

چند شکلی ژنتیکی در ناحیه کلروپلاستی انار (*Punica petA-psaJ granatum*)

زهراء حاجی احمدی^۱، مجید طالبی^{۲*}، بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی^۳

۱، ۲- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و استاد

گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mtalebi@cc.iut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۲/۹)

چکیده

انار (L.) *Punica granatum* یکی از قدیمی‌ترین میوه‌های شناخته شده و جزو مهمترین گیاهان باعی در ایران محسوب می‌شود که پراکنده‌گی و تنوع قابل توجه‌ای در ایران دارد. نتایج تحقیقات صورت گرفته بر اساس نشانگرهای مولکولی مختلف مانند SSR، RAPD، AFLP، *petG*، *petL*، *psbE*، *psbF*، *psbJ*، *petA*، *psaJ* و *tRNA^{rp}*، *dRNA^{pro}* با هدف توالی‌یابی و تجزیه و تحلیل فیلوجنی در انار استفاده شد. استخراج DNA ژنومی از برگ‌های انار وحشی، اهلی، زیستی و گیاه مورد استخراج گردید و ژن‌های مورد نظر توسط واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی که بر اساس توالی DNA همددیف شده با سایر گیاهان طراحی گردیده شده بود، تکثیر شدند. توالی‌یابی محصولات واکنش‌های PCR نشان داد که این ناحیه حدود ۵۴۰۰ جفت باز دارد و از ناحیه‌ی بین‌ژنی *psbE*-*psbJ* با ۴/۹۸ درصد تنوع، می‌توان به عنوان نشانگر مناسب برای بررسی تنوع بین ارقام انار استفاده کرد. مقایسه‌ی انار با سایر گیاهان بر اساس ناحیه *petA-psaJ* انار را در فاصله‌ی کمتری از خانواده‌ی Myrtaceae و پس از آن Onagraceae قرار داد.

واژه‌های کلیدی

انار،
روابط فیلوجنی،
کلروپلاست،
ناحیه‌ی ژنی *petA-psaJ*،
همسانه سازی.

مقدمه

انار درختچه‌ای است متعلق به کوچکترین خانواده‌ی گیاهی به نام Punicaceae که این خانواده دارای یک جنس به نام *Punica* و دو گونه به نام‌های *P. granatum* (انار خوراکی) و *P. protopunica* (انارهای غیر خوراکی) می‌باشد. تفاوت این دو گونه در کوچکتر بودن و صورتی بودن گل گونه‌ی دوم و شیرینی کمتر آن است. گونه‌ی دوم در ایران وجود ندارد و رویشگاه اصلی آن جزایر سوکترا در اقیانوس هند گزارش شده است (Akbar 2006). پایه و اساس تحقیقات بهنژادی گیاهان بر وجود تنوع ژنتیکی استوار است. بدین جهت بدون تنوع ژنی ارائه ارقام اصلاح شده جدید امکان پذیر نخواهد بود (Akbar 2006). در ایران کلکسیون‌های غنی از ژنوتیپ‌های انار در شهرهای یزد، ساوه و ورامین وجود دارد ولی متأسفانه

کارایی استفاده از ژنوم کلروپلاستی در مطالعات رده بندی را در مقایه با ژن‌های هسته افزایش داده است (Clegg et al. 1994). ناحیه‌ی ژنی *petA-psaJ* شامل ده ناحیه‌ی ژنی (*petA*, *psbJ*, *petG*, *petL*, *psbE*, *psbF*, *tRNA^{Trp}*, *tRNA^{Pro}*) و *psbL* نه ناحیه‌ی بین ژنی است (Steel et al. 2010). در مطالعه‌ای مشخص شد که ناحیه‌ی *psbE-petL* دارای تنوع بالای بوده و می‌توان از آن به عنوان بارکد در بررسی تنوع درون گونه‌ای گیاه *Psiguria* استفاده کرد (Steel et al. 2010). از طرفی ناحیه *petA-psaJ* حاوی ژن‌های مربوط به فتوستتر است. بنابراین، هدف از انجام این پژوهش توالی یابی ناحیه‌ی ژنی *petA-psaJ* به منظور یافتن ناحیه‌ی مناسب برای بررسی تنوع بین ارقام انار و همچنین مقایسه‌ی نتایج حاصل با توالی این نواحی در دیگر گیاهان به هدف تعیین موقعیت انار در سیستم رده‌بندی گیاهی است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و استخراج DNA ژنومی

در این تحقیق نمونه‌های برگی مورد استفاده از درختان انار، شامل رقم اهلی ملس ترش ساوه (R8)، ژنوتیپ وحشی تپه‌های ساحلی دریا کنار بابلسر(TSDB)، ژنوتیپ زیستی گل سفید (AZS) و درختچه‌ی "مورد"¹ (BMT) موجود در مرکز تحقیقات اصفهان و یزد جمع آوری گردیدند. استخراج DNA از نمونه‌های برگی با استفاده از روش پیشنهادی در گیاه نارون (sayed-Tabatabaei et al. 2007) صورت گرفت. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده به وسیله الکتروفوروز ژل آگارز ۷/۰ درصد تعیین شد.

طراحی آغازگر و تکثیر نواحی ژنی و بین ژنی

به منظور تکثیر نواحی مورد نظر هم‌دیف سازی چندتایی توالی‌ها در ژن‌های کلروپلاستی گیاهان مختلف توسط نرم افزار MEGA ver4.0 صورت گرفت، سپس با استفاده از نرم افزار OLIGO ver 5.0 آغازگرهای اختصاصی از نواحی‌های حفاظت شده طراحی شدند و توسط شرکت‌های Metabion آلمان و Bioneer کره جنوبی ساخته شدند (جدول ۱). واکنش PCR در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ۱/۵ میکرولیتر بافر PCR ۱۰ برابر غلظت، ۲ میلی

اطلاعات کافی در مورد خصوصیات این ژنوتیپ‌ها در دسترس نمی‌باشد (Sarkhosh et al. 2007). مطالعات ژنتیکی کمی در مورد انار انجام شده است به طوریکه انار موضوع بسیاری از تحقیقات علمی نبوده و اطلاعات مورد استفاده در بررسی روابط ژنتیکی ارقام انار ایران بیشتر بر مبنای صفات مورفو‌لوزیک بوده است و نتایج نشان از وجود تنوع فتوتیپی قابل ملاحظه در میان نمونه‌هاست (Ohyama et al. 1986; Sarkhosh et al. 2007) با توجه به اینکه خصوصیات ظاهری گیاه تحت تأثیرشرایط محیطی قرار می‌گیرند، لذا صفات ظاهری نمی‌توانند معیار دقیق و مناسبی جهت گروه بندی ژنوتیپ‌های انار باشند و شناسایی دقیق این ژنوتیپ‌ها را با مشکل مواجه می‌سازند (Zheleva et al. 1998; Sarkhosh et al. 2007). به همین دلیل فرضیه‌ای که در مورد تنوع بالای ژرم‌پلاسم انار در ایران وجود دارد چنان‌dan قابل استناد نیست و ممکن است شرایط اقلیمی در این گوناگونی ژنوتیپ‌ها مؤثر باشد. با توجه به لزوم شناسایی دقیق‌تر ژنوتیپ‌های انار در جهت اصلاح این محصول و قابل اعتماد نبودن طبقه‌بندی انار بر اساس ویژگی‌های مورفو‌لوزیک و از طرفی به دلیل پیشرفت‌های قابل توجه در استفاده از تکنیک‌های مولکولی برای تشخیص منطقی تر ژنوتیپ‌های گیاهی به نظر می‌رسد کاربرد این روش‌ها در طبقه‌بندی و تعیین شناسنامه دقیق ژنوتیپ‌های انار در ایران و بررسی تفاوت دقیق بین ارقام جهت مدیریت مؤثر کلکسیون‌ها و برنامه‌های اصلاحی آینده انار ضرورتی انکارناپذیر باشد (Zheleva et al. 1998; Sarkhosh et al. 2007). با وجود تنوع مورفو‌لوزیک بین ارقام انار، در اغلب مطالعات صورت گرفته با استفاده از نشانگرهای مولکولی مختلف از جمله AFLP, RAPD و ISSR، چند شکلی پایینی مشاهده شده است (Talebi 2003; Sarkhosh et al. 2006; Zeinalabedini et al. 2010). دلیل این امر را به ژن‌های سیتوپلاسمی، تغییرات پس از نسخه‌برداری و شرایط اقلیمی مختلف مرتبط دانسته‌اند. یکی از عوامل سیتوپلاسمی در گیاهان کلروپلاست است. ژن‌های کلروپلاستی به صورت گستره‌ای برای درک فیلوزنی گیاهان در رده‌های مختلف تاکسونومیک به کار رفته است. در رده‌بندی و تکامل گیاهان کوچک بودن ژنوم، مقدار فراوان DNA و سرعت کمتر جهش در مقایسه با ژنوم هسته‌ای از جمله دلایلی است که

¹ Myrtle

جدول ۱- توالی آغازگرهای رفت و برگشت برای تکثیر ناحیه ی زنجی *petA-psaJ* در کلروپلاست

ردیف	نام جفت آغازگر	توالی آغازگر	درصد GC(%)	میزان *ΔG	طول آغازگر بر حسب bp	دماه انصال (°C)	بهینه شده
۱	F1 petA-psaJ	5'-CAATGATGGACCATGCA-3'	۴۴/۴	-۸/۴	۱۸	۵۰	۱۹
	R1 petA-psaJ	5'-TCTCCTTGACCAAATCCAC-3'	۴۷/۴	-۷/۹	۱۹		
۲	F2 petA-psaJ	5'-GTGGATTGGTCAAGGAG-3'	۵۰/۰	-۷/۹	۱۸	۵۰	۱۸
	R2 petA-psaJ	5'-TCGATTGATTTCCTGA-3'	۳۳/۳	-۸/۲	۱۸		
۳	F3 petA-psaJ	5'-TCATTCAAGAAAATCAAATCG-3'	۳۳/۳	-۸/۶	۲۱	۵۶	۲۱
	R3 petA-psaJ	5'-TGTTGAATTGAATCGTACCAAG-3'	۳۸/۳	-۷/۹	۲۱		
۴	F4 petA-psaJ	5'-CTGGTACGATTCAATTCAACA-3'	۳۸/۱	-۷/۰	۲۱	۵۰	۲۱
	R4 petA-psaJ	5'-CAACAAAACAATGTGTGCATC-3'	۳۸/۱	-۸/۱	۲۱		
۵	F5 petA-psaJ	5'-TAAGGTTCTTCTCTCC-3'	۳۸/۹	-۷/۹	۱۸	۵۰	۱۸
	R5 petA-psaJ	5'-TAAGCATGAAGATGAAGG-3'	۳۸/۹	-۸/۲	۱۸		
۶	F6 petA-psaJ	5'-CATTTCATTAGCTCCTT-3'	۳۳/۳	-۸/۲	۱۸	۵۰	۱۸
	R6 petA-psaJ	5'-GTTCAAATCCTGTATCC-3'	۴۴/۴	-۸/۱	۱۸		
۷	F7 petA-psaJ	5'-CTAACCAAGAACATGGAATCACG-3'	۴۲/۹	-۸/۴	۲۱	۵۶	۱۸
	R7 petA-psaJ	5'-TCTTCACCCCTTCCCATG-3'	۵۵/۶	-۸/۴	۱۸		
۸	F1 rbcL	5'-ACTCCGAATTCTGTGAGT-3'	۴۵/۰	-۸/۵	۲۰	۵۰	۲۰
	R1 rbcL	5'-AAATCAAGTCCACCACGAAG-3'	۴۵/۰	-۸/۵	۲۰		
۹	F2 rbcL	5'-TAAAGGAAGATGCTACCACA-3'	۴۰/۰	-۸/۲	۲۰	۵۰	۲۱
	R2 rbcL	5'-GCAATTCAATTAAAGAGAACGA-3'	۳۳/۳	-۸/۴	۲۱		
۱۰	F psbA-trnH	5'-ATTACAATCCACTGCCTG-3'	۴۵/۰	-۸/۵	۲۰	۵۵	۲۰
	R psbA-trnH	5'-ATGGCTTCAACCTAAATGG-3'	۴۰/۰	-۸/۴	۲۰		

* تغییرات انژی آزاد.

آمپی سیلین کشت داده شدند و برای توالی یابی به شرکت Macrogen کوه جنوبی ارسال شدند.
تجزیه و تحلیل داده‌ها

پس از دریافت نتایج، الکتروگرام توالی هر نمونه با نرم افزار Chromas ver 2.13 بررسی گردید و پس از اطمینان از کیفیت مناسب توالی‌ها، در پایگاه اطلاعاتی NCBI با توالی ژنوم دیگر گیاهان موجود در بانک ژن BLAST گردید تا توالی‌های بدست آمده تایید شوند. سپس هم‌ردیف سازی چندتایی بین توالی‌های مشخص شده در این تحقیق و اطلاعات موجود در GenBank جهت تعیین میزان تشابه آن‌ها و همچنین تجزیه و تحلیل‌های فیلورژنیک داده‌ها و رسم درخت فیلورژنیک با استفاده از نرم‌افزار ARLEQUIN ver 3.1 MEGA ver 4.0 انجام گردید. از نرم افزار kinefold CLC Main Workbench ver 5.0 و (tRNA kinefold.curie.fr) برای بررسی ساختار tRNA استفاده شد. Pairwise distance مقادیر p-distance و K2P distance توسط MEGA ver 5.0 محاسبه شد. Pairwise distance به معنای

مولار کلرید منیزیم ، یک واحد از آنزیم *Taq DNA* پلیمراز ، ۰/۲ میلی مولار dNTPs ۰/۳ میکرو مولار از هر آغازگر و حدود ۲۰ نانوگرم DNA در دستگاه ترموسایکلر شرکت Biorad Fermentase Life (۱۰۰bp به همراه نشانگر اندازه قطعات بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد در بافر الکتروفورز شد.

همسانه سازی و توالی یابی قطعات تکثیر یافته pTZ57R/T به منظور توالی یابی در ناقل PCR cloning همسانه سازی^۱ شدند. برای همسانه سازی نیاز به سلول‌های مستعد باکتری *Escherichia coli* بود که از کیت (Fermentase CO.) InsTA cloneTM استفاده شد. به منظور تایید ورود ژن مورد نظر به داخل باکتری *E. coli* MC1061 از سه روشن Colony PCR، غربال‌گری سریع^۲ و واکنش هضم آنزیمی استفاده شد. همسانه‌های حاوی قطعه مورد نظر که با تکنیک‌های فوق انتخاب و تأیید شده بودند، روی محیط جامد LB حاوی

¹ Colonizing² Rapid screening

نتایج محققین دیگر روی بارکدهای گیاهی در سایر خانواده‌ها نیز حاکی از تنوع درون‌گونه‌ای ۰/۲ درصد تا ۵/۷ درصد (Kress et al. 2007)، میانگین تنوع درون‌گونه‌ای صفر تا ۰/۴ درصد (Luo et al. 2010) و تنوع درون‌گونه‌ای ۰/۴۴ درصد تا ۱/۷۳ درصد (Selvaraj et al. 2008) است. بنابراین با توجه به مطالب ذکر شده می‌توان نتیجه گرفت که ناحیه *psbE-petL* تنوع مناسبی را در بین ارقام انار نشان داده است. با توجه به اینکه دو ناحیه‌ی ژنی *psbE* و *petL* در دو طرف ناحیه‌ی *psbE-petL*، در بین ارقام انار حفاظت‌شدگی بالایی دارند و به ترتیب دارای تنوع صفر و ۰/۸ درصد هستند (جداول ۲ و ۳)، از آن‌ها برای طراحی آغازگر استفاده شد. آغازگر رفت با توالی نوکلئوتیدی ۵'-GTTCTCCTGTGCTTCCAGA-۳' استفاده شد. آغازگر رفت با توالی ۵'-TCAAATAAGTCGTATCTGGTCA-۳' برای تکثیر این ناحیه طراحی شدند که از این آغازگرها می‌توان برای بررسی تنوع بین ارقام انار استفاده نمود. سه پارامتر انتخاب بارکد مناسب تنوع کافی بین نمونه‌ها، اندازه‌ی مناسب جهت تکثیر در PCR و وجود نواحی حفاظت شده در دو طرف آن به هدف طراحی آغازگرهای عمومی است (Kress et al. 2005)، که در تحقیق حاضر نیز ناحیه‌ی *psbE-petL* به دلیل دارا بودن پارامترهای ذکر شده به عنوان بارکد به هدف بررسی تنوع بین ارقام انار معرفی شد. سی و چهار ناحیه‌ی غیر کدکننده‌ی کلروپلاستی که به منظور Shaw et al. 2005; Shaw et al. 2007 معرفی شده بود در گیاه *Psiguria* بررسی شدند. از نه ناحیه‌ای که در مطالعه قبل بالاترین میزان تنوع را داشتند، چهار ناحیه‌ی بالاتری در گیاه *Psiguria* نشان دادند (Steel et al. 2010) که با نتایج تحقیق حاضر همسو هستند. در مطالعه سه ناحیه‌ی کلروپلاستی *matK*, *psbA-trnH*, *petA-psbJ* و *rps16-trnQ*, *ndhF-rpl32*, *ndhC-trnV* و *psbE-petL* تنوع درون و برون‌گونه‌ای (*Zingiberaceae*) *Boesenbergia* مشخص شد که ناحیه‌ی *petA-psbJ* دارای تنوع درون‌گونه‌ای در حدود ۰/۱۶ درصد در *B. Curtissii*, صفر درصد در *B. pulcherrima* و ۰/۳۳ درصد در *B. Longiflora* است و این ناحیه برای بررسی تنوع درون‌گونه‌ای پیشنهاد شد (Ngamriabsakul et al. 2006).

فاصله‌ی دوتایی بین هر جفت از نمونه‌ها است. ۲- (Kimura 2-parameter distance) K2P جایگزینی هم جنس به جایگزینی ناهمجنس محاسبه می‌کند. P-distance فاصله را بر اساس تفاوت در مکان‌های نوکلئوتیدی در بین دو توالی متفاوت نشان می‌دهد که از تقسیم تعداد نوکلئوتید متفاوت به تعداد کل نوکلئوتیدهای مقایسه شده به دست می‌آید.

نتایج و بحث

تنوع نوکلئوتیدی نواحی توالی‌بایی شده طول ناحیه *petA-psaJ* در cpDNA ژنوتیپ وحشی، اهلی و زیستی انار به ترتیب ۵۴۹۱، ۵۴۹۲ و ۵۴۹۴ و در cpDNA گیاه "مورد" ۵۳۹۲ جفت باز محاسبه شد که شامل ده ناحیه‌ی ژنی و Pairwise distance و P-distance حاصل از نتایج بررسی تنوع درون ارقام انار و بین انار و گیاه "مورد" در جدول ۳ و نتایج حاصل از بررسی تنوع بر اساس میزان جایگزینی در جدول ۴ خلاصه شده است. به منظور بررسی بهتر نتایج حاصل، داده‌ها توسط نرم افزار Microsoft Office Excel 2007 به صورت نمودار نمایش داده شدند (شکل ۱). همان طور که در جداول ۳ و ۴ مشاهده می‌شود، نواحی غیر کدکننده در مقایسه با نواحی کدکننده تنوع بالاتری را نشان داده‌اند که ناحیه‌ی *psbL-psbF* با وجود بیشترین میزان تنوع، به دلیل اینکه تعداد نوکلئوتید آن محدود است (در حدود ۲۱ جفت باز)، نمی‌تواند نماینده‌ی مناسبی برای بررسی تنوع در میان ارقام انار باشد و احتمالاً دلیل تنوع بالای آن، تعداد نوکلئوتید اندک آن است که حتی به ازای یک جهش نقطه‌ای هم تنوع بالایی را می‌تواند نشان دهد. به دلیل طول اندک این ناحیه قدرت تفکیک آن به کمک ژل الکتروفورز بسیار کم است و با توجه به هدف پژوهش حاضر (معرفی ناحیه‌ای به عنوان بارکد به منظور بررسی تنوع درون‌گونه‌ای انار) نیاز به ناحیه‌ای با طول مناسب است. ناحیه‌ی *psbE-petL* با درصد تنوع ۴/۹۸ درصد، میانگین K2P ۳ درصد، میانگین p-distance ۲۸ درصد و میانگین Pairwise distance ۳ درصد و تعداد نوکلئوتید مناسب (در حدود ۱۳۰۰ نوکلئوتید) تنوع نسبتاً بالاتری در مقایسه با سایر نواحی بررسی شده در *petA-psaJ* به منظور تمایز ارقام انار نشان داد.

جدول ۲- تعداد نوکلئوتید و اسید آمینه نواحی ژنی و بین ژنی در *petA-psaJ* در کلروپلاست های انار و گیاه "مورد"

نام ناحیه	تعداد نوکلئوتید در cpDNA انار	تعداد اسید آمینه در cpDNA انار	تعداد نوکلئوتید در cpDNA انار	تعداد اسید آمینه در cpDNA انار	تعداد نوکلئوتید در cpDNA انار	تعداد اسید آمینه در cpDNA انار	تعداد نوکلئوتید در cpDNA انار	تعداد اسید آمینه در cpDNA انار
	اهلی	وحشی	اهلی	وحشی	اهلی	وحشی	اهلی	وحشی
<i>petA</i>	۹۶۶	۹۶۴	۹۶۳	۲۲۱	۲۲۲	۲۲۱	۲۲۲	۲۲۱
<i>psbJ</i>	۱۲۳	۱۲۳	۱۲۳	۴۱	۴۱	۴۱	۴۱	۴۱
<i>psbL</i>	۱۲۲	۱۲۲	۱۱۷	۳۹	۳۹	۴۰	۳۹	۴۰
<i>psbF</i>	۱۲۰	۱۲۰	۱۲۰	۴۰	۴۰	۴۰	۴۰	۴۰
<i>psbE</i>	۲۵۳	۲۵۲	۲۵۲	۸۴	۸۴	۸۴	۸۴	۸۴
<i>petL</i>	۹۶	۹۶	۹۶	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲
<i>petG</i>	۱۱۴	۱۱۴	۱۱۴	۳۸	۳۸	۳۸	۳۸	۳۸
<i>tRNA^{pro}</i>	۷۴	۷۴	۷۴	۲۴	۲۴	۲۴	۲۴	۲۴
<i>tRNA^{mp}</i>	۷۳	۷۳	۷۳	۲۴	۲۴	۲۴	۲۴	۲۴
<i>psaJ</i>	۱۳۵	۱۳۵	۱۳۵	۴۵	۴۵	۴۵	۴۵	۴۵
<i>petA-psbJ</i>	۹۱۷	۹۲۰	۹۲۰	-	-	-	-	-
<i>psbJ-psbL</i>	۱۴۷	۱۴۷	۱۴۷	-	-	-	-	-
<i>psbL-psbF</i>	۲۲	۲۲	۲۲	-	-	-	-	-
<i>psbF-psbE</i>	۹	۹	۹	-	-	-	-	-
<i>psbE-petL</i>	۱۳۶۱	۱۳۸۲	۱۳۸۲	-	-	-	-	-
<i>petL-petG</i>	۱۷۸	۱۷۸	۱۷۸	-	-	-	-	-
<i>petG-tRNA^{mp}</i>	۱۲۶	۱۲۶	۱۲۶	-	-	-	-	-
<i>tRNA^{mp}-tRNA^{pro}</i>	۱۸۶	۱۸۵	۱۸۵	-	-	-	-	-
<i>tRNA^{pro}-psaJ</i>	۴۰۵	۴۰۴	۴۰۴	-	-	-	-	-
<i>petA-psaJ</i>	۵۴۹۲	۵۴۹۴	۵۴۹۱	۵۴۹۲	۵۴۹۲	۵۴۹۱	۵۴۹۲	۵۴۹۲

جدول ۳- بررسی تنوع بین جنسی و درون گونه‌ای ناحیه‌ای *petA-psaJ* در کلروپلاست های انار و گیاه "مورد" بر *P-distance* و *Pairwise distance*(model K₂P)

ناحیه	میانگین کل K ₂ P	میانگین کل Pairwise distance	میانگین کل °P-distance
درون گونه‌ای انار	درون گونه‌ای انار	درون گونه‌ای انار	درون گونه‌ای انار
بين انار و مورد	بين انار و مورد	بين انار و مورد	بين انار و مورد
<i>petA</i>	۰/۰۵	۰/۰۰۹۷۷	۰/۰۰۹۷۰
<i>psbJ</i>	۰/۰۳	۰/۰۱۶۷۰	۰/۰۱۶۲۶
<i>psbL</i>	۰/۰۱۷۳۳	۰/۰۲۶۱۳	۰/۰۲۵۴
<i>psbF</i>	۰/۰۱۶۸	۰/۰۱۶۸۷	۰/۰۱۶۶۷
<i>psbE</i>	۰/۰۰۴	۰/۰۰۴۳	۰/۰۱۸۸۶
<i>petL</i>	۰/۰۰۲	۰/۰۲۱۴۵	۰/۰۲۰۸۳
<i>petG</i>	۰/۰۰۶	۰/۰۰۰۵۹	۰/۰۰۰۵۸۵
<i>tRNA^{mp}</i>	۰/۰۱۳۷۰	۰/۰۱۳۷۴	۰/۰۱۳۵۱
<i>tRNA^{pro}</i>	۰/۰	۰/۰	۰/۰
<i>psaJ</i>	۰/۰	۰/۰۲۳۱۱	۰/۰۲۲۳۱
<i>petA-psbJ</i>	۰/۰۵	۰/۰۱۳۱۰	۰/۱۱۲۸۳
<i>psbJ-psbL</i>	۰/۰۵	۰/۰۲۵۷۱	۰/۰۲۴۷۱
<i>psbL-psbF</i>	۰/۰۶۵۲۲	۰/۰۵۴۳۵	۰/۰۶۰۶۱
<i>psbF-psbE</i>	۰/۰	۰/۰۳	۰/۰۸۶۸
<i>psbE-petL</i>	۰/۰۳	۰/۰۱۲۳۹۶	۰/۰۰۲۸۴۸
<i>petL-petG</i>	۰/۰۲	۰/۰۰۳۷۷	۰/۰۰۰۳۷۵
<i>petG-tRNA^{mp}</i>	۰/۰۲۲	۰/۰۰۷۵۸۳	۰/۰۰۷۰۲۰
<i>tRNA^{mp}-tRNA^{pro}</i>	۰/۰۰۳۵۹	۰/۰۰۳۰۹	۰/۰۰۳۰۷
<i>tRNA^{pro}-psaJ</i>	۰/۰	۰/۰۸۲۷۹	۰/۰۷۴۱۸

K₂P: فاصله بر اساس نسبت جایگزینی هم جنس به نام نشان می دهد.

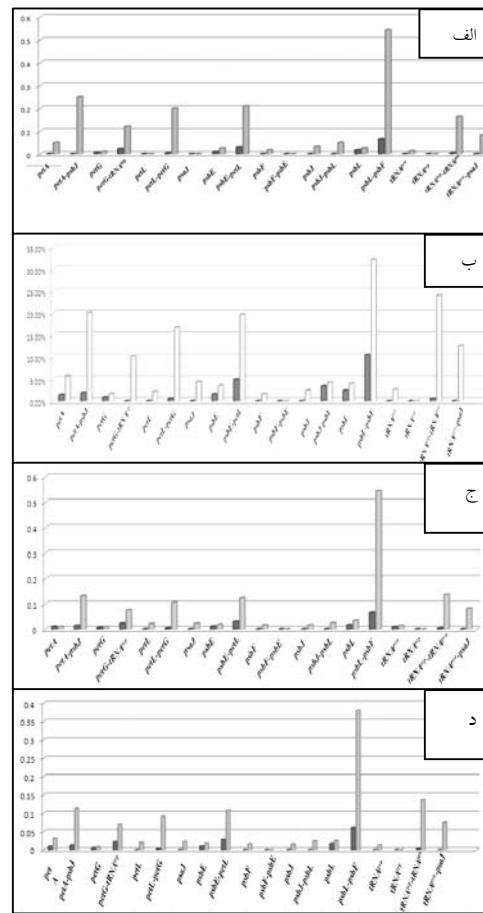
نوكلئوتیدهای استفاده شده نشان می دهد.

Pairwise distance : فاصله دو تابی.

جدول ۴- بررسی تنوع بین جنسی و درون گونه‌ای ناحیه *petA-psaJ* در کلروپلاست های انار و گیاه "مورد" بر اساس جایگزینی (هم جنس و ناهمجنس).

ناحیه ژنی (درصد)	تنوع درون گونه‌ای انار (درصد)	تنوع بین انار و مورد
۵/۷۰	۱/۴۴	<i>petA</i>
۲/۵	۰	<i>psbJ</i>
۴/۰۶	۲/۴۳	<i>psbL</i>
۱/۶۶	۰	<i>psbF</i>
۲/۷۷	۰/۸	<i>psbE</i>
۲/۲۴	۰	<i>petL</i>
۱/۷۵	۰/۸۷	<i>petG</i>
۲/۷۰	۰	<i>tRNA^{trp}</i>
۰	۰	<i>tRNA^{pro}</i>
۴/۴۴	۰	<i>psaJ</i>
۲۰/۱۹	۱/۹۱	<i>petA-psbJ</i>
۴/۷۶	۰	<i>psbJ-psbL</i>
۳۲/۲۵	۱۰/۵۲	<i>psbL-psbF</i>
۰	۰	<i>psbF-psbE</i>
۱۹/۷۳	۴/۹۸	<i>psbE-petL</i>
۱۶/۸۵	۰/۵۶	<i>petL-petG</i>
۱۰/۲	۰	<i>petG-tRNA^{trp}</i>
۲۴/۰۸	۰/۵	<i>tRNA^{trp}-tRNA^{pro}</i>
۱۲/۵۸	۰	<i>tRNA^{pro}-psaJ</i>

مشاهده می شود ژن کد کننده تریپتوфан گیاه مورد در مقایسه با ژنوتیپ های انار متفاوت بود، بنابراین ساختار ثانویه آن نیز ترسیم شد تا اثر احتمالی این تنوع بر آنتی کدون ژن مذکور مشخص شود. نتایج حاصل از ترسیم ساختار tRNA تریپتوfan و پروولین شود. نمونه های در شکل ۲ نشان داده شده است. همان طور که تمام نمونه های در شکل ۲ نشان داده شده است. همان طور که ملاحظه می شود، ساختار اولیه *tRNA^{pro}* و *tRNA^{trp}* در همه نمونه های کاملاً یکسان بوده و آنتی کدون های مربوط به آنها به ترتیب ۳'-CCA-3' و ۵'-UGG-3' است. در تحقیق (1985) et al. با بررسی *tRNA^{Pro}* کلروپلاست و میتوکندری لوبيا شباهی در حدود ۹۷/۳ درصد برای توالی این دو ژن با آنتی *tRNA^{3'-CCA-5'}* مشاهده شد. آنها اعتقاد دارند که *tRNA^{trp}* کلروپلاست و *tRNA^{trp}* میتوکندری اگرچه توسط دو ژن مختلف در دو مکان مجزا رمز می شوند ولی به دلیل شباهت بسیار زیاد



شکل ۱- تنوع بین جنسی (رنگ خاکستری) و درون گونه‌ای (رنگ مشکی) ناحیه *petA-psaJ* در انار و گیاه "مورد" بر اساس (الف) میانگین کل K2P، (ب) درصد تنوع بر اساس جایگزینی، (ج) میانگین کل P-distance (د) میانگین کل

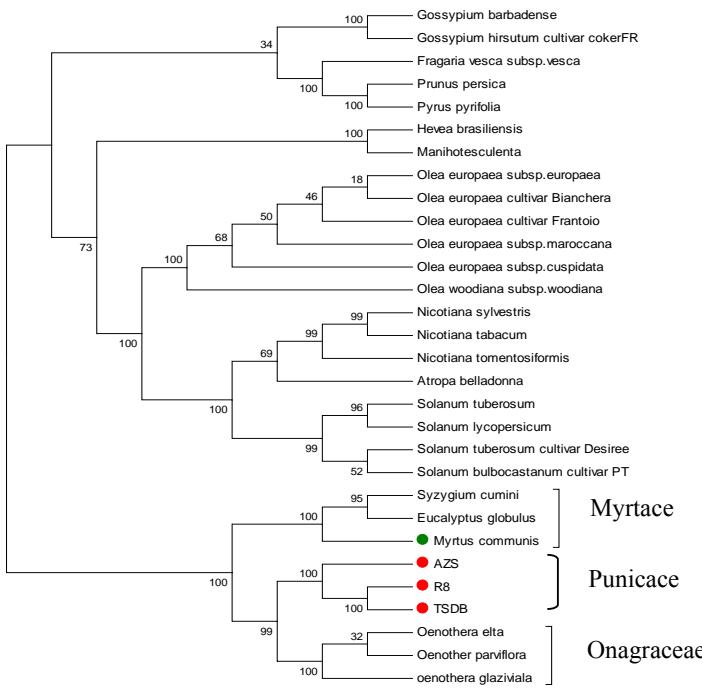
در مطالعه‌ی حاضر نیز تنوع درون گونه‌ای انار بر اساس ناحیه *petA-psbJ* ۱/۹۱ درصد به دست آمد، اما میزان تنوع این ناحیه در مقایسه با نواحی *psbE-petL* (۱۰/۵۲ درصد) و *psbL-psbF* (۴/۹۸ درصد) کمتر است. بنابراین بر اساس سه پارامتر استفاده شده در این تحقیق، توانایی ناحیه *petA-psbJ* در نشان دادن تنوع بین ارقام انار نسبت به دو ناحیه *psbE* و *psbL-psbF* پایین است و از اهمیت آن برای بررسی بین ارقام انار می‌کاهد.

بررسی ساختار تریپتوfan و پروولین در توالی ها در ناحیه بررسی شده دو ژن کد شونده *tRNA* تریپتوfan و پروولین وجود داشت. بنابراین ساختار اولیه آنها به هدف تعیین آنتی کدون مربوطه رسم شد و همان طور که در جداول ۳ و ۴

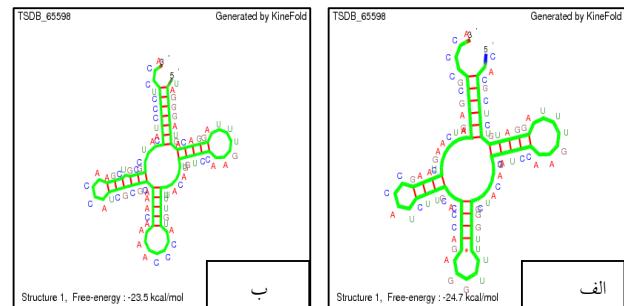
فقدان دستگاه ترشحی داخلی در اندام‌های رویشی و تخمدان منفرد با یک نهنج و پرچم‌های متعدد از این خانواده جدا شده و در خانواده Punicaceae قرار گرفت (Akbar 2006). در مطالعه ای با مقایسه‌ی ژن *rbcL* در دو خانواده Lythraceae و Onagraceae ارتباط بسیار نزدیکی (bootstrap=92%) بین آنها به دست آمد (Conti et al. 1997). این نتایج توسط مطالعات Dahlgren and Thorne (1984; Johnson and Briggs 1984; Sytsma et al. 2004) مولکولی سایر محققین هم تایید شد (Dahlgren and Thorne 1984; Johnson and Briggs 1984; Sytsma et al. 2004).

طبقه‌بندی دیگری نیز بیان شد که خانواده Punicaceae ارتباط نزدیکی با Onagraceae و Lythraceae (Koehne 1881) دارد (Marechal et al. 1985) با آنکه کدون 3'-UGG 5'- با آنها در گیاهان خانواده Lythraceae دلیل عدم توافق این نتایج در گیاهان خانواده Myrtaceae نمی‌توان نتیجه‌گیری قطعی در رابطه با شباهت خانواده Myrtaceae به Onagraceae و Punicaceae (Dahlgren and Thorne 1984; Johnson and Briggs 1984; Sytsma et al. 2004).

بررسی ژن‌های مشترک در بین چهار خانواده Onagraceae، Punicaceae، Myrtaceae و Lythraceae در مطالعات آتی می‌باشد.



شکل-۳- درخت فیلوزنی ژنتیکی اثار و سایر گیاهان بر اساس توافق نوکلئوتیدی ناحیه ژنی *petA-psaJ* در کلروپلاست. AZS: رنگ زیستی، R8: رقم اهلی، TSDB: رقم وحشی و *Myrtus communis* ژنتیکی وحشی گیاه "مورد" (Hoker and Bentham 2006).



شکل-۲- (الف) ساختار اولیه *tRNA^trp* و (ب) *tRNA^trp* رسم شده در انار و گیاه "مورد".

توالی آنها، احتمالاً از یک ژن اولیه مشترک مشتق شده اند (et Marechal et al. 1985). در تحقیق دیگری ساختار *tRNA^trp* از خیار با آنکه کدون 3'-UGG 5'- بررسی شد و نشان داد که در حدود ۹۳ درصد با *tRNA^Pro* اسفناج و ۷۲ درصد با *tRNA^trp* در میتوکندری لوبيا شباهت دارد و این تشابه بالا در بین گیاهان می-تواند در ارتباط با ساختار و عملکرد مشابه آنها باشد (Hande et al. 1997). نتایج تحقیقات بر روی گیاهان خشکی نشان داد که *tRNA^Pro* کلروپلاست همه چهار کدون مربوط به پروتئین Shaw et al. (2007) (CCU, CCC, CCA, CCG) را رمز گشایی می‌کند (al. 2007).

روابط فیلوزنی اثار بر اساس نواحی توافقی یافته شده با استفاده از BLAST ناحیه *petA-psaJ* گیاهان نزدیکتر به اثار انتخاب و از آنها برای رسم درخت فیلوزنی بر اساس روش حداقل صرفه جویی^۱ استفاده شد (شکل ۳). همان طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود بر اساس توافق این ناحیه ژنی، اثار شباهت زیادی با خانواده Onagraceae و پس از آن Myrtaceae دارد که از این خانواده نزدیکترین گونه از لحاظ تکاملی به اثار *Myrtus communis* (ژنتیک وحشی گیاه "مورد") تشخیص داده شد. جنس *Punica* ابتدا از نظر رده‌بندی گیاهی اثار در خانواده Myrtaceae قرار گرفته بود، لیکن در بررسی‌های بعدی به علت اختلافات عمده آناتومیک آن را از این تیره جدا گردیده و در خانواده Lythraceae طبقه‌بندی شد (Akbar 2006). اما پس از بررسی‌های Hoker and Bentham^۲ به دلیل

^۱Maximum parsimony

منابع

- Akbar S (2006) Use of DNA markers to determine the mode of pollination in pomegranate. MSc thesis, Isfahan University of Technology, IRAN. (In Farsi)
- Clegg MT, Gaut BS, Learn GH, Morton BR (1994) Rates and Patterns of chloroplast DNA evolution, Proceedings of the National Academy of Sciences. USA, 91: 6797-6801.
- Conti E, Litt A, Wilson PG, Graham SA, Briggs BG, Johnson LAS, Sytsma KJ (1997) Interfamilial relationships in Myrtales: molecular phylogeny and patterns of morphological evolution. Systematic Botany 22(4): 629-647.
- Dahlgren R, Thorne RF (1984) The order Myrtales: circumscription, variation, and relationships, Annals of the Missouri Botanical Garden 81: 419-450.
- Hande S (1997) Nucleotide sequence of a cucumber chloroplast proline tRNA, Journal of Bioscience and Bioengineering 22: 143-147.
- Johnson LAS, Briggs BG (1984) Myrtales and Myrtaceae a phylogenetic analysis, Annals of the Missouri Botanical Garden 71:700-756.
- Koehne E (1881) Lythraceae monographice describuntur, Botanische Jahrbücher für Systematik 1: 142-157.
- Kress WJ, Erickson DL (2007) A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region, PLoS. ONE. 2, 508.
- Luo K, Chen SL, Chen KL (2010) Assessment of candidate plant DNA barcodes using the Rutaceae family, Sci China Life Sci 53, 701 – 708.
- Kress WJ, Wurdack KJ, Zimmer EA, Weight LA, Hanzen DH (2005) Use of DNA barcodes to identify flowering plants, Proceedings of the National Academy of Sciences 102(23): 8369-8374.
- Marechal L, Guillemaut P, Grienberger JM, Weil H (1985) Sequence and codon recognition of bean mitochondria and chloroplast *tRNAs^{TrP}*: evidence for a High degree of homology, Nucleic Acids Research 13(12): 4411-4416.
- Miyao M, Murata N (1989) The mode of binding of three extrinsic protein of 33 kDa, 24 kDa and 18 kDa in the photosystem II complex of spinach, Biochimica et Biophysica Acta 977:315–321.
- Mor TS, Ohad I, Hirschberg J, Pakrasi HB (1995) An unusual organization of the genes encoding cytochrome b559 in *Chlamydomonas reinhardtii* : *psbE* and *psbF* genes are separately transcribed from different regions of the plastid chromosome, Molecular and General Genetics 246: 600–604.
- Ngamriabsaku C, Techaprasan J (2006) The phylogeny of Thai *Boesenbergia* (Zingiberaceae) based on *petA-psbJ* spacer (chloroplast DNA), Journal of Science and Technology 28(1) : 49-57.
- Ohyama K, Fukuzawa H, Kohchi T, Shirai H, Sano T, Sano S, Umesono K, Shiki Y, Takeuchi, Z Chang M, Inokuchi H, Ozeki H (1986) Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA, Nature 322: 572-574.
- Oliver JL, Marin A, Marinte-Zapater JM (1989) Chloroplast gene transferred to the nuclear plant genome have adjusted to nuclear base composition and codon usage, Journal of Molecular Biology 18: 65-73.
- Sarkhosh A, Zamani Z, Fatahi MR, 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 MR, Ebadi A, Saie A, Tabatabae SZ (2007) Study on Relationships among Fruit Quantitative and Qualitative Characteristics of Some Pomegranate Genotypes, The Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources 10 (4), 147-160. (In Farsi)
- Sayed-Tabatabaei BE, Rahimmalek M, Talebi M, Yamchi A, Etemadi N, Mobli M (2007) Assessment of genetic diversity of Isfahan elams (*Ulmus* spp. L.) populations using RAPD and ISSR markers, Iranian Society for Horticultural Science 8(4), 213-224. (In Farsi)
- Selvaraj D, Sarma RK, Sathishkumar R.(2008) Phylogenetic analysis of chloroplast *matK* gene from Zingiberaceae for plant DNA barcoding, Bioinformation 3(1), 24-27.
- Shaw J, Lickey EB, Schilling EE, Small RL (2007) Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding region for phylogenetic studies in angiosperms: The tortoise and the hare III, American Journal of Botany 94(3): 275–288.
- Shaw J, Lickey EB, Beck JT (2005) The tortoise and the hare II Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis, American Journal of Botany 92: 142–166.
- Steele PR, Friar LM, Gilbert LE, Jansen RK (2010) Molecular systematics of the neotropical genus *Psiguria* (Cucurbitaceae): implication for phylogeny and species identification, American Journal of Botany 97(1): 156-173.
- Sytsma KJ, Litt A, Zihra ML, Pires JC, Nepokroeff M, Conti E, Walker J, Wilson PG (2004) Clades, clocks, and continents: Historical and biogeographical analysis of Myrtaceae, Vochysiaceae, and relatives in the Southern Hemisphere, International Journal of Plant Sciences 165(4): S85-S105.
- Talebi M (2003) Analysis of genetic diversity in some pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars of Iran, using Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD) markers. MSc thesis. Isfahan University of Technology, IRAN. (In Farsi)
- Zeinalabedini M, Khayam-Nekoui M, Grigorian V, Gradziel TM, Martinez-Gomez P, (2010) The origin and dissemination of the cultivated almond as determined by nuclear and chloroplast SSR marker analysis. Scientia Horticulturae. 125: 593–601.
- Zheleva D, Sharma J, Panico M, Morris HR, Barber J (1998) Isolation and characterisation of monomeric and dimeric CP47-RC PSII complexes, Journal of Biological Chemistry 273:16122–16127