کاربرد نشانگرهای ریزماهواره در بررسی تنوع ژنتیکی انار ترش ایران

مهربانو کاظمی الموتی (۱ و ۵)، محمد علی ابراهیمی (۲)، مهرشاد زین العابدینی (۳)، محسن مردی (٤)

۱ و ۵- دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه پیام نور تهران، کارشناس آزمایشگاه ژنومیکس پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران ۲- استادیار دانشگاه پیام نور تهران، دانشکده علوم پایه و کشاورزی ۳- استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران ٤- دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

علیرغم اینکه ایران یکی از بزرگترین صادر کنندگان انار دنیا بشمار می‌رود، تاکنون مطالعه دقیق و گسترده‌ای پیرامون تنوع ژنتیکی و تعیین اصالت ژنتیکی انار صورت نگرفته است. در این مطالعه، ابتدا کارایی ۱۲ نشانگر ریز ماهواره در ۱۰ ژنوتیپ انار موجود در کلکسیون یزد بررسی شد و در ادامه تحقیق هفت نشانگر ریز ماهواره با بهترین چند شکلی، مورد استفاده قرار گرفت. کارایی این نشانگرها در ۲۳۸ ژنوتیپ انار ترش موجود در کلکسیون یزد ارزیابی شد. آغازگرهای SSR-MP26 و SSR-MP39 به ترتیب با ۰/۹۰۷ و ۰/٥٤٤ بیشترین و کمترین PIC را نشان دادند. تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ ها را در شش گروه تفکیک کرد که تنوع ژنتیکی بالای ژنوتیپ های انار ترش ایران را نشان داد. این تحقیق نشان می‌دهد که کلکسیون انار یزد ممکن است، دارای ژنوتیپ های یکسان با اسامی مشابه بوده و ژنوتیپ های مورد بررسی نیز از اختلاط ژنتیکی بالایی برخوردار باشند. به منظور کسب اطلاعات دقیق‌تر پیشنهاد می‌گردد که در مطالعات بعدی از تعداد آغازگرهای ریزماهواره بیشتر و اطلاعات مورفولوژیکی استفاده شود.

کلمات کلیدی: انار، تنوع ژنتیکی، نشانگر ریزماهواره

مقدمه

انار با نام علمی *Punica granatum L.* از شاخه پیدازادان و رده نهاندانگان است که به کوچک‌ترین خانواده گیاهی دولپه ای‌ها (*Punicaceae*) تعلق دارد و بومی ایران می‌باشد (سوریانو و همکاران ۲۰۱۰). امروزه، تعیین اصالت ژنتیکی محصولات باغی از سطح مورفولوژی و فنولوژی فراتر رفته و به وسیله روش‌های نوین زیست فناوری در سطح ژنوتیپ گیاه صورت می‌گیرد. استفاده از نشانگرهای دی ان آ به علت عدم تاثیر پذیری از محیط و نمایان شدن در سطح دی ان آ از بهترین روش‌های موجود برای بررسی تنوع ژنتیکی می‌باشد. رحیمی و همکاران (١٣٨٤)، روابط ژنتیکی ۱۱ ژنوتیپ خویشاوند انار ایران را با استفاده از نشانگر AFLP مورد ارزیابی قرار دادند. زمانی و همکاران (۲۰۰۷)، به مطالعه همبستگی بین صفات کمی و کیفی میوه انار پرداختند. تجزیه کلاستر با استفاده از هفت عامل اصلی ژنوتیپ ها را به پنج کلاستر تقسیم نمود. موقعیت ژنوتیپ ها در آنالیز تری پلات با استفاده از سه فاکتور نیز موجب تفکیک ژنوتیپ های با طعم شیرین از ژنوتیپ های با طعم ملس گردید. سرخوش و همکاران (٢٠٠٦) با استفاده از نشانگرهای RAPD، سطح تنوع موجود بین ٢٤ ژنوتیپ انار ایرانی را بررسی کردند. بالاترین و پایین ترین تشابهات بین ژنوتیپ ها به ترتیب ۰/۸۹ و ۰/۲۹ بود و در تشابه ٦٠٪، ژنوتیپ ها به ٤ زیر شاخه تقسیم شدند. در حال حاضر، نشانگرهای ریزماهواره (SSRs) با دارا بودن ویژگی‌هایی نظیر توزیع مناسب ژنومی، چند شکلی بالا و ماهیت همبارزی، یکی از بهترین نشانگرهای موجود در زمینه مطالعه تنوع و روابط ژنتیکی طیف وسیعی از گیاهان محسوب می‌شود (مارس و مراکچی۱۹۹۹). هدف از این تحقیق، ارزیابی کارایی نشانگرهای ریزماهواره در بررسی تنوع و روابط ژنتیکی ارقام و ژنوتیپ های انار ترش ایران و نیز ارزیابی دقیق ژنوتیپ های موجود بمنظور شناسایی نمونه های تکراری می باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق شامل ۲۳۸ ژنوتیپ انار ترش ایران موجود در کلکسیون انار یزد است. روش استخراج به کمک کیت BIONEER به عنوان مناسب‌ترین روش، جهت استخراج انتخاب شد. به منظور انتخاب آغازگرهایی با کارایی بالا، ابتدا ۱۲ آغازگر ریزماهواره، که از ژنوم انار جدا سازی شده بودند (پیرسیدی و همکاران)، در ۱۰ نمونه تصادفی از ارقام انار ترش موجود در کلکسیون انار شهرستان یزد، مورد آزمایش قرار گرفتند. آزمایشات اولیه بر روی

ژل آکریل آمید معمولی انجام شد. تعداد ۷ آغازگر انتخاب و جهت نشان دار شدن با IRD 700 به شرکت مربوطه سفارش داده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Biorad در حجم ۱۰ میکرولیتر و در پلیت ۳۸٤ تایی انجام گردید. چرخه‌های حرارتی شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹٤ درجه و مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل حرارتی شامل ۱۰ چرخه حرارتی Touch Down و متعاقباً ۲۵ چرخه با دمای اتصال مشخص برای هر آغازگر انجام شد. محصولات حاصل از واکنش زنجیره پلیمراز در الکتروفورزعمودی ژل پلی آکریل آمید ٦ درصد و با کمک دستگاه DNA (Analyser 4300) تفکیک و ارزیابی شدند. آلل‌های حاصل از نشانگرهای SSR به صورت صفر و یک امتیازدهی شدند و ارزیابی شاخص‌های تنوع ژنتیکی، تجزیه خوشه‌ای به کمک نرم افزارهای PowerMarker 3.25، NTSYS 2.02 انجام گردید.

نتایج و بحث

با انجام آزمایشات اولیه و از مجموعه آغازگرهای مورد استفاده، هفت آغازگر دارای چند شکلی مناسب در بررسی تنوع و روابط ژنتیکی نمونه‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. در مجموع، ۳۰ آلل چند شکل مشاهده گردید. تعداد ۲ تا ۸ آلل با میانگین ۳/۷ آلل برای هر آغازگرها، در آغازگرهای مورد استفاده مشاهده شد. بیشترین تعداد آلل به آغازگر MP26 با ۸ آلل چند شکل و کمترین تعداد آلل‌ها به آغازگر MP39 با ۲ آلل چند شکل تعلق داشت. با توجه به نتایج بدست آمده, می‌توان گفت که، نشانگرهای MP51 و MP26 با بیشترین PIC، بیشترین شاخص چند شکلی را نشان می‌دهند، در نتیجه این دو نشانگر بهتر از سایر نشانگرهای استفاده شده، می‌توانند فاصله ژنتیکی ارقام و ژنوتیپ های انار را مشخص کنند. به منظور گروه‌بندی ژرم‌پلاسم انار ترش از ماتریس عدم تشابه ژنتیکی بر اساس ضریب آلل های مشترک و تجزیه خوشه‌ای با استفاده از روش‌های UPGMA و NJ استفاده شد. ضریب همبستگی کوفنتیک مربوط به دندروگرام به دست آمده با روش UPGMA، ۰/۵۵۹ و با روش NJ، ۰/۳۵ بود. با وجودی که همبستگی کوفنتیک این دندروگرام حدود ۰/۵۵ بود، ولی با توجه به معنی دار بودن در سطح ۱٪ و جداسازی قابل توجیه ژنوتیپ ها, این دندروگرام انتخاب شد. رینکون و همکاران (۱۹۹٦), در تجزیه کلاستر با استفاده از داده‌های مولکولی نشان دادند که به طور کلی ضریب کوفنتیک پایین, دلیل بر عدم کارائی نمودار حاصل نمی‌تواند باشد، بلکه ضریب همبستگی کوفنتیک پایین ممکن است به دلیل شرایط غیر عادی در داده‌ها به خصوص داده‌های مولکولی باشد. بر اساس تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA، تمامی نمونه‌ها در شش گروه اصلی قرار گرفتند. گروه اول شامل دو ژنوتیپ ترش پوست سفید ایلام و ترش پوست سفید کرمان می‌باشد. تشابه اسمی این نمونه‌ها که در یک گروه جداگانه قرار گرفته‌اند، نشان دهنده این است که احتمالاً منشاء این دو ژنوتیپ مشابه بوده و با انتقال از یک منطقه به منطقه دیگر در فهرست ژنوتیپ های آن استان نیز قرار گرفته است. گروه دوم شامل شش ژنوتیپ مربوط به استان‌های لرستان، کردستان، یزد، فارس، تهران و کرمان می‌باشد. با بررسی این دندروگرام، مشاهده می‌شود که در این گروه ارتباط خاصی بین قرارگیری ژنوتیپ ها بر مبنای تقسیم‌بندی استانی و یا نمونه‌های با نام‌گذاری مشابه در کنار یکدیگر وجود نداشته و نمونه‌ها به طور مستقل از این عوامل طبقه بندی شده‌اند. در گروه سوم دو ژنوتیپ از استان‌های مازندران و چهار محال قرار گرفته‌اند که تشابه اسمی نیز ندارند. گروه چهارم شامل سه زیر گروه است. زیر گروه اول ١٤ ژنوتیپ از استان‌های فارس، یزد، کرمان و سیستان و بلوچستان را در بر می‌گیرد. زیر گروه دوم شامل۳۰ ژنوتیپ از استان‌های فارس، یزد، کرمان و سیستان و بلوچستان، چهار محال و بختیاری و لرستان است و زیر گروه سوم نیز دارای ٢٤ ژنوتیپ استان‌های فارس، یزد، مازندران، کرمان، هرمزگان می‌باشد. در مجموع این گروه شامل ۷۱ ژنوتیپ است که بعد از گروه ۵ بیشترین تعداد ژنوتیپ ها را در خود جای داده است. لازم به ذکر است که اکثر ژنوتیپ های این گروه مربوط به استان‌های مرکزی و شرقی و جنوب شرقی ایران می‌باشند. کلاستر پنجم، دربرگیرنده ١٠٤ ژنوتیپ از استان‌های مختلف کشور است، که بزرگترین گروه را

تشکیل می‌دهد و شامل چهار زیرگروه می‌باشد. کلاستر ششم نیز شامل ٤٣ ژنوتیپ است که به دو زیر گروه تقسیم می‌شود. بطور کلی نتایج بدست آمده از تجزیه‌های آماری به روش‌های مختلف نسبتاً مشابه بوده و به نظر می‌رسد عدم مطابقت بین نواحی جغرافیایی نمونه‌ها، نام‌گذاری و خصوصیات ژنتیکی آنها از خصوصیات ژرم‌پلاسم‌های انار موجود می‌باشد. آنالیز ژرم‌پلاسم انار تونس که بر پایه خصوصیات میوه توسط مارس و مراکچی (١٩٩٩) انجام شده بود، نشان داد که منشا جغرافیایی ارقام، معیاری جهت تعیین گروه بندی آنها بشمار نمی‌رود. همچنین، در مطالعه‌ای دیگر (جبیر و همکاران) که با استفاده از نشانگرهای AFLP و بر روی ژنوتیپ‌های تونس انجام شد، نویسندگان گزارش کردند که دسته‌بندی ژنوتیپ‌ها مستقل از منشا جغرافیایی‌شان بوده است. مطالعه حاضر نیز نشان داد که نمونه‌های انار ترش ژرم‌پلاسم موجود، بر اساس مکان‌ها و یا نام‌گذاری‌های مشابه تفکیک نمی‌شوند، زیرا ممکن است بر اساس نسب به یکدیگر مرتبط نباشند. از آنجایی که منشاء دقیق این گیاهان شناخته شده نیست، این احتمال وجود دارد که انارهایی که در یک منطقه جغرافیایی وجود دارند، در اصل از مکان دیگری منشا گرفته و تحت نام جدیدی در مقصد کشت شده باشند. این نتایج ناشی از جابجایی ژنوتیپ‌ها از منطقه اصلی به سایر بخش‌های کشور و عمدتاً بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی بوده که این امر لزوم دقت در زمان نام-گذاری نمونه‌ها و همچنین لزوم استفاده همزمان از اطلاعات مولکولی و مورفولوژیکی را در احداث کلکسیون آشکار می‌سازد زیرا 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 تأثیرات بعد از نسخه‌برداری و توارث غیر هسته‌ای نیز می‌تواند دلیل عدم تناسب نشانگرهای مولکولی و خصوصیات مورفولوژیکی باشد. بنابراین انجام مطالعات مورفولوژیکی دقیق و یا مطالعه صفات فنولوژیکی برگ، گل و میوه می‌تواند در حصول نتایج قابل اعتماد تر در ژنوتیپهای انار مثمر ثمر باشد.

منابع

١- **رحیمی، ت.، ا. ب. سید طباطبایی، ب. شریف نبی، و س. قبادی، ١٣٨٤.** مطالعه روابط ژنتیکی برخی از ارقام انار ایران با استفاده از نشانگر AFLP. مجله علوم کشاورزی. ٣٦ (٦): ٣٧٣ -٣٧٩

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

3-**Mars, M. & M. Marrakchi. 1999**. Diversity of pomegranate (*Punica granatum* L.) germplasm in Tunisia. Genet. Resour. Crop Ev. Vol. 46. Pp. 461-467.

4-**Pirseyedi, S.M., Valizadegan, S., Mardi, M., Ghaffari, M., Mahmoodi, P., Zeinalabedini, M., and Khayam, S.M. 2010**. Isolation and characterization of novel microsatellite. *Int. J. Mol. Sci. 11*: 2010-2016; doi:10.3390/ijms11052010

5-**Rincon, F., B. Johnson, J. Crossa, and S. Taba. 1996**. Cluster analysis, an approach to sampling variability in maize accessions. May-dica 41:307–316

6-**Sarkhosh, A. , Z. Zamani, R. Fatahi, and A. Ebadi, 2006**. Rapd markers reveal polymorphism among some Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) lanraces. Sci. Hort, 111:24-29

7-**Soriano، J., E. Zuriaga, P. Rubio, G. Llacer, R. Infante, M. Luisa Badenes, 2010**. Development and characterization of microsatellite markers in pomegranate (Punica granatum L.). MOL Breeding DOI 10.1007/s11032-010-9511-4

8-**Stover, E. and E. W. Mercure, 2007**. The pomegranate a new look at the fruit of paradise. HortScience. 42:1088-1092

9-**Zamani, Z., A. Sarkhosh, R. Fatahi, and A. Ebadi, 2007**. Genetic Relationships among pomegranate genotypes studied by fruit characteristics and rapid markers.J. Hort. Sci. Biotechnol., 82:11-18

Application of microsatellite markers in studies of genetic diversity of Iranian sour Pomegranate (*Punica granatum* L.)

M.B. Kazemi Alamuti [1,5], M.A. Ebrahimi[2] ,. M. Zeynalabedini[3], M. Mardi[4*],
[1,3,4]Department of Genomics, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran
[2,5]Department of Biology Payame Noor University, Tehran, Iran

Pomegranate (*Punica granatum* L.) is domesticated for the first time in the ancient Iran and has been cultivated since then and used as an important plant in the world due to its economical and medicinal importance. However Iran is a biggest exporter of pomegranate, there is no precise study on the genetic diversity and genetic background of this plant.
Here, 12 SSR markers were studied on 10 genotypes of Iran's pomegranate and we observed well polymorphism in seven primers. Then these seven markers were studied on 238 genotypes of Irananian sour pomegranate deposited in Yazd collection.
SSR-MP26 and SSR-MP39 showed the highest and lowest PIC, respectively. Cluster analysis separated the genotypes within 6 groups which show the high rate of genetic variation in sour Iranian pomegranate germplasm. This study suggested that Yazd germplasm might contain divergent genotypes with analogue names or vice versa. In order to get more precise information at future studies, we suggested the isolation of more SSR primers along with morpho-pomological information.

Key Words: Pomegranate, Genetic diversity, Microsattelite Marker,