مجله علوم باغبانی ایران
دوره ۴۴، شماره ۱، ۱۳۹۲ (۱۱۸-۱۰۹)

ارزیابی گوناگونی ژنتیکی ژنوتیپ های انار *(Punica granatum)* طارم زنجان با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD

ولی ربیعی[1*]، مینا سعادتی[2]، رقیه عظیم خانی[3]، سجاد جعفری[2]و سمیه محمدی[4]
۱،۳،۴، استادیار ، مربی، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان
۲، دانشجویان کارشناسی ارشد ، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۵ – تاریخ تصویب: ۹۱/۳/۲۱)

چکیده

انار یکی از مهمترین میوه‌هایی است که ایران مرکز و کشت و کار آن در دنیا بشمار می-رود و غنی‌ترین ذخایر ژنتیکی انار دنیا در ایران وجود دارد. در این مطالعه تنوع ژنتیکی ۱۵ نمونه انار مربوط به شهرستان طارم زنجان با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD مورد بررسی قرار گرفت. DNA ژنومی از برگ‌ها استخراج، و از نظر ویژگی های کمی و کیفی در واکنش PCR، مورد ارزیابی قرار گرفتند. از تعداد ۳۹ آغازگر تصادفی ۱۰ نوکلئوتیدی، در مجموع ۲۷۳ نوار تشکیل شد، ۲۰۱ نوار چند شکل و ۷۲ نوار تک شکل بودند. تعیین فواصل ژنوتیپ-ها با استفاده از نرم‌افزار NTSYS انجام شد و در نهایت دندروگرام براساس ضریب تشابه SMC و الگوریتم UPGMA ترسیم گردید. بیشترین و کمترین تشابه بین ژنوتیپ‌ها به ترتیب برابر ۸۳٪ و ۵۹٪ بدست آمد. دندروگرام حاصل در حد تشابه ۰/۵۹ ژنوتیپ‌ها را به دو گروه جدا تقسیم کرد و در حد تشابه ۰/۶۳ ارقام به سه گروه تقسیم شدند. همچنین ضریب کوفنتیک بین ماتریس تشابه و دندروگرام حاصل در حد r=۰/۷۶ بدست آمد که نشان دهنده همبستگی مناسب دندروگرام با ماتریس تشابه است. در نمونه شیرین پوست نازک که در یک گروه جداگانه قرار گرفت امکان بهره گرفتن از هتروزیس و زمینه تولید واریته های هیبرید وجود دارد. گروه بندی بر اساس تجزیه به مولفه‌های اصلی نتایج حاصل از تجزیه کلاستر را تایید می‌کند.

واژه‌های کلیدی: انار، تنوع ژنتیکی، نشانگر مولکولی، RAPD

مقدمه

انار (*Punica granatum* L.) گیاهی است درختچه‌ای با شاخه‌های کوتاه که از زمان‌های قدیم در ایران کشت و کار می‌شده است. 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 بین کشورهای تولید کننده انار در دنیا، ایران دارای بیشترین سطح زیر کشت می‌باشد و انار ایران به دلیل کیفیت مرغوب، ظاهر جذاب و رنگ مطلوب دانه‌های آن در بخش صادرات غیر نفتی و در بین محصولات کشاورزی در بازارهای جهانی محصول مناسبی می‌باشد. ارقام صادراتی انار براساس مهمترین صفات مورفولوژیکی چون رنگ پوست، رنگ دانه، طعم دانه، ضخامت پوست و وزن میوه انتخاب می‌شوند (Mohseni, 2007). شهرستان طارم از نظر جغرافیایی در ۴۸ درجه و ۳۰ دقیقه تا ۴۹

* نویسنده مسئول: ولی ربیعی تلفن: ۰۹۱۲۱۴۱۵۴۴۷ E-mail: rabiei@znu.ac.ir

درجه و ۱۵ دقیقه طول جغرافیایی، و ۳۶ درجه و ۴۱ دقیقه تا ۳۷ درجه و ۱۲ دقیقه عرض جغرافیایی قرار گرفته است. این شهرستان در ارتفاع ۶۵۰ متری از سطح دریا و در شمال شرقی استان زنجان واقع شده است و دارای اقلیمی معتدل و نیمه مرطوب بواسطه ی وجود رودخانه ی قزل اوزن می باشد. ارقامی از انار که در شهرستان طارم مورد کشت و کار قرار می‌گیرند شامل: ملس شهسوار، پوست سیاه، ساوه، میخوش صورتی، شهسوارشیرین، دوستی، ترش محلی، ترش جنگلی، کبابی، شیرین کوچک، شیرین پوست نازک، شیرین پوست کلفت، ملس پوست نازک و ملس پوست کلفت می‌باشد که ارقام ملس، دوستی، شهسوار و میخوش بازار پسندی بسیار خوبی دارند (Behzadi, 1998). غنای ژرم‌پلاسم انار ایران را می‌توان در کلکسیون شهرستان‌های یزد، ساوه و ورامین مشاهده کرد. بررسی تنوع ژنتیکی درختان میوه براساس خصوصیات مورفولوژیکی اگرچه با ارزش می‌باشد و می‌تواند در شناسایی ژنوتیپ‌ها موثر باشد اما به دلیل تاثیر عوامل محیطی روی آنها امروزه استفاده از روش‌های مولکولی برای شناسایی و تفکیک دقیق ژنوتیپ‌ها و ارقام اجتناب ناپذیر است (Struss, 2001). ذخایر ژنتیکی گیاهی، ضمن فراهم آوردن مواد اولیه برای توسعه کشاورزی، به عنوان منبعی برای سازگاری ژنتیکی در برابر تغییرات محیطی و استرس ها مطرح هستند. روند افزایش تولید و بهبود کیفیت مواد غذایی بستگی به حفاظت و به کارگیری موثر منابع ژنتیکی دارد.نیل به این هدف مستلزم شناسایی، ارزیابی، حفاظت، ثبت و تبادل این مواد است (Abdmishani & Bushehri, 1998). تنوع ژنتیکی درجمعیت‌های گیاهی بر اثر مجموعه‌ای از مکانیسم‌ها شامل جهش، نوترکیبی، مهاجرت، جریان ژن، رانده‌شدن ژنتیکی و انتخاب طبیعی و یا مصنوعی بوجود آمده و حفظ می‌شود (Henry, 1997). امروزه نشانگرهای مولکولی در سطوح وسیعی از علوم گیاهی و جانوری در زمینه‌های مختلف از جمله مطالعه تنوع ژنتیکی، تهیه نقشه‌های ژنتیکی، همسانه سازی ژن‌ها، تشخیص بیماری‌های گیاهی و همچنین در مدیریت بهتر و موثر ژرم‌پلاسم گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Naghavi et al., 2005). یک نشانگر مناسب برای بررسی تنوع ژنتیکی باید دارای چهار خصوصیت باشد که عبارت از وراثت پذیری بالا، داشتن چند شکلی بالا، سهولت ارزیابی و اندازه‌گیری و قابلیت تعمیم نتایج به مطالعات دیگراست. تکنیک‌های مولکولی زیادی به عنوان نشانگر جهت بررسی تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند که این نشانگرهای مولکولی را می‌توان از هر نوع داده مولکولی که اختلافات قابل گزینشی بین دو موجود زنده را در دسترس قرار می‌دهند، بدست آورد (Zane, 2002).

انواع مختلف نشانگرهای DNA مانند AFLP[1]، SSR[2]، DAF [3] و RAPD با تفاوت‌های زیادی از نظر تکنیکی و روش تولید، نحوه‌ی کاربرد، امتیاز بندی و تفسیر نتایج ابداع و معرفی گردیده‌اند. نشانگرهای SSR و AFLP از بین این نشانگرها به طور وسیع برای بررسی تنوع ژنتیکی ارقام مورد استفاده قرار می‌گیرند. نشانگرهای RAPD برای ترسیم نقشه لینکاژی گیاه کاربرد دارند. علاوه بر مزایایی چون عدم استفاده از مواد رادیواکتیو و عدم نیاز به داشتن اطلاعات قبلی در مورد توالی ژنوم مورد مطالعه، با توجه به اینکه این نشانگر در مقایسه با نشانگرهایی چون SSR میزان چند شکلی بیشتری را آشکار می‌کنند؛ قدرت تفکیک ژنوتیپ‌هایی که تفاوت زیادی با یکدیگر ندارند و همچنین نشانگرهایی قادر به تفکیک آنها نیستند را دارا می باشند (Sheidai et al., 2008). از نشانگر RAPD در بررسی تنوع ژنتیکی بسیاری از ارقام گیاهی باغی از جمله، زیتون (Collins et al., 1993)، سیب (Oraguzie et al., 2001; Harada et al., 2007) استفاده شده است. همچنین در ایران بررسی تنوع ژنتیکی در بادام (Shiran et al., 2007)، گردو (Atefi,1993)، انار (Sarkhosh et al.,2006)، انجیر (Mahdavian et al., 2008) و گیلاس های ایرانی (Khadivi et al., 2010) با استفاده از صفات مرفولوژیکی و پومولوژیکی انجام شده است. اولین گزارش در مورد انارهای ایران با استفاده از نشانگرهای RAPD توسط Talebi badaf et al. (2003) ارائه شده است این محقق برای اولین بار تنوع ژنتیکی

1. Amplified Fragments Length Polymorphism
2. Simple Sequence Repeat
3. DNA Amplified Fingerprinting

۲۸ ژنوتیپ انار را که از کلکسیون انار یزد تهیه شده بودند را با استفاده از نشانگرهای RAPD مورد بررسی قرار داد. از ۱۰۴ آغازگر تصادفی سری اوپرن تعداد ۱۳ آغازگر چندشکلی نشان دادند. محققین دیگری میزان تنوع و خویشاوندی را در ۲۴ ژنوتیپ انار ایران و ۱۱۳ آغازگر تصادفی در انجام واکنش PCR بر روی نمونه‌ها آزمایش کردند که ۲۷ آغازگر تکثیر DNA الگوی خوبی را نشان دادند و این ۲۷ آغازگر در مجموع ۲۵۷ قطعه در کل ژنوتیپ‌ها تکثیر کردند که در بین آنها ۱۵۸ قطعه چند شکل بودند. بنابر نتایج بدست آمده، ژنوتیپ‌های مورد نظر، از تنوع بالایی برخوردار بودند و این نشان دهنده غنی بودن ذخایر ژنتیکی انار در ایران است (Zamani et al., 2007). هدف از تحقیق حاضر نیز بررسی تنوع و قرابت ژنتیکی برخی از ارقام انار که در منطقه طارم زنجان کشت و کار می‌شوند، با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این تحقیق نمونه ی برگ انار ۱۵ ژنوتیپ (ارقام شیرین پوست نازک، شیرین پوست کلفت، ساوه، ترش محلی، ترش جنگلی، میخوش صورتی، ملس پوست کلفت، ملس پوست نازک، دوستی، شهسوار شیرین، ملس شهسوار، کبابی، پوست سیاه، شیرین کوچک و رقمی که در منطقه ناشناخته بود و در اینجا به عنوان ناشناخته یا Unknown معرفی شده است) از باغات شهرستان طارم زنجان در فروردین ماه سال ۱۳۸۸ جمع آوری و در شرایط ازت مایع ۱۹۶- درجه سانتیگراد به دمای ۸۰- درجه سانتیگراد انتقال داده شد.

استخراج DNA و شرایط PCR

استخراج DNA گیاه انار به دلیل داشتن برگ‌های خشبی مشکل می‌باشد. در این آزمایش دو روش اصلی Murry & Thammson-CTAB (1980) و (2004) Hanania et al. برای استخراج DNA به کار گرفته شد. علاوه بر این دو روش، DNA نمونه‌های مختلف با استفاده از کیت استخراج DNA شرکت Fermentas نیز استخراج شد. نمونه های DNA به دست آمده از این سه روش بر روی دستگاه الکتروفورز با ژل آگارز ۰/۸٪ قرار گرفته و به کمک آن علاوه بر تایید کیفیت، غلظت یکسان DNA نمونه‌ها (۵ نانوگرم در میکرولیتر) آماده شد. ۴۸ آغازگر تصادفی RAPD از کمپانی Biooner تهیه گردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز طبق روش (Williams et al, 1990) برای هر واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: ۰/۸ میکرولیتر (50mM) $MgCL_2$, ۰/۵ میکرولیتر $dNTP_s$ (۱۰mM)، ۲/۵ میکرولیتر 10x PCR Buffer، ۰/۲ میکرولیتر Taq (DNA polymerase) ۱U، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (۰/۱ mM) و ۱۸ میکرولیتر dH_2O انجام شد. چرخه-های حرارتی مطابق جدول شماره (۱) با استفاده از دستگاه ترموسایکلر کمپانی Biorad مدل iCycler انجام گردید.

جدول ۱- برنامه تکثیر PCR با استفاده از نشانگرهای RAPD

سیکل اول	۴ دقیقه 94^0C (واسرشت سازی DNA)
	۱ دقیقه 37^0C (اتصال)
	۲ دقیقه 72^0C (بسط)
سیکل بعدی (۴۴دور)	۱ دقیقه 92^0C (واسرشت سازی DNA)
	۱ دقیقه 37^0C (اتصال)
	۲ دقیقه 72^0C (بسط)
بسط نهایی	۲ دقیقه 72^0C
نگهداری فراورده PCR	۴ به مدت بی نهایت ^0C

محصولات تکثیر توسط ژل آگارز ۱/۲ ٪ تفکیک شده و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، با استفاده از دستگاه ژل داک عکس برداری شد. میزان قدرت تمایز هر باند و آغازگر RAPD با استفاده از فرمول زیر بدست

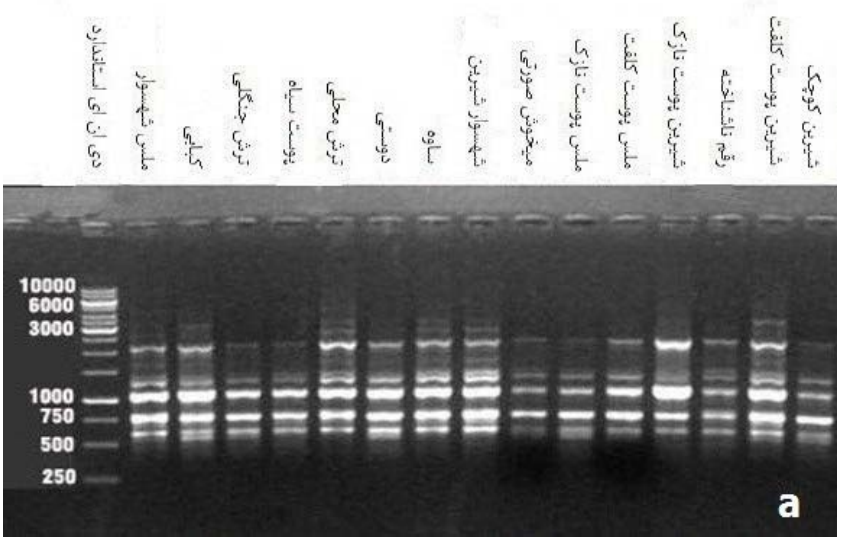
آمد که در آن p_i درصد فراوانی یک آلل از هر باند می‌باشد.

$$Rp = \sum I_b$$
$$I_b = 1-[2\times (0.5-P_i)]$$

گروه بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای UPGMA[1] و ضریب MC [2] انجام شد. ساختار ژنتیکی مجموعه حاضر با استفاده از روش تجزیه به مولفه‌ی اصلی[3] نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. از این روش می‌توان برای آنالیز داده‌ها به ویژه زمانی که مولفه‌های اصلی بیش از ۲۵ درصد واریانس کل را توجیه می‌نمایند استفاده کرد (Mohammadi & Prasanna, 2003). تجزیه کلاستر و تجزیه به مولفه‌های اصلی با استفاده از نرم افزار NTSYS Ver.2.02 انجام شد.

نتایج و بحث

با توجه به اندازه‌گیری‌های کیفی نمونه‌های DNA استخراج شده روی ژل آگارز و انجام PCR با این سه روش مشخص گردید که روش Hanania et al. (2004) روی گیاه انار روش مناسبی برای استخراج DNA می‌باشد. DNA به دست آمده از این روش از کمیت و کیفیت بالایی برای انجام واکنش PCR برخوردار است. در این روش محتویات سیتوپلاسمی سلول‌های متلاشی شده در مراحل اولیه استخراج حذف می‌شود. درحین این عمل تمامی مواد مشکل‌زا و متابولیت‌های ثانویه‌ای که محل تجمع آن‌ها در سیتوپلاسم سلول می‌باشد از محیط کار خارج می‌شوند و بدون نیاز به وجود کربن فعال برای حذف آلودگی‌های پلی ساکاریدی، ادامه مراحل استخراج با استفاده از دستور العمل پایه CTAB دنبال می‌شود (Hanania et al., 2004). از ۴۸ آغازگر مورد استفاده، ۳۹ آغازگر چندشکلی مطلوبی نشان دادند. با استفاده از ۳۹ آغازگر مورد مطالعه برای ۱۵ رقم انار، جمعاً ۲۷۳ نوار تولید گردید که اندازه آن‌ها بین محدوده ۳۰۰ تا ۴۵۰۰ جفت باز متغیر بود. الگوی باندی حاصل از تکثیر DNA با استفاده از یکی از نشانگرها (RAPD58) نشان داده شده است (شکل ۱).



شکل۱- الگوی باندهای حاصل از تکثیر DNA ارقام انار با استفاده از آغازگر تصادفی RAPD58

قطعات چند شکل، درصد چند شکلی و R_P برای آغازگرهای که چندشکلی مناسبی را آشکار کردند، محاسبه شده است. از مجموع قطعات تکثیر شده تعداد ۱۹۸ باند یعنی ۷۲/۵۳٪ چندشکل بودند. همچنین درصد چندشکلی از ۱۰۰٪ در آغازگرهای OPH03، OPGO5 و TIBMBB14 تا ۲۰٪ در RAPD52 متفاوت بود. در میان مجموع آغازگرها میزان قدرت تمایزآغازگر RAPD7 و RAPD56 از بقیه آن‌ها بیشتر (۵/۶) بود و با توجه به قدرت بالای آن‌ها در تفکیک ارقام انار استفاده از آن‌ها در سایر مطالعات این گیاه قابل توصیه می‌باشد(جدول۲) .

1. Unweighted pair-group method for Arithmetic Average
2. Simple Matching Coefficient
3. Principal Coordinate Analysis

باندهای اختصاصی ژنوتیپ‌ها در برخی از آغازگرها به دست آمدند که از جمله آن‌ها می‌توان به باند ۱۰۰۰جفت بازی و نیز باند ۳۰۰۰ جفت بازی ایجاد شده توسط آغازگر RAPD68 و یا باند ۴۵۰ جفت بازی ایجاد شده توسط آغازگر OPH03 که اختصاصی شیرین پوست کلفت هستند اشاره کرد. در تکثیر با OPH03 همچنین یک باند ۷۵۰ جفت بازی فقط در دو رقم شیرین کوچک و شیرین پوست کلفت مشاهده شد. تکثیر توسط OPH05 باندهای اختصاصی دیگری با اندازه‌های ۲۵۰۰ و ۴۵۰ جفت باز به ترتیب برای ژنوتیپ‌های شهسوار شیرین و کبابی ایجاد کردند. این باندهای اختصاصی را می‌توان در شناسایی این ژنوتیپ‌ها و نیز تهیه شناسنامه آن‌ها به کار برد. همچنین ممکن است وجود ارتباط بین این باندها و صفات مهمی که اختصاصی این ژنوتیپ‌ها هستند از طریق آنالیز توده‌های در حال تفرق[1] به اثبات برسد، در این حالت می‌توان از آن‌ها برای طراحی نشانگرهای SCAR[2] استفاده کرد (Roy, 2000). ماتریس تشابه و دندروگرام ایجاد شده از این داده‌ها نشان داد، میزان تشابه ژنتیکی بین ارقام انار ۴۸/۵۹ درصد می‌باشد که میزان آن نسبتا زیاد بوده و نشان دهنده تشابه ژنتیکی بالا و تنوع ژنتیکی کم ارقام مورد مطالعه می‌باشد.

جدول۲- آغازگرهای تصادفی ۱۰ نوکلئوتیدی RAPD مورد استفاده برای تعیین تنوع ژنتیکی ۱۵ رقم انار منطقه‌ی طارم زنجان و درصد چندشکلی حاصل از آن‌ها

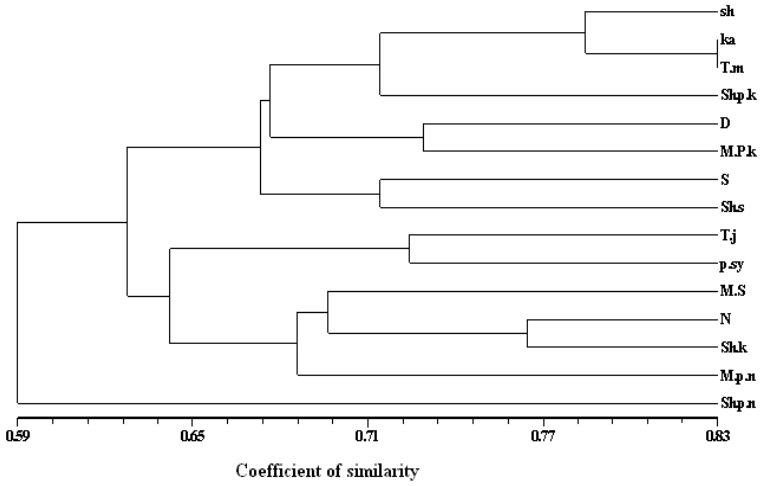
ردیف	آغازگر	توالی ۳'-۵'	تعداد کل قطعات تکثیر شده (a)	تعداد قطعات چند شکل (b)	درصد چند شکلی (b/a)×۱۰۰	Rp
۱	RAPD2	TGC CGA GCT G	۷	۶	۸۶	۳/۴۶
۲	RAPD3	AGT CAG CCA C	۱۰	۷	۷۰	۵/۰۷
۳	RAPD7	GAA ACG GGT G	۹	۸	۸۹	۵/۶
۴	RAPD9	GGG TAA CGC C	۴	۱	۲۵	۰/۵۳
۵	RAPD10	GTG ATC GCA G	۵	۲	۶۰	۱/۲
۶	RAPD11	CAA TCG CCG T	۱۲	۱۱	۹۲	۵/۴۷
۷	RAPD13	CAG CAC CCA C	۸	۷	۸۷/۵	۱/۶
۸	RAPD24	CCG CCC AAA C	۳	۲	۶۷	۰/۵۳
۹	RAPD27	AGC GAG CAA G	۶	۳	۵۰	۱/۲
۱۰	RAPD29	CCC TAC CGA C	۶	۴	۶۷	۱/۸۷
۱۱	RAPD31	AAT GCC CCA G	۸	۵	۶۲/۵	۲/۲۷
۱۲	RAPD35	CTC CTG CCA A	۹	۸	۸۹	۴/۴
۱۳	RAPD37	CCC AGC TGT G	۷	۵	۷۱	۳/۱۳
۱۴	RAPD40	GTG TCG CGA G	۵	۴	۸۰	۱/۳۳
۱۵	RAPD50	CTG CTG GGA C	۱۰	۵	۵۰	۱/۸۷
۱۶	RAPD51	GTA GAC CCG T	۱۰	۹	۹۰	۵/۳۳
۱۷	RAPD52	CCT TGA CGC A	۵	۱	۲۰	۰/۱۳
۱۸	RAPD57	AGG GAA CGA G	۴	۲	۷۵	۱/۷۳
۱۹	RAPD58	CCA CAG CAG T	۹	۴	۴۴	۳/۲۷
۲۰	RAPD63	CCT GGG CCT A	۳	۱	۲۳	۰/۹۳
۲۱	RAPD68	GAG GGG GTG A	۸	۵	۶۲/۵	۲/۱۳
۲۲	RAPD69	GAG CAC CAG G	۵	۴	۸۰	۲
۲۳	OPH12	ACG CGC ATG T	۵	۴	۸۰	۴/۲۷
۲۴	OPH13	GAC GCC ACA C	۸	۶	۷۵	۳/۶
۲۵	OPH03	ACG CAT CGC A	۶	۶	۱۰۰	۱/۲
۲۶	OPH04	GGA AGT CGC C	۴	۳	۷۵	۲/۲۷
۲۷	OPH05	AGT CGT CCC C	۶	۵	۸۳	۲/۴
۲۸	OPGO3	GAG CCC TCC A	۷	۴	۵۷	۱/۰۷
۲۹	OPGO4	AGC GTG TCT G	۶	۴	۶۷	۱/۷۳
۳۰	OPGO5	CTG AGA CGG A	۸	۸	۱۰۰	۳/۸۷
۳۱	TIBMBB07	GAA GGC TGG G	۱۰	۹	۹۰	۳/۲
۳۲	TIBMBB09	AGG CCG GTC A	۸	۳	۳۷/۵	۰/۹۳
۳۳	TIBMBC08	GGT CTT CCC T	۵	۲	۴۰	۱/۳۳
۳۴	TIBMBB13	CTT CGG TGT G	۶	۴	۶۷	۱/۰۷
۳۵	TIBMBB14	GTG GGA CCT G	۱۰	۱۰	۱۰۰	۲/۸
۳۶	TIBMBB15	AAG TGC CCT G	۱۳	۱۲	۹۲	۵/۴۷
۳۷	TIBMBA07	GGG TCG CAT C	۸	۶	۷۵	۴
۳۸	TIBMBA08	CCA CAG CCG A	۶	۳	۵۰	۱/۷۳
۳۹	TIBMBD17	GTT CGC TCC C	۴	۳	۷۵	۱/۰۷

1. Bulk Segregant Analysis
2. Sequence Characterized Amplified Regions

محققان در مطالعه تنوع ژنتیکی ارقام انار با کمک نشانگر RAPD، میزان آن را بین ارقام مورد مطالعه بر اساس ضریب تشابه جاکارد ۵۵/۹۸ درصد بدست آوردند (Sheidai et al., 2008). با توجه به این امر که تمامی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از یک منطقه جغرافیایی جمع آوری شده‌اند و نیز اینکه تکثیر این گیاه معمولا از روش‌های غیرجنسی انجام می‌شود، پائین بودن سطح تنوع ژنتیکی در مجموعه مورد مطالعه قابل توجیه است. بیشترین میزان تشابه ژنتیکی بین دو ژنوتیپ ترش محلی و کبابی (۰/۷۵) و کمترین میزان آن بین دو ژنوتیپ ملس پوست نازک و شیرین پوست نازک (۰/۳۳) بدست آمد (جدول۳ و شکل ۲). دراین گروه بندی، ارقام مورد مطالعه در فاصله ۰/۵۹(شکل ۲) به دو گروه مجزا تقسیم شدند. در گروه اول رقم شیرین پوست نازک به صورت یک گروه مجزا در آمده است و چهارده رقم دیگر گروه دوم را تشکیل دادند. در گروه دوم در فاصله ۰/۶۴ دو زیر مجموعه از یکدیگر جدا می‌شوند، به طوریکه ژنوتیپ‌های ملس شهسوار، کبابی، ترش محلی، شیرین پوست کلفت، دوستی، ملس پوست کلفت، ساوه و شهسوار شیرین در زیرمجموعه اول از بقیه ارقام تفکیک می‌شوند.

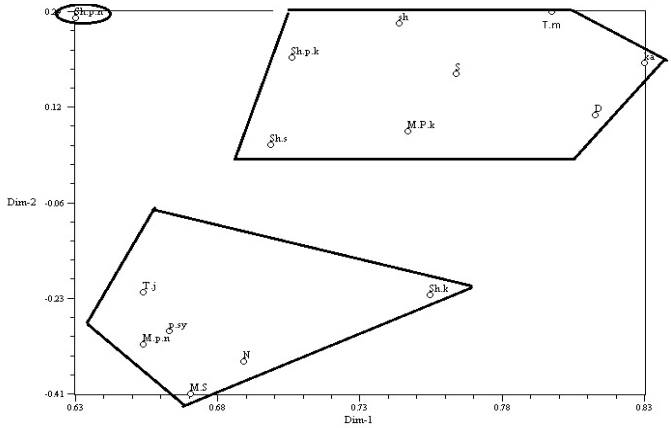
جدول۳- ماتریس تشابه حاصل از داده های RAPD ارقام انار طارم زنجان با استفاده از ضریب تشابه SMC و نرم افزار NTYSIS

ژنوتیپ	ملس شهسوار	کبابی	ترش جنگلی	پوست سیاه	ترش محلی	دوستی	ساوه	شهسوار شیرین	میخوش صورتی	ملس پوست نازک	ملس پوست کلفت	شیرین پوست نازک	ناشناخته	شیرین پوست کلفت	شیرین کوچک
ملس شهسوار	۱														
کبابی	۰/۶۷	۱													
ترش جنگلی	۰/۴۳	۰/۵۵	۱												
پوست سیاه	۰/۴۳	۰/۵۰	۰/۵۴	۱											
ترش محلی	۰/۶۵	۰/۷۵	۰/۴۷	۰/۴۸	۱										
دوستی	۰/۵۴	۰/۶۵	۰/۴۶	۰/۵۰	۰/۶۶	۱									
ساوه	۰/۵۳	۰/۶۳	۰/۴۴	۰/۴۲	۰/۵۷	۰/۶۳	۱								
شهسوار شیرین	۰/۵۳	۰/۵۰	۰/۳۶	۰/۳۷	۰/۴۷	۰/۵۵	۰/۵۷	۱							
میخوش صورتی	۰/۴۴	۰/۴۶	۰/۴۴	۰/۵۰	۰/۳۹	۰/۴۷	۰/۴۷	۰/۵۲	۱						
ملس پوست نازک	۰/۴۱	۰/۴۶	۰/۳۷	۰/۴۰	۰/۴۵	۰/۵۲	۰/۴۱	۰/۴۵	۰/۴۸	۱					
ملس پوست کلفت	۰/۵۱	۰/۵۸	۰/۴۵	۰/۴۰	۰/۵۵	۰/۶۴	۰/۵۱	۰/۵۰	۰/۴۲	۰/۵۳	۱				
شیرین پوست نازک	۰/۴۵	۰/۴۷	۰/۳۶	۰/۳۶	۰/۴۹	۰/۴۹	۰/۴۸	۰/۴۲	۰/۳۶	۰/۳۳	۰/۵۱	۱			
ناشناخته	۰/۴۲	۰/۵۰	۰/۵۰	۰/۴۴	۰/۴۷	۰/۴۷	۰/۴۷	۰/۳۹	۰/۴۹	۰/۴۸	۰/۴۵	۰/۳۸	۱		
شیرین پوست کلفت	۰/۵۲	۰/۵۷	۰/۴۰	۰/۴۶	۰/۵۹	۰/۵۳	۰/۵۵	۰/۴۳	۰/۴۰	۰/۳۵	۰/۴۵	۰/۴۵	۰/۴۶	۱	
شیرین کوچک	۰/۴۹	۰/۵۶	۰/۴۰	۰/۵۰	۰/۵۲	۰/۵۹	۰/۵۲	۰/۵۰	۰/۵۱	۰/۵۲	۰/۵۳	۰/۴۰	۰/۵۹	۰/۴۸	۱



شکل ۲- گروه بندی ارقام انار طارم زنجان بر اساس داده‌های حاصل از RAPD به روش UPGMA و با استفاده از ضریب تشابهSMC (M.sh ملس شهسوار، Ka کبابی، T.j ترش جنگلی، T.m ترش محلی، D دوستی، S ساوه، M.s میخوش صورتی، Sh.p.n شیرین پوست نازک، Sh.p.k شیرین پوست کلفت، N رقم ناشناخته، M.p.n ملس پوست نازک، P.sy پوست سیاه، Sh.k شیرین کوچک، M.p.k ملس پوست کلفت، Sh.s شهسوار شیرین)

نمودار به دست آمده از تجزیه به مولفه‌های اصلی نیز این گروه بندی و ساختار ژنتیکی در ارقام مورد مطالعه را تایید می‌کند (شکل ۳). مولفه اصلی اول و دوم هر کدام به ترتیب ۵۲/۱۷ و ۵۸/۵۶ درصد کل تنوع موجود در داده‌ها را توجیه می‌کنند. با توجه به فاصله ژنتیکی زیاد رقم شیرین پوست نازک و قرار گرفتن آن به صورت جدا از بقیه ارقام، انجام تلاقی بین این چنین ارقامی که فاصله ژنتیکی بیشتری دارند کارایی بیشتری در زمینه تولید واریته‌های هیبرید و نیز تشکیل جمعیت‌های در حال تفرق خواهند داشت (Popi et al.,2000). در زیر گروه دوم در فاصله ۰/۸۳ دو رقم کبابی و ترش محلی از سایر اعضای گروه تفکیک شده اند.



شکل ۳- نمودار گروه بندی ژنوتیپ‌های انار طارم زنجان بر اساس دو مولفه اول و دوم در تجزیه به مولفه‌های اصلی داده‌های حاصل از RAPD(M.sh ملس شهسوار، Ka کبابی، T.j ترش جنگلی، T.m ترش محلی، D دوستی، S ساوه، M.s میخوش صورتی، Sh.p.n شیرین پوست نازک، Sh.p.k شیرین پوست کلفت، N رقم ناشناخته، M.p.n ملس پوست نازک، P.sy پوست سیاه، Sh.k شیرین کوچک، M.p.k ملس پوست کلفت، Sh.s شهسوار شیرین)

این دو رقم نسبت به سایرین بیشترین تشابه را دارند، که دلیل نزدیکی این دو رقم به یکدیگر می تواند اجداد مشترک در منطقه باشد. ارزیابی تنوع در ذخایر ژنتیکی گیاهی که از شانس بالایی برای بروز ژن های

مفید برخوردار می‌باشند از اولین پیش نیازهای ضروری برای برنامه‌ریزی در جهت حفاظت و بهره‌برداری پایدار از آنها می‌باشد. صفات مورفولوژیکی تحت تاثیر عوامل متعددی قرار می‌گیرند که این عوامل در سطح DNA بی‌تاثیر هستند. مجموعه این عوامل سبب می‌شود تا ژنوتیپ‌هایی که براساس داده‌های موجود در سطح DNA نزدیک به هم هستند از نظر خصوصیات مورفولوژیکی متفاوت باشند (Gupta & Liu, 2004). همچنین در این مطالعه برخی صفات مورفولوژیکی ارقام مورد مطالعه قرار گرفت (جدول ۴) و با مقایسه آن با صفات مولکولی و گروه بندی حاصل از داده‌های RAPD نتایج جالب توجهی حاصل شد.

جدول۴- اسامی ژنوتیپ های انار طارم زنجان و برخی خصوصیات مورفولوژیکی مهم آن‌ها

ردیف	ژنوتیپ یا رقم	علامت اختصاری	رنگ پوست	رنگ آریل	طعم
۱	ملس شهسوار	M.sh	زرد	صورتی کمرنگ	شیرین
۲	کبابی	Ka	قرمز	قرمز	ملس
۳	ترش جنگلی	T.j	قرمز پرنگ و براق	صورتی پررنگ	ترش
۴	ترش محلی	T.m	سبز	صورتی کمرنگ تا پررنگ	ترش
۵	دوستی	D	سفید مایل به زرد	صورتی کمرنگ	شیرین
۶	ساوه	S	زرد متمایل به صورتی	قرمزپررنگ	ملس متمایل به ترش
۷	میخوش صورتی	M.s	زرد متمایل به صورتی	صورتی پررنگ تا قرمز	ملس شیرین
۸	شیرین پوست نازک	Sh.p.n	صورتی متمایل به قرمز	قرمز	شیرین
۹	شیرین پوست کلفت	Sh.p.k	صورتی منمایل به قرمز	صورتی	شیرین
۱۰	رقم ناشناخته	N	سبز	صورتی	ملس
۱۱	ملس پوست نازک	M.p.n	زرد متمایل به صورتی	صورتی تا قرمز	ملس
۱۲	پوست سیاه	P.sy	بنفش تیره تا سیاه	صورتی	شیرین
۱۳	شیرین کوچک	Sh.k	زرد مایل به صورتی	صورتی	شیرین
۱۴	ملس پوست کلفت	M.p.k	صورتی روشن	صورتی تا قرمز	ملس
۱۵	شهسوار شیرین	Sh.s	سفید تا صورتی روشن	صورتی تا صورتی پررنگ	شیرین

در ژنوتیپ‌های بررسی شده رقم ترش محلی، ترش جنگلی و رقم ناشناخته جزء ژنوتیپ‌های وحشی انار طارم زنجان بودند و از لحاظ ویژگی‌های ظاهری (اندازه و رنگ) از کوچک‌ترین انارها هستند (بویژه رقم ترش جنگلی که میوه‌های آن به طور متوسط تقریبا به اندازه‌ی یک گردو است). در تجزیه کلاستری حاضر از سایر ژنوتیپ‌ها تفکیک نشدند، و حتی ژنوتیپ ترش محلی با ژنوتیپ کبابی که یک رقم اهلی در منطقه است در یک فاصله‌ی ژنتیکی قرار گرفتند. همچنین در این مقایسه نمی‌توان قرارگیری و نزدیکی ارقام با یکدیگر را با هیچ یک از خصوصیات مورفولوژیکی مهم آن‌ها توجیه نمود. که این امر ممکن است از ماهیت ژنتیکی داده‌های RAPD ناشی شده باشد، یعنی این امکان وجود دارد که نشانگرهای RAPD که جهت بررسی تنوع ژنتیکی ارقام استفاده شده‌اند مربوط به نواحی از ژنوم باشند که ترجمه نشده و در کنترل صفات مورفولوژیکی نقشی ندارند. باید توجه داشت که قطعات تکثیر یافته در RAPDالزاما از نظر توالی نوکلئوتیدی یکسان نیستند و قطعه‌هایی با اندازه یکسان ممکن است متعلق به قسمت‌های مختلف ژنوم و دارای توالی متفاوت باشند. همچنین اطلاعات حاصل از ترجمه توالی‌های نوکلئوتیدی تحت تاثیر تغییرات پس از ترجمه قرار می‌گیرند، از طرفی پاره‌ای از صفات، وراثت خارج از هسته‌ای دارند که

ژن‌های کنترل کننده آن‌ها در اندامک‌های سیتوپلاسمی قرار می‌گیرند (Hughes, 1996). مجموعه این عوامل سبب می‌شود که ارقامی که بر اساس داده‌های موجود در سطح DNA مشابه هستند از نظر خصوصیات مورفولوژیکی متفاوت یا متشابه باشند. بنابراین داده‌های RAPD ممکن است با گروه‌بندی افراد بر اساس خصوصیات گیاهشناسی و مورفولوژیکی همسویی کافی نداشته باشد. این امر با توجه به تاثیر پذیری این صفات از عوامل محیطی دور از انتظار نیست. چنین نتیجه‌ای توسط Dwivedi et al. (2001) نیز گزارش شده است. لذا در برنامه‌های اصلاحی اگر گزینش افراد فقط بر اساس صفات گیاهشناسی و

مورفولوژیکی باشد ممکن است نتیجه مطلوب را نداشته باشد. نتایج این پژوهش و تحقیقات محققین دیگر در گذشته نشان می‌دهد که ژنوتیپ‌های وحشی و تجاری انار در ایران دارای سطح پلی مورفیسم بالایی هستند (Talebi badaf et al., 2003; Sarkhosh et al., 2006). در نهایت می‌توان گفت که نشانگر RAPD از توانایی مطلوب برای مطالعه ساختار و تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های انار برخوردار است و لذا توصیه می‌شود از این داده‌های مولکولی به عنوان مکمل مناسب و کارآمد در برنامه‌های اصلاحی این گیاه، بخصوص برنامه‌های گزینش و هیبریداسیون جهت تهیه ارقام هیبرید و یا جمعیت‌های مورد نیاز برای ترسیم نقشه‌های لینکاژی استفاده شود. از طرفی با توجه به هزینه‌های بالای نگهداری ارقام در بانک‌های ژن، پیشنهاد می‌شود ارقامی که تشابه ژنتیکی زیادی دارند حذف شده و ارقام با فاصله ژنتیکی بیشتر وارد بانک ژن شوند.

REFERENCES

1. Abdmishani, C. & Shanejat-Bushehri, A. A. (1998). *Advanced plant breeding*. Tehran University publications. vol. 2 (*Plant Biotechnology*), 335p. (In Farsi).
2. Atefi, J. (1993). Evaluation of walnut genotype in Iran. *Acta Horticulturae*, 311, 25-37.
3. Behzadi Shahrbabaki, H. (1998). *Genetic diversity of pomegrante genotypes in Iran*. Nashr Amoozesh Keshavarzi. 265p. (In Farsi).
4. Collins, W. Sh. & Sedgley, M. (2004). A molecular linkage map of olive (*Olea europaea* L.) based on RAPD, microsatellite, and SCAR markers. *Genome*, 47, 26-35.
5. Dwivedi, S., Gurtu, S., Chandra, S., Yuejin, W. & Nigam, S. N. (2001). Assessment of genetic diversity among selected groundnut germplasm. I: RAPD analysis. *Plant Breeding*, 120, 345-349.
6. Gupta, M. & Liu, J. S. (2004). Discussions on 'a bayesian approach to DNA sequence segmentation. *Biometrics*, 60, 582-583.
7. Hanania, U., Velcheva, M., Sahar, N. & Perl, A. (2004). An improved method for the isolation of high quality DNA from *Vitis vinifera*. *Plant Molecular Biol*ogy *Rep*orter, 22, 173-177.
8. Harada, T. (1993). DNA-RAPD detected genetic variation and polymorphism in *Malus*. *Euphytica*, 65, 87-91.
9. Henry, R. J. (1997). *Practical applications of plant molecular biology*. Chapman and Hall, London. 360 p.
10. Hughes, M. L. (1996). *Plant molecular genetics*. PrenticeHall. England. 245 p.
11. Jain, P. K., LalSaini, M., Pathak, H. & Gupta, V. K. (2007). Analysis of genetic variation in different banana (*Musa* species) variety using random amplified polymorphic DNAs (RAPDs). *African Journal of Biotechnology*, 6, 60-69.
12. Khadivi khub, A., Zamani, Z., Bozari, N. & Fatahi, M. R. (2010). Evaluation of genetic diversity in some Iranian sweet cherry cultivars using some morphological characteristics and RAPD markers. *Seed and Plant Improvement Journal*, 25, 195-209.
13. Mahdavian, M., Lessani, H., Kuhi, M., Zare, H., Akrami, M. & Tabatabaei, Z. (2007). Morphological and Pomological Characteristics of Fig from Istahban, Iran. *Acta Horticulturae*, 760, 521-526.
14. Mohammadi, S.A. & Prasanna, B. M. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants- Silent statistical tools and considerations. *Crop Science*, 43, 1235-1248.
15. Mohseni, A. (2007). *Identification and introducing the best exportable Iranian pomegranate cultivars*. Publications of Ministry of Jehad-Keshavarzi. 30 p. (In Farsi).
16. Murry, H. G. & Thammpson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acid Research*, 8, 4321-4325.
17. Naghavi, M.R., Ghareyazie, B. & Hosseini Salkadeh, G. (2005). *Molecular markers*. University of Tehran Press. 340 p. (In Farsi).
18. Oraguzie, N. C., Gardiner, S.E., Heather, H., Stefanati, M., Ball, V. G. & Vincet, M. (2001). Genetic diversity and relationships in *Malus* sp germplasm collection as determination by randomly amplified polymorphic DNA. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 126, 318-328.
19. Popi, J., Rajnpreht, J., Kannenberg, L. W. & Pauls, K. P. (2000). Random amplified polymorphic DNA-based evaluation of diversity in the hierarchical, Open-Ended Population Enrichment Maize Breeding System. *Crop Science,* 40, 619-625.
20. Roy, D. (2000). *Plant breeding: Analysis and exploitation of variation*. Alpha Science International Ltd, India. 310 p.
21. Sarkhosh, A., Zamani, Z., Fatahi, M. R. & Ebadi, A. (2006). RAPD markers reveal polymorphism among some Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes. *Scientia Horticulturae*, 111, 24-29.

22. Sheidai M., Saneghi, A., Shahryari, Z. H. & Normohammadi, Z. (2008). RAPD and cytogenetic study of some pomegranate cultivars. *CaryologIa*, 61, 68-73.
23. Shiran, B., Amirbakhtiar, N., Kiani, S., Mohammadi, S., Sayed Tabatabaei, B. E. & Moradi, H. (2007). Molecular characterization and genetic relationship among cultivars assessed by RAPD and SSR markers. *Scientia Horticulturae*, 111, 280-292.
24. Struss, D., Boritzki, M., Glozerk, K. & Southwick, S. M. (2001). Detection of genetic diversity among population of sweet cherry. *Horticultural Science and Biotechnology*, 76, 362-367.
25. Talebi badaf, M., sharifnabi, B. & Bahar, M. (2003). Genetic diversity of some Iranian pomegranate genotypes using RAPD Markers. In:Proceeding of *3rd National Congress on Biotechnology*, 9-11Sept.,Ferdowsi University of Mashhad, Iran, (343-345). (In Farsi).
26. Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. & Tingey, S. C. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research*, 18, 6531-6536.
27. Zamani, Z., Sarkhosh, A., Fattahi, M. R. & Ebadi, A. (2007). Genetic relationships among pomegranate genotypes studies by fruit characteristics and RAPD markers. *Jornal of Horticultural Science and Biotechnology*, 82, 11-18.
28. Zane, L., Baragelloni, L. & Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11, 1-16.