵ ترکیب برای آغازگر انتخابی مرتبط با *Eco*RI (*Eco*RI+ AAC ، ACT + *Eco*RI، *Eco*RI + ACA، *Eco*RI + ACC، *Eco*RI + AAG) و ۷ ترکیب آغازگر انتخابی مرتبط با *Tru*1I (*Tru*1I + CAA، CTT + *Tru*1I، *Tru*1I + CAG، *Tru*1I + CAT، *Tru*1I + CCT، CTA+ *Tru*1I، *Tru*1I + CCG)مورد آزمون قرار گرفتند. در نهایت، ۷ جفت ترکیب آغازگری (*Tru*1I + CAA / *Eco*RI + ACT، *Tru*1I + CAT / *Eco*RI + ACT / *Eco*RI + ACT، *Tru*1I + CTT / *Eco*RI + ACT، CTA+ *Tru*1I / *Eco*RI + ACC، *Tru*1I + CAA / *Eco*RI + AAC، *Tru*1I + CAA / *Eco*RI+ AAC، *Tru*1I + CTT / *Eco*RI+ AAC) که وضوح نواری بهتر، تعداد نوار و چندشکلی بیشتری تولید کردند، گزینش شدند. قطعات DNA تکثیر شده بر روی ژل پلی آکریلامید ۶٪ جدا شدند. الکتروفورز به مدت ۲ ساعت با بافر TBA 1X و ولتاژ ۱۲۰۰ ولت انجام و رنگ‌آمیزی به روش نیترات نقره صورت گرفت (۱۸).

تجزیه داده‌های AFLP: هر یک از قطعات تکثیر شده به عنوان یک صفت در نظر گرفته شد و حضور و عدم حضور آنها به ترتیب با اعداد یک و صفر نمایش داده شد. پس از تشکیل ماتریس یک و صفر، ماتریس شباهت ژنوتیپ‌ها با استفاده از نرم‌افزار NTsys و با استفاده از ضریب تشابه Dice (۱۱) محاسبه گردید. در نهایت تجزیه خوشه‌ای[1] بر اساس ماتریس تشابه و به روش UPGMA انجام شد. همچنین جهت تعیین پلی‌مورفیسم و شاخص h[2] (تنوع ژنی) در هر جمعیت از نرم افزار Popgene 32[3] استفاده گردید (۱۰ و ۲۳). علاوه بر این تجزیه بر اساس تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCoA)[4] با استفاده از نرم افزار GenALEx 6.1[5] (۱۲) انجام گرفت (۶) و نمودار دو بعدی جهت گروه‌بندی و بررسی روابط بین ژنوتیپ‌ها رسم شد. همچنین با استفاده از این نرم افزار تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA)[6] با ۹۹۹ نمونه برداری مجدد تصادفی[7] انجام گرفت (۵ و ۶).

نتایج و بحث

تجزیه AFLP ۳۱ ژنوتیپ انار، با استفاده از هفت جفت آغازگر، در مجموع ۲۳۷ نوار قابل امتیازدهی ایجاد کرد که اندازه آنها در محدوده ۵۰ تا ۱۰۰۰ bp بود. در این بین، ۱۱۲ قطعه چندشکلی نشان دادند. میانگین تعداد قطعات تکثیر شده به ازای هر جفت آغازگر ۳۳/۸ و میانگین تعداد قطعات چندشکل به ازای هر جفت آغازگر ۱۶ بود (۴۷/۲۶ درصد) (شکل ۱).



شکل ۱- نیمرخ ژل پلی‌اکریلامید واسرشت نشان دهنده‌ی الگوی باندی AFLP ۳۱ ژنوتیپ با ترکیب آغازگری (M-CAA/E-ACT)

آنالیزهای مولکولی در بین ۳۱ ژنوتیپ مورد آزمون: نتایج حاصل از ماتریس تشابه (جدول آورده نشده) نشان داد که تشابه ژنتیکی جفت ژنوتیپ‌ها بین ۰/۷۹۳ تا ۰/۹۹۷ متغیر بود و میانگین شباهت ژنتیکی بین تمام جفت ژنوتیپ‌ها ۰/۹۴۴ محاسبه گردید. جفت ژنوتیپ‌های شیرین دانه سفید فردوس و شیشه کب، شیشه کب و آلک شیرین ساوه، ملس معمولی سرجو و شیرین پوست سفید، ملس

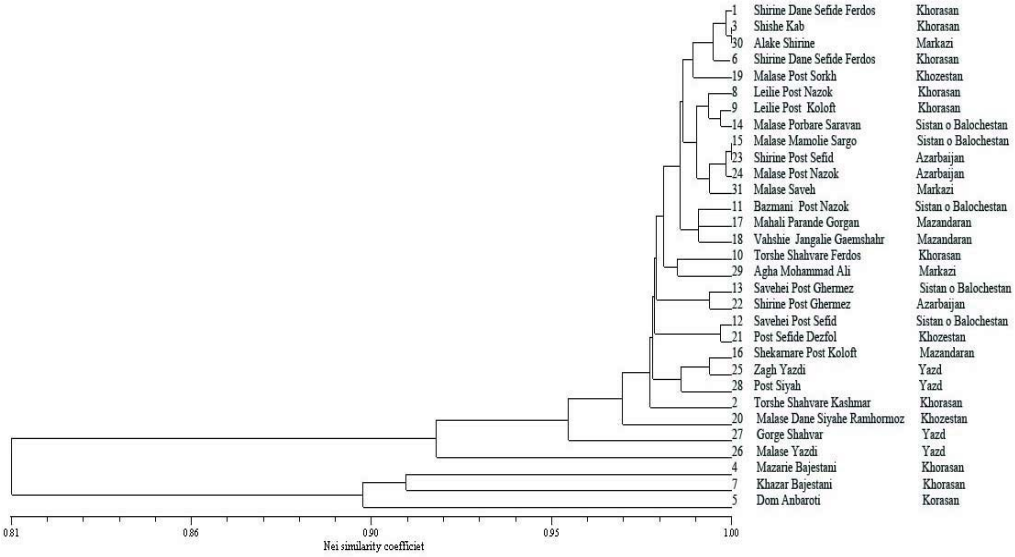
1- Cluster Analysis
2- Nei's gene diversity
3-Version 1.31
4-Principal co-ordinate analysis

5-Genetic analysis in excel dec 2007
6-Analysis of molecular variance (AMOVA)
7- permutation

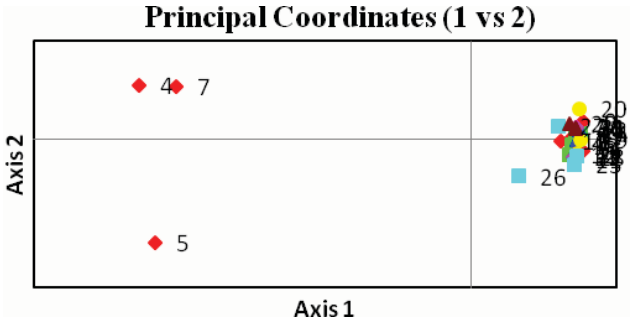
معمولی سرجو و ملس پوست نازک بیشترین شباهت نسبت به هم (۰/۹۹۷) و ژنوتیپ‌های مزاریع بجستانی و لیلی پوست نازک (۰/۷۹۷)، دم انبروتی و ملس دانه سیاه رامهرمز کمترین تشابه ژنتیکی (۰/۷۹۳) را نسبت به هم داشتند.

نتایج تجزیه خوشه‌ای حاکی از وجود شباهت بسیار بالا بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه می‌باشد. چنانکه ارقام در سطح تشابه ۰/۸۱ از هم تفکیک شده‌اند، به جز ارقام دم انبروتی، خزر بجستانی و مزاریع بجستانی میزان تشابه اکثر ژنوتیپ‌ها بالای ۹۵٪ می‌باشد. در ۰/۸۱ تشابه، ۳۱ ژنوتیپ‌های انار از هفت منطقه متفاوت به دو گروه مجزا تفکیک شدند. گروه اول شامل سه ژنوتیپ (دم انبروتی، خزر بجستانی و مزاریع بجستانی) بوده که از لحاظ خصوصیات مورفولوژیکی با بقیه ژنوتیپ‌ها متفاوت می‌باشند. ملس یزدی اولین زیر گروه از گروه دوم می‌باشد که در ضریب ژنتیکی ۰/۹۲ از بقیه جدا شده است. زیرگروه دوم شامل یک گروه بزرگ در ضریب شباهت ۰/۹۵ می‌باشد که بقیه ژنوتیپ‌ها در آن وجود دارند، با وجود فاصله زیاد جغرافیایی مناطق رویش آنها و خصوصیات مورفولوژیکی متفاوت، شباهت بسیار زیادی در سطح DNA (مولکولی) با هم دارند و در یک گروه قرار گرفته اند (شکل ۲). همچنین ضریب کوفنتیکی[1] بین ماتریس تشابه و دندروگرام در حد r=۰/۹۹ بدست آمد که نشان دهنده همبستگی مناسب دندروگرام با ماتریس تشابه است.

تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های اصلی: نمودار دو بعدی که جهت گروه‌بندی و بررسی روابط بین ژنوتیپ‌ها ترسیم شد (شکل ۳)، بیانگر فاصله قابل ملاحظه میان ژنوتیپ‌ها دم انبروتی، خزر بجستانی و مزاریع بجستانی متعلق به منطقه خراسان از دیگر ارقام است که تأیید کننده نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای می‌باشد.



شکل۲- دندروگرام به دست آمده با استفاده از ماتریس تشابه و به روش UPGMA برای ۳۱ ژنوتیپ انار با استفاده از نشانگرهای AFLP



شکل ۳- رابطه میان ۳۱ ژنوتیپ انار مورد آزمون با استفاده از تجزیه مؤلفه‌های اصلی با استفاده از نرم‌افزار GenAlExe. مؤلفه اول (PC1) و دوم (PC2) در مجموع ۹۴/۵ درصد کل تنوع را در بر می‌گیرند.

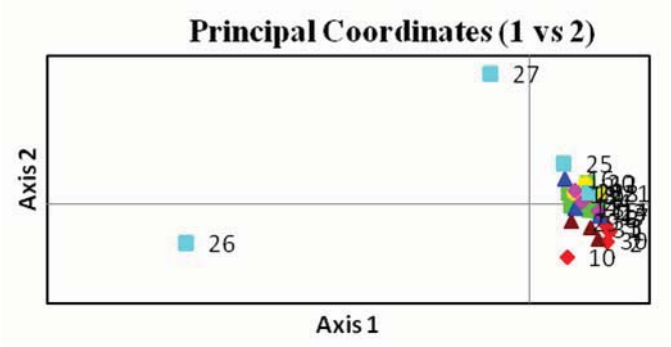
1- Cophenetic

به منظور مطالعه بهتر تنوع، ساختار ژنتیکی و رابطه میان جمعیت‌های انار و به علت تفاوت قابل توجهی که سه ژنوتیپ دم انبروتی و خزر بجستانی و مزاریع بجستانی با بقیه ژنوتیپ‌ها نشان دادند، در آنالیز دوم PCoA، این ارقام حذف شدند تا فاصله میان دیگر ژنوتیپ‌ها آشکارتر گردد. بنابراین با ۲۸ ژنوتیپ و هفت جمعیت مربوط به استان‌های مختلف تجزیه PCoA انجام و نمودار دو بعدی آن رسم شد. در این حالت فاصله قابل توجه میان ژنوتیپ‌های ملس یزدی و گرچ شهوار یزدی از منطقه یزد و با دیگر ژنوتیپ‌ها وجود دارد. حتی در شکل ۴ شباهت میان ژنوتیپ‌ها هر منطقه آشکارتر می‌باشد. نتایج حاصل از این آنالیز الگوی مشابهی را با نتایج به دست آمده قبلی نشان داد.

آنالیز مولکولی ساختار جمعیتهای انار: شاخص‌های برآورد تنوع ژنتیکی به همراه میزان چند شکلی برای هر جمعیت با استفاده از نرم‌افزار Popgene 32 به دست آمد که در جدول ۲ مشاهده می‌شوند. تنوع ژنی (h) که شاخصی از میزان تنوع می‌باشد، در مجموع ۳۱ ژنوتیپ مورد آزمون برابر با ۰/۰۸۵ می باشد. این در حالی است که در هر جمعیت h دارای مقادیر ۰/۱ و کمتر می‌باشد. حداقل میزان h (تنوع ژنی) و چند شکلی مربوط به جمعیت‌های مرکزی (۰/۰۱۲ و ۲/۹۵ درصد) و آذربایجان شرقی (۰/۰۱۲۵ و ۳/۳۸ درصد) می‌باشد و جمعیت‌های خراسان (۰/۱۳۸ و ۴۲/۱۹ درصد)، یزد (۰/۰۵۹ و ۱۴/۷۷ درصد) بیشترین میزان تنوع ژنی و چند شکلی را دارا می‌باشند. یکی دیگر از شاخص‌های آماری بسیار مهم که توسط این نرم‌افزار محاسبه شد، آماره G_{ST} می‌باشد. در مطالعه حاضر مقدار G_{ST}=۰/۳۳۶ که نشان دهنده آن است که سهم تنوع داخل جمعیت‌ها بسیار بیشتر از تنوع بین جمعیت‌ها می‌باشد.

همچنین مقایسات دوبدو جمعیت در ماتریس شباهت نی (جدول آورده نشده) نشان دهنده میزان شباهت ژنتیکی آنها می‌باشد. نتایج نشان می‌دهد که جمعیت‌ها شباهت بسیار بالایی به هم دارند و این اختلاف جزئی ناشی از اختلاف درون جمعیتی است (شکل ۵).

آنالیز واریانس مولکولی: اگرچه نتایج اولیه نشان دهنده سهم بیشتر تنوع درون جمعیتی بر اساس ضریب G_{ST} می‌باشد با این حال، به منظور محاسبه اجزاء واریانس و تعیین سهم هر کدام در تنوع کل، آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA)[1] با استفاده از نرم افزار GenAlExe6.1 انجام گرفت. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که در مجموع سهم تنوع درون جمعیت‌ها از تنوع بین آنها بیشتر است که تنوع درون جمعیتی ۹۹ درصد از کل تنوع را شامل می‌شود (جدول ۳ و شکل ۶).

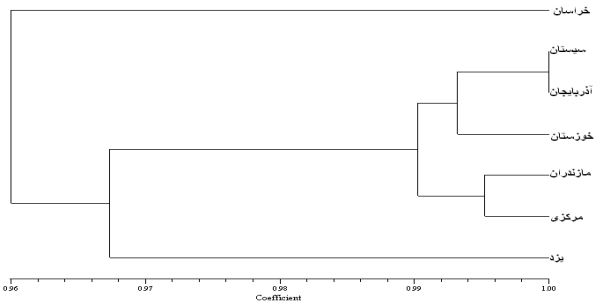


شکل ٤-رابطه میان ۲۸ ژنوتیپ انار با استفاده از تجزیه مؤلفه‌های اصلی با استفاده از نرم‌افزار GenAlExe. مؤلفه اول (PC1) و دوم (PC2) در مجموع ۷۷/۹۷ درصدکل تنوع را در بر می‌گیرند.

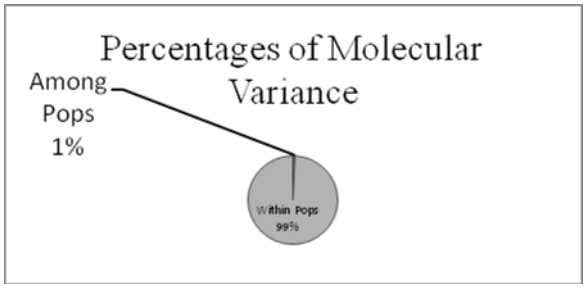
جدول ۲- شاخص‌های تنوع و میزان چند شکلی برای هر جمعیت

جمعیت	h	تعداد مکانهای چند شکل	درصد چند شکلی
خراسان	۰/۱۳۸	۱۰۰	٪۴۲/۱۹
سیستان و بلوچستان	۰/۰۲۴	۱۶	٪۶/۷۵
مازندران	۰/۰۱۵	۹	٪۳/۸۰
خوزستان	۰/۰۲۰	۱۴	٪۵/۹۱
آذربایجان شرقی	۰/۰۱۲۵	۸	٪۳/۳۸
یزد	۰/۰۵۹	۳۵	٪ ۱۴/۷۷
مرکزی	۰/۰۱۲	۷	٪۲/۹۵
کل	۰/۰۸۵	۱۱۲	٪۴۷/۲۶

1-Analysis of molecular variance



شکل ۵- دندروگرام حاصل از روش UPGMA برای هفت جمعیت



شکل ٦- سهم تنوع بین جمعیت‌ها و درون جمعیت‌ها از تنوع کل در بین هفت جمعیت مورد بررسی

جدول ۳- جدول آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA)

منابع تغییر	df	SS	MS	Est. Var.	%
بین جمعیتها	۶	۶۲/۰۹۱	۱۰/۳۴۸	۰/۰۷۶	٪۱
داخل جمعیتها	۲۴	۲۴۰/۶۸۳	۱۰/۰۲۸	۱۰/۰۲۸	٪۹۹
کل	۳۰	۳۰۲/۷۷۴		۱۰/۱۰۴	٪۱۰۰

واریانس تخمینی برای داخل و بین جمعیت‌ها :.Est.Var

درصد واریانس هر منبع تغییر به واریانس کل : .Var %

ترسیم دندروگرام نشان داد کـه ژنوتیـپ‌هـا مـستقل از خاسـتگاه جغرافیایی و نام محلی، گروه‌بنـدی شـده‌انـد. بـه عبـارت دیگـر هـیچ گروه‌بندی مشخصی براساس نام محلی ژنوتیپ‌ها مـشاهده نـشد. بـه صورتی مشابه در مطالعه دیگری که بر روی ژنوتیپ‌های انار در تونس با استفاده از نشانگر AFLP، نویسندگان گزارش دادند که گروه‌بنـدی ژنوتیـپ‌هـا مـستقل از خاسـتگاه جغرافیـائی‌شـان اسـت و پـراکنش یکنواختی در منطقه داشته‌اند (۷).

نتـایج مـشابه دیگـری بوسـیله یـوآن و همکـاران (۲۴) بـر روی جمعیت‌های وحشی انار در چین با استفاده از نشانگر AFLP و نارزری و همکـاران (۹) بـر جمعیـت‌هـای انـار وحـشی هنـد بـا اسـتفاده از نشانگرهای RAPD و DAMD[1] گزارش شده است که نشان دهنـده این است چندان الگوی مشخصی در خصوص تفکیک ارقام بـا توجـه به منطقه جغرافیایی (مکـان رویـش) مـشاهده نـشده اسـت. بـه نظـر می‌رسد عـدم انطبـاق بـین منطقـه جغرافیـایی ارقـام و ویژگـی‌هـای ژنتیکی‌شان، یک ویژگی از ژرم‌پلاسم انار باشد.

در نمودار دو بعدی PCoA نیز، ژنوتیپ‌ها با هم همپوشانی بـسیار بالایی داشته است و تفکیک نشده‌اند. این نتـایج بـا نتـایج حاصـل از آنالیز جمعیتی AMOVA، G_{ST} و هتروزایگوسیتی (h) کاملاً منطبـق است. تمام این آنالیزها نشان می‌دهند که تنوع بین ژنوتیـپ‌هـا بـسیار کم است و بخش اعظم تنوعی که مشاهده می‌شود، مربـوط بـه تنـوع داخل جمعیت‌ها است. این مسئله خود بیانگر آن است که جمعیت‌های مورد نظر در ژنوتیپ‌ها انار، اگرچه هر کـدام متعلـق بـه یـک منطقـه جغرافیایی خاص است، اما تفکیکی بر اساس منطقـه جغرافیـایی بـین آنها انجام نشده است.

همان طور که در دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای بـر اسـاس ضریب نی مشاهده می‌شود، ژنوتیپ‌های داخل جمعیـت‌هـای منـاطق سیستان و بلوچستان، مازندران، مرکزی، آذربایجان و خوزستان بـسیار به هم نزدیک می‌باشند. با توجه به مقادیر پـایین G_{ST} (G_{ST}=۰/۳۳۶) و I (I=۰/۱۴) می‌توان استنتاج کرد که تنـوع درون جمعیـت بیـشتر از بین جمعیت‌ها می‌باشد. آنالیز AMOVA این نتایج را تأیید می‌کند.

1-Directed amplification of minisatellite DNA

تنوع ژنتیکی به موجودات زنده کمک می‌کند تا با تغییرات محیطی موجود مقابله کنند. در نتیجه هتروزیگوسیتی کم، تولیدمثل و بقاء موجودات زنده کاهش می‌یابد. انار از جمله گیاهانی است که علاوه بر دگرگرده افشانی درصد بسیار پایینی نیز خودگرده افشانی دارد. همچنین میزان جریان ژنی[1] بدست آمده در این مطالعه (N_m=۰/۹۸۶) که بسیار بالا است با توجه به فاصله جغرافیایی زیاد بین مناطق مختلف کشت و کار ژنوتیپ‌های انار مورد مطالعه امکان دگرگرده‌افشانی بین ارقام مناطق مختلف نمی‌باشد. این فرض وجود دارد که با توجه به شواهد تاریخی، کشت و کار انار از زمان‌های باستان در ایران رواج داشته است (۱). انواع درخت مثمر یا زینتی انار را بیشتر به وسیله قلمه تکثیر می‌کنند. زیرا این روش ازدیاد بسیار ساده و بازده آن خوب و مفید است. این جمعیت های زراعی دچار زوال و فرسایش ژنی شده‌اند. بنابراین فراوانی ژنی و تنوع ژنتیکی آنها روبه کاهش است. این مسئله از میزان h (شاخصی از تنوع ژنی) در میان جمعیت‌های مورد بررسی نیز به خوبی قابل استنباط است (شکل ۲). در مطالعه‌ای که یوآن و همکاران (۲۴) بر روی جمعیت‌های وحشی انار در چین انجام دادند، میزان آماره G_{ST}=۰/۲۰۲۸ و N_m=۱/۹۰۲۷ را بدست آوردند. این محققان عنوان کردند با اینکه فاصله جغرافیایی بین جمعیت‌ها زیاد بوده و امکان دگرگرده افشانی وجود ندارد اما جریان ژنی ملایمی در بین و درون جمعیت‌ها وجود دارد.

این درحالی است که در جمعیت‌هایی که فراوانی ژنی و تنوع ژنتیکی آنها روبه کاهش است، امکان سازگاری‌های کوتاه و بلند مدت به تنش‌های محیطی وجود ندارد و این امر می‌تواند به عنوان خطری برای بقاء گونه‌هایی که سازگاری محلی منحصربه فردی با منطقه رویش خود پیدا کرده‌اند، محسوب شود. گسترش طبیعی انار در ایران در سواحل شمالی و همچنین در بعضی نقاط دامنه‌های جنوبی البرز و جنگل‌های غرب و جنوب تا بلوچستان ذکر شده است (۱۴). بنابراین با توجه به وسعت و مناطق دست نخورده که انار وحشی به صورت طبیعی و خودرو در آنجا رشد می‌کند می‌توان گفت که منابع ژرم‌پلاسم غنی در ایران وجود دارد. از سوی دیگر کم بودن تنوع ژنتیکی در ارقام زراعی نشان می‌دهد که امکان اصلاح این گونه‌ها بدون استفاده از توده‌های وحشی بسیار کم و محدود است.

در نتیجه برای جلوگیری از فرسایش ژنتیکی گیاهان ارزشمند بایستی از جمعیت‌های موجود حفاظت کرد و می‌توان تلاقی‌های زیادی را با ژنوتیپ‌هایی که بطور ژنتیکی متفاوتند یا ژنوتیپ‌هایی با منشاء متفاوت انجام داد. جهت برنامه‌های بهنژادی می‌توان از دو روش استفاده کرد، اول اینکه به جستجوی ژنوتیپ‌های برتر در رویشگاه‌های مختلف پرداخته شود، سپس این ژنوتیپ‌ها را وارد برنامه‌های بهنژادی کلاسیک کرد. در روش دوم می‌توان از روش‌های نوین بیوتکنولوژی مانند انتقال ژن جهت انتقال ژنی خاص به گیاه مورد نظر استفاده کرد.

نتایج بدست آمده از کاربرد این نشانگر می‌تواند زمینه‌ساز انجام کارهای اصلاحی در ارتباط با بهنژادی و شناسایی ذخایر موجود باشد.

منابع

۱- بهزادی شهر بابکی ح. ۱۳۷۷. پراکندگی و تنوع ارقام انار ایران. نشر آموزش کشاورزی.

۲- نعمتی ز.، تهرانی فر ع.، فارسی م.، میرشمسی کاخکی ا. و نعمتی ح. ۱۳۹۰. بهینه‌سازی جداسازی DNA ژنومی (با خلوص بالا) در گیاه انار. سومین همایش ملی انار ایران.

3- Dellaporta S.L., Wood J., and Hicks J.B. 1983. A plant DNA minipreparation: version II. Plant Mol Biol Rep, I: 19–21.

4- Doyle J.J., and Doyle J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem, Bull, 19: 11–15.

5- Excoffier L., Smouse P.E., and Quattro J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotype*s*: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics, 131: 479–491.

6- Huff D.R., Peakall R., and Smouse P.E. 1993. RAPD variation within and among populations of outcrossing buffalograss (Buchloe dactyloides (Nutt.) Engelman). Theoretical and Applied Genetics, 96: 827–834.

7- Jbir R., Hasnaoui N., Mars M., Marrakchi M., and Trifi M. 2008. Characterization of Tunisian pomegranate (*Punica granatum L.*) cultivars using amplified fragment length polymorphism analysis. Scientia Horticulturae, 115: 231–237.

8- Levin G.M. 1994. Pomegranate (*Punica granatum* L.) plant genetic resource in Turkamenistan. Plant Genetic Resource Newsletter, 97, 31–36.

9- Narzary D., Mahar K.S., Rana T.S., and Ranade S.A. 2009. Analysis of genetic diversity among wild pomegranates in Western Himalayas, using PCR methods. Scientia Horticulturae, 121: 237–242.

10- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. Nature, 106: 283–292.

1- Gen flow

11- Nei M., and Li W. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc Natl Acad Sci USA, 76: 5269-5273.
12- Peakall R., and Smouse P.E. 2001. GenAlEx V5: Genetic Analysis in Excel. Population Genetic Software for teaching and research. Canberra: Australian National University.
13- Pirttila A., Hirsikorpi. M.M., Kamarainen T., Jaakola L., and Hohtola A. 2001. DNA isolation methods for medicinal and aromatic plants. Plant Molecular Biology Reporter, 19: 273.
14- Rechinger K.H. 1966. Punicaceae. Flora Iranica. No.22.
15- Saghai-Maroof M.A., Soliman K.M., Jorgensen R.A., and Allard R.W. 1984. Ribosomal DNA spacerlength polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 81: 8014–8018.
16- Sarkhosh A., Zamani Z., Fatahi R., and Ebadi A. 2006. RAPD markers reveal polymorphism among some Iranian pomegranate (*Punica granatum L.*) genotypes. Scientia Horticulturae, 111: 24–29.
17- Sarkhosh A., Zamani Z., Fatahi R., and Ranjbar H. 2009. Evaluation of genetic diversity among Iranian soft-seed pomegranate accessions by fruit characteristics and RAPD markers. Scientia Horticulturae, 121: 313–319.
18- Sanguinetti C.J., Dias Neto E., and Simpson A.J.G. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. Biotechniques, 17: 915–919.
19- Tehranifar A., Zarei M., Nemati Z., Esfandiyari B., and Vazifeshenas M.R. 2010. Investigation of physico-chemical properties and antioxidant activity of twenty Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. Scientia Horticulturae, 126: 180–185.
20- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., and Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research, 23: 4407-–4414.
21- Vroh B., Harvengt L., Chandelier A., Mergeai G., and Jardin P.D. 1996 .Improved RAPD amplification of recalcitrant plant DNA by the use of activated charcoal during DNA extraction. Plant Breeding, 15: 205–206.
22- Wünsch A., and Hormaza J.I. 2002. Cultivar identification and genetic fingerprinting of temperate fruit tree species using DNA markers. Euphytica, 125: 59–67.
23- Yeh F.C., Yang R.C., and Boyle T. 1999. POPGENE, the User-Friendly Shareware for Population Genetic Analysis. Molecular Biology and Biotechnology center, University of Alberta, Canada.Available at http://www.ulberta.ca/~fyeh/
24- Yuan Z., Yin Y., Qu J., Zhu L., and Li Y. 2007. Population Genetic Diversity in Chinese Pomegranate (*Punica granatum* L.) Cultivars Revealed by Fluorescent-AFLP Markers. Journal of Genetics and Genomics, 34(12): 1061-1071.