

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

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

۱، ۲ و ۳- 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 (*Punica granatum* L.) یکی از قدیمی ترین میوه های شناخته شده و جزو مهمترین گیاهان باغی در ایران محسوب می شود که پراکندگی و تنوع قابل توجهی در ایران دارد. نتایج تحقیقات صورت گرفته بر اساس نشانگرهای مولکولی مختلف مانند RAPD، AFLP، SSR در انار حاکی از چندشکلی پایین بین ژنوتیپ های آن علیرغم تنوع مورفولوژیک بوده است. در این پژوهش ناحیه ی ژنی *petA-psaJ* (شامل ژن های *petA*، *psbJ*، *psbL*، *psbF*، *psbE*، *petG*، *tRNA^{trp}* و *tRNA^{pro}*) با هدف توالی یابی و تجزیه و تحلیل فیلوژنی در انار استفاده شد. استخراج DNA ژنومی از برگ های انار وحشی، اهلی، زینتی و گیاه مورد استخراج گردید و ژن های مورد نظر توسط واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی که بر اساس توالی DNA همردیف شده با سایر گیاهان طراحی گردیده شده بود، تکثیر شدند. توالی یابی محصولات واکنش های PCR نشان داد که این ناحیه حدود ۵۴۰۰ جفت باز دارد و از ناحیه ی بین ژنی *psbE-petL* با ۴/۹۸ درصد تنوع، می توان به عنوان نشانگر مناسب برای بررسی تنوع بین ارقام انار استفاده کرد. مقایسه ی انار یا سایر گیاهان بر اساس ناحیه *petA-psaJ* انار را در فاصله ی کمتری از خانواده ی Onagraceae و پس از آن Myrtaceae قرار داد.

واژه های کلیدی

انار،
روابط فیلوژنی،
کلروپلاست،
ناحیه ی ژنی *petA-psaJ*،
همسانه سازی.

مقدمه

انار درختچه ای است متعلق به کوچکترین خانواده ی گیاهی به نام Punicaceae که این خانواده دارای یک جنس به نام *Punica* و دو گونه به نام های *P. granatum* (انار خوراکی) و *P. protopunica* (انارهای غیر خوراکی) می باشد. تفاوت این دو گونه در کوچکتر بودن و صورتی بودن گل گونه ی دوم و شیرینی کمتر آن است. گونه ی دوم در ایران وجود ندارد و رویشگاه اصلی آن جزایر سوکترا در اقیانوس هند گزارش شده است (Akbar 2006). پایه و اساس تحقیقات به نژادی 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 کلکسیون های غنی از ژنوتیپ های 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 (*psbJ*, *petA*), *psbJ*, *petA*, *psbL*, *psbF*, *psbE*, *petL*, *petG*, *tRNA^{pro}*, *tRNA^{trp}* و *psaJ*) و نه ناحیهی بین ژنی است (Steel et al. 2010). در مطالعهی مشخص شد که ناحیهی *psbE-petL* دارای تنوع بالایی بوده و می توان از آن به عنوان بارکد در بررسی تنوع درون گونه ای گیاه *Psiguria* استفاده کرد (Steel et al. 2010). از طرفی ناحیهی *petA-psaJ* حاوی ژنهای مربوط به فتوسنتز 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 رده بندی گیاهی است.

مواد و روش ها

مواد گیاهی و استخراج DNA ژنومی

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

طراحی آغازگر و تکثیر نواحی ژنی و بین ژنی

به منظور تکثیر نواحی مورد نظر همردیف سازی چندتایی توالی ها در ژن های کلروپلاستی گیاهان مختلف توسط نرم افزار MEGA ver4.0 صورت گرفت، سپس با استفاده از نرم افزار OLIGO ver 5.0 آغازگرهای اختصاصی از نواحی های حفاظت شده طراحی شدند و توسط شرکت های 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 ژنوتیپ ها در دسترس نمی باشد (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 مورفولوژیک بوده است و نتایج نشان از وجود تنوع فنوتیپی قابل ملاحظه در میان نمونه هاست (Ohyama et al. 1986; Sarkhosh et al. 2007). ولی با توجه به اینکه خصوصیات ظاهری گیاه تحت تأثیر شرایط محیطی قرار می گیرند، لذا صفات ظاهری نمی تواند معیار دقیق و مناسبی جهت گروه بندی ژنوتیپ های انار باشند و شناسایی دقیق این ژنوتیپ ها را با مشکل مواجه می سازند (Zheleva et al. 2007; Sarkhosh et al. 1998). به همین دلیل فرضیه ای که در مورد تنوع بالای ژرم پلاسما انار در ایران وجود دارد چندان قابل استناد نیست و ممکن است شرایط اقلیمی در این گوناگونی ژنوتیپ ها مؤثر باشد. با توجه به لزوم شناسایی دقیق تر ژنوتیپ های انار در جهت اصلاح این محصول و قابل اعتماد نبودن طبقه بندی انار بر اساس ویژگی های مورفولوژیک و از طرفی به دلیل پیشرفت های قابل توجه در استفاده از تکنیک های مولکولی برای تشخیص منطقی تر ژنوتیپ های گیاهی به نظر می رسد کاربرد این روش ها در طبقه بندی و تعیین شناسنامه دقیق ژنوتیپ های انار در ایران و بررسی تفاوت دقیق بین ارقام جهت مدیریت مؤثر کلکسیون ها و برنامه های اصلاحی آینده انار ضرورتی انکارناپذیر باشد (Zheleva et al. 1998; Sarkhosh et al. 2007). با وجود تنوع مورفولوژیک بین ارقام انار، در اغلب مطالعات صورت گرفته با استفاده از نشانگرهای مولکولی مختلف از جمله RAPD، AFLP و ISSR، چند شکلی پایینی مشاهده شده است (Talebi 2003; Sarkhosh et al. 2006; Zeinalabedini et al. 2010). دلیل این امر را به ژن های سیتوپلاسمی، تغییرات پس از نسخه برداری و شرایط اقلیمی مختلف مرتبط دانسته اند. یکی از عوامل سیتوپلاسمی در گیاهان کلروپلاست است. ژن های کلروپلاستی به صورت گسترده ای برای درک فیلوژنی گیاهان در رده های مختلف تاکسونومیک به کار رفته است. در رده بندی و تکامل گیاهان کوچک بودن ژنوم، مقدار فراوان DNA و سرعت کمتر جهش در مقایسه با ژنوم هسته ای از جمله دلایلی است که

¹ Myrtle

جدول ۱- توالی آغازگرهای رفت و برگشت برای تکثیر ناحیه‌ی ژنی *petA-psaJ* در کلروپلاست

ردیف	نام جفت آغازگر	توالی آغازگر	درصد GC(%)	میزان ΔG	طول آغازگر بر حسب bp	دمای اتصال بهینه شده (°C)
۱	F1 <i>petA-psaJ</i>	5'-CAATGATTGGACCATGCA-3'	۴۴/۴	-۸/۴	۱۸	۵۰
	R1 <i>petA-psaJ</i>	5'-TCTCCTTGACCAATCCAC-3'	۴۷/۴	-۷/۹	۱۹	
۲	F2 <i>petA-psaJ</i>	5'-GTGGATTGTGTCAGGAG-3'	۵۰/۰	-۷/۹	۱۸	۵۰
	R2 <i>petA-psaJ</i>	5'-TCGATTTGATTTTCCTGA-3'	۳۳/۳	-۸/۲	۱۸	
۳	F3 <i>petA-psaJ</i>	5'-TCATTTCAGGAAAAATCAAATCG-3'	۳۳/۳	-۸/۶	۲۱	۵۶
	R3 <i>petA-psaJ</i>	5'-TGTTGAATTGAATCGTACCAG-3'	۳۸/۳	-۷/۹	۲۱	
۴	F4 <i>petA-psaJ</i>	5'-CTGGTACGATTCAATTCAACA-3'	۳۸/۱	-۷/۰	۲۱	۵۰
	R4 <i>petA-psaJ</i>	5'-CAACAAAAACAATGTGTGCATC-3'	۳۸/۱	-۸/۱	۲۱	
۵	F5 <i>petA-psaJ</i>	5'-TAAGGTTTCTTTCTCTCC-3'	۳۸/۹	-۷/۹	۱۸	۵۰
	R5 <i>petA-psaJ</i>	5'-TAAGCATGAAGATGAAGG-3'	۳۸/۹	-۸/۲	۱۸	
۶	F6 <i>petA-psaJ</i>	5'-CATTTCAATTTAGCTCCTT-3'	۳۳/۳	-۸/۲	۱۸	۵۰
	R6 <i>petA-psaJ</i>	5'-GTTCAAATCCTGTCATCC-3'	۴۴/۴	-۸/۱	۱۸	
۷	F7 <i>petA-psaJ</i>	5'-CTAACCAAGAATGGAATCACG-3'	۴۲/۹	-۸/۴	۲۱	۵۶
	R7 <i>petA-psaJ</i>	5'-TCTTCACCCCTTCCCATG-3'	۵۵/۶	-۸/۴	۱۸	
۸	F1 <i>rbcl</i>	5'-ACTCCGAATTTCTGTGAGT-3'	۴۵/۰	-۸/۵	۲۰	۵۰
	R1 <i>rbcl</i>	5'-AAATCAAGTCCACCACGAAG-3'	۴۵/۰	-۸/۵	۲۰	
۹	F2 <i>rbcl</i>	5'-TAAAGGAAGATGCTACCACA-3'	۴۰/۰	-۸/۲	۲۰	۵۰
	R2 <i>rbcl</i>	5'-GCAATTCAATTAAGAGAACGA-3'	۳۳/۳	-۸/۴	۲۱	
۱۰	F <i>psbA-trnH</i>	5'-ATTCACAATCCACTGCCTTG-3'	۴۵/۰	-۸/۵	۲۰	۵۵
	R <i>psbA-trnH</i>	5'-ATGGCTTCAACCTAAATGG-3'	۴۰/۰	-۸/۴	۲۰	

* ΔG : تغییرات انرژی آزاد.

مولار کلرید منیزیم، یک واحد از آنزیم *Taq DNA* پلیمرراز، ۰/۲ میلی مولار dNTPs، ۰/۳ میکرو مولار از هر آغازگر و حدود ۲۰ نانوگرم DNA در دستگاه ترموسایکلر شرکت Biorad انجام شد. محصول PCR به همراه نشانگر اندازه 100bp (Fermentase Life Science Co.) به منظور تخمین اندازه‌ی قطعات بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد در بافر TBE الکتروفورز شد.

همسانه سازی و توالی‌یابی قطعات تکثیر یافته

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

^۱ Cloning^۲ Rapid screening

آمپی سیلین کشت داده شدند و برای توالی‌یابی به شرکت MacroGen کره 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 همدریف سازی چندتایی بین توالی‌های مشخص شده در این تحقیق و اطلاعات موجود در GenBank جهت تعیین میزان تشابه آن‌ها و همچنین تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیک داده‌ها و رسم درخت فیلوژنتیک با استفاده از نرم‌افزار ARLEQUIN ver 3.1 انجام گردید. از نرم افزار MEGA ver 4.0 برای بررسی تعداد جایگزینی هم جنس و نا همجنس و از نرم افزارهای CLC Main Workbench ver 5.0 و (kinfold) برای بررسی ساختار tRNA استفاده شد. مقادیر Pairwise distance و p-distance، K2P distance توسط MEGA ver 5.0 محاسبه شد. Pairwise distance به معنای

نتایج محققین دیگر روی بارکدهای گیاهی در سایر خانواده ها نیز حاکی از تنوع درون گونه‌ای ۰/۲ درصد تا ۵/۷ درصد (Kress et al. 2007)، میانگین تنوع درون گونه‌ای صفر تا ۰/۴ درصد (Luo et al. 2010) و تنوع درون گونه‌ای ۰/۴۴ درصد تا ۱/۷۳ درصد (Selvaraj 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 (جدول ۲ و ۳)، از آن‌ها برای طراحی آغازگر استفاده شد. آغازگر رفت با توالی نوکلئوتیدی 5'-GTTCTCTGTGCTTCCAGA-3' و آغازگر برگشت با توالی 3'-TCAAATAAGTCGTATCTTGGTCA-5' 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 کد کننده‌ی کلروپلاستی که به منظور بررسی تنوع درون گونه‌ای (Shaw et al. 2007; Shaw et al. 2005) معرفی شده بود در گیاه *Psiguria* بررسی شدند. از نه ناحیه‌ای که در مطالعه قبل بالاترین میزان تنوع را داشتند، چهار ناحیه‌ی *psbE-petL*، *rps16-trnQ*، *ndhC-trnV* و *ndhF-rpl32* تنوع بالاتری در گیاه *Psiguria* نشان دادند (Steel et al. 2010) که با نتایج تحقیق حاضر همسو هستند. در مطالعه سه ناحیه‌ی کلروپلاستی *petA-psbJ*، *psbA-trnH* و *matK* به منظور بررسی تنوع درون و برون گونه‌ای (Zingiberaceae) *Boesenbergia* مشخص شد که ناحیه‌ی *petA-psbJ* دارای تنوع درون گونه‌ای ۰/۱۶ درصد در *B. Curtisii*، صفر درصد در *B. pulcherrima* و ۰/۳۳ درصد در *B. Longiflora* است و این ناحیه برای بررسی تنوع درون گونه‌ای پیشنهاد شد (Ngamriabsakul et al. 2006).

فاصله‌ی دوتایی بین هر جفت از نمونه‌ها است. (Kimura 2- K2P parameter distance) میزان فاصله را بر اساس نسبت 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 توالی‌یابی شده

طول ناحیه *petA-psaJ* در cpDNA ژنوتیپ وحشی، اهلی و زینتی انار به ترتیب ۵۴۹۱، ۵۴۹۲ و ۵۴۹۴ و در cpDNA گیاه "مورد" ۵۳۹۲ جفت باز محاسبه شد که شامل ده ناحیه‌ی ژنی و نه ناحیه‌ی بین ژنی است (جدول ۲). میانگین کل K2P، 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 کد کننده در مقایسه با نواحی کد کننده 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 درون گونه‌ای 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 نوکلئوتید در cpDNA گیاه "مورد"	تعداد اسید آمینه در cpDNA انار	تعداد اسید آمینه در cpDNA گیاه "مورد"	تعداد نوکلئوتید در cpDNA گیاه "مورد"	تعداد نوکلئوتید در cpDNA انار	تعداد نوکلئوتید در cpDNA گیاه "مورد"	تعداد نوکلئوتید در cpDNA انار
	اهلی	وحشی	زیتنی	اهلی	وحشی	زیتنی	اهلی	وحشی
<i>petA</i>	۹۶۶	۹۶۴	۹۶۶	۹۶۳	۹۶۳	۹۶۳	۹۶۳	۹۶۳
<i>psbJ</i>	۱۲۳	۱۲۳	۱۲۳	۱۲۳	۱۲۳	۱۲۳	۱۲۳	۱۲۳
<i>psbL</i>	۱۲۲	۱۱۷	۱۱۷	۱۱۸	۱۱۷	۱۱۷	۱۱۸	۱۱۷
<i>psbF</i>	۱۲۰	۱۲۰	۱۲۰	۱۲۰	۱۲۰	۱۲۰	۱۲۰	۱۲۰
<i>psbE</i>	۲۵۳	۲۵۲	۲۵۲	۲۵۲	۲۵۲	۲۵۲	۲۵۲	۲۵۲
<i>petL</i>	۹۶	۹۶	۹۶	۹۶	۹۶	۹۶	۹۶	۹۶
<i>petG</i>	۱۱۴	۱۱۴	۱۱۴	۱۱۴	۱۱۴	۱۱۴	۱۱۴	۱۱۴
<i>tRNA^{trp}</i>	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴
<i>tRNA^{trp}</i>	۷۳	۷۳	۷۳	۷۳	۷۳	۷۳	۷۳	۷۳
<i>psaJ</i>	۱۳۵	۱۳۵	۱۳۵	۱۳۵	۱۳۵	۱۳۵	۱۳۵	۱۳۵
<i>petA-psbJ</i>	۹۱۷	۹۲۰	۹۴۱	۹۸۶	۹۸۶	۹۸۶	۹۸۶	۹۸۶
<i>psbJ-psbL</i>	۱۴۳	۱۴۷	۱۴۷	۱۴۷	۱۴۷	۱۴۷	۱۴۷	۱۴۷
<i>psbL-psbF</i>	۲۲	۲۲	۲۲	۳۱	۳۱	۳۱	۳۱	۳۱
<i>psbF-psbE</i>	۹	۹	۹	۷	۷	۷	۷	۷
<i>psbE-petL</i>	۱۳۸۵	۱۳۸۲	۱۳۶۱	۱۲۶۰	۱۲۶۰	۱۲۶۰	۱۲۶۰	۱۲۶۰
<i>petL-petG</i>	۱۷۸	۱۷۸	۱۷۸	۱۷۱	۱۷۱	۱۷۱	۱۷۱	۱۷۱
<i>petG-tRNA^{trp}</i>	۱۲۱	۱۲۶	۱۲۶	۱۳۱	۱۳۱	۱۳۱	۱۳۱	۱۳۱
<i>tRNA^{trp}-tRNA^{trp}</i>	۱۸۶	۱۸۵	۱۸۶	۱۶۹	۱۶۹	۱۶۹	۱۶۹	۱۶۹
<i>tRNA^{trp}-psaJ</i>	۴۵۵	۴۵۴	۴۵۴	۴۲۲	۴۲۲	۴۲۲	۴۲۲	۴۲۲
<i>petA-psaJ</i>	۵۴۹۲	۵۴۹۱	۵۴۹۴	۵۳۹۲	۵۳۹۲	۵۳۹۲	۵۳۹۲	۵۳۹۲

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

ناحیه	میانگین کل K ₂ P	میانگین کل Pairwise distance	میانگین کل P-distance
	درون گونه‌ای انار	بین انار و مورد	درون گونه‌ای انار
<i>petA</i>	۰	۰/۰۵	۰/۰۹۷۰
<i>psbJ</i>	۰	۰/۰۳۳	۰/۰۹۷۰
<i>psbL</i>	۰/۰۱۷۳۳	۰/۰۲۶۱۳	۰/۰۱۷
<i>psbF</i>	۰	۰/۰۱۶۸	۰/۰۱۶۶۷
<i>psbE</i>	۰/۰۰۴	۰/۰۲۲	۰/۰۴۳۲
<i>petL</i>	۰	۰/۰۲	۰/۰۲۱۴۵
<i>petG</i>	۰/۰۰۶	۰/۰۱۱	۰/۰۵۸۵
<i>tRNA^{trp}</i>	۰	۰/۰۱۳۷۰	۰/۰۱۳۷۴
<i>tRNA^{trp}</i>	۰	۰	۰
<i>psaJ</i>	۰	۰	۰/۰۲۳۱۱
<i>petA-psbJ</i>	۰	۰/۲۵	۰/۱۳۱۷۲
<i>psbJ-psbL</i>	۰	۰/۰۵	۰/۰۲۵۷۱
<i>psbL-psbF</i>	۰/۰۶۵۲۲	۰/۰۵۴۳۵	۰/۰۶۵۲۲
<i>psbF-psbE</i>	۰	۰	۰
<i>psbE-petL</i>	۰/۰۳	۰/۲۱	۰/۱۲۳۹۶
<i>petL-petG</i>	۰/۰۰۳۷	۰/۲	۰/۱۰۵۲۶
<i>petG-tRNA^{trp}</i>	۰/۰۲۲	۰/۱۲	۰/۰۷۵۸۳
<i>tRNA^{trp}-tRNA^{trp}</i>	۰/۰۰۳۵۹	۰/۱۶۳۶۰	۰/۰۰۳۵۹
<i>tRNA^{trp}-psaJ</i>	۰	۰/۰۸۲۷۹	۰/۰۸۲۷۹

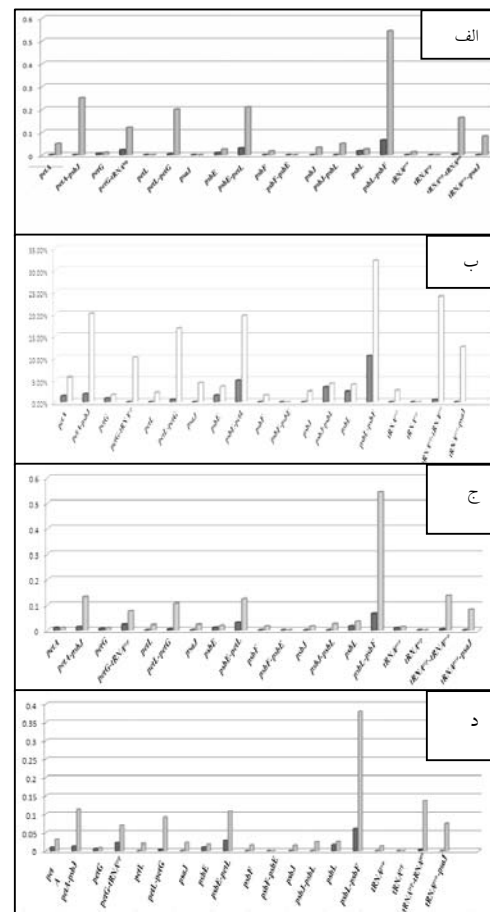
K₂P: فاصله بر اساس نسبت جایگزینی هم جنس به ناهم جنس نشان می‌دهد. Pairwise distance: فاصله‌ی دو تایی.

P-distance: فاصله بر اساس تعداد نوکلئوتید متفاوت به تعداد کل نوکلئوتیدهای استفاده شده نشان می‌دهد.

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

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

مشاهده می‌شود ژن کد کننده‌ی تریپتوفان گیاه مورد در مقایسه با ژنوتیپ‌های انار متنوع بود، بنابراین ساختار ثانویه‌ی آن نیز ترسیم شد تا اثر احتمالی این تنوع بر آنتی‌کدون ژن مذکور مشخص شود. نتایج حاصل از ترسیم ساختار tRNA تریپتوفان و پرولین تمام نمونه‌ها در شکل ۲ نشان داده شده است. همان طور که ملاحظه می‌شود، ساختار اولیه‌ی *tRNA^{trp}* و *tRNA^{pro}* در همه‌ی نمونه‌ها کاملاً یکسان بوده و آنتی‌کدون های مربوط به آن‌ها به ترتیب 5'-CCA-3' و 5'-UGG-3' است. در تحقیق (et al. 1985) Marechal با بررسی *tRNA^{pro}* کلروپلاست و میتوکندری لوبیا تشابهی در حدود ۹۷/۳ درصد برای توالی این دو ژن با آنتی‌کدون 5'-CCA-3' مشاهده شد. آن‌ها اعتقاد دارند که *tRNA^{trp}* کلروپلاست و *tRNA^{trp}* میتوکندری اگر چه توسط دو ژن مختلف در دو مکان مجزا رمز می‌شوند ولی به دلیل شباهت بسیار زیاد

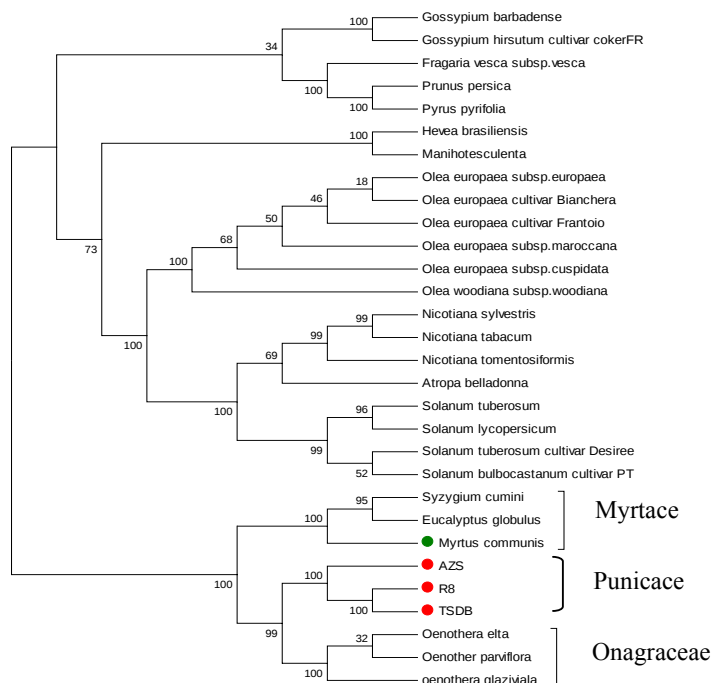


شکل ۱- تنوع بین جنسی (رنگ خاکستری) و درون گونه‌ای (رنگ مشکی) ناحیه‌ی *petA-psaJ* در انار و گیاه "مورد" بر اساس (الف) میانگین کل K2P، (ب) درصد تنوع بر اساس جایگزینی، (ج) میانگین کل Pairwise distance، (د) میانگین کل P-distance.

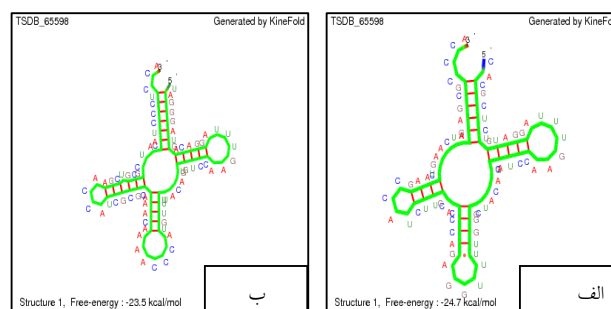
در مطالعه‌ی حاضر نیز تنوع درون گونه‌ای انار بر اساس ناحیه‌ی *petA-psbJ* ۱/۹۱ درصد به دست آمد، اما میزان تنوع این ناحیه در مقایسه با نواحی *psbL-psbF* (۱۰/۵۲ درصد) و *psbE-petL* (۴/۹۸ درصد) کمتر است. بنابراین بر اساس سه پارامتر استفاده شده در این تحقیق، توانایی ناحیه‌ی *petA-psbJ* در نشان دادن تنوع بین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

بررسی ساختار تریپتوفان و پرولین در توالی‌ها در ناحیه بررسی شده دو ژن کد شونده ی tRNA تریپتوفان و پرولین وجود داشت. بنابراین ساختار اولیه‌ی آن‌ها به هدف تعیین آنتی‌کدون مربوطه رسم شد و همان‌طور که در جداول ۳ و ۴

فقدان دستگاه ترشحي داخلی در اندام‌های رویشی و تخمدان منفرد با یک نهنج و پرچم‌های متعدد از این خانواده جدا شده و در خانوادهی *Punicaceae* قرار گرفت (Akbar 2006). در مطالعه ای با مقایسه‌ی ژن *rbcL* در دو خانوادهی *Lythraceae* و *Onagraceae* ارتباط بسیار نزدیکی (bootstrap=92%) بین آنها به دست آمد (Conti et al. 1997). این نتایج توسط مطالعات مولکولی سایر محققین هم تایید شد (Dahlgren and Thorne 2004; Sytsma et al. 1984; Johnson and Briggs 1984). در طبقه بندی دیگری نیز بیان شد که خانوادهی *Punicaceae* ارتباط نزدیکی با *Lythraceae* و *Onagraceae* دارد (Koehne 1881) به دلیل عدم توالی یابی این ناحیه در گیاهان خانوادهی *Lythraceae*، نمی‌توان نتیجه‌گیری قطعی در رابطه با شباهت خانوادهی *Punicaceae* به *Onagraceae* و *Myrtaceae* داشت و نیاز به بررسی ژن‌های مشترک در بین چهار خانوادهی *Lythraceae*، *Onagraceae*، *Punicaceae* و *Myrtaceae* در مطالعات آتی می‌باشد.



شکل ۳- درخت فیلوژنی ژنوتیپ‌های انار و سایر گیاهان بر اساس توالی‌های نوکلئوتیدی ناحیه ژنی *petA-psaJ* در کلروپلاست. AZS: رقم زیتنی، R8: رقم اهلی، TSDB: رقم وحشی و *Myrtus communis* ژنوتیپ وحشی گیاه "مورد"



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

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

روابط فیلوژنی انار بر اساس نواحی توالی‌یابی شده با استفاده از BLAST ناحیه‌ی *petA-psaJ* گیاهان نزدیک‌تر به انار انتخاب و از آنها برای رسم درخت فیلوژنی بر اساس روش حداکثر صرفه جویی^۱ استفاده شد (شکل ۳). همان طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود بر اساس توالی این ناحیه‌ی ژنی، انار شباهت زیادی با خانوادهی *Onagraceae* و پس از آن *Myrtaceae* دارد که از این خانواده نزدیک‌ترین گونه از لحاظ تکاملی به انار گونه *Myrtus communis* (ژنوتیپ وحشی گیاه "مورد") تشخیص داده شد. جنس *Punica* ابتدا از نظر رده‌بندی گیاهی انار در خانواده *Myrtaceae* قرار گرفته بود، لیکن در بررسی‌های بعدی به علت اختلافات عمده آناتومیک آن را از این تیره جدا گردیده و در خانوادهی *Lythraceae* طبقه بندی شد (Akbar 2006). اما پس از بررسی‌های Hoker and Benthام^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 Jahrbucher fur 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, Grienemberger 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, Marintez-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, Tabatabaie 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