ژنتیک نوین
دوره دهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۴
صفحه ۲۲۰-۲۰۹

تنوع ژنتیکی و فیتوشیمیایی ژرم پلاسم انار (*Punica granatum*) استان کرمان با استفاده از نشانگرهای مولکولی وکروماتوگرافی

Genetic and phytochemical diversity of *Punica geranatum* germplasm in Kerman province using molecular markers and chromatography

سارا خسروی[۱]، غلامرضا شریفی‌سیرچی*[۲]، امین باقی‌زاده[۳]

۱- کارشناس‌ارشد، دانشگاه شهید باهنر کرمان
۲- دانشیار، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان
۳- دانشیار، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان

Khosravi S[1], Sharifi-Sirchi GR*[2], Baghizade A[3]

1. Graduated MSc, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran
2. Associate Professor, University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran
3. Associate Professor, Institute of Science, High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sharifi-sirchi@hormozgan.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۲- تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۱۸)

چکیده

انار با نام علمی *Punica granatum* L. از جمله درختانی است که علاوه بر داشتن میوه خوشمزه، گل، پوست میوه، ریشه و ساقه آن در صنعت داروسازی و رنگرزی مورد استفاده فراوان قرار می‌گیرد. انار بومی ایران بوده و بیشترین سطح زیر کشت این گیاه در دنیا متعلق به ایران است. انار در نواحی خشک، معتدل و گرم و تقریبا مرطوب استان کرمان به طور گسترده با تنوع زیستی نسبتا زیاد کشت می‌شود. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و فیتوشیمیایی ژرم پلاسم انار استان کرمان تعداد ۲۰ ژنوتیپ از مناطق مختلف استان کرمان جمع-آوری شدند. ۱۵ آغازگر RAPD و سه آغازگر ISSR جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده شد. پس از انجام الکتروفورز در مجموع ۱۸۶ باند ایجاد شد که در محدوده ۲۴۰ تا ۲۸۰۰ جفت باز قرار داشتند و از بین آنها ۱۶۹ باند (۹۱ درصد) چند شکلی نشان دادند. در نتیجه تجزیه کلاستر، ۲۰ ژنوتیپ مورد مطالعه در ۴ گروه جایابی شدند که تقریبا با تنوع جغرافیایی و وضعیت آب و هوایی همخوانی داشتند. نتایج گاز کروماتوگرافی-طیف سنجی جرمی ترکیبات شیمیایی اسانس پوست انارهای ترش کوهبنان، شیرین چترود و ملس ماهان به ترتیب ۴۰، ۲۴ و ۱۸ ماده با درصد مشابهت بالای ۹۰ را نشان داد. در انار ترش کوهبنان بیشترین ترکیبات اسانس به ترتیب شامل هگزادکانوئیک اسید، اکتادکان و هگزادسن، در انار شیرین چترود به ترتیب شامل تترادکانول، دودکانول و تری دسن-۱-ال و در انار ملس ماهان به ترتیب شامل هگزادسن، اکتادکان و هگزادکانوئیک اسید بودند.

واژه‌های کلیدی

اسانس
انار
تنوع ژنتیکی
گازکروماتوگرافی- طیف سنجی جرمی
نشانگر مولکولی

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-04]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.7.5]

مقدمه

انار با نام علمی *Punica granatum* L. و نام انگلیسی Pomegranate گیاهی متعلق به خانواده Lythraceae است (Morris 2007; Hajiahmadi et al. 2013). مطابق با نظریه دکاندول و شواهد موجود، انار بومی ایران و کشور های همجوار آن است. خصوصیات خاص این گیاه از جمله شکل، رنگ، گل، میوه از یک طرف و مقاومت به شرایط نامساعد محیطی باعث شده که این درختچه خصوصا در مناطق کویری مورد اقبال خاصی قرار بگیرد (The Third Seminar of Pomegranate 1994; Mirjalili 2002). امروزه انار در اکثر نقاط دنیا از مناطق آسیای مرکزی تا هیمالیا، خاورمیانه، آسیای صغیر و حوزه مدیترانه اروپا و آمریکا گسترش یافته است. در حدود ۷۶۰ ژنوتیپ، کولتیوار و گونه انار در ایران وجود دارد (Shahr Babaki 1998). در اکثر نقاط دنیا دسته‌بندی و نام‌گذاری درختان انار بر اساس تقریبا ۲۹ صفت فنوتیپی است. در استان کرمان (واقع در بین عرض‌های حدود ۲۶ تا ۳۲ درجه شمالی در جنوب شرق ایران با آب و هوای متنوع کویری و خشک، کوهستانی و گرمسیری) نیز که یکی از مناطق گسترش این درخت می‌باشد کولتیوارهای مختلف بر اساس ناحیه و منطقه جغرافیایی پیدایش، شکل، رنگ و مزه نامگذاری می‌شوند. هر چند جنبه‌های فنوتیپی هنوز برای دسته-بندی انواع مختلف انار استفاده می‌شوند، کارایی بالای نشانگرهای مولکولی DNA در انگشت نگاری ژنتیکی به لحاظ سرعت، دقت، عدم تاثیر پذیری از محیط و اثرات مادری و سن گیاه سبب استفاده روزافزون آنها در درختان شده است. در درخت انار مارکرهای مولکولی DNA مختلفی از جمله SSR، SRAP، ISSR، RAPD، AFLP و RFLP استفاده می‌شود (Ercisli et al. 2007; Jbir et al. 2008; Pirseyedi et al. 2010; Ercisli et al. 2011; Talebi et al. 2011; Parvaresh et al. 2012; Soleimani et al. 2012). اما مارکرهای مولکولی RAPD (به دلیل سادگی کار، کارایی، عدم نیاز به توالی‌یابی و تکنیک‌های بلاتینگ) و ISSR (استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، توارث بارز و ارائه پلی-مورفیسم مناسب) پرکاربردترین آنها در انگشت نگاری‌های ژنتیکی و برآورد ارتباط ژنتیکی در ژرم‌پلاسم انار می‌باشند (Sarkhosh et al. 2006; Yuan et al. 2007; Jbir et al. 2008; Sheidai et al. 2008).

در مطالعه‌ای با استفاده از تکنیک RFLP بر روی DNA ریبوزومی ده کولتیوار انار به بررسی تنوع ژنتیکی آنها پرداختند. با توجه به مقایسات دوتایی و ترسیم دندروگرام تشابه معلوم شد که همه نمونه‌های مورد مطالعه در این دندروگرام با هم تفاوت داشتند. با این حال سطوح بالایی از روابط خویشاوندی ژنتیکی تخمین زده شد. در این مطالعه، ارتباط ضعیفی بین ویژگی‌های ژنتیکی و مورفولوژیکی انار وجود داشت (Melgarejo et al. 2009).

در مطالعه‌ای، ۳۶ ژنوتیپ انار از ۷ منطقه مختلف ساوه جمع‌آوری شد و از ۴۴ مارکر RAPD، ISSR و SSR استفاده شد که از این تعداد ۱۹ مارکر پلی‌مورفیسم نشان دادند و بر اساس نتایج ژنوتیپ‌ها را در سه گروه اصلی دسته‌بندی کردند. تجزیه‌های واریانس مولکولی نشان داد که تنوع ژنتیکی معنی‌داری در میان ژنوتیپ‌های انار در محل‌های مختلف (۷ گروه محلی) وجود ندارد به طوری که از این تنوع مشاهد شده تنها دو درصد آن ناشی از اختلاف بین گروهی بود و ۹۸ درصد باقی‌مانده آن ناشی از اختلاف درون گروهی بود (NoorMohammai 2012). در سال ۲۰۰۶ تنوع ژنتیکی ۲۴ ژنوتیپ انار ایرانی استان کرج با استفاده از ۱۰۰ مارکر رپید بررسی شد که از میان آنها تنها ۱۶ مارکر پلی-مورفیسم نشان دادند و در مجموع ۱۷۸ باند تولید کردند که ۱۰۲ باند چند شکلی نشان دادند. بر اساس این نتایج ژنوتیپ‌ها در ۴ گروه تقسیم‌بندی شدند. این مطالعه نشان داد که استفاده از مارکر رپید ابزار مناسبی برای بررسی تنوع ژنتیکی می‌باشد (Sarkhosh 2006).

امروزه، اهمیت انار به عنوان گیاه دارویی روز به روز در حال افزایش است. بنابراین شناخت ترکیبات موثر در اندام‌های مختلف آن و نقش آنها در مسیرهای متابولیکی درمان بیماری‌ها از ضروریات به نظر می‌رسد. متابولیت‌های موجود در قسمت‌های مختلف میوه و درخت انار شامل انواع قندها، اسیدهای‌آلی، آلکالوییدها، پلی‌فنل‌ها، فلاونوییدها، آنتوسیانین‌ها، اسیدهای‌چرب، ویتامین‌ها و نظایر آن است. آلکالوییدها بیشتر در پوست انار یافت می‌شوند و مهمترین آلکالوییدشناخته شده انار شامل پله‌تیرین و مشتقات آن ایزو پله‌تیرین، متیل پله‌تیرین، و پزودوپله‌تیرین است (Zargari 1996). به علاوه در پوست انار ترکیبات ضد باکتریایی، قارچی و ویروسی وجود دارد. انواع ترکیبات فنلی و تاننی در انار

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-04]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.7.5]

عبارتند از الاژیک اسید، گالیک اسید، پونیکالین، کلروژنیک اسید، هیدروکسی سینامیک اسید، پروتوکاتچیک اسید، هیدروکسی بنزوییک اسید، کافئیک اسید، فرولیک اسید، کوماریک اسید، فلوریدزین، کوئرستین، کاتکین، پ-کوماریک اسید و او-کوماریک اسید همچنین فلاونوییدهای موجود در میوه انار لوتئولین، کامپفرول و نارینژین هستند که به صورت گلیکوزیدی یافت می‌شوند (Aviram et al. 2000).

ارزیابی تنوع ژنتیکی موجود در ژرم‌پلاسم یک گونه زراعی هم در طرح‌های به نژادی و هم حفاظت از منابع ژنتیکی کاربرد دارد (Sun et al. 2003). یکی از متداول‌ترین روش مولکولی که امروزه جهت تعیین تنوع ژنتیکی گونه‌ها و ارقام گیاهی استفاده می‌شود روش RAPD است (Hoque et al. 2002). بنابراین هدف اصلی در این تحقیق، بررسی تنوع ژنتیکی و فیتوشیمیایی ژنوتیپ‌های انار استان کرمان با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR و کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی به منظور فراهم آوردن اطلاعات ژنتیکی و فیتوشیمیایی لازم جهت برنامه-های اصلاحی بود.

مواد و روش‌ها

برگ‌های جوان گیاه انار از ۲۰ رویشگاه مختلف در استان کرمان جمع آوری شد (جدول ۱).

استخراج DNA و بررسی کمی و کیفی آن

به دلیل وجود پلی‌ساکارید و پلی‌فنل بسیار زیاد در بافت برگ انار، از روش تغییر یافته CTAB، جهت استخراج ژنومی به شرح ذیل استفاده شد (Krizman et al. 2006). ۰/۰۸-۰/۰۶ گرم از برگ انار در داخل هاون به کمک ازت مایع به صورت پودر درآورده شد، بلافاصله ml ۱/۵ از بافر استخراج [تریس اسید کلریدریک با pH=۸ (۱۰۰ میلی‌مولار)، کلریدسدیم (دو مولار)، اتیلن دی آمین ترا استات با pH=۸ (۲۰ میلی‌مولار)، ستیل تری متیل آمونیوم بromید (دو درصد (w/v))، پلی وینیل پیرولیدون (دو درصد (w/v))] به همراه µl ۲۰ بتامرکاپتواتانول به آن اضافه شد و به خوبی مخلوط شد. مخلوط داخل تیوپ‌ها با وارونه کردن به خوبی مخلوط شد. سپس تیوپ‌ها در بن ماری ۵۵°C به مدت یک شب قرار داده شد در مرحله بعد تیوپ‌ها در g ×۱۴۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق به وسیله سانتریفیوژ یخچال‌دار مدل Unicen MR سانتریفیوژ شد و مایع رویی به تیوپ جدید انتقال داده شد. هم حجم مایع رویی ایزوآمیل‌الکل اضافه شد و به خوبی ورتکس شد. سپس در g ×۱۴۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد، در این مرحله سه فاز تشکیل شد که مایع رویی به تیوپ جدید انتقال داده شد این مرحله 5-4 بار با توجه به میزان آلودگی تکرار شد. هم حجم مایع رویی ایزوپروپانول اضافه شد و به وسیله وارونه کردن مخلوط شد. آنگاه در ۲۵°C به مدت یک ساعت قرار داده شد. سپس در g × ۷۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته شد و پلت با یک میلی‌لیتر از بافر شستشو (اتانول ۷۵ درصد) شسته شد. مرحله شستشو دو بار تکرار شد.

جدول ۱- خصوصیات و مناطق جمع‌آوری انارها

منطقه	مزه	رنگ پوست	آب و هوا
باغین	ملس	قرمز	نسبتا معتدل
بافت	ملس	قرمز	معتدل کوهستانی
بردسیر	شیرین	زرد	معتدل کوهستانی
بلورد	ترش	قرمز	سرد و معتدل
بم	ملس	زرد	گرم و خشک
جوپار	ترش	قرمز	خنک و معتدل
جیرفت	ترش	صورتی	گرم و مرطوب
چترود	شیرین	صورتی	معتدل خشک
رابر	ترش	قرمز	سرد و معتدل
راور	ملس	صورتی	گرم و خشک
رفسنجان	ترش	صورتی	نیمه کویری
زرند	ملس	صورتی	معتدل
سیرجان	شیرین	صورتی	معتدل و خشک
سیرچ	شیرین	صورتی	معتدل سردسیری
شهداد	ملس	صورتی	گرم و خشک
کرمان	ملس	زرد	خنک و معتدل
کهنوج	ملس	زرد	گرم و خشک
کوهبنان	ترش	زرد	نیمه بیابانی
ماهان	ملس	قرمز	نیمه بیابانی
منوجان	شیرین	زرد	گرم و مرطوب

سپس در g × ۹۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. مایع رویی دور ریخته شد و پلت در دمای اتاق خشک شد. آنگاه پلت در µl ۱۰۰ از بافر TE [تریس اسیدکلریدریک با ۸ =PH (۱۰ میلی‌مولار) و اتیلن دی آمین ترا استات با pH=۸ (یک میلی‌مولار)] حل شد، در صورت وجود آلودگی در g ×۱۴۰۰۰ به

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.7.5]

مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد و مایع رویی به تیوپ جدید انتقال داده شد. جهت مشاهده چشمی وضعیت DNA استخراجی، الکتروفورز نمونه‌های DNA روی ژل آگارز یک درصد انجام شد و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید زیر نور UV در دستگاه ژل‌داک مشاهده شدند. در این روش شکستگی DNA در ژل آگارز قابل بررسی است. DNA شکسته شده بر روی ژل آگارز به صورت لکه یا اسمیر و یا به صورت قطعه‌هایی با وزن مولکولی کم مشاهده می‌شود. از روش اسپکتروفتومتری برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استفاده شد. برای انجام این کار از دستگاه اسپکتروفتومتر carry 50 ساخت کمپانی Varian استفاده شد. بدین ترتیب نمونه‌های با ۲ – ۱/۸=۲۶۰/۲۸۰ OD که خلوص خوبی داشتند، انتخاب شدند.

انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

تمامی مواد مورد استفاده برای PCR به جز DNA، آب مقطر و آغازگرها به صورت میکروتیوب‌های تجاری و محلول بودند که از شرکت سیناژن تهیه شدند. مخلوط PCR ۲۵ µl محتوی یک میکرولیتر از DNA الگوی تهیه شده با غلظت ng/µl ۵۰، ۲ میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت mM ۵۰، ۲/۵ میکرولیتر dNTP با غلظت µM ۲/۵، ۰/۳ میکرولیتر Taq DNA polymerase با غلظت unit/µl ۵، دو میکرولیتر آغازگر با غلظت µM ۲، µl ۲/۵ بافر PCR دارای غلظت ۱۰ برابر [KCl ۵۰۰mM و Tris–HCl (pH=۸/۴)] و µl ۱۴/۷ آب دو بار تقطیر استریل بود. ترموسایکلرهای مورد استفاده در این تحقیق در نوع ساده و گرادیانت ساخت کمپانی اپندورف بودند. ابتدا دمای بهینه هر آغازگر با استفاده از ترموسایکلر گرادیانت (شیب دمایی) بدست آمد. با توجه به اینکه این دمای بدست آمده به طور متوسط ۵–۷°C کمتر از دمای ذوب هر آغازگر بود (جدول۲) بنابراین در هر واکنش PCR دمای ۵ چرخه ابتدایی ۵ درجه پایین‌تر در نظر گرفته شد و ۳۵ چرخه باقی‌مانده آن در دمای ذوب واقعی انجام شد. برنامه دمایی PCR برای همه آغازگرها مشابه بوده و بخش متغیر آن دمای اتصال آغازگر به DNA تک رشته بود. شرایط PCR برای کلیه آغازگرها به شرح ذیل بود: ۱– واسرشت آغازین DNA در ۹۴°C به مدت ۴ دقیقه (یک چرخه)؛ ۲– تک رشته‌ایی شدن DNA در دمای ۹۴°C به مدت ۵۰ ثانیه (این مرحله در ۴۰ چرخه تکرار شد)؛ اتصال آغازگر به DNA تک رشته‌ای در دمای اتصال بهینه مربوط به هر آغازگر به مدت ۴۰ ثانیه، بسط آغازگر در دمای ۷۲°C به مدت دو دقیقه؛ ۳– تکمیل بسط در دمای ۷۲°C به مدت ۸ دقیقه (یک چرخه). به منظور بررسی تکرارپذیری نوارهای RAPD و ISSR عمل PCR تحت شرایط یکسان، به طورتصادفی برروی DNAهای گیاهان مورد نظر دوباره انجام شد که تکرارپذیری باندهای حاصل تایید شد.

الکتروفورز ژل آگارز

قطعات PCR شده برای هر آغازگر روی ژل آگارز یک درصد (W/V) در بافر TBE (1X) [تریس، اسید بوریک و اتیلن دی آمین ترا استات با pH =۸ (۰/۵ مولار)] جدا شدند. نمونه‌ها به مدت ۱۲۰ دقیقه با جریان ۸۰ ولت الکتروفورز شدند. دستگاه مورد استفاده در این تحقیق از نوع الکتروفورز افقی مدل E132 از شرکت Consort بلژیک بود. ژل با اتیدیوم بروماید (۱۰ µg/ml) به مدت ۱۰ دقیقه رنگ آمیزی و سپس با آب مقطر شستشو داده شد. آنگاه ژل درون دستگاه ژل– داک مدل Syngene تحت اشعه ماورا بنفش قرار گرفت و پس از مشاهده نوارها در زیر این نور، از ژل با فرمت‌های مختلف توسط نرم افزار Genesnap (6.08.04) عکس تهیه شد (شکل۱). نشانگر وزن مولکولی (۱۰۰ bp) محصول شرکت فرمنتاز به میزان دو میکرولیتر در هر ژل برای شناسایی و امتیازدهی باندها مورد استفاده قرار گرفت.

تجزیه آماری ماتریس داده‌ها

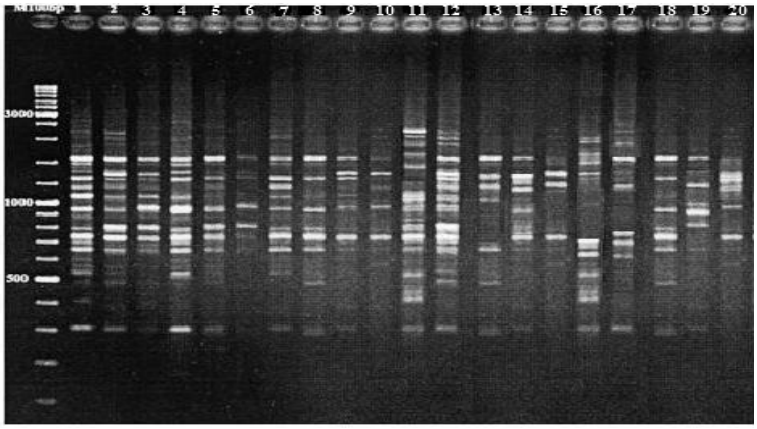
از ۲۴ آغازگر تصادفی تعداد ۱۸ آغازگر که باناددهی بهتری داشتند جهت تجزیه انتخاب شدند (جدول۲). برای تجزیه آماری داده‌ها، در ابتدا باندهای واضح را مشخص کرده و با توجه به اندازه نشانگر استاندارد ۱۰۰ bp اندازه هر کدام از باندهای واضح در هر چاهک را بر اساس طول و وزن مولکولی استاندارد مشخص شد. این عمل توسط نرم افزار Genetools در تمام ژل‌های مربوط به ۱۸ آغازگر انجام پذیرفت. هر کدام از باندهای چند شکل در هر آغازگر به عنوان یک متغیر مستقل در نظر گرفته شد. حضور یا عدم حضور هر کدام از باندهای مشاهده شده برای هر یک از ۱۸ آغازگر به ترتیب با اعداد یک و صفر امتیازدهی شدند و سپس در نرم افزار Excel یک ماتریس از اعداد صفر و یک برای آغازگرهای مورد استفاده تهیه شد. سپس داده‌ها به NTedit، بخش

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-04]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.7.5]

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای RAPD و ISSR و چندشکلی‌های بدست آمده از ۲۰ ژنوتیپ انار

نام آغازگر	توالی آغازگر ´۵ به ´۳	دمای اتصال (°C)	کل باندها	باندهای چندشکل	درصد چندشکلی
	RAPD				
A	GGTCTCCTAG	۳۲	۱۲	۱۱	۹۱/۶
B	CGGAGAGCGA	۳۴	۸	۷	۸۷/۵
C	CGGCATAAGA	۳۰	۶	۶	۱۰۰
D	TGGGCTCGCT	۳۴	۱۲	۱۲	۱۰۰
E	ACTTGTGCGC	۳۲	۱۰	۸	۸۰
F	CCCACTGACG	۳۴	۶	۶	۱۰۰
۷۵	GAGGTCCAGA	۳۶	۱۱	۱۰	۹۰/۹
۵۳	CTCCCTGAGC	۳۴	۱۳	۱۳	۱۰۰
۵۹	GAATGCGAGC	۳۲	۹	۷	۷۷/۷
۶۳	TTCCCCGCCC	۳۶	۱۴	۱۴	۱۰۰
۶۸	GAGGGGAAGA	۳۲	۱۰	۸	۸۰
۷۱	GAGGGCGAGG	۳۶	۱۰	۹	۹۰
۷۲	GAGCACGGGA	۳۴	۱۴	۱۴	۱۰۰
۳۹۱	GCGAACCTCG	۳۴	۱۳	۱۱	۸۴/۶
۳۹۹	TTGCACCTGA	۳۰	۹	۷	۷۷/۷
	ISSR				
ISS2	$(GA)_5GC$	۴۴	۶	۵	۸۳/۳
ISS3	$(CA)_5GT$	۴۵	۱۰	۹	۹۰
ISS5	$(GAA)_5$	۴۲	۱۳	۱۲	۹۲/۳
کل	-	–	۱۸۶	۱۶۹	–
میانگین	-	–	۱۰/۳	۹/۳۸	۹۰/۳۱



شکل ۱- مشاهده نوارهای چند شکلی با نشانگر ۶۸ در ۲۰ ژنوتیپ انار پس از الکتروفورز. چاهک‌ها به ترتیب ۱) انار بردسیر؛ ۲) انار رفسنجان؛ ۳) انار راور؛ ۴) انار باغین؛ ۵) انار زرند؛ ۶) انار منوجان؛ ۷) انار چترود؛ ۸) انار جوپار؛ ۹) انار کرمان؛ ۱۰) انار سیرجان؛ ۱۱) انار شهداد؛ ۱۲) انار سیرج؛ ۱۳) انار کهنوج؛ ۱۴) انار رابر؛ ۱۵) انار ماهان؛ ۱۶) انار بلورد؛ ۱۷) انار بافت؛ ۱۸) انار بم؛ ۱۹) انار کوهبنان و ۲۰) انار جیرفت.

*هر چاهک حاوی یکی از ۲۰ ژنوتیپ انار جمع‌آوری شده از استان کرمان می‌باشد که به ترتیب از یک تا ۲۰ شماره‌گذاری شدند.

ورودی نرم افزار NTSYS انتقال داده شد. ماتریس تشابه با استفاده از ضریب تشابه دایس به کمک نرم افزار NTSYS-pc (Ver2/02) حاصل شد (Rohlf 1998)، به منظور بررسی همبستگی بین دندروگرام و ماتریس تشابه، ضریب همبستگی کوفنتیک محاسبه شد. همچنین تجزیه به مولفه های اصلی انجام گرفت و پلات دوبعدی و سه بعدی حاصل از آن رسم شد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.7.5]

مواد گیاهی برای آزمایش تنوع فیتوشیمیایی

از ۲۰ منطقه مورد بررسی سه منطقه چترود (شیرین)، ماهان (ملس)، کوهبنان (ترش) به طور تصادفی انتخاب شدند و پوست میوه انار در این مناطق جمع آوری شد.

اسانس گیری

استخراج اسانس با روش تقطیر با آب و با دستگاه کلونجر انجام شد (ASTA 1968). بدین منظور ۲۰ گرم از پوست‌های انار آسیاب شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در آب خیسانده شد آنگاه پوست انار خیسانده شده را وارد بالون مربوطه کرده و تا خط نشانه بالون به آن آب مقطر اضافه شد. در آغاز میزان معینی محلول نمک با غلظت مشخص درون لوله جدا سازی ریخته شد و سپس جریان آب سرد برقرار شد تعدادی سنگ جوش (به منظور جوشش یکنواخت) به محتویات بالون اضافه شد و سپس بالون به دستگاه متصل و دستگاه روشن شد در ابتدا هیتر روی درجه آخر قرار داده شد و وقتی که آب به جوش آمد روی شماره دو ثابت شد. اسانس‌گیری به مدت ۵ ساعت ادامه یافت سپس دستگاه خاموش و پس از ۴ دقیقه مقدار یک میلی‌لیتر پنتان به اسانس جمع‌آوری شده اضافه شد. اضافه کردن پنتان به علت کم بودن مقدار اسانس بود و چون پنتان حلال خوبی برای اسانس است مقدار اسانس جمع‌آوری شده که به قسمتی از دستگاه به نام لوله‌های مبرد چسبیده را در خود حل کرده و استخراج آن را راحت‌تر می‌کند. اسانس جمع‌آوری شده در داخل شیشه‌های تیره و در بسته جمع‌آوری شد. سپس کل سیستم حلال پنتان و ترکیبات فرار توسط سولفات سدیم انیدر آبگیری شد. آنگاه تا زمان تجزیه کمی و کیفی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس به وسیله GC/MS[1] نمونه‌ها در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

کروماتوگرافی گازی طیف سنجی جرمی

برای شناسایی ترکیبات موجود در اسانس گیاه، اجزای متشکله اسانس گیاه به کمک دستگاه گازکروماتوگراف مدل ksShimadzu-QP5050 متصل به طیف سنج جرمی مدل Shimadzu-QP5050 صورت گرفت. جداسازی ترکیبات در ستون موئین Fused silica از نوع DBX-5 با طول ۴۰ متر، قطر داخلی ۰/۱۸ میلی‌متر و ضخامت لایه نازک ۰/۱۸ میکرومتر انجام گرفت. از گاز هلیوم با خلوص ۹۹/۹۹ درصد به عنوان گاز حامل استفاده شد. برای جداسازی ترکیبات اسانس از برنامه دمایی زیر استفاده شد: دمای آون به مدت ۵ دقیقه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داشته شد و سپس تا ۲۷۵ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۵ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه افزایش یافت. دمای آشکارساز ۲۳۰ درجه سانتی‌گراد، دمای محل تزریق ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد، نسبت شکافت ۱:۴۳ و سرعت جریان گاز هلیوم به داخل ستون ۰/۹ میلی‌لیتر بر دقیقه انتخاب شدند.

نتایج و بحث

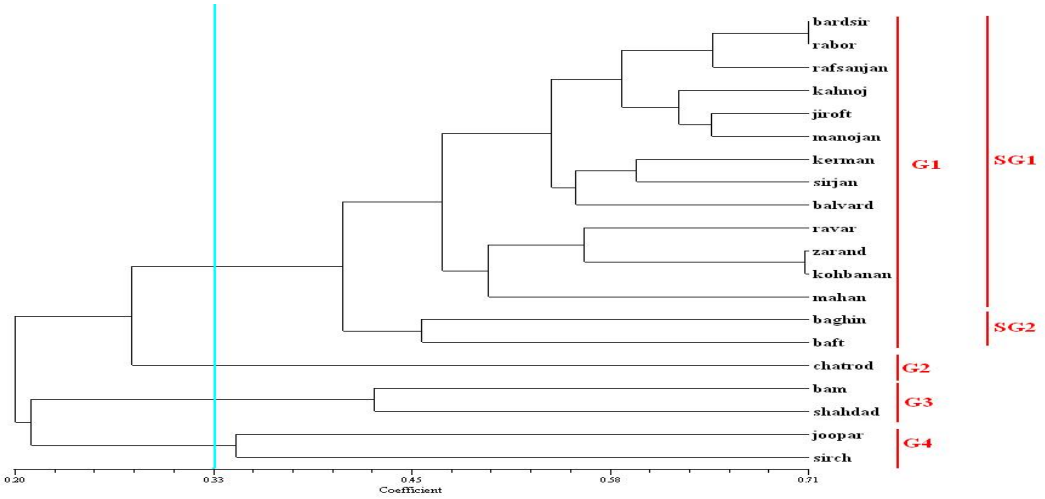
مجموعا ۱۸۶ قطعه DNA توسط ۱۸ آغازگر انتخاب شده برای تجزیه، تکثیر شد که از بین آنها ۱۷ قطعه در بین تمام ۲۰ توده یک شکل بودند و باقی‌مانده آنها (۱۶۹ قطعه) چند شکلی نشان دادند که حاکی از درصد بالای قطعات چند شکل در بین نمونه-های مورد مطالعه است. تعداد قطعات تکثیر شده با آغازگرهای مختلف متفاوت بود (جدول۲). بیشترین تعداد باند چند شکل ۱۴ عدد و مربوط به RAPD72 و RAPD63 و کمترین تعداد ۵ عدد و مربوط به آغازگر ISSR2 بود. اندازه قطعات تکثیر شده در تمام آغازگرها در محدوده ۲۸۰۰-۲۴۰ جفت‌باز تخمین زده شد. دامنه وسیع تشابه (۰/۷۱-۰/۲) نشان دهنده کارایی RAPD و ISSR در ارزیابی تنوع مولکولی، نشان دادن اختلافات بین جمعیت‌های مورد مطالعه و گروه‌بندی آنهاست (Huff et all. 1993).

در صورت در نظر گرفتن خط مرجعی در سطح تشابه ۰/۳۳ دندوگرام، چهار خوشه متفاوت بدست می‌آید به طوری که پراکندگی جغرافیایی نمونه‌ها را در چهار گروه قرار می‌دهد (شکل۲)؛ گروه اول که شامل دو زیر گروه اصلی می‌باشد (G1 شکل۲). زیرگروه الف) که شامل نمونه‌های بردسیر، رابر، رفسنجان، کهنوج، جیرفت، منوجان، کرمان، سیرجان، بلورد، راور، زرند، کوهبنان و ماهان می‌باشد (SG1 شکل۲) و زیرگروه ب) که شامل باغین و بافت می‌باشد (SG2 شکل۲). در گروه دوم چترود قرار گرفت (G2 شکل۲). گروه سوم شامل، بم و شهداد می‌باشد (G3 شکل۲). گروه چهارم شامل، جوپار و سیرچ است (G4 شکل۲). بیشتر توده‌ها در گروه یک متمرکز بودند که تنوع

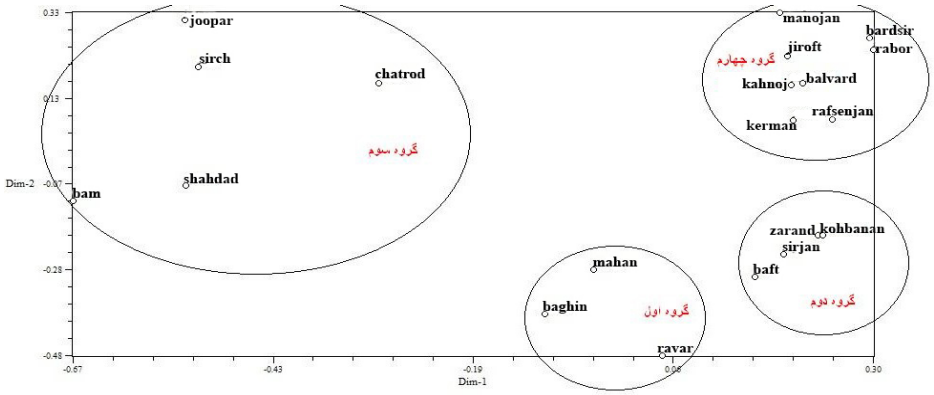
[1] Gas chromatography- Mass spectrometry

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-04]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.7.5]



شکل ۲- دندوگرام مربوط به داده‌های حاصل از نشانگر RAPD و ISSR، بر اساس الگوریتم میانگین فاصله (UPGMA)



شکل ۳- پلات دو بعدی ۲۰ نمونه انار استان کرمان حاصل از تجزیه به مولفه‌های اصلی که در ۴ گروه تقسیم بندی شدند. گروه اول) باغین، راور و ماهان؛ گروه دوم) بافت، زرند، سیرجان و کوهبنان؛ گروه سوم) بم، جوپار، چترود، سیرچ، شهداد؛ گروه چهارم) بردسیر، بلورد، جیرفت، رابر، رفسنجان، کرمان، کهنوج و منوجان.

مولکولی اکثر این ژنوتیپ‌ها تا حد زیادی منطبق بر تنوع جغرافیایی بود. اما مواردی نیز وجود داشت که از تنوع جغرافیایی تبعیت نمی‌کردند. مقدار ضریب همبستگی کوفنتیک که برابر با ۰/۸۴ بود، نشان داد که دندروگرام بدست آمده و ماتریس تشابه با یکدیگر همبستگی خوبی دارند. نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی که در شکل‌های ۳ و ۴ آمده است، با نتایج مربوط به تجزیه کلاستر تا حد زیادی همخوانی داشت.

در تجزیه GC-MS برای افزایش دقت شناسایی هر جزء جدا شده، همراه طیف جرمی از ارزش بازداری نسبی (اندیس کواتس) جهت صحه گذاشتن بر شناسایی توسط طیف جرمی استفاده شد. در نهایت اجزای اسانس با استفاده از مقایسه طیف‌های جرمی استاندارد موجود در کتابخانه الکترونیک willey ۲۰۰۰ موجود در نرم افزار lab solution دستگاه GC/MS و محاسبه اندیس بازداری استاندارد، بر اساس سری آلکان‌های C_7–C_{19} تزریق شده با شرایط یکسان و مقایسه آنها با اعداد استاندارد موجود در مراجع شناسایی شدند. از ۱۶۴ پیک به دست آمده از گاز کروماتوگرافی پوست انار ترش ۴۰ ماده با شباهت بالاتر از ۹۰ انتخاب شد (جدول ۳)، از ۶۳ پیک بدست آمده از گاز کروماتوگرافی پوست انار شیرین ۲۴ ماده با شباهت بالاتر از ۹۰ انتخاب شد (جدول ۴) و از ۴۵ پیک بدست آمده از گاز کروماتوگرافی پوست انار ملس ۱۸ ماده با شباهت بالاتر از ۹۰ انتخاب شد (جدول ۵). در نمونه پوست انار ترش ماده تریکوزان و نونانال به ترتیب دارای بیشترین و کمترین زمان بازداری می‌باشند. در اسانس پوست این نوع انار، ترکیبات اسید هگزادکانیک، اکتادکان، هگزادکان، ایکوزان و متیل تترادکانات به ترتیب دارای بیشترین مقدار درصد بودند. در اسانس پوست انار شیرین چترود، نانودکان و دودکان دارای

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.7.5]

جدول ۳- ترکیبات شیمیایی تشکیل دهنده پوست انار ترش کوهبنان (زمان بازداری برحسب ثانیه)

ردیف	نام ترکیب	درصد	زمان بازداری	شاخص بازداری	ردیف	نام ترکیب	درصد	زمان بازداری	شاخص بازداری
۱	Nonanal	۰/۰۷	۱۲/۴۹۵	۱۰۵۳	۲۱	Bisabolol	۰/۲۷	۲۵/۳۸۹	۱۴۹۶/۵۸
۲	Alpha terpineol	۰/۰۲	۱۴/۷۴۵	۱۱۳۰	۲۲	Cinnamaldehyde	۰/۲۱	۲۶/۴۸	۱۵۴۱/۴۹
۳	Dodecane	۰/۰۳	۱۴/۹۴۱	۱۱۲۶	۲۳	Octadecane	۴/۸۵	۲۹/۹۰۶	۱۶۸۳/۶۵
۴	Decanal	۰/۲۱	۱۵/۱	۱۱۳۳/۵۳	۲۴	Pentadecanone	۰/۳۲	۲۷/۸۳۵	۱۵۹۷/۷۲
۵	Naphthalene	۰/۰۲	۱۵/۶۷۲	۱۰۹۹	۲۵	Octadecanol	۰/۴۹	۲۸/۴۷۶	۱۶۲۴/۳۲
۶	Decenal	۰/۰۳	۱۶/۴۴۵	۱۱۷۴/۳۶	۲۶	Nonadecane	۰/۳۲	۲۹/۱۳۳	۱۶۵۱/۵۸
۷	Tridecane	۰/۰۶	۱۷/۳۲۴	۱۲۰۲	۲۷	Farnesyl acetate	۰/۳۲	۲۹/۴۸۲	۱۶۶۶/۰۶
۸	Undecanal	۰/۰۶	۱۷/۵۱	۱۲۰۸/۷۵	۲۸	Eicosane	۲/۱۸	۳۱/۰۰۷	۱۷۴۳/۶۴
۹	Hexyl tiglate	۰/۰۴	۱۸/۰۴۴	۱۲۲۶/۷۳	۲۹	Tricosane	۰/۰۴	۲۸/۳۲	۲۰۹۶/۳۸
۱۰	Undecenal	۰/۰۶	۱۸/۷۸	۱۲۵۱/۵۱	۳۰	Hexadecanoic acid	۴۵/۸۱	۳۴/۷۵۱	۱۹۲۹/۸۰
۱۱	Tetradecane	۰/۱۹	۱۹/۵۵۹	۱۲۷۷/۷	۳۱	Linoleic acid	۰/۸۹	۳۸/۲۸۳	۲۰۹۴/۷۱
۱۲	Dodecanal	۰/۱۳	۱۹/۷۷۱	۱۲۸۴/۸۸	۳۲	Decanoic acid	۰/۷۷	۱۹/۲۵۲	۱۲۶۷/۴
۱۳	Caryophyllen	۰/۸۹	۲۰/۱۱۵	۱۲۹۶/۴۶	۳۳	Farnesene	۰/۴۴	۲۲/۹۸۵	۱۴۰۶/۲
۱۴	Dodecanol	۰/۸۷	۲۱/۱۷۴	۱۳۳۷/۴۱	۳۴	Bisabolene Z-α	۰/۱۴	۲۴/۰۷۶	۱۴۴۷/۲۲
۱۵	Benzene	۰/۱۱	۲۱/۳۷۵	۱۳۴۵/۰۶	۳۵	Dodecanoic acid	۱/۰۲	۲۳/۳۳۴	۱۴۱۹/۳۲
۱۶	Pentadecane	۰/۱۷	۲۱/۶۶۱	۱۳۵۵/۹۳	۳۶	Hexadecane	۰/۷۴	۲۷/۵۱۸	۱۵۸۴/۵۶۴۳
۱۷	Bisabolene β	۰/۴۳	۲۱/۹۱	۱۳۶۲/۴	۳۷	Tetradecene	۱/۳۶	۲۳/۹۱۲	۱۴۴۱/۰۵۲۶
۱۸	Methyl undecanoate	۰/۰۳	۲۲/۱۵۹	۱۳۷۴/۸۷	۳۸	Heptadecane	۰/۵۲	۲۶/۸۲۴	۱۵۵۵/۷۶۷۶
۱۹	Tridecen-1-al <(2E)->	۰/۸۹	۲۳/۱۹۷	۱۴۱۴/۱۷	۳۹	Methyl tetradecanate	۱/۳۸	۲۶/۹۹۹	۱۵۶۳/۰۲۹
۲۰	Gurjunene β-	۰/۱۳	۲۴/۲۸۴	۱۴۵۵/۰۳	۴۰	Hexedecene	۳/۶۶	۲۸/۹۲۶	۱۶۴۲/۹۸۷۶

جدول ۴ – ترکیبات شیمیایی تشکیل دهنده پوست انار شیرین چترود (زمان بازداری برحسب ثانیه)

ردیف	نام ترکیب	درصد	زمان بازداری	شاخص بازداری	ردیف	نام ترکیب	درصد	زمان بازداری	شاخص بازداری
۱	Dodecane	۰/۲۹	۱۴/۹۷۴	۱۱۲۷/۵	۱۳	Bisabolene β	۱/۷۵	۲۱/۹۱۵	۱۳۶۵/۶
۲	Decanal	۰/۹۸	۱۵/۱۰۶	۱۱۳۱/۷	۱۴	Bisabolene	۱/۲۳	۲۵/۰۰۳	۱۴۸۳
۳	Tetradecene	۵/۱۲	۲۵/۱۴	۱۴۸۹/۲	۱۵	Sesquiphellandrene β	۱/۲۸	۲۲/۲۳۸	۱۳۷۷/۹
۴	Tetredecane	۱/۱	۱۹/۵۷	۱۲۷۸/۹	۱۶	Dodecanoic acid	۱/۲۲	۲۳/۰۷	۱۴۰۹/۶
۵	Cedrene	۰/۴۱	**۱۹/۹۶۷**	**۱۲۹۲/۴**	۱۷	Tridecene	۵/۱۶	۲۳/۶۵۸	۱۴۳۲/۲
۶	Bergamotene cis	۱/۵۹	۲۰/۴۰۱	۱۳۰۸	۱۸	Hexadecene	۰/۵۷	۲۲/۳۷۱	۱۳۸۲/۹
۷	Caryophllene	۴/۶۹	۲۰/۱۱۵	۱۲۹۷/۴	۱۹	Hexadecane	۳/۱۷	۲۴/۲۲۴	۱۴۵۴
۸	Geranyl acetone	۰/۹۷	۲۰/۷۱۹	۱۳۲۰/۱	۲۰	Dillapiole	۰/۵۵	۲۴/۲۴۴	۱۴۵۴/۸
۹	Farnesene	۱/۱۳	۲۱/۴۴۹	۱۳۴۷/۹	۲۱	Tetradecanol	۱۰/۲۷	۲۹/۱۲۸	۱۶۴۲/۶
۱۰	Dodecanol	۶/۰۸	۲۱/۱۶۹	۱۳۳۷/۲	۲۲	Heptadecane	۱/۲۲	۲۵/۵۴	۱۵۰۴/۶
۱۱	Curcumene ar	۰/۲۴	۲۱/۳۸۱	۱۳۴۵/۳	۲۳	Octadecane	۳/۰۹	۲۷/۳۷	۱۵۷۵
۱۲	Pentadecane	۰/۹۸	۲۱/۶۶	۱۳۵۵/۹	۲۴	Nonadecane	۰/۹۲	۲۹/۱۲۸	۱۶۴۲/۶

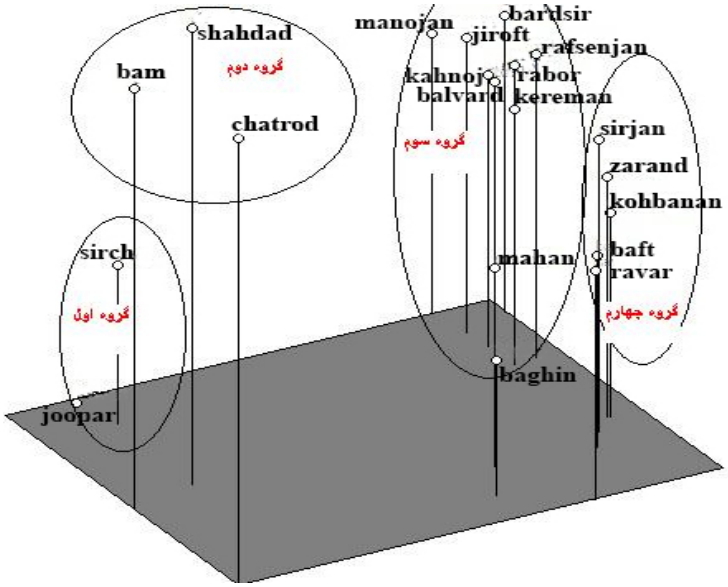
بیشترین و کمترین زمان بازداری بودند. در این اسانس، ترادکانول، ترادسین، اکتادکان، برگاموتن و سکویفلاندرن بیشترین سطح زیر پیک را به خود اختصاص دادند. در اسانس پوست انار ملس ماهان ترکیبات دکانال و هگزادکانال کمترین و بیشترین زمان بازداری را به خود اختصاص دادند. همچنین در اسانس پوست انار ملس ماهان بیشترین درصد مربوط به هگزادسن، اکتادکان، اسید هگزادکانیک، آلفا-فارنسن و ترادسن بود. هگزادکانوئیک اسید و اکتادکانوئیک اسید موجود در پوست انار ترش دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانتی، ضدسرطانی و ضدالتهاب می‌باشند (Wei et al. 2011; Usharani et al. 2013). همچنین

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.7.5]

جدول ۵- ترکیبات شیمیایی تشکیل دهنده پوست انار ملس ماهان (زمان بازداری برحسب ثانیه)

ردیف	نام ترکیب	درصد	زمان بازداری	شاخص بازداری	ردیف	نام ترکیب	درصد	زمان بازداری	شاخص بازداری
۱	Decanal	۰/۵۵	۱۵/۱۰۵	۱۱۳۱/۶۸	۱۰	Cis-alpha-bisabolene	۰/۳۶	۲۲/۵۹۳	۱۳۹۱/۳۶
۲	Tetradecane	۱/۴۶	۲۴/۶۱	۱۴۶۷/۲۹	۱۱	Dodecanoic acid	۰/۵۸	۲۳/۰۸۵	۱۴۰۹/۹۶
۳	Tetradecene	۲/۵۲	۲۵/۱۶۱	۱۴۸۸	۱۲	Hexadecene	۱۱/۳۷	۲۸/۹	۱۶۲۸/۵۷
۴	Caryophyllene	۳/۱	۲۰/۱۲	۱۲۹۷/۶۱	۱۳	Hexadecane	۲/۴۸	۲۷/۵۵۵	۱۵۷۸
۵	Farnesene	۱/۵۷	۲۱/۴۴۹	۱۳۴۷/۸۷	۱۴	Tetradecanal	۰/۳۸	۱۹/۷۷۶	۱۲۸۵/۹۱
۶	Pentadecane	۱/۲	۲۱/۶۸۲	۱۳۵۶/۷۳	۱۵	Pentadecanone	۱/۲۶	۲۸/۲۱۱	۱۶۰۲/۶۶
۷	Dodecanol	۱/۵۳	۲۱/۱۵۸	۱۳۳۶/۸۰	۱۶	Octadecane	۵/۳۸	۲۷/۴۲۸	۱۵۷۳/۲۳
۸	alpha.Farnesene	۳/۱۳	۲۱/۸۹۴	۱۳۶۴/۷۹	۱۷	Nonadecane	۱/۸۶	۲۹/۱۵۷	۱۶۳۸/۲۳
۹	beta.Sesquiphellandrene cyclohexene	۰/۸۴	۲۲/۲۴۴	۱۳۷۸/۱	۱۸	Hexadecanoic acid	۵/۲۹	۲۹/۶۶۸	۱۶۵۷/۴۴

کاریوفیلین موجود در پوست انار ترش دارای فعالیت ضدباکتریایی، ضدالتهاب، قارچ‌کشی و دارای اثر آرام بخش نیز می‌باشد (Kumar et al. 2010). تترادسن موجود در پوست انار شیرین که میزان آن ۵/۱۲ درصد می‌باشد دارای فعالیت ضد آنژیوژنیک می‌باشد (Wu et al. 2004). کاریوفیلن یکی از ترکیبات موجود در پوست انار ملس است که به طور گسترده در اسانس‌های گیاهی موجود می‌باشد که دارای چندین فعالیت بیولوژیکی مانند اثرات ضد التهاب، آنتی بیوتیک، آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطانی و بی‌حس‌کنندگی موضعی می‌باشد. در تحقیقات گذشته یک غلظت غیرسمی از کاریوفیلن، دارای اثر ضد سرطانی بر روی سلول‌های سرطانی بدن انسان می‌باشد (Legault et al. 2007). در تحقیق حاضر، تعداد زیاد نوارهای چند شکل RAPD و ISSR و دامنه وسیع تشابه (۰/۷۱-۰/۲) در میان توده‌های انار، وجود تنوع ژنتیکی بالایی را در میان جمعیت‌های بومی انار استان کرمان، حتی میان توده‌های نزدیک به هم از لحاظ جغرافیایی، نشان داد. در تحقیقی با استفاده از مارکر RAPD سطوح تنوع را در میان ۲۴ ژنوتیپ انار ایرانی بررسی شده، در این آزمایش از میان صد آغازگر تصادفی ده نوکلئوتیدی بکار رفته در واکنش‌های PCR، تنها شانزده آغازگر توانستند، الگوهای چندشکلی را به صورت قابل اطمینانی نشان دهند. از این آغازگرها ۱۷۸ باند به دست آمد که ۱۰۲ باند چندشکل بودند. تجزیه خوشه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس باندهای بدست آمده، با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روش تجزیه خوشه‌بندی UPGMA صورت گرفت. بیشترین و کمترین تشابه بدست آمده در میان ژنوتیپ‌ها به ترتیب ۰/۸۹ و ۰/۲۹ بود. در یک سطح تشابه شصت درصدی، ژنوتیپ‌ها به چهار گروه تقسیم‌بندی شدند. محاسبه ضریب همبستگی فنوتیپی، وجود همبستگی بالایی (r=۰/۹) را بین ماتریس تشابه و دندروگرام UPGMA نشان داد که نشان دهنده روابط خویشاوندی میان ارقام است. نتایج نشان داد که ارقام یکسان از دو منطقه جغرافیایی متفاوت، الگوهای یکسانی را نشان ندادند. در بیشتر موارد گروه‌بندی‌ها با خصوصیات مورفولوژیکی و دربعضی موارد، با نام محلی ارقام مطابقت نداشتند (Sarkhosh et al. 2006).



شکل ۴- پلات سه بعدی ۲۰ نمونه انار استان کرمان حاصل از تجزیه به مولفه-های اصلی که در ۴ گروه تقسیم بندی شدند. گروه اول) شامل جوپار و سیرچ؛ گروه دوم) بم، چترود و شهداد؛ گروه سوم) باغین، بردسیر، بلورد، رابر، رفسنجان، کرمان، کهنوج، ماهان و منوجان؛ گروه چهارم) بافت، راور، زرند، سیرجان و کوهبنان.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.7.5]

در یک پژوهش 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 جغرافیایی شامل ایالت‌های شاندونگ، آنهویی، شانکسی، یوونان، هنان و گزینجیانگ مورد بررسی قرار گرفتند. بوسیله هشت ترکیب آغازگری، ۱۳۵ تا ۱۸۵ مکان چندشکلی بدست آمد. درصد چندشکلی بین ۶۲/۵ تا ۸۶/۵ درصد متغیر بود که نشان دهنده تنوع ژنتیکی بالا در بین ارقام انار بود. و مشابه با این تحقیق تنوع ژنتیکی در میان گونه‌ها بیشتر از تنوع ژنتیکی موجود بین جمعیت‌ها بود. تجزیه واریانس نشان داد که بین جمعیت‌ها از نظر تنوع ژنتیکی تفاوت معنی‌داری وجود دارد. جریان ژنی اندازه‌گیری شده بین جمعیت‌ها بر اساس ضریب تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها ۱/۹۰۲۷ است، بنابراین جریان ژنی ملایمی بین جمعیت‌ها وجود دارد. بر اساس تجزیه خوشه‌بندی UPGMA که اغلب ارقام یک جمعیت یکسان با یکدیگر در یک خوشه قرار گرفته بودند، اما اندکی تنوع ژنتیکی نیز مشاهده شد. همه پارامترهای ژنتیکی محاسبه شده نشان دادند که تنوع فراوانی در ارقام انارچینی وجود داشت و تنوع جمعیت هنان به صورت معنی داری بالاتر از دیگر جمعیت‌ها بود (Yuan et al. 2007). در تحقیقی با استفاده از ویژگی‌های مورفولوژیکی میوه و مارکر مولکولی RAPD روابط خویشاوندی، تنوع ژنتیکی و مورفولوژیکی ارقام انار بی‌هسته ایرانی بررسی شد. ۳۶ صفت میوه در این ارقام اندازه‌گیری شد. با استفاده از تجزیه فاکتور، ده فاکتور اصلی محاسبه شد و جهت گروه‌بندی ارقام با استفاده از روش وارد بکار گرفته شد. براین اساس ارقام به سه گروه اصلی تقسیم‌بندی شدند. از ۲۹ آغازگر ده نوکلئوتیدی، ۱۴ مورد چند شکلی مناسبی نشان دادند، و در مجموع ۴۳ مارکر RAPD تولید شد. تخمین تشابه ژنتیکی، با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و داده‌های RAPD، بین ۰/۱۳ تا ۰/۱ متغیر بود. با مقایسه دو دندروگرام نشانگر مورفولوژیکی با نشانگر RAPD ضریب همبستگی بسیار پایینی (r=-۰/۳۶) به دست آمد. بر اساس این مطالعه برای تشخیص ارقام انار بی‌هسته خصوصیات میوه و مارکر RAPD، تکمیل کننده‌اند (Sarkhosh 2009). دو نشانگر مبتنی بر PCR را به منظور بررسی تنوع و ساختار ژنتیکی در جمعیت‌های انار وحشی هیمالیای غربی (هند) مقایسه شد. ۴۹ نمونه بین دو منطقه از هیمالیای غربی با استفاده از تکنیک‌های RAPD و DAMA مورد مطالعه قرار گرفتند. از بین شش آغازگر DAMA، پنج آغازگر الگوهای واضحی را به وجود آوردند. از مجموع ۱۴۳ باند بدست آمده، ۱۴۰ باند چند شکل (۹۷/۰۸ درصد) را نشان دادند. از ۱۲۰ آغازگر RAPD، ۲۱ آغازگر الگوهای مجزا و واضحی را به وجود آوردند. از مجموع ۴۴۵ باند بوجود آمده، ۹۳/۷۲ درصد چند شکل بودند. تکنیک DAMA در مقایسه با روش RAPD چندشکلی بیشتری نشان داد. براساس دندروگرام معلوم شد که تنوع جغرافیایی ژنوتیپ‌ها از تنوع ژنتیکی پیروی نمی‌کند و گیاهان وحشی انار مستقل از وابستگی‌های جغرافیایی-شان هستند. نتایج نشان داد که عدم انطباق بین منطقه جغرافیایی نمونه‌ها و ویژگی‌های ژنتیکی‌شان، یک ویژگی از ژرم‌پلاسم انار می‌باشد (Narzary 2009).

در تحقیق حاضر نیز تنوع مولکولی اکثر ژنوتیپ‌ها منطبق بر تنوع جغرافیایی آنها بود. عدم تطابق کامل تنوع مولکولی با تنوع جغرافیایی توده‌های انار می‌تواند به دلیل جابجایی ژرم‌پلاسم باشد. در مجموع نتایج نشان می‌دهد که تنوع بالایی برای گونه-های انار بومی استان کرمان حتی در ژنوتیپ‌های نزدیک به هم از نظر جغرافیایی وجود دارد. این تنوع ژنتیکی بالا احتمالا به آنها اجازه می‌دهد که با تغییرات محیطی آسانتر سازگار شوند. درک چنین تنوع بالایی می تواند در مدیریت و حفاظت ژرم‌پلاسم‌های انار مفید باشد. مجموع مطالعات انجام شده بر روی توده‌های انار نشان می‌دهند که نشانگر مولکولی RAPD و ISSR برای بررسی تنوع ژنتیکی بین این ژنوتیپ‌ها مناسب بوده و توانسته دامنه وسیعی از تنوع را نشان داده و ژنوتیپ‌ها را به خوبی گروه‌بندی کرد. طی دو دهه اخیر کاربرد برخی ترکیب‌های طبیعی مانند عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی جهت کنترل بیولوژیک عوامل بیماری‌زا مورد توجه قرار گرفته‌اند. پوست انار سرشار از ترکیبات ضد باکتریایی است (Growther et al. 2012). محتوای فنولیک پوست میوه انار ۸/۱ برابر محتوای فنولیک برگ آن و ظرفیت آنتی اکسیدانی پوست میوه، بذر و برگ درخت انار به ترتیب ۵۵/۳، ۳۵/۷ و ۱۶/۴ درصد مشخص شد. بنابراین به نظر می‌رسد که محتوای فنولیکی بالای پوست و بذر انار می‌تواند خاصیت ضد

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-04]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.7.5]

قارچی و ظرفیت آنتی اکسیدانی قوی این عصاره‌ها را بوجود آورد (Selah varzi et al. 2011).

روش‌های مختلف استخراج و بهره‌گیری از حلال‌های مختلف (آب، اتانول و متان) سبب وجود مواد فعال بیولوژیکی متفاوت در اسانس پوست آن در تحقیقات مختلف شد (Growther et al. 2012). در این تحقیق از روش استخراج یکسان و آب به عنوان حلال برای استحصال هر سه اسانس پوست انار استفاده شد و مشخص شد که ترکیبات گرانیل استون، دیلاپیول، کورکومن و کدرین فقط در اسانس پوست انار شیرین چترود قابل شناسایی بودند و ماده ترادکانال بطور اختصاصی در اسانس پوست انار ملس ماهان شناسایی شد. همچنین در اسانس پوست انار ترش کوهبنان ۴۰ ماده با شباهت بیش از ۹۰ وجود داشت و ترکیبات سینامالدهید، گیرجیونه، دودکانال، بنزن، یونی‌دکانال، تری‌دکان، یونی‌دکنال، هگزیل‌تیگلات، تریکوزان، متیل‌یونی‌دکانوات، دکنال، نفتالن، آلفاترپینول و نونانال فقط در این اسانس مشاهده شدند. بیش از ده ماده شناسایی شده در هر سه اسانس وجود داشتند با این تفاوت که مقدار آن متفاوت بود. در تحقیقی که روستاییان و همکاران بر روی ۴ نمونه پوست انار با استفاده از روش GC-MS انجام دادند ترکیباتی شامل پالمتیک اسید، استریک اسید، اکوزونیک اسید، اولئیک اسید، آلفا لینویک اسید و لینولئیک اسید شناسایی شد. همچنین نشان داده شد که ماده ایکوزان در نمونه انار ترش بیشتر از شیرین بود که در نمونه انار شیرین چترود ما نیز وجود نداشت (Rustaiyan et al. 2013). طی مطالعه‌ای بر روی عصاره پوست انار هندی ۱۸ ترکیب شامل پیروگالول، هیدروکسی متیل فورفورال، دی آلوز و دی‌متیل فوماریک اسید شناسایی شد که با مواد بدست آمده از این تحقیق مشابهت پایینی داشتند و دلیل این تنوع شیمیایی می‌تواند ناشی از تنوع جغرافیایی و اقلیمی مناطق باشد (Sangeetha et al. 2011). در تحقیقی با استفاده از روش GC/MS در پوست انار ماده‌های ماتول، گلیسرول، پیروگالول، هگزادکان، پالمیتیک اسید و اکتادکان شناسایی شدند که با یافته‌های ما اندکی مشابهت داشت مانند اکتادکان و هگزادکان (Anusha 2011). تفاوت ترکیبات قابل شناسایی در اسانس پوست سه نوع انار ترش کوهبنان، ملس ماهان و شیرین چترود نه تنها به تفاوت به مزه دانه و رنگ پوست میوه، خصوصیات فیزیولوژیکی و منطقه جغرافیایی مربوط می‌شود بلکه از نظر ژنتیکی نیز بر اساس مطالعه حاضر این سه نوع انار با یکدیگر متفاوت بودند و در دو کلاستر مختلف قرار داشتند. با توجه به ترکیبات زیاد شناسایی شده، تحقیقات بیشتر برای شناسایی عمل هر ترکیب و استفاده از آن‌ها در درمان بیماری‌ها ضروری به نظر می‌رسد.

منابع

ASTA (1968) Official analytical methods of the American Spice Trade Association. Englewood Cliffs, NJ:8-11.

Aviram M, Dornfeld L, Kaplan M (2000) Pomegranate juice flavonoids inhibit low–density lipoprotein oxidation and cardiovascular diseases: studies in atherosclerotic mice and in humans. Drugs Under Experimental and Clinical Research 28: 49- 62.

Bhaskar A (2012) phytochemical evalution by GC-MS and in vitro antioxidant activity of *Punica granatum* fruit rind extract. Journal of Chemical and Phamacetical Reserch 4:2869-2873.

Ercisli S, Agar G, Orhan E, Yildirim N, Hizarci Y (2007) Interspecific variability of RAPD and fatty acid composition of some pomegranate cultivars (*Punica granatum* L.) growing in Southern Anatolia Region in Turkey. Biochemical Systematics and Ecology 35: 764-769.

Ercisli S, Kafkas E, Orhan E, Kafkas S, Dogan Y, Esitken A (2011) Genetic characterization of pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes by AFLP markers. Biological Research 44: 345-350.

Growther L, Sukirtha K, Savitha N, Niren Andrew S (2012) Antibacterial activity of *Punica granatum* peel extract against Shiga toxin producing *E. coli*. International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research 4:163-173.

Hajiahmadi Z, Talebi M, Sayed-Tabatabaei BE (2013) Studying genetic variability of pomegranate (*Punica granatum* L.) based on chloroplast DNA and barcode genes. Molecular Biotechnology 55:249-259.

Hoque ME, Mishra SK, Sarker A (2002) Inheritance and linkage relationship between morphological and RAPD markers in lentil (Lens colinaris Medik). Indian Journal of Genetics and Plant Breeding 62: 5-10.

Huff DR, Peakall R, Smouse PE (1993) RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss [Buchloë dactyloides (Nutt.) Engelm.]. Theoretical and Applied Genetics 86:927-934.

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

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.7.5]

Križman M, Jakše J, Baričevič D, Javornik B, Prošek M (2006) Robust CTAB-activated charcoal protocol for plant DNA extraction. Acta agriculturae Slovenica 87: 427-433.
Kumar P, Kumaravel S, Lalitha C (2010) Screening of antioxidant activity, total phenolics and GC-MS study of Vitex negundo. African Journal of Biochemistry Research 4:191-195.
Legault J, Pichette A (2007) Potentiating effect of beta-caryophyllene on anticancer activity of alpha-humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics 59:1643-1647.
Melgarejo P, Martı´nez JJ, Herna´ndez F, Martı´nez F, Legua R, Oncina R, Martı´nezMurcia A (2009) Cultivar identification using 18S-28S rDNA intergenic spacer-RFLP in pomegranate (*Punica granatum* L.). Scientia Horticulturae 120: 500-503.
Mirjalili A (2002) Known of Pomegranate. First edition.nashr publication of agriculture sciences. (In Farsi).
Morris J (2007) A molecular phylogeny of the Lythraceae and inference of the evolution of heterostyly. PhD thesis, Kent State University, Ohio.
Narzary D, Mahar KS, Rana TS, Ranade SA (2009) Analysis of genetic diversity among wild pomegranates in Western Himalayas, using PCR methods. Scientia Horticulturae 121: 237-242.
Noormohammai Z (2010) Genetic variation among Iranian pomegranates (*Punica granatum* L.) using RAPD, ISSR and SSR markers. Australian Journal of Crop Science 6: 268-275.
Parvaresh M, Talebi M, Sayed-Tabatabaei BE (2012) Molecular diversity and genetic relationship of pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes using microsatellite markers. Scientia Horticulturae 138:244-252.
Pirseyedi SM, Valizadehghan S, Mardi M, Ghaffari MR, Mahmoodi P, Zahravi M, Nekoui SMK (2010) Isolation and characterization of novel microsatellite markers in pomegranate (*Punica granatum* L.). International Journal of Molecular Sciences 11:2010-2016.
Rohlf FJ (1998) NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2/02.
Rustaiyan A, Keivandokht S, Elahi Kurabaslo S, Taghizade M (2013) Extraction analysis and study of antioxidant activity and total phenolic of pomegranote seed oil from four diffrent regions of Iran. Nature and Science 11:14-18.
Sangeetha J, Vijayalakshmi K (2011) Determinate of Bioactive Components of Ethyl Acetal Fraction of *punica granatum* Rind Extract .International Journal Pharrmaceutical Sciences and Drug Research 3:116-122
Sarkhosh A, Zamani Z, Fatahi R, Ebadi A (2006) RAPD markers reveal polymorphism among some Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes. Scientia Horticulturae 111: 24-29.
Sarkhosh A, Zamani Z, Fatahi R, Ranjbar H (2009) Evaluation of genetic diversity among Iranian soft-seed pomegranate accessions by fruit. Scientia Horticulturae 121:313-319.
Selah varzi y, Terani far A, Jahan bakhsh V (2011) Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 2:47-56 (In Farsi)
Shahr Babaki B (1998) Genetic Diversity of Pomegranate Genotypes in Iran. Agriculture Education Publication. Karaj, Iran. pp: 265. (In Farsi)
Sheidai M, Saneghi A, Shahreiyari ZH, Noormohammadi Z, Farahanei F, Tabatabaei Ardakanei S (2008) RAPD and cytogenetic study of some pomegranate (Punica Granatum L.) cultivars. International Journal of Cytology Cytosystematics and Cytogenetics 6:68-73.
Soleimani MH, Talebi M, Sayed-Tabatabaei BE (2012) Use of SRAP markers to assess genetic diversity and population structure of wild, cultivated, and ornamental pomegranates (*Punica granatum* L.) in different regions of Iran. Plant Systematics and Evolution 298: 1141-1149.
Sun G, Wang-Pruski G, Mayich M (2003) RAPD and pedigree-based genetic diversity estimates incultivated diploid potato hybrids. Theoretical and Applied Genetics 107: 110-115.
Talebi BM, Bahar Masoud SB, Yamchi A (2011) Evaluation of genetic diversity among Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars, using ISSR and RAPD markers. Journal of Taxonomy and Biosystematics 8:35-44.
The third seminar of pomegranate, Saveh, Iran (1994) First Edition. Zarah bin Pubication. (In Farsi)
Usharani S, Chitra M (2013) GC-MS Analysis Of Methanol Extract Of Leaf Of Wattakaka Volubilis. International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences 3:161-165
Wei L, Wee W, Siong Y, Syamsumir D (2011) Characterization of Anticancer, Antimicrobial, Antioxidant Properties andChemical Compositions of Peperomia pellucida Leaf Extract. Acta Medica Iranica 49: 670-674.
Wu L, Chiang Y, Chuang H, Wang S, Yang G, Chen Y, Lai L, Shyur L (2004) Polyacetylenes function as anti-angiogenic agents. Pharmaceutical Research 21:2112-9.
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
Zargari A (1996) Medicinal plant (2). University of Tehran Publication. Tehran, Iran. pp: 465.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1394.10.2.7.5]