مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

بررسی تنوع ژنتیکی و تجزیه ساختار جمعیت ژرم‌پلاسم انار شیرین ایران با استفاده از نشانگرهای SSR

سیده مهسا موسوی درازمحله[1]، مهرشاد زین‌العابدینی*[2]، محسن مردی[3]، سید حسن مرعشی[4]، سعید ملک‌زاده[5]، مهربانو کاظمی[6]، طه رودبار شجاعی[6]، مهدی زهراوی[7]

[1] کارشناس ارشد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

[6,3,2] استادیار و دانشیار و کارشناس بخش تحقیقات ژنومیکس، پژوهشکده‌بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

[5,4] دانشیار و استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

[7] استادیار بانک ژن ایران، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر- کرج

تاریخ دریافت: 1390/10/20، تاریخ پذیرش: 1392/01/21

چکیده

ایران یکی از بزرگترین تولیدکنندگان و صادرکنندگان انار در دنیاست. هرچند تعداد گونه‌های جنس *Punica* بسیار کم است، تنوع مورفولوژیک بسیار بالایی در داخل ارقام و ژنوتیپ‌های موجود در کشور مشاهده می‌شود. لذا بمنظور تفکیک ژرم‌پلاسم غنی انار موجود در کشور، استفاده از نشانگرهای مناسب ضروری است. بهمین منظور در این مطالعه، 6 نشانگر چند شکل از میان 50 آغازگر ریزماهواره مورد بررسی، بر روی 194 نمونه موجود در ژرم‌پلاسم انار شیرین مورد آزمایش قرار گرفتند. در مجموع تعداد 24 آلل مشاهده گردید که تعداد آن در هر مکان ژنی در دامنه‌ای بین 2 تا 8 آلل قرار داشت. میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی این آغازگرها 0/746 و میانگین ناخالصی 0/778 بدست آمد که ماهیت قوی نشانگرهای ریزماهواره را در بررسی روابط و تنوع ژنتیکی اثبات می‌کند. تجزیه خوشه‌بندی با روش‌های UPGMA و NJ، نرم افزار MEGA4 و تجزیه ساختار با روش Bayesian نرم افزار STRUCTURE2.3 و تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) با نرم افزار NTSYS، بمنظور بررسی روابط ژنتیکی و ساختار جمعیت نمونه‌ها انجام شد. بررسی نتایج تمامی روش‌های ذکر شده نشان داد که طبقه‌بندی ارقام و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه مستقل از منشا جغرافیایی و نام گذاری پیشنهادیشان می‌باشد که این امر اختلاط شدید در ژرم‌پلاسم انار شیرین موجود را اثبات می‌نماید. بررسی مطالعه انجام شده وجود تنوع ژنتیکی بالایی را در ژرم‌پلاسم انار شیرین ایران اثبات می‌کند که می‌تواند برای اهداف اصلاحی مورد توجه قرار گیرد.

واژه کلیدی: *انار، تنوع ژنتیکی، ساختار، نشانگر ریزماهواره.*

*نویسنده مسئول: مهرشاد زین‌العابدینی تلفن: 02632703536 Email: mzeinolabedini@abrii.ac.ir

مقدمه

انار درخت یا درختچه‌ای است پر شاخ و برگ با شاخه‌های نامنظم، کم و بیش خاردار و پاجوش‌های زیاد که در مناطق سردسیری و نیمه گرمسیری به صورت خزان کننده و در نواحی گرمسیری به صورت همیشه سبز می‌باشد. انار از زمان‌های قدیم در ایران کشت و کار می‌شده است. بر طبق نظریه دکاندول و بنابر شواهد موجود، انار بومی ایران و کشورهای هم‌جوار می‌باشد و به طور طبیعی، به تدریج در مناطق آسیای مرکزی تا هیمالیا، خاورمیانه، آسیای صغیر و حوزه مدیترانه گسترش یافته است. در حال حاضر انار از نظر گیاه شناسی کوچکترین خانواده گیاهی است که دارای یک جنس به نام پونیکا *Punica* و دو گونه به نام‌های گراناتوم *Punica granatum* (انارهای معمولی وخوراکی) و پروتو پونیکا *Protopunica* (انارهای غیرخوراکی) می-باشد (Pirseyedi et al., 2010). ارقام مختلف انار از نظر خصوصیات مورفولوژیکی تفاوت های زیادی با یکدیگر دارند و تصور بر این است که این تفاوت ها، ناشی از اثر عوامل محیطی است. علیرغم وجود تعداد زیادی رقم و ژنوتیپ انار در ایران، مدارک مستدلی مبنی بر علل وجود چنین تنوعی وجود ندارد. البته، احتمال می رود که تفاوت های ژنتیکی عامل بروز تفاوت های مورفولوژیکی باشد که در این زمینه، تاکنون تحقیق جامعی صورت نگرفته است. شناسایی، جمع آوری و تشکیل کلکسیون اولیه انار در کشور از سال 1344 آغاز شد و درحال حاضر، بخش اعظمی از تنوع ژنتیکی انار متشکل از 760 ژنوتیپ اهلی، وحشی و زینتی، از مناطق مختلف کشور شناسایی وجمع آوری شده و در کلکسیون ذخایر توارثی یزد، نگهداری می شود. البته، تعداد 540 ژنوتیپ نیز در کلکسیون ساوه وجود دارد که آنها نیز ازکلکسیون یزد انتخاب و به ساوه منتقل گردیده است (Behzadi , 1998 shahrebabaki). شناخت تنوع ژرم‌پلاسمی و روابط ژنتیکی بین مواد اصلاحی، امری مهم در اجرای موفق برنامه‌های اصلاحی است، همچنین بررسی تنوع ژنتیکی درون ژرم‌پلاسم‌ها، بمنظور طبقه‌بندی قابل اعتماد ژنوتیپ‌ها می‌تواند شناسایی ژنوتیپ‌هایی را که برای هدف‌های اصلاحی خاص قابلیت بکارگیری دارند تسهیل نماید (Pazouki et al., 2010; Salehi et al., 2009). پیشرفتهای ایجاد شده در زمینه نشانگرهای مولکولی، در غلبه بر بسیاری از مشکلات موجود در زمینه طبقه‌بندی و حفاظت ذخایر ژنتیکی گیاهی مفید بوده است و امروزه طیف وسیعی از نشانگرهای مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نظیر DAF، RAPD، AFLP و SSR برای انجام مطالعات تنوع ژنتیکی بکار گرفته می‌شوند. در سال‌های اخیر گرایش به استفاده از ریزماهواره‌ها بدلیل مزایایی نظیر توانایی بالا در نشان دادن چندشکلی، توارث همبارز، فراوانی نسبی در ژنوم و تکرار پذیری بالا، بطور قابل ملاحظه‌ای رو به افزایش می‌باشد به طوری که فقط در فاصله سال‌های 2000-1995، بالغ بر 8000 ریزماهواره شناسایی و

جداسازی شدند (Zane et al., 2002). مهمترین کاربردهای ریزماهواره‌ها، مطالعه تنوع ژنتیکی، مطالعه فیلوژنی و تکاملی، تهیه نقشه ژنومی و نشانگری، همسانه کردن ژنی و نقشه‌یابی ژنتیکی، پژوهش‌های اکولوژیکی و تکامل جمعیت‌ها، انتخاب نشانگر همراه با صفت مورد نظر، خالص‌سازی مواد ژنتیکی و انجام مطالعات سیتوژنتیکی است. اخیرا نیز گزارشاتی از جداسازی ریزماهواره‌ها از انار و استفاده از آنها در ارزیابی سطح تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های متعلق به ایران (Pirseyedi et al., 2010)، ایتالیا، اسپانیا و ترکیه (Curro et al., 2010) و تونس (Hasnaoui et al., 2010) ارائه شده است. علی-رغم مطالعات گوناگون انجام شده در زمینه تنوع ژنتیکی انار با نشانگرهای مختلف، تاکنون مطالعه‌ای بر پایه نشانگرهای ریزماهواره بر روی ژرم پلاسم غنی انار شیرین ایران صورت نگرفته است. در این پژوهش برای اولین بار تنوع ژنتیکی و تجزیه ساختار جمعیت ژرم‌پلاسم انار شیرین ایران با استفاده از نشانگرهای SSR مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در این تحقیق 194 ژنوتیپ انار شیرین موجود در کلکسیون انار ایران (یزد) مورد مطالعه قرار گرفت (جدول 1). تجزیه‌های مولکولی: استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت GMO DNA Extraction (BioNEER)، از برگ گیاه صورت گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ (Nano Drop ND-1000) و ژل آگارز اندازه‌گیری شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از 50 نشانگر ریزماهواره انجام شد که از این تعداد 6 آغازگر الگوی باندی چند شکل ایجاد کردند. لازم به ذکر است که سایر آغازگرهای بکار رفته، الگوهای باندی مونومورف یا پیچیده ایجاد کردند. مشخصات آغازگرهای چندشکل SSR در جدول 2 نشان داده شده است (Pirseyedi et al., 2010). اجزای واکنش 10 میکرولیتری عبارت بود از 2 میکرولیتر DNA ژنومی، 0/05میکرولیتر آغازگر رفت (10 نانوگرم) و 0/15 میکرولیتر از آغازگر برگشت (10 نانوگرم) نشاندار شده با مواد فلوئورسنت IRD700، 0/9 میکرولیتر $MgCl_2$ (25 میلی-مولار)، 1 میکرولیتر بافر (10 برابر)، 0/5 میکرولیتر مخلوط نوکلئوتیدی (40 میلی‌مولار)، 0/12 میکرولیتر *Taq* پلیمراز (5 واحد در میکرولیتر) و 5/28 میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر شده، که با برنامه تاچ داون طبق چرخه‌های زیر تکثیر شدند. برنامه اول به مدت 5 دقیقه در دمای 95 درجه سانتی‌گراد جهت شروع واسرشت سازی DNA انجام گرفت. برنامهٔ دوم در 10 چرخه شامل 30 ثانیه در 95 درجه سانتی‌گراد، 30 ثانیه در 63 درجه سانتی‌گراد و 1 دقیقه در 72 درجه سانتی‌گراد و برنامه سوم در 25 چرخه بصورت 30 ثانیه در 95 درجه سانتی‌گراد، 30 ثانیه در 55 درجه سانتی‌گراد و 1دقیقه در 72 درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. برنامهٔ چهارم به

مدت 5 دقیقه در 72 درجه سانتی‌گراد جهت تکمیل بسط DNA انجام گرفت. تفکیک قطعات با استفاده از ژل پلی آکریل آمید و توسط دستگاه DNA Analyzer 4300 (LI-COR) انجام گرفت. تجزیه‌های آماری: باندهای مشاهده شده بر اساس حضور (1) یا عدم حضور (0)، امتیازبندی شدند. تجزیه داده‌ها با استفاده از روش‌های تجزیه خوشه‌بندی بر مبنای فاصله، با روش UPGMA و NJ نرم افزار MEGA4 (Tamura et al., 2007) و روش تجزیه خوشه‌ای بر مبنای مدل، با روش Bayesian نرم افزار STRUCTURE 2.3 (Pritchard et al., 2000) و تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) (نرم افزار NTSYSpc 2.02e) انجام گرفتند. همچنین برای به دست آوردن محتوای اطلاعات چند شکلی و میزان ناخالصی از نرم افزار PowerMarker v.3.25 استفاده شد.

نتایج و بحث

در این تحقیق پس از بکارگیری 50 نشانگر ریزماهواره، 6 نشانگر چندشکل بر روی 194 ژنوتیپ انار شیرین مورد ارزیابی قرار گرفتند. آغازگرهای بکار رفته در مجموع 24 باند چند شکل ایجاد نمودند که در محدوده 305-145 جفت بازی قرار داشتند. تمامی آغازگرهای مورد استفاده دارای چند شکلی در میان ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بودند. میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی این آغازگرها 0/746 و میانگین ناخالصی 0/778 بود که نشان دهنده کارا بودن نشانگرهای ریزماهواره در آشکارسازی چندشکلی می‌باشد. سایر اطلاعات بدست آمده از این آغازگرها در جدول 2 ارائه شده است. بالا بودن مقادیرPIC و هتروزیگوسیتی بدست آمده در این تحقیق در مقایسه با مطالعات مشابه (Hasnaoui et al., 2010; Pirseyedi et al., 2010; Curro et al., 2010)، ممکن است به دلیل تعداد زیاد ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی در این مطالعه باشد و کارایی نشانگرهای ذکر شده را برای بررسی تنوع ژنتیکی انار اثبات می‌کند.

برای گروه‌بندی ژرم‌پلاسم انار شیرین ماتریس عدم تشابه بر اساس ضریب نی (Nei 1972) تشکیل و تجزیه خوشه‌ای با استفاده از روش UPGMA و NJ انجام شد. ضریب همبستگی کوفنتیک مربوط به دندروگرام به دست آمده با روش UPGMA، 0/551 و با روش NJ، 0/287 بود. با توجه به اینکه ضریب کوفنتیک بدست آمده با روش UPGMA بالاتر از NJ بوده و این امر نشان‌دهنده‌ی همبستگی بیشتر بین ماتریس تشابه و دندروگرام رسم شده از این روش می‌باشد، در نتیجه تنها اطلاعات مربوط به این دندروگرام ارایه شد (شکل1).

جدول 1- اسامی ژنوتیپ های انار شیرین ایران واقع در کلکسیون یزد.

Table 1- Name of Iranian Sweet Pomegranate (*Punica granatum* L.) Genotypes deposited on Yazd collection.

شماره Nubmer	ژنوتیپ Genotype	شماره Nubmer	ژنوتیپ Genotype
1	Oud Shirin Narize (Fars)	99	Shirin Kam Bar Najaf Abad (Esfahan)
2	SHahvare Shirin Sarvestan (Fars)	100	Shirin Sormehei Kohpayeh (Esfahan)
3	Bihasteh Khafare Jahrom Shirin (Fars)	101	Shirin Pish Ras Kohpayeh (Esfahan)
5	Shetoni Sidone Marvdasht SHirin (Fars)	102	Shirin Bi Hasteh Najaf Abad (Esfahan)
6	SHirin Hasteh Dar Ghasr Dasht (Fars)	103	Shirin Pish Ras Najaf Abad (Esfahan)
7	Shahvar Eij Estahban SHirin (Fars)	104	Shirin Poost Sefid Natanze (Esfahan)
8	Khafari Jahrom SHirin (Fars)	105	Bi Hasteh Kam Bar Shirin (Esfahan)
9	Bihasteh Sarvestan SHirin (Fars)	106	Shirin Poost Ghermeze Kohpayeh (Esfahan)
10	Jaze Daneh Ghermeze Shirin (Fars)	107	Shirin Poost Nazok Natanze (Esfahan)
11	Bihasteh Nairize Shirin (Fars)	108	Shirin Hasteh Rize Najaf Abad (Esfahan)
12	Shahvar Shirin Ghasr Dasht (Fars)	109	Bi Hasteh Por Bar Shirin (Esfahan)
13	Bihasteh Ghasr Dasht Shirin (Fars)	110	Shirin Gar Najaf Abad (Esfahan)
14	Asali Sarvestan Shirin (Fars)	111	Shirin Poost Ghermeze Natanze (Esfahan)
15	Tashto Eij Estahban SHirin (Fars)	112	Bihasteh Ladize SHirin (Sistan va Balochestan)
16	Bi Daneh Darjazin Shirin (Fars)	113	Bihasteh SHirin (Sistan va Balochestan)
17	Kadro Poost Nazok Kazeron Shirin (Fars)	114	Bihasteh Sangan SHirin (Sistan va Balochestan)
18	Poost Seahe Kazerun Shirin (Fars)	115	Vashik SHirin (Sistan va Balochestan)
19	Kadro Poost Koloft Shirin (Fars)	116	SHirin Mamoli (Sistan va Balochestan)
20	Shekari Marvast Shirin(Yazd)	117	Shirin Ostokhani Geno (Hormozgan)
21	Shahvare Shirin Yazdi Shahed(Yazd)	118	Shirin Poost Ghermez (Hormozgan)
22	Post Siah Abarand Abad Shirin (Yazd)	119	Shirin Garach Haje Abad (Hormozgan)
23	Tabo va Larze Mehr Mahi SHirin(Yazd)	120	KHors Shirin Haji Abad (Hormozgan)
24	Khormai Marvast Mahrize SHirin(Yazd)	121	Shirin Kahieh Haji Abad (Hormozgan)
25	Gabri Ardakan Shirin (Yazd)	122	Shirin Daneh Ghermeze Kan (Tehran)
26	Khatoni Shirin Aqhda (Yazd)	123	Vahshi Kan Shirin (Tehran)
27	Shahvar Aghda Ardakan Shirin (Yazd)	124	Shirin Taghlid Kan (Tehran)
28	Tab Va Larze Aban Mahi Shirin (Yazd)	125	Shirin Ghomi Kan (Tehran)
29	Shirin Poost Koloft Harat (Yazd)	126	Shirin Poost Sabze Ezeh (Khoozestan)
30	Nimoli Kadoei Herabarjan	127	Shahvar Post Ghermez Shirin

	Shirin (Yazd)		(Semnan)
31	Dadashi Poost Koloft Shirin (Yazd)	128	Shirin Poost Nazok Darjzin (Semnan)
32	Shahvar Dadashi Darajeh Do Shirin (Yazd)	129	Gharanchok Sefid Lasajard Shirin (Semnan)
33	Sefideh Poost Khoshk Bafgh Shirin (Yazd)	130	Shahvar Poost Sefid Shirin (Semnan)
34	Shirin Poost NazokAbarkoh (Yazd)	131	Shirin Poost Koloft (Semnan)
35	Dadashi Garach Poost Nazok Shirin (Yazd)	132	Gharanchok Daneh Sorkh Shirin (Semnan)
36	Garch Sahvare Darajeh 2 Shirin (Yazd)	133	Shirin Poost Sefid (Chahar Mahal va Bakhtiari)
37	Kotji Por Bar Bafgh Shirin (Yazd)	134	Vahshi Shirin (Chahar Mahal va Bakhtiari)
38	Ghors Gelo Kotah Bafgh Shirin (Yazd)	135	Shirin Sabze Poost Nazok (Kohkiloyeh va Boyer Ahmad)
39	Narak Shirin Ashkzar (Yazd)	136	Shirin Poost Sefid (Kohkiloyeh va Boyer Ahmad)
40	Shirin Poost Koloft Abar Koh (Yazd)	137	Rash Shirin Narak (Kohkiloyeh va Boyer Ahmad)
41	Shirin Shahvar Ashkzar (Yazd)	138	SHekar NarDaneh Sefid Baneh Shirin (Kordestan)
42	Poost Sefid Khoshk Bafgh Shirin (Yazd)	139	Poost Siahe Saveh Shirin (Markazi)
43	Sefideh Shireh Shirin Bafgh (Yazd)	140	Alak Shirin Saveh (Markazi)
44	Shahvar Dadashi Darajeh Yek Shirin (Yazd)	141	Tabestani save Shirin (Markazi)
45	Shirin Poost Nazok Marvast (Yazd)	142	Malas Shirin Saveh (Markazi)
46	Shirin Taneh Sorkh Saghand (Yazd)	143	Shirin Poost Sefid Saveh (Markazi)
47	Shirin Shahvar Darajeh Yek Saghand (Yazd)	144	Ghermeze Nar Shirin Shabestar (Azarbayejan Gharbi)
48	Shirin Poost Koloft Bahabad Bafgh (Yazd)	145	Shirin Golmankhaneh Eromiah (Azarbayejan GHarbi)
49	Shirin Malas Marvast Mahrize (Yazd)	146	Agh Nar Shirin Shabestar (Azarbayejan Sharghi)
50	SHirin Poost Koloft Saghand (Yazd)	147	SHekar NarTasoj Shirin (Azarbayejan Sharghi)
51	Shirin Tah Sorkh Darajeh Do Saghand (Yazd)	148	Shirin Miveh Dorosht (Azarbayejan Sharghi)
52	Torsh Poost Koloft Saghand SHirin (Yazd)	149	Pish Ras Shirin Dareh Horand (Azarbayejan Sharghi)
53	Shoor Poost Koloft Saghand SHirin (Yazd)	150	Shirin Dareh Horand (Azarbayejan Sharghi)
54	Garch Dadash Poost Nazok Shirin (Yazd)	151	Shirin Daneh Riz (Azarbayejan Sharghi)
55	Shirin Jojok Bajeston (Khorasan)	152	Shirin Daneh Ghermeze (Azarbayejan Sharghi)
56	Shirin Sang Sefid Sabzevar (Khorasan)	153	Shirin Zod Ras (Azarbayejan Shrghi)
57	Zargoshei Torbat Haidarieh Shirin (Khorasan)	154	Shirin Poost Ghermeze (Azarbayejan Sharghi)
58	Shirin Fahloje Tabas (Khorasan)	155	Shirin Poost Sefid (Azarbayejan Sharghi)
59	Shahvar Darajeh Ek Shirin (Khorasan)	156	Shirin Bi Hasteh Chenjeh (Kermanshah)
60	Shirin Poost Ghermez Sabzevar (Khorasan)	157	Poost Seahe Shirin (Kermanshah)
61	Shahvar Shirin Bajestoni (Khorasan)	158	Shirin Poost Koloft (Kermanshah)

62	Shirin Poost koloft Bajeston (Khorasan)	159	Shirin Nar Paveh (Kermanshah)
63	Shahvar Fahlonje Tabas Shirin (Khorasan)	160	Zar Nar Ravavsar Paveh Shirin (Kermanshah)
64	Ghand Poost Sefid Shirin (Khorasan)	161	Sabze Shirin Charmak Kalam (Ilam)
65	Ghand Neghab Kashmar Shirin (Khorasan)	162	Shirin Kam Bar Saleh Abad (Ilam)
66	Shirin Daneh Ghermes Ferdus (Khorasan)	163	Shirin Daneh Sefid Mehran (Ilam)
67	Shirin Neghab Kashmar (Khorasan)	164	Post Ghermez Shahr Babak SHirin (Kerman)
68	Kaviri Bagh Malek Ezeh Shirin (Khorasan)	165	Dombkoh Post Ghermeze Bam SHirin (Kerman)
69	Shirin Daneh Sefid Ramhormoze (Khorasan)	166	Dambkohe Sar Jangal Bam Shirin (Kerman)
70	Shirin Namoli Ferdus (khorasan)	167	Abdandan Shirin Ravar (Kerman)
71	Bi Daneh Kashmar Shirin (Khorasan)	168	Shirin Poost Ghermez Rafsanjan (Kerman)
72	Shirin Daneh Sefid Ferdos (Khorasan)	169	Bihasteh Daneh Ghermez Shirin (Kerman)
73	Shekar Nar Poost Koloft Shirin (Mazandaran)	170	Shahi Daneh Ghermez Shirin (Kerman)
74	Kabdar Shirin Behshahr (Mazandaran)	171	Shirin Poost Sefid Rafsanjan (Kerman)
75	Shirin Jangal Sisangan (Mazandaran)	172	Dom Lak Chatrod Shirin (Kerman)
76	Shirin Agha Mandali Gorgan (Mazandaran)	173	Shirin Poost Ghermez Ravar (Kerman)
77	Agha Mohseni Gorgan Shirin (Mazandaran)	174	Shirin Hasteh Rize Baft (kerman)
78	Shirin Zir Ab Savadkohe (Mazandaran)	175	Shirin Poost Koloft Baft (Kerman)
79	Shirin Nar Behshahr (Mazandaran)	176	Zagh Poost Ghermez Shirin (Kerman)
80	Roshanaei Bi Daneh Gorgan Shirin (Mazandaran)	177	Khasak Daneh Ghermes Ravar Shirin (Kerman)
81	SHekar Nar Poost Nazok Shirin (Mazandaran)	178	Shirin Daneh Ghermes Rafsanjan (Kerman)
82	Shirin Mamoli Gorgan (Mazandaran)	179	Shirin Shahvar Sirjan (Kerman)
83	Shirin Goli Nar Behshahr (Mazandaran)	180	Shirin Poost Nazok Baft (Kerman)
84	Bazri Shirin Dastjerd (Esfahan)	181	Shirin Khas Sirach Shahdad (Kerman)
85	Ardestani Post Sefid SHirin (Esfahan)	182	Shirin Hasteh Rize SHahdad (kerman)
86	Post Sefid Homa Abad Shirin (Esfahan)	183	Jazi Poost Sefid Shirin (Kerman)
87	Post Syahe Dastjerd Shirin (Esfahan)	184	Shirin Garach Sirjan (Kerman)
88	Bihasteh Najaf Abad Shirin (Esfahan)	185	Shahi Daneh Seahe Chatrud Shirin (Kerman)
89	Shirin Poost Sefid Shahreza (Esfahan)	186	Shirin Hasteh Dar Khabar Baft (Kerman)
90	Shirin SHahvar Ardestan (Esfahan)	187	Shirin Dandeh Dare Khabar Baft (Kerman)
91	Poost Seahe Ardestan Shirin (Esfahan)	188	Bi Hasteh Shirin Khabar Baft (Kerman)
92	Bi Hasteh Ardestan Shirin (Esfahan)	189	Zard Anar Khoram Abad Shirin (Lorestan)
93	Shirin Mamoli Ardastan	190	Ghermeze Shirin Kohdasht

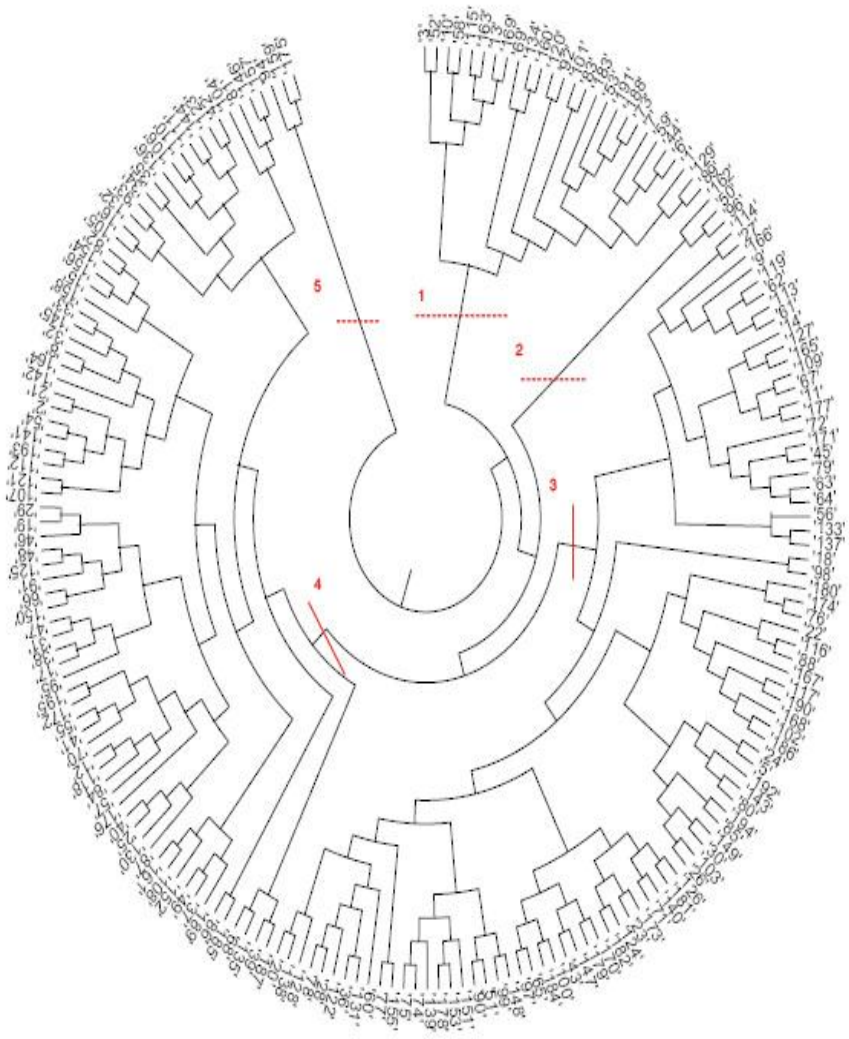
	(Esfahan)		(Lorestan)
94	Shirin Poost Ghermeze Zavareh (Esfahan)	191	Shirin Daneh Ghermeze Khoram Abad (Lorestan)
95	Shirin Zardabady Ardestan (Esfahan)	192	Zard Mahali Tang Seab Shirin (Lorestan)
96	Shirin Shahvar Kohpayeh (Esfahan)	193	Shirin Lori Khoram Abad (Lorestan)
97	Hasteh Dar Por Bar Shirin (Esfahan)	194	Shahvar Miveh Dorosht Tarom Shirin (Zanjan)
98	Shirin Poost Koloft (Esfahan)	195	Shirin Poost Ghermeze Ramsar (Gilan)

جدول 2- اطلاعات بدست آمده از آغازگرهای ریزماهواره.

Table 2 - Produced information by microsatellite primers.

آغازگر Primer	تعداد آلل Number of alleles	اندازه Size	PIC	H
MP07	4	180-190	0.789	0.814
MP12	4	240-270	0.872	0.883
MP26	8	145-160	0.915	0.919
MP30	3	160-190	0.668	0.713
MP39	2	250-305	0.496	0.568
MP42	3	200-220	0.741	0.775

نتایج نشان داد که هیچ ارتباط خاصی بین قرارگیری ژنوتیپ‌ها در دسته‌ها بر مبنای تقسیم-بندی‌های استانی و یا ژنوتیپ‌هایی با نام‌گذاری مشابه وجود نداشته و ژنوتیپ‌ها بطور مستقل از این عوامل طبقه‌بندی شده‌اند. از 5 گروه حاصل، گروه‌های 1، 3 و 4 حاوی بیشترین تعداد نمونه‌ها بوده و هر یک از 2 گروه بعدی (2 و 5) تنها حاوی 3 نمونه انار بودند. با بررسی این دندروگرام، مشاهده می‌شود که هیچ ارتباط خاصی بین قرارگیری نمونه‌ها در گروه‌های پنج-گانه بر مبنای تقسیم‌بندی‌های استانی و نمونه‌های با نام‌گذاری مشابه وجود نداشته و نمونه‌ها بطور مستقل از این عوامل طبقه بندی شده‌اند. برای مثال درگروه 5، 3 نمونه پوست قرمز زواره اصفهان (با شماره 94 در دندروگرام)، نار پاوه کرمانشاه (159) و پوست کلفت بافت کرمان (175) با هم در یک دسته قرار گرفته‌اند. نمونه پوست سفید کهگیلویه بویراحمد (136) و پوست قرمز کوهپایه اصفهان (106) در گروه 4 طبقه-بندی شدند. در بعضی موارد نیز نمونه‌های با اسامی مشابه مربوط به استان‌های مختلف در کنار هم در یک دسته قرار گرفتند مثلا در گروه 1، نمونه‌های شهوار فارس، خراسان و یزد با شماره-های 7، ٥٩،٤٤ در کنار هم قرار گرفتند.



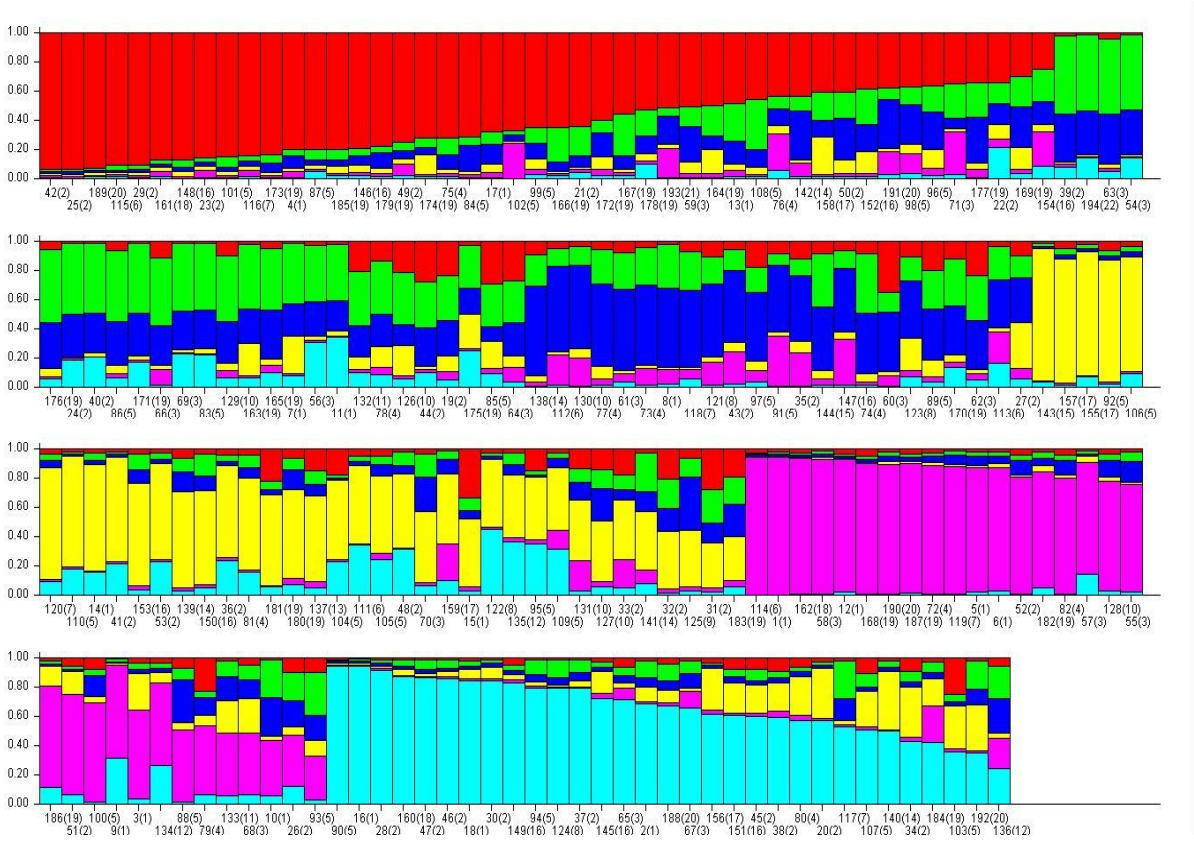
شکل 1- گروه بندی 194 ژنوتیپ انار شیرین ایران با استفاده از نشانگر ریزماهواره بر اساس الگوریتم UPGMA.

Figure 1- Grouping of 194 Iranian sweet Pomegranate (*Punica granatum* L.) Genotype using microsatellite markers according to UPGMA algorithm.

نتایج تجزیه خوشه‌بندی بر مبنای مدل، بر اساس شاخص آماری Bayesian، به منظور پی بردن به ساختار فاصله‌ای جمعیت‌ها و با فرض اینکه مدل تبار [1] از نوع مخلوط [2] و مدل فراوانی آللی از نوع پیوسته باشد و نیز با فرض K=1 تا K=10 (K نشان دهنده‌ی تعداد جمعیت است) نشان داد که در ژرم‌پلاسم موجود 6 جمعیت وجود دارد که هیچ یک از آنها بر مبنای استان-هایی که این ژنوتیپ‌ها از آنجا منشا گرفته یا جمع آوری شده بودند، بطور کامل از هم تفکیک

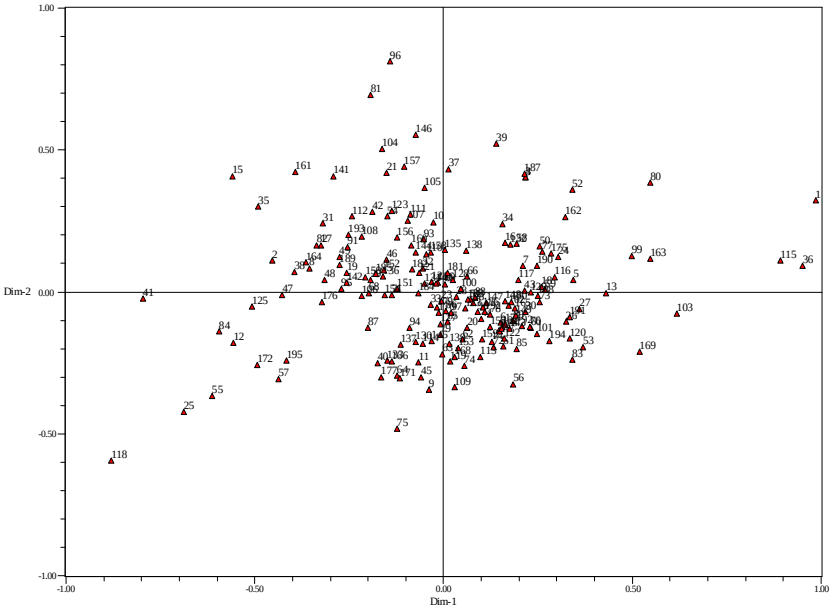
[1] Ancestry model
[2] Admixture

نشده‌اند (شکل2). اختلاط شدید مشاهده شده در این ژرم‌پلاسم، این فرض را که تبار ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از نوع مخلوط باشد اثبات می‌کند. یعنی فرد i ممکن است بخش‌هایی از ژنوم خود را از تبار خود در جمعیت K، به ارث برده باشد. همچنین فراوانی آللی نیز ممکن است در جمعیت‌های مختلف به علت مهاجرت و یا تبار مشترک، مشابه باشد (شکل 2).



شکل 2- دسته‌بندی ژرم‌پلاسم انار بر اساس نرم افزار Structur.

Figure 2- Clastring of Pomegranate Germplasm using structure software.



شکل 3- تجزیه به مختصات اصلی در 194 ژنوتیپ شیرین انار بومی ایران با استفاده از نشانگرهای SSR.

Figure 3- Principal coordinate analysis of 194 Iranian sweet pomegranate accessions based on SSR markers.

با استفاده از محاسبه‌ی مقادیر مشخصه[1]، بر اساس اولین محور با مقدار مشخصه 16/665 و درصد واریانس 7/18 و دومین محور با مقدار مشخصه 12/245 و درصد واریانس 5/28، از طرح اولین 2 مختصات برای ترسیم شکل PCoA استفاده شد (شکل3). تجزیه به مختصات اصلی نیز قادر به نمایش تفکیک واضحی در ژرم‌پلاسم موجود نگردید و تصویر پیچیده‌ای از روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها و ارقام ایجاد کرد و به نظر می‌رسد به ابعاد بیشتری جهت توضیح روابط بین ژنوتیپ‌ها نیاز است. طبق نظر Melchinger (1993) زمانی که اولین، دومین یا سومین مختصات اصلی کمتر از 25% کل واریانس را بیان می‌کند، روش‌های تجزیه خوشه‌ای برای کشف روابط بین ژنوتیپ‌ها حساس‌تر و قابل اعتمادتر از تجزیه PCoA می‌باشد.

به طور کلی نتایج بدست آمده از تجزیه با روش‌های مختلف یکدیگر را تائید می‌کنند. به نظر می‌رسد عدم مطابقت بین نواحی جغرافیایی ژنوتیپ‌ها و نام‌گذاری و خصوصیات ژنتیکی آن-ها از خصوصیات ژرم‌پلاسم‌های انار شیرین بومی ایران می‌باشد. تجزیه ژرم‌پلاسم انار تونس که برپایه خصوصیات میوه توسط Mars and Marrakchi (1999) انجام شده بود، نشان داد که منشا جغرافیایی ارقام، تعیین کننده دسته‌بندی آنها بر پایه خصوصیات نمی‌باشد. در مطالعه‌ای که با استفاده از نشانگر RAPD بر روی 24 ژنوتیپ انار ایران انجام گردد نیز گزارش شد که هیچ کلاستربندی مشخصی بر اساس صفات

[1] Eigenvalue

مورفولوژیک و نام ژنوتیپ‌ها وجود نداشت، بنابراین بسیاری از ارقام بر پایه صفات ظاهری و شیمیایی-فیزیکی خود می‌توانند از یکدیگر متمایز شوند و به عنوان شیرین، ترش، ملس، زودرس طبقه‌بندی شوند (Sarkhosh et al., 2006). در مطالعه‌ای دیگر بر روی ژنوتیپ‌های تونس برمبنای AFLP نیز گزارش شد که دسته‌بندی ژنوتیپ‌ها مستقل از منشا جغرافیایی‌شان بوده است (Jbir et al., 2008).

مطالعه حاضر نیز نشان داد که ژنوتیپ‌های انار شیرین ژرم‌پلاسم موجود بر اساس مکان‌ها و یا نام‌گذاری‌های مشابه شباهتی در دسته‌بندی نشان نمی‌دهند، که یکی از دلایل آن ممکن است عدم شناخت منشا دقیق گیاه باشد یعنی انارهایی که در یک منطقه جغرافیایی وجود دارند در اصل از مکان دیگری منشا گرفته ولی تحت نام جدیدی در مقصد کشت شده باشند. چنین نتایجی اغلب بدین علت رخ می‌دهد که جابجایی ژنوتیپ‌ها از منطقه اصلی به سایر بخش‌های کشور بیشتر برپایه خصوصیات مورفولوژیکی و جمع‌آوری و کدگذاری ژنوتیپ‌ها در کلکسیون می‌باشد که این امر لزوم دقت در هنگام نام‌گذاری ژنوتیپ‌ها و همچنین لزوم استفاده همزمان از اطلاعات مولکولی و مورفولوژیک را برای تاسیس کلکسیون آشکار می‌سازد. زیرا که برخی از جهش‌ها و تغییرات ژنتیکی در خصوصیاتی نظیر رنگ میوه، شکل، اندازه درخت رخ می‌دهند که از نظر فنوتیپی به راحتی قابل شناسایی هستند، اما با استفاده از برخی نشانگرهای مولکولی قابل تشخیص نیستند. همچنین باید توجه شود که تاثیرات بعد از نسخه‌برداری و توارث غیرهسته‌ای نیز می‌تواند یکی از دلایل عدم تناسب نشانگرهای مولکولی و خصوصیات مورفولوژیک باشد بنابراین انجام مطالعات مورفولوژیکی بیشتر و یا مطالعه صفات فنولوژیک بر روی برگ، گل و میوه برای گرفتن نتایج قابل اعتمادتر در ژنوتیپ-های انار می‌تواند مثمر ثمر باشد.

تعداد ناکافی نشانگرهای چندشکل استفاده شده در این مطالعه می‌تواند عامل دیگر عدم مشاهده رابطه مشخص بین نمونه‌های هر گروه بر اساس تقسیم‌بندی‌های جغرافیایی باشد. بنابراین ممکن است با افزایش تعداد نشانگرهای SSR مورد استفاده به تفکیک بهتری در ژرم‌پلاسم مورد مطالعه دست یابیم که این امر مستلزم طراحی و استفاده از آغازگرهای SSR بیشتری می‌باشد. همین‌طور از آنجایی که آغازگرهای SSR از نواحی غیرکدکننده طراحی شده است، در حالیکه خصوصیات مورفولوژیک حاصل توالی‌های بیان شونده و برهم‌کنش آنهاست، بنابراین قسمتهایی از ژنوم که بوسیله این آغازگرها تکثیر شده احتمالا در ژنهای کدکننده برای خصوصیات مورفولوژیکی قرار ندارند، بنابراین استفاده از آغازگرهای EST که بر پایه نواحی کدشونده طراحی می‌شوند، پیشنهاد می-گردد.

منابع

Behzadi Shahrbabaki H (1998). Genetic Diversity of Pomegranate Genotypes in Iran. Nashr Amoozesh Keshavarzi. Tehran, Iran.

Currò S, Caruso M, Distefano G, Gentile A, La Malfa L (2010). New microsatellite loci for pomegranate, *Punica granatum* (Lythraceae). American Journal of Botany 58-60.

Hasnaoui N, Buonamici A, Sebastiani F, Mars M, Trifi M, Vendramin G (2010). Development and characterization of SSR markers for pomegranate (*Punica granatum* L.) using an enriched library. Conservation Genetic Resource.

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

Mars M, Marrakchi M (1999). Diversity of pomegranate (*Punica granatum* L.) germplasm in Tunisia. Genetic Resource Crop Evolution 46: 461-467.

Melchinger AE (1993). Use of RFLP markers for analyses of genetic among breeding materials and prediction of hybrid performance. D.R. Buxton (ed.) 621–628.

Nei M (1972). Genetic distance between populations. American Naturalist. 106: 283-292.

Pazouki L, Mardi M, Salehi Shanjani P, Hagidimitriou M, Pirseyedi S.M, Naghavi M.R, Avanzato D, Vendramin E, Kafkas S, Ghareyazie B, Ghaffari M.R, Khayam Nekoui S.M (2010). Genetic diversity and relationships among Pistacia species and cultivars. Conservation Genetics 11:311–318.

Pirseyedi S.M, Valizadegan S, Mardi M, Ghaffari M, Mahmoodi P, Zeinalabedini M, Khayam S.M (2010). Isolation and characterization of novel microsatellite markers in pomegranate (*Punica granatum* L.). International Journal of Molecular Science 11: 2010-2016.

Salehi Shanjani P, Mardi M, Pazouki L, Hagidimitriou M, Avanzato D, Pirseyedi S.M, Ghaffari M.R, Khayam Nekoui S.M (2009). Analysis of the molecular variation between and within cultivated and wild Pistacia species using AFLPs. Tree Genetics and Genomes 5:447–458.

Sarkhosh A, Zamani Z, Fatahi R, Ebadi A (2006). RAPD markers reveal polymorphism among (*Punica granatum* L.) genotypes. Scientia Horticulturae 111:24-29.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 8: 1596-1599.

Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. Molecular Ecology 1-16.

The Survey of Genetic Diversity & Population Structure Analysis of Iranian Sweet Pomegranate (*Punica granatum* L.) Germplasm Using SSR Markers

Mousavi Derazmahalleh S.M. [1], Zeinalabedini M.[*] [2], Mardi M.[3], Marashi S.H. [4], Malekzadeh S.[5], Kazemi M.[6], Roodbar shojaie T.[6], Zahravi M.[7]

[1] MSc student, Plant Breeding Dept., University of Ferdousi, Mashhad, Iran.
[2] Assistant Professor, Genomics Dept., Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran.
[3] Associated Professor, Genomics Dept., Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran.
[4] Associated Professor, Plant Breeding Dept., University of Ferdousi, Mashhad, Iran.
[5] Association Professor, Plant Breeding Dept., University of Ferdousi, Mashhad, Iran.
[6] Technician, Genomics Dept., Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran.
[7] Association Professor, Iran Gene Bank, Seed & Plant Improvement Institute, Karaj, Iran.

Abstract:

The pomegranate (*Punica granatum* L.) is native horticultural plants of Iran which have been cultivated from ancient times for its economic, ornamental and medicinal properties globally. Now Iran is one of the largest manufacturers and exporters of pomegranate in the world. Although the number of *Punica* species is very low, but there is a high morphological diversity have been observed within the existing varieties and genotypes in country. Therefore, the use of appropriate markers in order to separate the rich pomegranate germplasm of country is necessary. In this study, six out of 50 microsatellite markers (SSR) were polymorphic on 194 samples of the sweet pomegranate germplasm. Total numbers of observed alleles were 24, the number of alleles per locus have ranged between 2 to 8. Average polymorphism information content and heterozygosity of these primers were 0.746 and 0.778 respectively, have proved strong nature of microsatellite markers in genetic diversity studies. In order to assess of genetic relationships and population structure, Cluster analysis was performed by methods UPGMA and NJ with MEGA4 software, structure analysis model-based Bayesian by STRUCTURE2.3 software and principal coordinate analysis (PCoA) with NTSYS software. Results of all mentioned methods have shown that cultivars and genotypes are generally clustered independently from their geographical origin and their proposed denomination suggesting that severe admixture in studied samples. Survey of our study indicated that there is a high genetic diversity among of sweet pomegranate germplasm in Iran that this result can be used for purpose of breeding.

Keyword: *Pomegranate, Genetic diversity, Structure, Microsatellite marker.*

[*] Corresponding Author: Zeinalabedini M. Tel: 026-32703536 Email: mzeinolabedini@abrii.ac.ir