



ارزیابی تنوع و روابط ژنتیکی ژنوتیپ‌های انار با استفاده از نشانگر AFLP

رضا نظیفی گلیردی^۱، غفار کیانی^{۲*}، علی دهستانی کلاگر^۳، سید حمیدرضا هاشمی^۳

^۱دانشجوی سابق بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
^۲استادیار گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
^۳پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۱۳، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۲/۱۱

چکیده

انار (*Punica granatum L.*) گیاهی بومی ایران می‌باشد. به رغم اینکه انار از مهمترین محصولات صادراتی ایران به شمار می‌رود، اما شناسنامه دقیقی برای تعیین اصالت ژنتیکی و حفظ حقوق مالکیت این ذخیره توارثی گران‌بها در کشور وجود ندارد. در پژوهش حاضر برای بررسی روابط ژنتیکی ۴۷ ژنوتیپ انار، شامل ۹ ژنوتیپ زراعی (از کلکسیون انار یزد) و ۳۸ ژنوتیپ وحشی (از استان‌های مازندران، گیلان و گلستان)، از نشانگر AFLP استفاده گردید. با استفاده از ۱۰ ترکیب آغازگری تعداد ۸۲۵ نوار (باند) بدست آمد، که تعداد ۶۹۷ نوار چندشکلی نشان دادند. از بین آغازگرهای مورد استفاده، ترکیب آغازگری M-CTT و E-ACG با ۱۴۸ نوار بیشترین تعداد نوار و ترکیب آغازگری E-ACC و M-CTG با ۴۰ نوار کمترین تعداد نوار را تولید کردند. مقدار متوسط محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) برای آغازگرها برابر با ۰/۲۱ بدست آمد. متوسط شاخص نشانگر (MI) ۱۷/۳۳ بدست آمد که بیشترین آن مربوط به ترکیب آغازگری M-CAC و E-AAG می‌باشد. بیشترین شباهت ژنتیکی بین نمونه‌های بهنمیر و شیرین‌کن تهران و کمترین میزان شباهت بین نمونه‌های برنجستانک و خوش دره دیده شد. تجزیه به مولفه‌های اصلی نشان داد که ۳ مولفه در مجموع ۵۷ درصد واریانس کل را توجیه می‌نماید. از ترکیب‌های آغازگری شناخته شده در این پژوهش می‌توان به عنوان ابزار قدرتمندی در تعیین روابط ژنتیکی در بین ژنوتیپ‌های انار استفاده نمود.

کلمات کلیدی: انار، تنوع ژنتیکی، نشانگر AFLP، تجزیه به مولفه‌های اصلی.

مقدمه

نشانگر چندشکلی طول قطعات حاصل از تکثیر (AFLP) توسط Vos et al. (1995) معرفی شد. آنان مدعی بودند که نشانگر مذکور علاوه بر دارا بودن مزایای RFLP مثل دقت و تکرارپذیری، دارای ویژگی‌های مثبت روش‌های مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز نیز می‌باشد. این نشانگر ابزاری موثر برای مطالعه تنوع و ارتباط ژنتیکی میان افراد گونه‌ها و اعضای سلسله گیاهی به شمار می‌رود افزون بر این، این روش کارایی زیادی برای مطالعات فیلوژنی، نقشه یابی پیوستگی ژن‌ها و شناسایی ارقام دارد. از جمله تحقیقاتی که تا کنون در این رابطه بر روی انار صورت گرفته می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

روابط ژنتیکی ۱۱ ژنوتیپ کاملاً نزدیک انار ایران با استفاده از نشانگر AFLP مورد ارزیابی قرار گرفت (Rahimi et al., 2005). ۱۰ ترکیب آغازگری متفاوت برای تشخیص روابط ژنوتیپ‌های انار در دو منطقه اصفهان و یزد با اسامی مشابه مورد استفاده قرار گرفت. بیشترین شباهت بین ارقام پوست سیاه و آمنه خاتونی (۲۰/۳ درصد) وجود داشت. پس از برش خوشه بندی داده‌های حاصل از AFLP در فاصله ۰/۶۴، هفت رقم در دو گروه جای گرفتند چهار رقم باقی مانده هر کدام یک گروه را تشکیل دادند. علی‌رغم سطح چند شکلی پایین در ارقام مورد مطالعه، تفاوت‌هایی در الگوهای نوار بندی در بین ژنوتیپ‌های با اسامی مشابه و همچنین بین دو منطقه جغرافیایی مشاهده گردید.

انار با نام علمی *Punica granatum L.* یکی از قدیمی‌ترین میوه‌های خوراکی شناخته شده است که به صورت درختچه‌ای پر شاخ و برگ با پاجوش‌های زیاد و ارتفاعی بین پنج تا هشت در هر نوع اقلیمی از نظر آب و هوا و خاک رشد می‌کند. از نظر گیاهشناسی انار از خانواده Punicaceae با سطح کروموزومی $2n=2x=16$ می‌باشد (Moslemi et al., 2010). شواهد تاریخی دال بر این است که انار بومی ایران و کشورهای هم‌جوار می‌باشد و به طور طبیعی به آذربایجان، ترکیه و حوزه مدیترانه گسترش یافته است (Tehranifar et al., 2010). در حدود ۸۰۰ رقم انار از استان‌های مختلف ایران در مجموعه انار یزد جمع‌آوری شده است. آگاهی از تنوع ژنتیکی یک گونه می‌تواند به اصلاحگر برای چگونگی جمع‌آوری و استفاده از منابع ژنتیکی مختلف و پیش‌بینی فواید ژنتیکی بالقوه، در برنامه‌های اصلاحی کمک کند. امروزه تعیین اصالت ژنتیکی محصولات باغی از سطح مورفولوژی و فنولوژی فراتر رفته و بوسیله روش‌های نوین بیوتکنولوژی در سطح ژنوتیپ گیاه (DNA) صورت می‌گیرد. استفاده از روش‌های جدید در برنامه‌های شناسایی ارقام، فرایند شناسایی را بوسیله انگشت‌نگاری هر ژنوتیپ در هر مرحله رشدی و بطور مستقل از فاکتورهای محیطی تسریع می‌کند.

بود. نتایج بدست آمده نشان داد که ژنوتیپ‌ها عموماً مستقل از خاستگاه جغرافیایی و نام‌گذاریشان گروه‌بندی شدند (Nemati *et al.*, 2012). تکنیک AFLP بر اساس هضم DNA ژنومی و تحت تاثیر قرار گرفتن جایگاه شناسایی آنزیم برشی به علت حذف، اضافه و جهش در این جایگاه حاصل می‌آید که نتیجه آن چندشکلی در قطعات حاصل AFLP می‌باشد (Witkowicz *et al.*, 2003). در این تحقیق کارایی روش AFLP برای بررسی تنوع ژنتیکی و برآورد فاصله ژنتیکی ۴۷ نمونه وحشی و زراعی انار ۳ استان مازندران، گیلان، گلستان و ۹ رقم زراعی مورد بررسی قرار گرفت و انتظار می‌رود از ترکیب آغازگری شناخته شده در این پژوهش بتوان به عنوان ابزار قدرتمندی در شناسایی روابط و خویشاوندی موجود در بین ژنوتیپ‌های انار استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و استخراج DNA

در این تحقیق از ۴۷ نمونه انار شامل ۳۸ نمونه وحشی و ۹ رقم زراعی استفاده شد. نمونه‌های وحشی از مناطق مختلف استان مازندران، گیلان و گلستان جمع‌آوری و نمونه‌های زراعی نیز از کلکسیون انار یزد جمع‌آوری گردید (جدول ۱). استخراج DNA از برگ به روش CTAB انجام گرفت. بررسی کیفیت و کمیت DNA حاصل با استفاده از سه روش

در پژوهشی Sarkhosh *et al.* (2006) با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD سطح تنوع موجود بین ۲۴ ژنوتیپ انار ایرانی را بررسی کردند. تعداد ۱۰۰ آغازگر تصادفی در انجام واکنش PCR بر روی نمونه‌ها آزمایش شد که از بین آنها ۱۶ آغازگر در بین ژنوتیپ‌ها چندشکلی نشان دادند. بالاترین و پایین‌ترین میزان تشابه بین ژنوتیپ‌ها به ترتیب ۰/۸۹ و ۰/۲۹ بود و در تشابه ۶۰٪ ژنوتیپ‌ها به ۴ زیر شاخه تقسیم شدند. در پژوهشی دیگر Avamleh *et al.* (2009) از ۸ آغازگری AFLP برای بررسی تنوع ژنتیکی ۱۲ ژنوتیپ انار که از ۳ منطقه در اردن جمع‌آوری شده بود استفاده کردند. که از این تعداد ۱۵ ژنوتیپ وحشی، ۳۴ ژنوتیپ نیمه وحشی و ۱۴ ژنوتیپ زراعی بودند. ۸ آغازگر RAPD و ۴ آغازگر DAMD استفاده شده الگوهای چندشکلی مجزایی در بین ژنوتیپ‌ها نشان دادند. بیشترین و کمترین فاصله ژنتیکی در ژنوتیپ‌های زراعی ۰/۱۲ و ۰/۹، در ژنوتیپ‌های نیمه وحشی ۰/۲۴ و ۰/۹۷ و در مورد ژنوتیپ‌های وحشی ۰/۳۸ و ۰/۹۵ بود. نتیج این تحقیق نشان داد که سطح بالایی از تنوع ژنتیکی در میان ژنوتیپ‌ها وجود دارد و هر دو روش RAPD و DAMD برای بررسی ژنتیکی انار مفید می‌باشد. در مطالعه‌ای DNA ژنومی ۳۱ ژنوتیپ مختلف انار متعلق به هفت استان ایران با استفاده از هفت ترکیب آغازگری AFLP مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای حاکی از وجود شباهت بسیار بالا بین ژنوتیپ مورد مطالعه

تکثیر قطعات با استفاده از Touch Down PCR انجام گرفت. به این ترتیب که در ۱۲ سیکل ابتدایی دمای اتصال به مقدار ۰/۷ درجه سانتیگراد در ابتدای هر سیکل کاهش داده شد. محصولات PCR به منظور تفکیک آلی قبل از بارگذاری، واسرشته شد، که به این منظور مقدار ۸ تا ۱۰ میکرولیتر از بافر بارگذاری حاوی فرم-آمید^۱ به ۲۰ میکرولیتر محصول PCR اضافه شد. سپس کلیه نمونه‌ها را به مدت ۶ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد در ترموسایکلر قرار داده و بلافاصله بر روی یخ منتقل شد، تا برای بارگذاری بر روی ژل پلی‌اکریلامید ۶٪ آماده شود. دستگاه جداسازی قطعات تکثیری بکار رفت. قطر ژل مورد استفاده ۰/۲۵ میلیمتر و ابعاد آن ۳۰ × ۳۸ سانتیمتر با حجم ۵۵ میلی‌لیتر بود. الکتروفورز به مدت ۲ ساعت با استفاده از بافر TBA 1x و ولتاژ ۱۲۰۰ ولت انجام و رنگ آمیزی به روش نیترات نقره صورت گرفت (Bassam et al., 1991). تجزیه و تحلیل داده‌ها: 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. در مرحله بعد داده‌های امتیازدهی شده با استفاده از نرم‌افزار Excel به یک ماتریس منتقل گردید. سپس با استفاده از نرم افزار NTYSY ver2.02 ماتریس تشابه بر اساس ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA ترسیم گردید.

سپکتروفوتومتری و الکتروفورز ژل آگارز صورت گرفت.

اجرای مراحل AFLP

آزمایشات AFLP بر اساس روش Vos et al. (1995) انجام گرفت. واکنش هضم با استفاده از دو آنزیم برشی *EcoRI* و *Tru91* (با جایگاه برشی مشابه *MseI*) ساخت شرکت Roche انجام شد. برای اطمینان از انجام عمل هضم مقدار ۵ میکرولیتر از مخلوط، با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد با بافر TBE 1X الکتروفورز شد و از انجام عمل هضم اطمینان حاصل آمد. پس از برش DNA توسط آنزیم‌های برشی سازگارسازهای (آداپتور) الیگونوکلئوتیدی دو رشته‌ای به هر دو انتهای قطعه‌های برشی چسبنده اضافه شدند. مرحله تکثیر پیش انتخابی با استفاده از آغازگرهایی که کاملاً مکمل توالی سازگارسازها به همراه تعدادی نوکلئوتید اضافی (۰ تا ۴ عدد) بودند انجام شد. در مرحله تکثیر انتخابی مجدداً مجموعه کوچکتری از قطعات مرحله پیش‌انتخابی برای تکثیر، انتخاب شدند. در این مرحله از آغازگرهایی که دارای ۳ نوکلئوتید انتخابی در انتهای ۳ خود هستند استفاده شد. تعداد بیش از ۱۶ ترکیب آغازگری مختلف با ۳ نوکلئوتید در انتهای ۳ مورد آزمون (primer selection) قرار گرفت. از بین این تعداد ترکیب آغازگری، تعداد ۱۰ ترکیب، که دارای بهترین کیفیت نوار با کمترین حالت در پس‌زمینه و بیشترین مقدار چندشکلی بود، انتخاب شد (جدول ۲).

¹Formamide

جدول ۱- ژنوتیپ های جمع آوری شده انار از مناطق مختلف.

Table 1- Collected genotypes of pomegranates from different regions.

محل جمع آوری Location	ترتیب نمونه Sample orde	محل جمع آوری Location	ترتیب نمونه Sample orde	محل جمع آوری Location	ترتیب نمونه Sample orde	محل جمع آوری Location	ترتیب نمونه Sample order
طوالش Tavalesh	G38	رامسر Ramsar	G26	بهنمیر Bahnamir	G13	قوشی چشمه Ghoushi Cheshmeh	G ₁
آستارا Astara	G39	رودسر Roudsar	G27	قائم شهر Ghaem Shahr	G14	جنگل گلستان Golestan Forest	G ₂
ملس ساوه Malas Saveh	G40	املش Amlash	G28	برنجستانک Berenjestana k	G15	کاله Kalaleh	G ₃
رباب نیریز Robab Neiriz	G41	لاهیجان Lahijan	G29	خوش دره Khosh Darreh	G16	گنبد کاووس Gonbad Kavous	G ₄
الک ساوه Alak Saveh	G42	آستانه اشرفیه Astaneh Ashrafiyeh	G30	زیراب Zirab	G17	مینودشت Kinoudasht	G ₅
شاهوار شیرین سروستان Shahvar Shirin Sarvestan	G43	رودبار Roudbar	G31	بابل Babol	G18	آق قلا Agh Ghala	G ₆
شیرین پوس کلفت Shirin Poust Koloft	G44	منجیل Manjil	G32	محمود آباد Mahmoud Abad	G19	بندر ترکمن Bandar Torkman	G ₇
بی هسته شیرین Bihasteh Shirin	G45	لوشان Loshan	G33	آمل Amol	G20	علی آباد کنول Aliabad Katoul	G ₈
شیرین کن تهران Shirin Kan Tehran	G46	رشت Rasht	G34	نور Nour	G21	هزار پیچ Hezar Pich	G ₉
فردوس Ferdous	G47	فومن Foman	G35	نوشهر Noshahr	G22	کرد کوی Kord Kouy	G ₁₀
		بندر انزلی Bandar Anzali	G36	چالوس Chalous	G23	میانکاله Mian Kaleh	G ₁₁
		رضوانشهر Rezvan Shahr	G37	تنکابن Tonekabon	24	فرح آباد Farah Abad	G ₁₂

جدول ۲- ترکیبات آغازگری مورد استفاده در مرحله تکثیر انتخابی.

Table 2- Primer combinations used for selective amplification stage.

آغازگرهای مربوط به <i>EcoRI</i>	آغازگرهای مربوط به <i>MseI</i>	شماره
Primers related to <i>EcoRI</i>	Primers related to <i>MseI</i>	Number
<i>EcoRI</i> Selective Primer+AGG	<i>MseI</i> Selective Primer+CTG	1
<i>EcoRI</i> Selective Primer+AGC	<i>MseI</i> Selective Primer+CAT	2
<i>EcoRI</i> Selective Primer+AAG	<i>MseI</i> Selective Primer+CTA	3
<i>EcoRI</i> Selective Primer+GGA	<i>MseI</i> Selective Primer+CTC	4
<i>EcoRI</i> Selective Primer+GGA	<i>MseI</i> Selective Primer+CTT	5
<i>EcoRI</i> Selective Primer+GGA	<i>MseI</i> Selective Primer+CAA	6
<i>EcoRI</i> Selective Primer+GTG	<i>MseI</i> Selective Primer+CTT	7
<i>EcoRI</i> Selective Primer+GTG	<i>MseI</i> Selective Primer+CAA	8
<i>EcoRI</i> Selective Primer+GGA	<i>MseI</i> Selective Primer+CAT	9
<i>EcoRI</i> Selective Primer+GTG	<i>MseI</i> Selective Primer+CCT	10

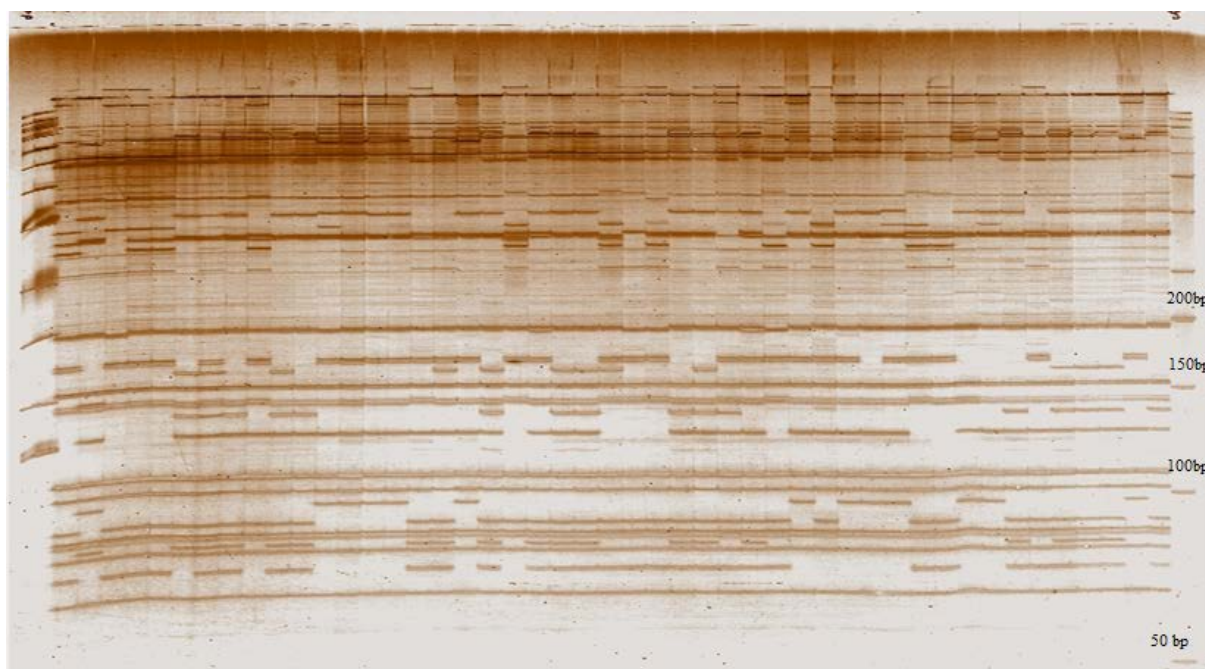
آغازگری در دامنه بین ۴۰ باند برای ترکیب آغازگری E-ACC, M-CTG تا ۱۴۸ باند برای ترکیب آغازگری E-ACG, M-CTT متغیر بود (شکل ۱). متوسط باند کل و باند چندشکل برای هر ژنوتیپ به ترتیب ۸۲/۵ و ۶۷/۷ باند بود.

محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) برای قدرت تشخیص مکانهای ژنی AFLP محاسبه شد، با توجه به نتایج جدول ۳ متوسط PIC بدست آمده برای ۱۰ ترکیب آغازگری ۰/۲۱ بود. بیشترین مقدار PIC به ترکیب آغازگری E-AAG M-CAC با ۰/۲۸ و کمترین میزان آن مربوط به ترکیب آغازگری E-AGG, M-CTT با متوسط ۰/۱۱ تعلق داشت. پایین بودن میزان PIC نشان دهنده سطح پائین تمایز می باشد.

علاوه بر تجزیه خوشه ای تجزیه به مولفه-های اصلی با استفاده از نرم افزار NTYSY ver2.02 انجام شد و نمودار دوبعدی و سه بعدی جهت گروه بندی و بررسی روابط بین ژنوتیپ ها رسم شد.

نتایج و بحث

انار یک گونه چند ساله با عمر طولانی و دگرگشن (گرده افشانی به کمک حشرات) است که این صفت بیولوژیکی به ایجاد و حفظ سطح بالای تنوع ژنتیکی مشاهده شده کمک می کند. در این مطالعه از مجموع ۱۰ ترکیب آغازگری که برای بررسی انتخاب شد، در مجموع ۸۲۵ باند تولید شد، که ۷۶۴ باند آن چندشکلی نشان داد. تعداد باندهای تولید شده توسط هر ترکیب



شکل ۱- پروفایل ژل اکریلامید مربوط به ترکیب آغازگری E-ACG, M-CTT.

Figure 1- Profile of acrylamide gel for primer combination of E-ACG, M-CTT.

E-AAA, M- و ترکیب آغازگری $(0/19 \pm 0/66)$ را CCC (بیشترین و کمترین تنوع را $(0/14 \pm 0/14)$ حاصل کردند. دندروگرام مربوط به داده‌های حاصل از نشانگر AFLP با استفاده از ۷۶۴ باند پلی مورف در شکل ۲ نشان داده شده است. بر اساس این دندروگرام ژنوتیپ‌های انار در ۵ گروه کاملاً مجزا قرار گرفتند. گروه اول شامل نمونه‌های فردوس و شیرین‌کن تهران بودند. گروه دوم شامل نمونه‌های بندر انزلی، رضوانشهر، منجیل، لوشان، رشت، فومن، طوالش، آستارا، ملس‌ساوه، رباب نیریز، قچاق‌قم، الک ساوه، شهوار شیرین سروستان، شیرین پوست کلفت و بی هسته شیرین بود.

میانگین شاخص نشانگر AFLP بر پایه تعداد نوارهای چندشکل در این تحقیق $17/33$ بود که بیشترین و کمترین میزان آن به ترتیب به ترکیب آغازگرهای M-CAC, E-AAG با $23/47$ و E-ACC, M-CTG با $7/09$ مربوط بود که بالا بودن میزان شاخص نشانگر نشان دهنده توان جداسازی بالای ترکیب در مقایسه با دیگر ترکیب‌های آغازگری است. شاخص نشانگر (MI) که یکی از شاخص‌ها در قدرت تفکیک یک نشانگر می‌باشد نشان می‌دهد تفاوت این شاخص زمانی ملموس‌تر می‌شود که در بررسی بین گونه‌ایی به کار گرفته شوند. بر اساس شاخص شائون نیز ترکیب آغازگری (M-CTG)

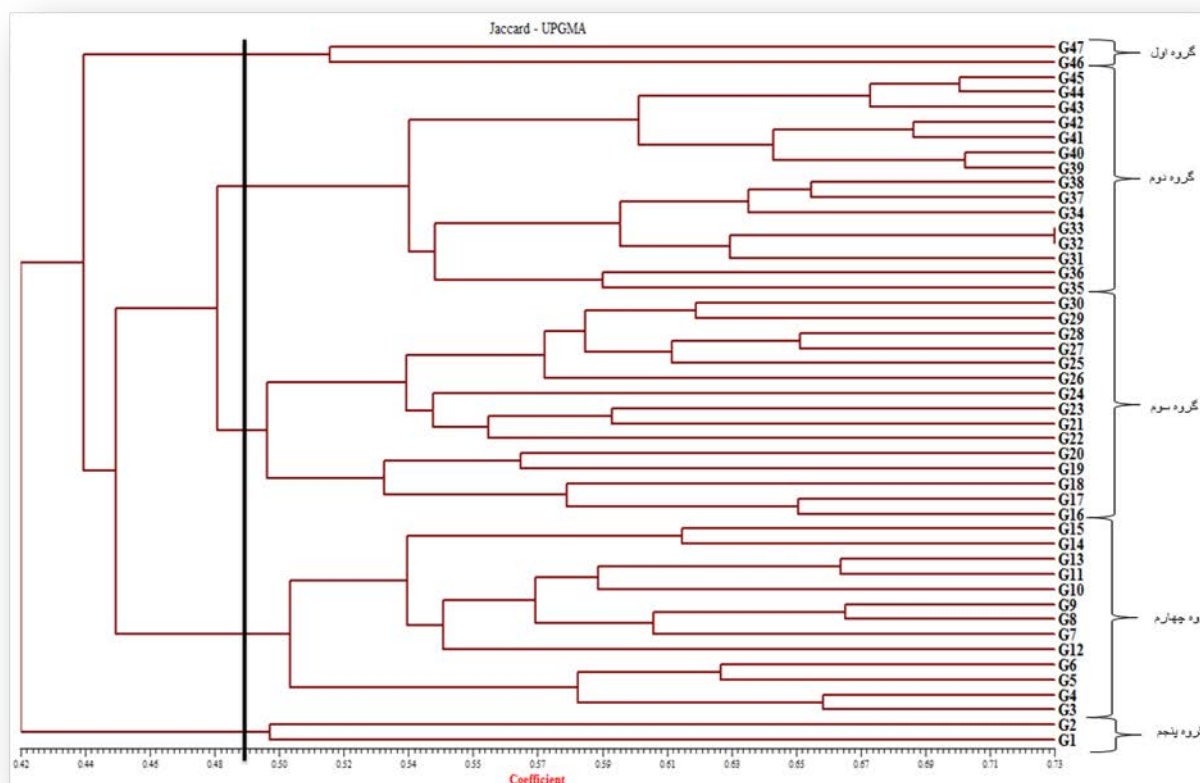
جدول ۳- نتایج حاصل از بررسی تنوع ۴۷ ژنوتیپ انار با استفاده از نشانگر AFLP.

Table 3- Results of diversity study in 47 pomegranate genotypes using AFLP marker.

شاخص شانون Shannon index	شاخص پراکندگی diversity index	شاخص نشانگر Marker index	PIC	درصد نوارهای چندشکل Polymorphism percent	تعداد نوارهای چندشکل No. polymorphic bands	تعداد کل نوار No. total bands	
0.29 ± 0.19	0.13 ± 0.17	22.11	0.263	84.07	95	113	E-AAC, M-CAC
0.66 ± 0.19	0.17 ± 0.13	7.59	0.132	57.50	23	40	E-ACC, M-CTG
0.16 ± 0.23	0.10 ± 0.16	19.52	0.227	86	43	50	E-ACC, M-CAT
0.27 ± 0.21	0.16 ± 0.15	13.82	0.158	87.50	63	72	E-ACG, M-CTA
0.20 ± 0.19	0.11 ± 0.14	20.79	0.236	88.10	111	126	E-ACT, M-CTC
0.26 ± 0.16	0.14 ± 0.10	14.96	0.195	76.74	33	43	E-AGT, M-CTC
0.24 ± 0.22	0.14 ± 0.16	21.96	0.256	85.81	127	148	E-ACG, M-CTT
0.30 ± 0.20	0.17 ± 0.14	9.32	0.116	80.43	37	46	E-AGG, M-CTT
0.14 ± 0.15	0.07 ± 0.10	19.77	0.238	83.08	54	65	E-AAA, M-CCC
0.30 ± 0.19	0.18 ± 0.14	23.47	0.285	90.98	111	122	E-AAG M-CAC
		17.33	0.210	82.02	67.7	82.5	میانگین Mean

دیده شد. با توجه به نتایج تجزیه کلاستر می توان گفت تقسیم بندی ناحیه ای و جغرافیایی تاثیری در تنوع ایجاد شده بین نمونه ها نداشته اما تنوع درون ناحیه ای مشهود است، بدین معنی که ژنوتیپ های درون گروهی هر استان تنوع ژنتیکی بالایی از خود نشان دادند که علت این امر عواملی چون جهش و قدرت تفکیک بالای نشانگرهای بکار رفته در تحقیق (Sunil Kumar, 1999)، و نحوه نمونه برداری (شرایط محیطی منطقه) مانند پستی و بلندی از سطح دریا، مناطق جنگلی، مناطق کوهستانی و حتی ساحلی است.

نمونه های خوش دره، زیرآب، بابل، محمود آباد، آمل، نوشهر، نور، چالوس، تنکابن، رودسر، رامسر، املش، لاهیجان، آستانه اشرفیه و رودبار در گروه سوم قرار گرفتند. نمونه های کلاله، گنبد کاووس، مینودشت، فرح آباد، بندرترکمن، علی آباد کتول، هزار پیچ، کردکوی، میانکاله، فرح آباد، بهنمیر، قائم شهر و برنجستانک در گروه چهارم قرار گرفتند و گروه پنجم شامل نمونه های قوشی چشمه و جنگل گلستان بود. بیشترین ژنوتیپ ها در گروه دوم و سوم و کمترین آنها در گروه اول و پنجم بودند. بیشترین شباهت ژنتیکی بین نمونه های بهنمیر و شیرین کن تهران و کمترین میزان شباهت بین نمونه های برنجستانک و خوش دره



شکل ۲- گروه‌بندی ژنوتیپ‌های گیاه انار با استفاده از نشانگر AFLP.

Figure 2- Clustering of Pomegranate genotypes using AFLP marker.

داده‌های مربوط به نشانگرهای DNA بهترین حالت آن است که نشانگرها توزیع یکنواخت و مناسبی در ژنوم داشته باشند و بتوانند از تمام ژنوم نمونه برداری کنند. بنابراین در صورتی که نشانگرها از بخش‌های مختلف ژنوم انتخاب شوند و همبستگی آنها کم باشد تعداد مؤلفه‌های بیشتری برای توجیه کل تغییرات لازم است. اطلاعات بدست آمده از تجزیه مؤلفه‌های اصلی مؤید این مطلب است که این ترکیبات آغازگری پراکندگی نسبتاً خوبی در سطح ژنوم دارند.

نتایج تجزیه به‌مؤلفه‌های اصلی شامل مقادیر ویژه، نسبت واریانس توجیه شده توسط هر مؤلفه و واریانس تجمعی سه مؤلفه اول در جدول ۴ نشان داده شده است. نتایج تجزیه به‌مؤلفه‌های اصلی نشان داد، سه مؤلفه اول در مجموع ۵۷ درصد واریانس کل را توجیه می‌کنند که سهم مؤلفه اول ۴۸/۹۵ درصد، مؤلفه دوم ۴/۴۸ درصد و مؤلفه سوم ۳/۶۵ درصد از تغییرات کل می‌باشد. این امر نشان دهنده این می‌باشد که نشانگر AFLP (با ترکیبات به کار رفته در این تحقیق) پوشش نسبتاً خوبی در سطح ژنوم دارد. در بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از

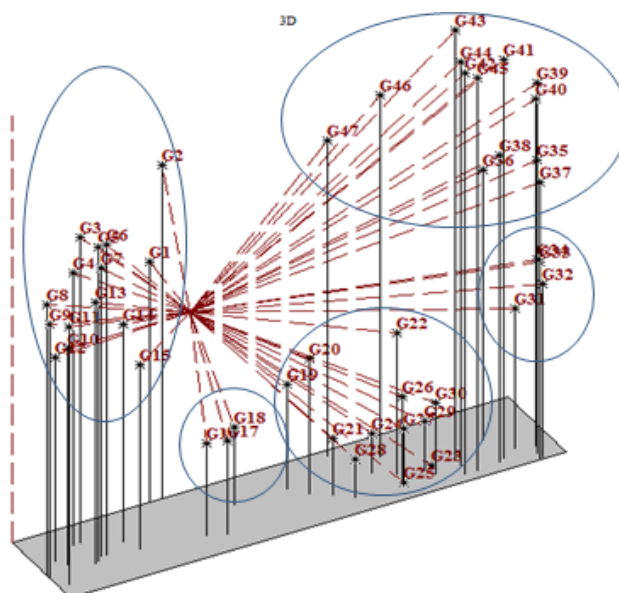
جدول ۴- تجزیه به مولفه‌های اصلی داده‌های مربوط به AFLP.

Table 4- Principle component analysis for AFLP data.

مؤلفه	مقادیر ویژه	واریانس	واریانس تجمعی
component	Eigent values	Variance	Cumulative variance
مؤلفه اول first component	23.01	48.95	48.95
مؤلفه دوم second component	2.10	4.48	53.44
مؤلفه سوم third component	1.67	3.56	57.00

توجه تغییرات بسیار بالا می‌باشد ۵ گروه حاصل از دندوگرام نیز در تجزیه به مولفه‌های اصلی قابل رویت است بنابراین نمودار سه بعدی تجزیه به مولفه‌های اصلی گروه‌بندی انجام شده را توجیه می‌کند.

در شکل ۳ نمایش سه بعدی پراکنش افراد پیرامون مؤلفه‌های اصلی نشان داده شده است. تجمع افراد در یک نقطه از پلات نشان دهنده تشابه ژنتیکی آن افراد می‌باشد. همان طور که در این شکل مشاهده می‌شود سهم سه مؤلفه اول در



شکل ۳- دیاگرام سه بعدی تجزیه به مولفه‌های اصلی بر اساس سه مؤلفه اول داده‌های نشانگر AFLP.

Figure 3- Three dimension diagram of principle component analysis based on first three components of AFLP data.

اصلاحی انار برای اهداف مختلف باشد. با توجه به نتایج این تحقیق می توان گفت که تقسیم بندی ناحیه ای و جغرافیایی تاثیر در تنوع ایجاد شده بین نمونه ها نداشته اما تنوع درون ناحیه ای مشهود است. اینگونه نتایج توسط Yuan *et al.* (2007) و نیز Narzary *et al.* (2009) روی جمعیت های وحشی انار گزارش شده است که نشان دهنده این موضوع است که الگوی مشخصی در تمایز ارقام انار با توجه به مناطق جغرافیایی وجود ندارد.

در کل نتایج نشان داد که چندشکلی مطلوبی بین نمونه های وحشی انار در سه استان وجود دارد که این نشان دهنده غنای زیاد پایه ی ژنتیکی انار در ایران است. در زمینه بررسی تنوع ژنتیکی انار با استفاده از نشانگرهای مولکولی گزارشات متعددی وجود دارد (Rahimi *et al.*, 2005; Avamleh *et al.*, 2009; Nemati *et al.*, 2012; Zamani *et al.*, 2007; Durgac *et al.*, 2008; Narzary *et al.*, 2009). این تنوع ژنتیکی می تواند منبع قابل استفاده برای کمک به برنامه

منابع

- Avamleh H, Hassawi D, Migdadi H, Brake M (2009). Molecular characterization of pomegranate (*punica granatum L.*) landraces grown in Jordan using amplified fragment length polymorphism markers. *Biotechnology* 8: 316-322.
- Bassam BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Annals of Biochemistry* 196: 80-83.
- Durgac C, Ozgen M, Simsek O, Kacar YA, Kiyaga Y, Celebi S, Gunduz K, Serce S (2008). Molecular and pomological diversity among pomegranate (*punica granatum L.*) cultivars in Eastern Mediterranean region of Turkey. *African Journal of Biotechnology* 7: 1294-1301.
- Moslemi M, Zahravi M, Bakhshi Khaniki Gh (2010). Genetic diversity and population genetic structure of pomegranate (*Punica granatum L.*) in Iran using AFLP marker. *Scientia Horticulturae* 126: 441-447.
- Narzary D, Kamalesh SM, Rana TS, Ranade SA (2009). Analysis of genetic diversity among wild pomegranates in Western Himalayas, using PCR methods. *Scientia Horticulturae* 121: 237-242.
- Nemati Z, Tehranifar A, Farsi M, Mirshamsikakhki A, Nemati H, Kayyat M (2012). Evaluation of genetic diversity of Iranian Pomegranate cultivars using fruit morphological characteristics and AFLP markers. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 1:261-268.
- Rahimi T, Seyed Tabatabai B, Sharif nabi B, Ghobadi S (2005). The study of genetic relationship of some of pomegranate from Iran by AFLP marker. *Agronomy Science Journal* 36: 1373-1379.
- Sarkhosh A, Zamani Z, Fatahi R, Ebadi A (2006). RAPD markers revealed polymorphism among (*Punica granatum L.*) genotypes. *Scientia Horticulturae* 111:24-29.
- Sunil Kumar L (1999). DNA markers in plant improvement. *Biotechnology Advances* 17: 143-182.

- Tehranifar A, Zarei M, Nemati Z, Esfandiyari B, Vazifeshenas MR (2010). Investigation of physicochemical properties and antioxidant activity of twenty Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. *Scientia Horticulturae* 126: 180–185.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, *et al.* (1997). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407–4414.
- Witkowicz J, Urbanczyk-Wochniak E, Przybecki Z (2003). AFLP marker polymorphism in cucumber (*Cucumis sativus* L.) near isogenic lines differing in sex expression. *Cellular and Molecular Biology Letters* 8: 375-381.
- 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. *Journal of Genetics and Genomics* 34: 1061-1071.
- Zamani Z, Sarkhosh A, Fatahi R, Ebadi A (2007). Genetic relationships among pomegranate genotypes studied by fruit characteristics and RAPD markers. *Journal of Horticultural Sciences and Biotechnology* 82: 11-18.

Assessment of diversity and genetic relationships in Pomegranate genotypes using AFLP marker

Nazifi-Gelirdi R.¹, Kiani G.*², Dehestani-Kolagar A.³, Hashemi S.H.R.³

¹MSc student of Biotechnology, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran.

²Department of Biotechnology and Plant Breeding, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Sari, Iran.

³Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan.

Abstract

Pomegranate (*Punica granatum* L.) is native to Iran with several ecotypes which have been adapted to various climatic conditions and diseases. Although it is one of the important exported fruits, there is not a precise identification criteria to determine the authenticity of genetic inheritance and proprietary rights in the country. In the present study the genetic relationships of 47 pomegranate genotypes, including 9 cultivated genotypes (from the collection of Yazd) and 38 wild genotypes (from Mazandaran, Gilan and Golestan provinces), were investigated with AFLP markers. Using 10 primer combinations, 825 bands were obtained of which 697 showed polymorphism. Among the primers, primer combination of M-CTT and E-ACG showed the highest number of bands (148) and primer combination of E-ACC, M-CTG produced the lowest number of bands (40). The average value for PIC was 0.21, while Average Marker Index (MI) was 17.33 that the highest one belonged to primer combination of M-CAC and E-AAG. Maximum genetic similarity belonged to Bahnamir with Shirin Kan Tehran samples and the minimum genetic similarity observed between Berenjestanak and Khosh Darreh. Principal component analysis showed that 57% of the total variance was explained by first three components. The identified primer combinations in this study could be used as a powerful tool for determination of genetic relationships between Pomegranate genotypes.

Keywords: *Pomegranate, Genetic diversity, AFLP markers, Principal component analysis.*

