ژنتیک نوین
دوره هفتم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۱
صفحه ۲۴۸- ۲۴۱

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

زهرا حاجی احمدی[۱]، مجید طالبی*[۲]، بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی[۳]

۱،۲و۳- 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 قدیمی‌ترین میوه‌های شناخته شده و جزو مهمترین گیاهان باغی در ایران محسوب می شود که پراکندگی و تنوع قابل توجه‌ای در ایران دارد. نتایج تحقیقات صورت گرفته بر اساس نشانگرهای مولکولی مختلف مانند RAPD، AFLP، SSR در انار حاکی از چندشکلی پایین بین ژنوتیپ‌های آن علیرغم تنوع مورفولوژیک بوده است. در این پژوهش ناحیه‌ی ژنی *petA-psaJ* (شامل ژن‌های *petA*، *psbJ*، *psbL*، *psbF*، *psbE*، *petL*، *petG*، *tRNA*^{pro}، *tRNA*^{trp} و *psaJ*) با هدف توالی‌یابی و تجزیه و تحلیل فیلوژنی در انار استفاده شد. استخراج DNA ژنومی از برگ‌های انار وحشی، اهلی ، زینتی و گیاه مورد استخراج گردید و ژن‌های مورد نظر توسط واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی که بر اساس توالی DNA همردیف 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*-*petL* 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 Onagraceae و پس از آن Myrtaceae قرار داد.

واژه‌های کلیدی

انار،
روابط فیلوژنی،
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 امکان‌پذیر نخواهد بود (Akbar 2006). در ایران کلکسیون های غنی از ژنوتیپ های انار در شهرهای یزد، ساوه و ورامین وجود دارد ولی متأسفانه

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.5.4]

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 مورفولوژیک بوده است و نتایج نشان از وجود تنوع فنوتیپی قابل ملاحظه در میان نمونه‌هاست (Ohyama et al.1986;Sarkhosh et al. 2007). ولی 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 چندان 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 مورفولوژیک و از طرفی به دلیل پیشرفت‌های قابل توجه در استفاده از تکنیک‌های مولکولی برای تشخیص منطقی‌تر 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 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 ژن‌های سیتوپلاسمی، تغییرات پس از نسخه‌برداری و شرایط اقلیمی مختلف مرتبط دانسته‌اند. یکی از عوامل سیتوپلاسمی در گیاهان کلروپلاست است. ژن‌های کلروپلاستی به صورت گسترده‌ای برای درک فیلوژنی 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 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*، *psbL*، *psbF*، *psbE*، *petL*، *petG*، $tRNA^{pro}$، $tRNA^{trp}$ و *psaJ*) و نه ناحیه‌ی بین ژنی است (Steel et al. 2010). در مطالعه‌ای مشخص شد **که** ناحیه‌ی *psbE-petL* دارای تنوع بالایی بوده و می‌توان از آن به عنوان بارکد در بررسی تنوع درون گونه‌ای 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 رده‌بندی گیاهی است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و استخراج DNA ژنومی

در این تحقیق نمونه های برگی مورد استفاده از درختان انار، شامل رقم اهلی ملس ترش ساوه (R8)، ژنوتیپ وحشی تپه‌های ساحلی دریا کنار بابلسر(TSDB)، ژنوتیپ زینتی 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 ازروش پیشنهادی در گیاه نارون (sayed-Tabatabaei et al. 2007) صورت گرفت. کیفیت وکمیت 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 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 شرکت های Metabion آلمان و Bioneer کره جنوبی ساخته شدند (جدول۱). واکنش PCR در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل۱/۵ میکرولیتر بافر PCR ۱۰ برابر غلظت، ۲ میلی

[1] Myrtle

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.5.4]

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 petA-psaJ	5'-CAATGATTGGACCATGCA-3'	۴۴/۴	-۸/۴	۱۸	۵۰
	R1 petA-psaJ	5'-TCTCCTTGACCAAATCCAC-3'	۴۷/۴	-۷/۹	۱۹	
۲	F2 petA-psaJ	5'-GTGGATTTGGTCAAGGAG-3'	۵۰/۰	-۷/۹	۱۸	۵۰
	R2 petA-psaJ	5'-TCGATTTGATTTTCCTGA-3'	۳۳/۳	-۸/۲	۱۸	
۳	F3 petA-psaJ	5'-TCATTCAGGAAAATCAAATCG-3'	۳۳/۳	-۸/۶	۲۱	۵۶
	R3 petA-psaJ	5'-TGTTGAATTGAATCGTACCAG-3'	۳۸/۳	-۷/۹	۲۱	
۴	F4 petA-psaJ	5'-CTGGTACGATTCAATTCAACA-3'	۳۸/۱	-۷/۰	۲۱	۵۰
	R4 petA-psaJ	5'-CAACAAAACAATGTGTGCATC-3'	۳۸/۱	-۸/۱	۲۱	
۵	F5 petA-psaJ	5'-TAAGGTTTCTTTCTCTCC-3'	۳۸/۹	-۷/۹	۱۸	۵۰
	R5 petA-psaJ	5'-TAAGCATGAAGATGAAGG-3'	۳۸/۹	-۸/۲	۱۸	
۶	F6 petA-psaJ	5'-CATTTCATTTAGCTCCTT-3'	۳۳/۳	-۸/۲	۱۸	۵۰
	R6 petA-psaJ	5'-GTTCAAATCCTGTCATCC-3'	۴۴/۴	-۸/۱	۱۸	
۷	F7 petA-psaJ	5'-CTAACCAAGAATGGAATCACG-3'	۴۲/۹	-۸/۴	۲۱	۵۶
	R7 petA-psaJ	5'-TCTTCACCCCTTCCCATG-3'	۵۵/۶	-۸/۴	۱۸	
۸	F1 rbcL	5'- ACTCCGAATTTCTGTCGAGT-3'	۴۵/۰	-۸/۵	۲۰	۵۰
	R1 rbcL	5'- AAATCAAGTCCACCACGAAG-3'	۴۵/۰	-۸/۵	۲۰	
۹	F2 rbcL	5'-TAAAGGAAGATGCTACCACA-3'	۴۰/۰	-۸/۲	۲۰	۵۰
	R2 rbcL	5'-GCAATTCAATTAAGAGAACGA-3'	۳۳/۳	-۸/۴	۲۱	
۱۰	F psbA-trnH	5'-ATTCACAATCCACTGCCTTG-3'	۴۵/۰	-۸/۵	۲۰	۵۵
	R psbA-trnH	5'-ATGGCTTTCAACCTAAATGG-3'	۴۰/۰	-۸/۴	۲۰	

*ΔG: تغییرات انرژی آزاد.

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 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 توالی یابی در ناقل pTZ57R/T همسانه سازی[1] شدند. برای همسانه‌سازی نیاز به سلول‌های مستعد باکتری *Escherichia coli* بود که از کیت PCR cloning InsTA clone™ (Fermentase CO.) استفاده شد. به منظور تایید ورود ژن مورد نظر به داخل باکتری *E. coli* MC1061 از سه روش Colony PCR، غربال‌گری سریع[2] و واکنش هضم آنزیمی استفاده شد. همسانه های حاوی قطعه مورد نظرکه با تکنیک‌های فوق انتخاب و تأیید شده بودند، روی محیط جامد LB حاوی آمپی سیلین کشت داده شدند و برای توالی یابی 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 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 فیلوژنتیک داده‌ها و رسم درخت فیلوژنتیک با استفاده از نرم‌افزار MEGA ver 4.0 انجام گردید. از نرم افزار ARLEQUIN ver 3.1 برای بررسی تعداد جایگزینی هم جنس و نا همجنس و از نرم افزارهای CLC Main Workbench ver 5.0 و(kinefold kinefold.curie.fr) برای بررسی ساختار tRNA استفاده شد. مقادیر K2P distance، p-distance وPairwise distance توسط MEGA ver 5.0 محاسبه شد. Pairwise distance به معنای

[1] Coloning
[2] Rapid screening

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.5.4]

فاصله‌ی دوتایی بین هر جفت از نمونه‌ها است. (Kimura 2-parameter distance) K2P 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 می آید.

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 کلK2P، Pairwise distance و P-distance حاصل ازنتایج 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 جدول۴ خلاصه شده است. به منظور بررسی بهتر نتایج حاصل، داده‌ها توسط نرم افزارMicrosoft Office Excel 2007 به صورت نمودار نمایش داده شدند(شکل۱). 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 احتمالا 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 ناحیه ای 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، میانگینK2P ۳ درصد ، میانگین p-distance ۲۸ درصد و میانگین Pairwise distance ۳ درصد وتعداد نوکلئوتید مناسب (در حدود ۱۳۰۰ نوکلئوتید) تنوع نسبتا بالاتری در مقایسه با سایر نواحی بررسی شده در *petA-psaJ*، به منظور تمایز ارقام انار نشان داد.

نتایج محققین دیگر روی بارکدهای گیاهی در سایر خانواده ها نیز حاکی از تنوع درون‌گونه‌ای۰/۲ 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 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 در صد هستند (جداول ۲ و ۳)، از آن‌ها برای طراحی آغازگر استفاده شد. آغازگر رفت با توالی نوکلئوتیدی 5'-GTTCTCCTGTGCTTCCAGA-3' وآغازگر برگشت با توالی5'-TCAAATAAGTCGTATCTTGGTCA-3' 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. سی‌وچهار ناحیه‌ی غیر کد کننده‌ی کلروپلاستی که به منظور بررسی تنوع درون گونه‌ای(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 *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).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.5.4]

جدول۲- 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 اسیدآمینه در cpDNA گیاه"مورد"
	اهلی	وحشی	زینتی		اهلی	وحشی	زینتی	
petA	۹۶۶	۹۶۴	۹۶۶	۹۶۳	۳۲۲	۳۲۱	۳۲۲	۳۲۱
psbJ	۱۲۳	۱۲۳	۱۲۳	۱۲۳	۴۱	۴۱	۴۱	۴۱
psbL	۱۲۲	۱۱۷	۱۱۷	۱۱۸	۴۰	۳۹	۳۹	۳۹
psbF	۱۲۰	۱۲۰	۱۲۰	۱۲۰	۴۰	۴۰	۴۰	۴۰
psbE	۲۵۳	۲۵۲	۲۵۲	۲۵۲	۸۴	۸۴	۸۴	۸۴
petL	۹۶	۹۶	۹۶	۹۶	۳۲	۳۲	۳۲	۳۲
petG	۱۱۴	۱۱۴	۱۱۴	۱۱۴	۳۸	۳۸	۳۸	۳۸
$tRNA^{pro}$	۷۴	۷۴	۷۴	۷۴	۲۴	۲۴	۲۴	۲۴
$tRNA^{trp}$	۷۳	۷۳	۷۳	۷۳	۲۴	۲۴	۲۴	۲۴
psaJ	۱۳۵	۱۳۵	۱۳۵	۱۳۵	۴۵	۴۵	۴۵	۴۵
petA-psbJ	۹۱۷	۹۲۰	۹۴۱	۹۸۶	–	–	–	–
psbJ-psbL	۱۴۳	۱۴۷	۱۴۷	۱۴۷	–	–	–	–
psbL-psbF	۲۲	۲۲	۲۲	۳۱	–	–	–	–
psbF-psbE	۹	۹	۹	۷	–	–	–	–
psbE-petL	۱۳۸۵	۱۳۸۲	۱۳۶۱	۱۲۶۰	–	–	–	–
petL-petG	۱۷۸	۱۷۸	۱۷۸	۱۷۱	–	–	–	–
petG-tRNA^{trp}	۱۲۱	۱۲۶	۱۲۶	۱۳۱	–	–	–	–
tRNA^{trp}-tRNA^{pro}	۱۸۶	۱۸۵	۱۸۶	۱۶۹	–	–	–	–
tRNA^{pro}-psaJ	۴۵۵	۴۵۴	۴۵۴	۴۲۲	–	–	–	–
petA-psaJ	۵۴۹۲	۵۴۹۱	۵۴۹۴	۵۳۹۲				

جدول۳- بررسی تنوع بین جنسی و درون گونه‌ای ناحیه‌ی *petA-psaJ* در کلروپلاست های انار و گیاه"مورد" بر K_2P، Pairwise distance(model K_2P) و P-distance.

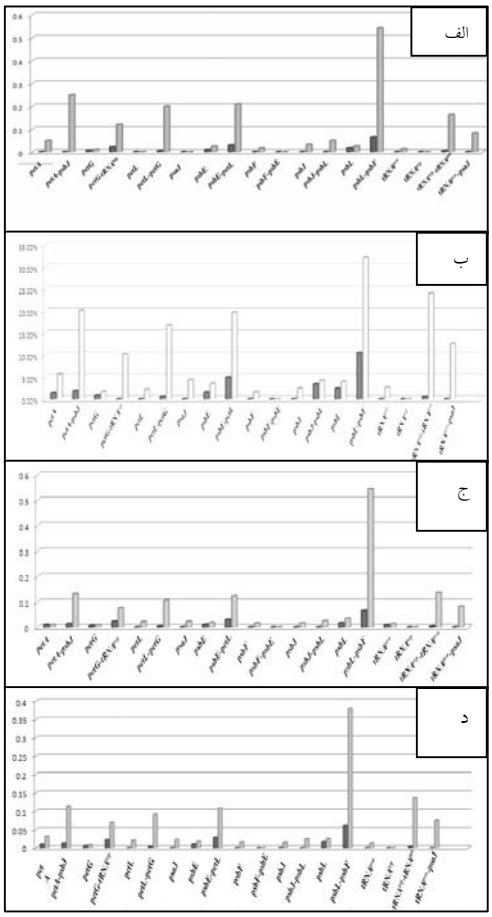
ناحیه	میانگین کل * K_2P		میانگین کل * Pairwise distance		میانگین کل * P-distance	
	درون گونه‌ای انار	بین انار و مورد	درون گونه‌ای انار	بین انار و مورد	درون گونه‌ای انار	بین انار و مورد
petA	۰	۰/۰۵	۰/۰۰۹۷۷	۰/۰۰۹۷۰	۰/۰۰۹۷۰	۰/۰۳۱۷۱
psbJ	۰	۰/۰۳۳	۰	۰/۰۱۶۷۰	۰	۰/۰۱۶۲۶
psbL	۰/۰۱۷۳۳	۰/۰۲۶۱۳	۰/۰۱۷	۰/۰۳۵	۰/۰۱۷۰۹	۰/۰۲۵۶۴
psbF	۰	۰/۰۱۶۸	۰	۰/۰۱۶۶۷	۰	۰/۰۱۶۶۷
psbE	۰/۰۰۴	۰/۰۲۲	۰/۰۰۴۳	۰/۰۲۲	۰/۰۰۴۳۲	۰/۰۱۸۸۶
petL	۰	۰/۰۲	۰	۰/۰۲۱۴۵	۰	۰/۰۲۰۸۳
petG	۰/۰۰۶	۰/۰۱۱	۰/۰۰۵۹	۰/۰۰۸۸۸	۰/۰۰۵۸۵	۰/۰۰۸۷۷
tRNA^{trp}	۰	۰/۰۱۳۷۰	۰	۰/۰۱۳۷۴	۰	۰/۰۱۳۵۱
tRNA^{pro}	۰	۰	۰	۰	۰	۰
psaJ	۰	۰	۰	۰/۰۲۳۱۱	۰	۰/۰۲۲۳۱
petA-psbJ	۰	۰/۲۵	۰/۰۱۳۲۶	۰/۱۳۱۷۲	۰/۰۱۳۱۰	۰/۱۱۲۸۳
psbJ-psbL	۰	۰/۰۵	۰	۰/۰۲۵۷۱	۰	۰/۰۲۴۷۱
psbL-psbF	۰/۰۶۵۲۲	۰/۵۴۳۵	۰/۰۶۵۲۲	۰/۵۴۳۵	۰/۰۶۰۶۱	۰/۳۸
psbF-psbE	۰	۰	۰	۰	۰	۰
psbE-petL	۰/۰۳	۰/۲۱	۰/۰۳	۰/۱۲۳۹۶	۰/۰۲۸۴۸	۰/۱۰۸۶۸
petL-petG	۰/۰۰۳۷	۰/۲	۰/۰۰۳۷۷	۰/۱۰۵۲۶	۰/۰۰۳۷۵	۰/۰۹۱۵۴
petG-tRNA^{trp}	۰/۰۲۲	۰/۱۲	۰/۰۲۲۵۴	۰/۰۷۵۸۳	۰/۰۲۲۰۴	۰/۰۷۰۲۰
tRNA^{trp}-tRNA^{pro}	۰/۰۰۳۵۹	۰/۱۶۳۶۰	۰/۰۰۳۵۹	۰/۱۳۶۳۲	۰/۰۰۳۵۷	۰/۱۳۶۳۲
tRNA^{pro}-psaJ	۰	۰/۰۸۲۷۹	۰	۰/۰۸۲۷۹	۰	۰/۰۷۴۱۸

K_2P: 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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.5.4]



شکل۱- 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* (۱۰/۵۲درصد) 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 می-کاهد.

بررسی ساختار تریپتوفان و پرولین در توالی‌ها

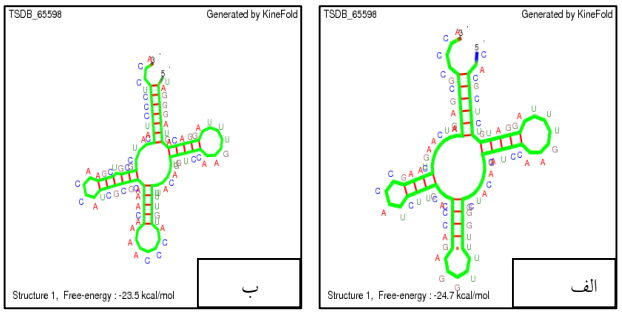
در ناحیه بررسی شده دو ژن کد شونده ی tRNA تریپتوفان و پرولین وجود داشت. بنابراین ساختار اولیه‌ی آن‌ها به هدف تعیین آنتی کدون مربوطه رسم شد و همان‌طور که در جداول ۳ و ۴

جدول۴- 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)
petA	۱/۴۴	۵/۷۰
psbJ	۰	۲/۵
psbL	۲/۴۳	۴/۰۶
psbF	۰	۱/۶۶
psbE	۰/۸	۲/۷۷
petL	۰	۲/۲۴
petG	۰/۸۷	۱/۷۵
$tRNA^{trp}$	۰	۲/۷۰
$tRNA^{pro}$	۰	۰
psaJ	۰	۴/۴۴
petA-psbJ	۱/۹۱	۲۰/۱۹
psbJ-psbL	۰	۴/۷۶
psbL-psbF	۱۰/۵۲	۳۲/۲۵
psbF-psbE	۰	۰
psbE-petL	۴/۹۸	۱۹/۷۳
petL-petG	۰/۵۶	۱۶/۸۵
petG-$tRNA^{trp}$	۰	۱۰/۲
$tRNA^{trp}$*-*$tRNA^{pro}$	۰/۵	۲۴/۰۸
$tRNA^{pro}$*-psaJ*	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 شکل۲ نشان داده شده است. همان طور که ملاحظه می شود، ساختار اولیه‌ی $tRNA^{Pro}$ و$tRNA^{trp}$ در همه‌ی نمونه‌ها کاملا یکسان بوده و آنتی کدون های مربوط به آن‌ها به ترتیب '5'-CCA-3' و '5'- UGG -3' است. در تحقیق (Marechal et al. 1985) با بررسی $tRNA^{Pro}$ کلروپلاست و میتوکندری لوبیا تشابهی در حدود۳/ ۹۷ درصد برای توالی این دو ژن با آنتی کدون '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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.5.4]

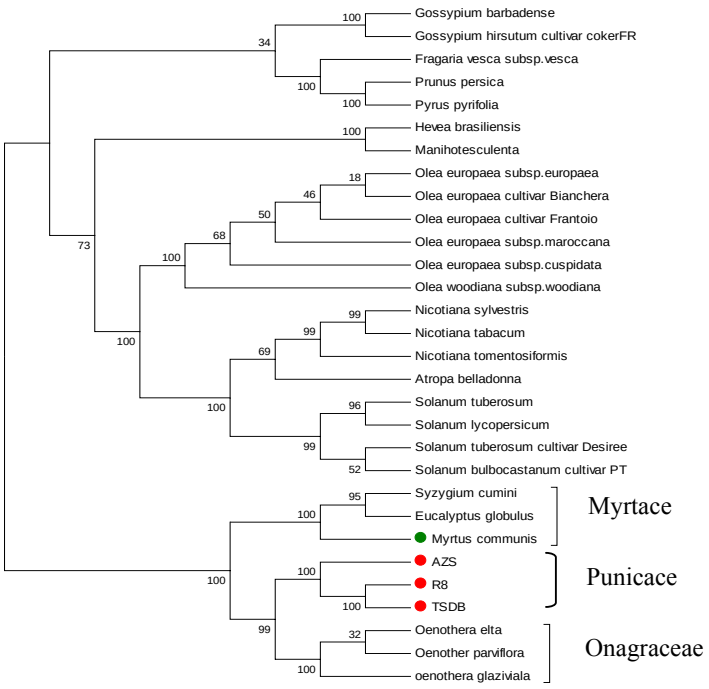


شکل۲- (الف) ساختار اولیه $tRNA^{trp}$ و (ب) $tRNA^{pro}$ رسم شده در انار و گیاه"مورد".

توالی آن‌ها، احتمالا از یک ژن اولیه‌ی مشترک مشتق شده اند (Marechal et al.1985). در تحقیق دیگری ساختار $tRNA^{trp}$ از خیار با آنتی کدون '3- UGG -5' 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 (Hande et al.1997). 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[1] استفاده شد (شکل ۳). همان طور که در شکل۳ 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 Bentham[2] به دلیل فقدان دستگاه ترشحی 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 1984;Johnson and Briggs 1984 ;Sytsma et al. 2004). 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 Punicacaea به Onagraceae و Myrtaceae داشت و نیاز به بررسی ژن‌های مشترک در بین چهار خانواده‌ی Myrtaceae، Punicaceae، Onagraceae و Lythraceae در مطالعات آتی می‌باشد.



شکل۳- درخت فیلوژنی ژنوتیپ‌های انار و سایر گیاهان بر اساس توالی های نوکلئوتیدی ناحیه ژنی *petA-psaJ* در کلروپلاست . AZS: رقم زینتی، R8: رقم اهلی، TSDB: رقم وحشی و *Myrtus communis* ژنوتیپ وحشی گیاه"مورد"

[1]Maximum parsimony

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.5.4]

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, Grienenberger 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 cytocrhome 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 speciese 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 Mrytaceae, 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 Chemistry273:16122–16127

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1391.7.3.5.4]