

آنالیز ساختار ژنتیکی برخی از ارقام انار کشت شده در نقاط مختلف جهان با استفاده از آغازگر مولکولی SSR

الهام صادقی سرشت^۱، حمیدرضا کریمی^{۲*}، خلیل ملک‌زاده^۳، علی‌اکبر محمدی میریک^۳، سیدحسین
میردهقان^۲

- ۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولیعصر (عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران
۲- استاد، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولیعصر (عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران
۳- به‌ترتیب استادیار، دانشیار، گروه ژنتیک و تولید گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولیعصر (عج) رفسنجان،
رفسنجان، ایران

Sadeghi Seresht E¹, Karimi HR^{*2}, Malekzadeh Kh³, Mohammadi Mirik AA³,
Mirdehghan SH²

- 1- PhD Student, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Vali-e-
Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran
2- Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Vali-e-
Asr University of Rafsanjan, Rafsanjan, Iran
3- Assistant Professor, Associate Professor Respectively, Department of Genetics
and Crop Production, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan,
Rafsanjan, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: hrkarimi2017@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۰۳ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۲۴

چکیده

انار (*Punica granatum L.*) یکی از قدیمی‌ترین میوه‌های خوراکی است که دارای ارزش غذایی و خواص دارویی بالایی می‌باشد. مرکز پیدایش انار آسیای میانه، به ویژه بخش‌های از ایران، افغانستان و هند می‌باشد که از آن‌جا به دیگر نقاط جهان گسترش یافته است که نشان دهنده تنوع ژنتیکی گسترده و دامنه سازگاری بالای آن جهت کشت در شرایط اقلیمی مختلف است. به‌منظور بررسی روابط ژنتیکی موجود بین و درون جمعیت‌های ارقام انار از کشورهای ایران، افغانستان، ترکمنستان، سوریه، لبنان، هند، یمن و ایالت متحده آمریکا واقع در دو قاره آسیا و آمریکا از آغازگر SSR استفاده شد. در این مطالعه، شش آغازگر ریز ماهواره‌ای، ۲۴ آلل چند شکل تولید کردند. برای هر مکان ژنی تعداد آلل‌ها از ۳ تا ۵ آلل با میانگین ۴ آلل متغیر بود. محتوی اطلاعات چند شکلی مربوط به مکان‌های ژنی ۰/۲۸ تا ۰/۴۶ با میانگین ۰/۳۸ ارزیابی شد. نتایج شاخص تنوع نی، تجزیه و تحلیل هم‌هنگ اصلی و تجزیه واریانس مولکولی، حاکی از وجود تنوع در داخل ژنوتیپ‌های هر جمعیت بود. در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، ارقام ایرانی دارای تنوع ژنتیکی بالاتری نسبت به سایر جمعیت‌ها بودند. براساس نتایج تجزیه خوشه‌ای مشخص شد که تنوع جغرافیایی ژنوتیپ‌ها تا حدودی از تنوع ژنتیکی تبعیت می‌کند. براساس پژوهش حاضر آغازگر SSR توانست اطلاعات سودمندی را در ارتباط با روابط ژنتیکی ژنوتیپ‌های انار با منشاء مختلف ارائه دهد که می‌تواند در برنامه‌های به نژادی انار مانند برنامه‌های گزینش و هیبریداسیون جهت تهیه ارقام هیبرید و یا ترسیم نقشه‌های لینکازی و همچنین توالی‌یابی باندهای اختصاصی و مدیریت کلکسیون‌های انار مفید واقع شود.

واژه‌های کلیدی

انار
آنالیز ساختاری
تنوع ژنتیکی
SSR

مقدمه

انار با نام علمی *Punica granatum* L. متعلق به خانواده Lythraceae و یکی از قدیمی‌ترین میوه‌های خوراکی است که دارای ارزش غذایی و خواص دارویی بالایی می‌باشد (Morris 2007). برخی از محققین با توجه به شواهد تاریخی خاستگاه اولیه انار را آسیای میانه، به‌ویژه بخش‌های از ایران، افغانستان و هند می‌دانند و معتقدند که انار از این مناطق به دیگر نقاط جهان گسترش یافته است (Sarkhosh et al. 2006; Karimi and Mirdehghan 2013). براساس گزارشات FAO سطح زیر کشت انار در دنیا به دلیل ارزش غذایی و مقاومت آن به شرایط کمبود آب در حال افزایش است (Zarei and Sahraroo 2018). نظر به اهمیت فوق العاده این گیاه ارزشمند تهیه شناسنامه مولکولی برای ارقام و ژنوتیپ‌های موجود جهت تعیین هویت و اصالت ژنتیکی و بررسی روابط خویشاوندی گام ارزنده‌ای در شناسایی و حفظ ذخایر توارثی خواهد داشت (Sarkhosh et al. 2009). تعیین هویت دقیق ارقام یا گونه‌های گیاهی به‌خصوص گیاهانی که دارای تکثیر رویشی هستند از اهمیت بسیاری برخوردار است. ابهامات زیادی در مورد نام ارقام انار در کشورهای تولید کننده وجود دارد. ممکن است نامی یکسان به ارقام مختلف نسبت داده شده باشد در حالی که از نظر خصوصیات با یکدیگر اختلاف زیادی دارند و یا ممکن است که ارقام در مناطق یا کشورهای مختلف نام‌گذاری متفاوت داشته باشند. لذا بررسی دقیق روابط فنوتیپی و فیلوژنی گیاهان نقش مهمی در تدوین برنامه‌های به‌نژادی به‌منظور تولید ارقام جدید با کیفیت بهتر و مقاومت بیشتر به شرایط نامساعد محیطی دارد (Karimi et al. 2007; Zarkti et al. 2023). یکی از روش‌های بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین روابط خویشاوندی بین رقم‌ها استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و مولکولی می‌باشد (Struss 2001). تشریح خصوصیات انار براساس صفات مورفولوژیکی از جمله روش‌های مناسب جهت بررسی ژرم پلاسماهای انار در سراسر جهان می‌باشد (Mir et al. 2007; Volkan et al. 2015; Sephond et al. 2016; Zarei et al. 2016). خصوصیات مورفولوژیکی به دلیل تأثیر پذیری از شرایط محیطی به‌تنهایی روش مناسبی در شناسایی ارقام نیستند، از این رو استفاده توأم از خصوصیات مورفولوژیکی و آغازگرهای مولکولی جهت تعیین تنوع و روابط ژنتیکی ژرم

پلاسماهای انار توصیه شده است (Sheidai et al. 2008; Jbir et al. 2007; Yuan et al. 2008). تاکنون مطالعات گوناگونی در ارتباط با استفاده از آغازگرهای مولکولی در مطالعات بررسی تنوع ژنتیکی ارقام انار صورت پذیرفته است (Hasnaoui et al. 2012; Patil et al. 2020; Noormohammadi et al. 2012; Caliskan et al. 2017). در پژوهشی جهت بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت ژرم پلاسماهای انار شیرین ایران از ۶ نشانگر SSR استفاده شد. نتایج نشان داد که در مجموع ۲۴ آلل مشاهده شد که تعداد آلل‌ها در هر مکان ژنی در دامنه‌ای بین ۲ تا ۸ آلل قرار داشت. میانگین محتوی اطلاعات چند شکلی این آغازگرها ۰/۷۴ به‌دست آمد که ماهیت قوی نشانگرهای ریز ماهواره‌ای را در بررسی روابط و تنوع ژنتیکی انار به اثبات می‌رساند (Mousavi Derazmahalleh et al. 2013). (Zarei and Sahraroo 2018) به‌منظور بررسی تفاوت‌های ژنتیکی درون و بین جمعیت‌های انار جمع‌آوری شده از نواحی مختلف استان فارس از آغازگر SSR استفاده کردند. از ۱۶ ترکیب آغازگر ۴۸ آلل در هر جایگاه ژنی به‌دست آمد. درصد چند شکلی بین ۰/۱۸ تا ۰/۵۸ متغیر بود که نشان دهنده تنوع ژنتیکی بالا در بین ارقام انار می‌باشد. پاتیل و همکاران (Patil et al. 2020) بیان نمودند که پایین بودن سطح چند شکلی در انار، آنالیزهای ژنتیکی از جمله نقشه‌های پیوستگی و QTL را مختل کرده است. از این رو، استفاده از نشانگرهای SSR چندشکلی که در سراسر ژنوم توزیع شوند، مطالعات ژنتیکی در انار را تا حد زیادی تسهیل می‌نماید. همچنین نشانگرهای SSR انجام برنامه‌های به‌نژادی از طریق انتخاب به کمک نشانگر (MAS) و شناسایی صحیح ژنوتیپ‌های انار برای حفاظت از حقوق اصلاح‌کنندگان مفید خواهند بود. (Giancaspro et al. 2017). بررسی ۶۳ ژنوتیپ انار جمع‌آوری شده از کشورهای مختلف گزارش کردند که ریزماهواره توانستند که ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را براساس منشاء جغرافیایی و صفات پومولوژی دسته‌بندی کنند. همچنین آن‌ها قادر به برقراری روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مختلف و امکان شناسایی مترادف‌ها و همان‌ها را فراهم آوردند. بررسی تنوع ژنتیکی در برخی ژنوتیپ‌های انار از کشور عراق با استفاده از ۱۲ آغازگر ریز ماهواره‌ای، در مجموع ۲۵ آلل با میانگین ۲/۰۸ آلل در هر جایگاه ژنی به‌دست آمد. میانگین هتروزیگوسیتی ۰/۳۳ و محتوی اطلاعات چند شکلی ۰/۲۵ گزارش شد. همچنین

تهیه شد. جمعیت‌های مورد بررسی شامل ۲۳ ژنوتیپ انار ایران و ۲۷ ژنوتیپ از کشورهای افغانستان، ترکمنستان، لبنان، هند، سوریه، یمن و ایالت متحده آمریکا بود که از لحاظ جغرافیایی در دو قاره آسیا و آمریکا قرار داده شدند (جدول ۱).

استخراج DNA ژنومی از بافت تازه برگ‌های جوان ارقام مورد ارزیابی به روش موری و تامسون (Murry and Thompson 1980) انجام گرفت. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و همچنین الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ تعیین شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از ۶ جفت آغازگر بر مبنای گزارش سورینا و همکاران (Soriano et al. 2010) انجام شد (جدول ۲). انجام واکنش PCR با استفاده از کیت پی سی آر (PCR Master Mix, 2X) تهیه شده از شرکت سیناژن در حجم ۲۰ میکرولیتر صورت گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از ترموسایکلر (Bio-Rad, C1000tm Thermal Cycler) ساخت کشور آمریکا با شرایط دمایی زیر صورت پذیرفت. واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، واسرشت ثانویه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال در دمای ۶۰-۵۵ درجه سانتی‌گراد (متفاوت برای هر جفت آغازگر) به مدت ۳۰ ثانیه، بسط آغازگر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ ثانیه و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. در پایان الکتروفورز محصول PCR با استفاده از ژل پلی‌اکریل آمید ۶ درصد و رنگ‌آمیزی توسط نیترات نقره در آزمایشگاه مولکولی گروه علوم باغبانی دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان صورت پذیرفت (Sambrook et al. 2001).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

امتیازدهی قطعات حاصل از PCR به صورت صفر (عدم وجود باند) و یک (وجود باند) برای هر یکی از آلل‌ها انجام شد. جهت بررسی کارایی هر آغازگر، شاخص‌های محتوی اطلاعات چند شکلی (PIC) (Weising et al. 2005)، قدرت تفکیک نشانگر (Rp) (Powell et al. 1999)، شاخص نشانگر (MI) (Prevost et al. 1996)، احتمال یکسانی (PI)، قدرت تفکیک کنندگی (D) (He et al. 2003)، شاخص تثبیت ژنی (F) (Peakall et al. 1995) محاسبه شدند.

فاصله ژنتیکی بین ۱۱ رقم انار مورد مطالعه بین ۰/۰۶ تا ۰/۲۶ بود (Sanjari 2015). (Hasnaoui et al. 2012) با مطالعه تنوع ژنتیکی ۳۳ ژنوتیپ انار با آغازگر SSR گزارش کردند که میانگین تعداد آلل در هر جایگاه ژنی ۲/۸۳ و میزان هتروزیگوسیتی قابل انتظار و مشاهده شده به ترتیب ۰/۲۴۵ و ۰/۲۴۳ می‌باشد که به دلیل باریک شدن خزانه ژنی تنوع ژنتیکی کمی نیز بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه مشاهده شده است. (Soriano et al. 2010) تنوع ژنتیکی موجود در ۱۱ ژنوتیپ انار از کشور اسپانیا را با استفاده از ۶۶ آغازگر SSR مورد بررسی قرار دادند. میانگین محتوی اطلاعات چند شکلی ۰/۳۷ برآورد شد. نتایج این مطالعه نشان داد که آغازگرهای SSR ابزاری قوی برای مطالعات تنوع ژنتیکی و تشخیص ژرم پلاسماهای کلکسیون‌های ارقام انار به حساب می‌آیند. در مطالعه‌ای ۵۸ جفت آغازگر ریز ماهواه‌ای طراحی شد که ۱۲ جفت از آن‌ها بر روی ۶۰ ژنوتیپ انار چند شکلی نشان دادند که در مجموع ۳۵ آلل با محدوده‌ای ۲ تا ۵ آلل برای هر مکان ژنی و محتوی اطلاعات چند شکلی با میانگین ۰/۴۳ به دست آمد (Pirseyyedi et al. 2010). (Ebrahimi et al. 2010) گزارش کردند که از بین ۲۵ جفت آغازگر ریز ماهواه‌ای مورد استفاده بر روی ارقام انار از کشور ایران، ۱۱ جفت آغازگر توانست به خوبی چند شکلی را نشان دهد. به طور کلی ۴۴ آلل چند شکلی با میانگین ۳/۳۸ آلل در هر جایگاه به دست آمد. میانگین محتوی اطلاعات چند شکلی در ۱۳ جایگاه ۰/۴۳ بود که نشان دهنده اهمیت بالای ریز ماهواره‌ها در بررسی تنوع ژنتیکی ارقام انار می‌باشد. لذا پژوهش حاضر به منظور بررسی کارایی آغازگر SSR در بررسی تنوع و ساختار ژنتیکی انار و بررسی روابط خویشاوندی ارقام انار ایران با دیگر کشورها و همچنین ارزیابی همبستگی بین فاصله جغرافیایی و فاصله ژنتیکی در جمعیت‌های مورد مطالعه طراحی شده است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال ۱۳۹۹-۱۴۰۰ در آزمایشگاه مولکولی بخش علوم باغبانی دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان صورت پذیرفت. در مجموع ۵۰ رقم تجاری انار در قالب ۲ جمعیت برای انجام تجزیه و تحلیل با آغازگر SSR مورد استفاده قرار گرفتند. نمونه‌های برگ‌ی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از کلکسیون انار واقع در شهرستان ساری

جدول ۱- جزئیات جمعیت انار مورد استفاده در این مطالعه

رقم	منشا	جمعیت	اختصار	رقم	منشا	جمعیت	اختصار
ملس ممتاز ساوه	ایران	آسیا	AIMS	Ariana	ترکمنستان	آسیا	ATAR
تبریزی	ایران	آسیا	AITA	Desertnyi	ترکمنستان	آسیا	ATDE
یوسف خانی	ایران	آسیا	AIYO	Cheranaya Roza	ترکمنستان	آسیا	ATCH
تفت طیس سوسکی	ایران	آسیا	AITT	Sirenevi	ترکمنستان	آسیا	ATSI
بجستانی	ایران	آسیا	AIBA	Austin	سوریه	آسیا	ASAU
شیرین قرمزابل	ایران	آسیا	AIPA	Kandahari1	افغانستان	آسیا	AAK1
بی هسته خفر جهرم	ایران	آسیا	AIBK	Kandahari2	افغانستان	آسیا	AAK2
وشیک ملس سراوان	ایران	آسیا	AIVO	Kandahari3	افغانستان	آسیا	AAK3
برگ موردی	ایران	آسیا	AIBG	Red Angel	لبنان	آسیا	ALRA
عود پوست سیاه	ایران	آسیا	AIOU	Unknown	یمن	آسیا	AYUH
اشکذر	ایران	آسیا	AIAS	Balegal	ایالت متحده آمریکا	امریکا	AUBA
شیرین زودرس	ایران	آسیا	AISH	Crab	ایالت متحده آمریکا	امریکا	AUCR
آلک	ایران	آسیا	AIAL	Cranbrey	ایالت متحده آمریکا	امریکا	AUCB
قچاق قم	ایران	آسیا	AIGH	Granada	ایالت متحده آمریکا	امریکا	AUGR
شیرین شهوار	ایران	آسیا	AISS	Floischmons	ایالت متحده آمریکا	امریکا	AUFL
زاغ عقد	ایران	آسیا	AIZH	Purple Heart	ایالت متحده آمریکا	امریکا	AUPU
پوست سیاه	ایران	آسیا	AIPO	American River	ایالت متحده آمریکا	امریکا	AUAM
بی هسته راور	ایران	آسیا	AIBR	Sweet	ایالت متحده آمریکا	امریکا	AUSW
شیشه کپ	ایران	آسیا	AISK	Hall	ایالت متحده آمریکا	امریکا	AUHA
انار شکری	ایران	آسیا	AIAS	Ever sweet	ایالت متحده آمریکا	امریکا	AUEV
کلباد	ایران	آسیا	AIKO	Elf	ایالت متحده آمریکا	امریکا	AUEL
گل به بهشهر	ایران	آسیا	AIGO	VKusnyi	ایالت متحده آمریکا	امریکا	AUVK
شیرین سفید زود رس	ایران	آسیا	AISF	Sakerdze	ایالت متحده آمریکا	امریکا	AUSA
Ganesh	هند	آسیا	AIGA	Wonderful	ایالت متحده آمریکا	امریکا	AUWO
Medoviy Vahsha	ترکمنستان	آسیا	ATME	Eve	ایالت متحده آمریکا	امریکا	AUEV

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای SSR مورد استفاده در این مطالعه (Soriano et al. 2011).

ردیف	جفت آغازگرها	توالی جفت آغازگرها ۳'→۵'	واحد تکراری	طول قطعه (bp)	محدوده قطعه (bp)	دمای اتصال (°C)
۱	PGCT001 FN677521	F:AGCTCCGATTGAGAGCAGAT R:TTGGAGCAATTGGAGAGAGA	(TC) ₁₈	۱۰۱	۱۲۰-۸۰	۵۹°C
۲	PGCT002 FN677522	F:AAACCCACCATCTCTCACTC R:CCTCTCTTCTCAGTACTCTCT	(CT) ₁₆	۱۱۶	۱۳۷-۹۶	۵۵°C
۳	PGCT005 FN677525	F:TCCGTGTGTGAAGAAGACCA R:GGTTTGGATTTCTTGGGTTTT	(CT) ₁₅	۱۱۷	۱۳۷-۹۶	۵۹°C
۴	PGCT017 FN677537	F:CCCCTAGTAAAGTCCACCT R:AGAGGTATTCGCAGGTTTTG	(CT) ₂₂	۱۷۶	۱۹۶-۱۵۶	۵۷°C
۵	PGCT019 FN677539	F:ACCCCTTAACCGGCCCC R:TCACCTCTAATGGCTTCCTC	(CT) ₁₀	۲۳۵	۲۵۴-۲۱۴	۵۷°C
۶	PGCT020 FN677540	F:TTCCCTTCGCTTTCACATC R:CCCGATCATTAATCCACAAA	(CT) ₁₅	۱۵۲	۱۷۲-۱۳۲	۵۹°C

جدول ۳- خلاصه آماری ۶ آغازگر SSR مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی ۵۰ ژنوتیپ انار

	Na	PIC	Rp	MI	Ne	I	h	Ho	He	F	PI	D
آغازگرها												
PGCT001	۳	۰/۴۶	۱/۱۳	۱/۸۵	۱/۷۸	۰/۶۲	۰/۴۳	۰/۲۰	۰/۷۹	۰/۸۲	۰/۲۶	۰/۸۳
PGCT002	۵	۰/۴۳	۱/۱۱	۱/۷۲	۱/۷۵	۰/۶۰	۰/۴۱	۰/۲۲	۰/۷۷	۰/۹۱	۰/۲۶	۰/۸۳
PGCT005	۴	۰/۲۸	۱/۶۳	۱/۱۵	۱/۸۸	۰/۶۵	۰/۴۶	۰/۱۵	۰/۹۶	۰/۹۷	۰/۰۹	۰/۹۰
PGCT017	۴	۰/۳۹	۱/۳۳	۱/۵۶	۱/۸۴	۰/۶۲	۰/۴۵	۰/۱۳	۰/۸۶	۰/۸۵	۰/۱۹	۰/۸۰
PGCT019	۴	۰/۳۸	۱/۱۱	۱/۱۵	۱/۶۹	۰/۵۹	۰/۵۰	۰/۲۵	۰/۷۴	۰/۸۳	۰/۲۷	۰/۷۲
PGCT020	۴	۰/۳۴	۱/۵۶	۱/۵۵	۱/۷۷	۰/۶۰	۰/۴۱	۰/۱۹	۰/۹۳	۰/۹۵	۰/۱۲	۰/۸۷
میانگین	۴	۰/۳۸	۱/۳۱	۱/۵۰	۱/۷۹	۰/۶۱	۰/۴۴	۰/۲۰	۰/۸۴	۰/۸۹	۰/۲۰	۰/۷۹

Na: تعداد آلل، PIC: محتوی اطلاعات چند شکلی، Rp: قدرت تفکیک نشانگر، MI: شاخص نشانگر، Ne: تعداد آلل‌های موثر

I: ایندکس شانون، H: شاخص تنوع ژنتیکی نای، Ho: هتروزیگوسیتی مشاهده شده، He: هتروزیگوسیتی قابل انتظار، F: شاخص تثبیت ژنی، PI: احتمال یکسانی، D: قدرت تفکیک کنندگی

جدول ۴- پارامترهای تنوع ژنتیکی در بین سه جمعیت انار توسط ۶ آغازگر SSR

جمعیت	تعداد نمونه	فراوانی آلل‌ها	P%	Na	Ne	Ne/Na	h	I	He	F
آسیایی	۳۵	۰/۶۷	۱۰۰	۲	۱/۸۲	۰/۹۵	۰/۴۴	۰/۶۳	۰/۴۴	-۰/۲۸
آمریکایی	۱۵	۰/۶۲	۹۵/۸۳	۱/۹۵	۱/۶۹	۰/۸۶	۰/۴۳	۰/۶۲	۰/۳۸	-۰/۱۲
جمعیت کل	۵۰	۱/۲۹	-	۴/۸۷	۳/۹۵	۱/۷۷	۰/۸۷	۱/۲۵	۰/۸۲	-۰/۴۰
میانگین	۲۵	۰/۶۲	۹۷/۹۱	۱/۷۱	۱/۹۷	۰/۸۸	۰/۴۳	۰/۶۲	۰/۴۱	-۰/۳۴

شاخص‌های درصد چند شکلی آلی، تنوع آلی، شاخص تنوع ژنی نای (h)، ایندکس شانون (I)، ضریب تشابه نی (Nei and Li 1979) جهت بررسی تنوع ژنتیکی بین و درون جمعیت‌های انار با استفاده از نرم‌افزار GenAleX6.5 انجام شد.

از نرم‌افزار POPGEN 1.32 جهت محاسبه میانگین تنوع ژنی کل (Ht)، میانگین تنوع ژنی در داخل جمعیت (Hs)، تنوع ژنی در بین جمعیت‌ها (GST) و جریان ژنی (Nm) همچنین جهت مطالعه گروه‌بندی جمعیت‌ها مورد استفاده قرار گرفت (Yeh et al. 1999). تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) (Peakall and Smouse 2006) و همچنین بررسی ارتباط بین فاصله ژنتیکی و فاصله جغرافیایی (تست متل) جمعیت‌های مورد مطالعه به‌وسیله نرم‌افزار GenAleX6.5 انجام گرفت. خوشه‌بندی داده‌ها با استفاده از تجزیه و تحلیل مختصات اصلی (PCoA) با استفاده از نرم‌افزار GenAleX6.5 و NTSYS Ver.2.02e (Rohlf 1998) انجام گرفت.

نتایج

در بررسی روابط ژنتیکی ۵۰ ژنوتیپ انار با استفاده از ۶ جفت آغازگر SSR، در مجموع ۲۴ آلل چند شکل شناسایی شد. در بین ۶ جفت آغازگر، آغازگر PGCT002 بیشترین (۵ مکان ژنی) و

آغازگر PGCT001 کمترین (۳ مکان ژنی) تعداد مکان را تولید کردند. میانگین محتوی اطلاعات چند شکلی در آغازگرهای مورد بررسی ۰/۳۸ بود و بیشترین میزان این شاخص (۰/۴۶) در آغازگر PGCT001 به‌دست آمد. دامنه قدرت تفکیک نشانگر از ۱/۱۱ در آغازگرهای PGCT002، PGCT019 تا ۱/۶۳ در آغازگر PGCT005 متغیر بود. مقادیر محاسبه شده شاخص نشانگر در آغازگرهای مورد مطالعه در محدوده ۱/۱۵ تا ۱/۸۷ بود. بیشترین میزان شاخص نشانگر برای آغازگر PGCT001 و کمترین آن برای آغازگر PGCT005 محاسبه شد. تعداد آلل‌های مؤثر در مکان‌های ژنی از ۱/۶۹ برای آغازگر PGCT019 تا ۱/۸۸ برای آغازگر PGCT005 با میانگین ۱/۷۹ متفاوت بود. ایندکس شانون در محدوده بین ۰/۵۶ تا ۰/۶۵ با میانگین ۰/۶۱ در بین مکان‌های ژنی متغیر بود. کمترین میزان شاخص تنوع ژنتیکی نای در آغازگرهای PGCT002، PGCT020 و بیشترین میزان در آغازگر PGCT019 محاسبه شد. میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده نیز بین ۰/۱۵ در مکان ژنی PGCT005 تا ۰/۲۵ در مکان ژنی PGCT019 با میانگین ۰/۲۰ متغیر بود. میزان هتروزیگوسیتی قابل انتظار در محدوده ۰/۷۴ تا ۰/۹۳ با میانگین ۰/۸۴ بود که بیشترین و کمترین میزان هتروزیگوسیتی مورد انتظار به‌ترتیب در آغازگرهای PGCT019 و

PGCT020 مشاهده شد.

شاخص تثبیت ژنی در محدوده ۰/۸۲ تا ۰/۹۷ در ژنوتیپ‌های انار متغیر بود میانگین احتمال یکسانی برای کل مکان‌های ژنی برابر ۰/۲۰ بود. بیشترین مقدار این شاخص (۰/۲۷) در آغازگر PGCT019 و کمترین (۰/۰۹) در آغازگر PGCT005 مشاهده شد. بیشترین میزان قدرت تفکیک کنندگی آغازگر ۰/۹۰ مربوط به آغازگر PGCT005 و کمترین میزان آن ۰/۷۲ مربوط به آغازگر PGCT019 ثبت شد (جدول ۳).

بررسی تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های مختلف انار

میانگین فراوانی آلل‌ها در ژنوتیپ‌های آسیایی و آمریکایی به ترتیب ۰/۶۷ و ۰/۶۲ بود. درصد مکان‌های ژنی چند شکل (P) در جمعیت‌های انار متفاوت بود، به طوری که بیشترین آن به جمعیت آسیایی و کمترین آن به جمعیت آمریکایی اختصاص داشت. ژنوتیپ‌های آسیایی با میانگین ۲ آلل و ژنوتیپ‌های آمریکایی با میانگین ۱/۹۵ آلل به ترتیب بالاترین و پایین‌ترین تنوع آللی (Na)

را به ازاء هر مکان ژنی داشتند. تعداد آلل مؤثر در ژنوتیپ‌های آسیایی ۱/۸۲ و در ژنوتیپ‌های آمریکایی ۱/۶۹ بود. بالاترین میزان نسبت تعداد آلل‌های مؤثر به تعداد آلل‌های مشاهده شده بین ۰/۸۶ تا ۰/۹۵ و با میانگین ۰/۸۸ متغیر بود. میانگین شاخص تنوع ژنتیکی نای و ایندکس شانون در سطح جمعیت‌ها به ترتیب ۰/۴۳ و ۰/۶۲ بود. بالاترین میزان هتروزیگوسیتی قابل انتظار (۰/۴۴) در ژنوتیپ‌های آسیایی مشاهده شد (جدول ۴). براساس نتایج به دست آمده در جمعیت‌های مورد مطالعه هیچ باند اختصاصی که حداقل در ۲۵ درصد از ژنوتیپ‌ها وجود داشته باشد مشاهده نشد (نتایج آورده نشده است). بررسی سایر پارمترهای آماری از جمله Gst و Nm برای ۲۴ آلل به دست آمده از تجزیه و تحلیل شش آغازگر SSR نشان داد که اکثر آن‌ها قابلیت تشخیص بسیار خوبی دارند و می‌تواند جمعیت‌های مورد مطالعه را از یکدیگر تفکیک کنند (جدول ۵).

جدول ۵- قدرت تمایز آلل‌های به دست آمده از ۶ آغازگر SSR در جمعیت‌های انار مورد مطالعه

آلل	تعداد نمونه	Ht	Hs	Gst	Nm
Allele 1	۵۲	۰/۴۶	۰/۴۵	۰/۰۲	۲۲/۹۷
Allele 2	۵۲	۰/۴۹	۰/۲۷	۰/۴۴	۰/۶۱
Allele 3	۵۲	۰/۱۳	۰/۱۳	۰/۵۸	۰/۱۰
Allele 4	۵۲	۰/۳۸	۰/۳۱	۰/۱۷	۲/۳۰
Allele 5	۵۲	۰/۴۱	۰/۳۲	۰/۲۱	۱/۸۵
Allele 6	۵۲	۰/۳۵	۰/۲۹	۰/۱۸	۲/۱۷
Allele 7	۵۲	۰/۳۷	۰/۲۹	۰/۲۰	۱/۹۲
Allele 8	۵۲	۰/۱۰	۰/۰۹	۰/۱۱	۱/۶۸
Allele 9	۵۲	۰/۴۸	۰/۴۶	۰/۰۴	۱۰/۳۱
Allele 10	۵۲	۰/۴۰	۰/۳۱	۰/۲۲	۱/۷۲
Allele 11	۵۲	۰/۳۵	۰/۲۸	۰/۱۸	۲/۱۴
Allele 12	۵۲	۰/۴۱	۰/۳۲	۰/۲۱	۱/۸۵
Allele 13	۵۲	۰/۳۷	۰/۳۱	۰/۱۶	۲/۵۳
Allele 14	۵۲	۰/۴۸	۰/۳۱	۰/۳۴	۰/۹۵
Allele 15	۵۲	۰/۴۹	۰/۲۴	۰/۱۴	۲/۸۵
Allele 16	۵۲	۰/۲۵	۰/۲۲	۰/۱۲	۳/۶۳
Allele 17	۵۲	۰/۲۹	۰/۲۵	۰/۱۳	۳/۱۴
Allele 18	۵۲	۰/۴۶	۰/۳۲	۰/۲۸	۱/۲۴
Allele 19	۵۲	۰/۳۵	۰/۳۲	۰/۰۷	۶/۳۴
Allele 20	۵۲	۰/۴۵	۰/۴۵	۰/۰۰۷	۶۴/۹۸
Allele 21	۵۲	۰/۴۸	۰/۳۱	۰/۳۵	۰/۹۱
Allele 22	۵۲	۰/۲۷	۰/۲۲	۰/۱۷	۲/۴۱
Allele 23	۵۲	۰/۴۴	۰/۳۲	۰/۲۶	۱/۳۷
Allele 24	۵۲	۰/۲۸	۰/۲۴	۰/۱۲	۳/۴۹
میانگین	۵۲	۰/۳۷	۰/۲۹	۰/۲۰	۶/۰۶

بررسی تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های مختلف انار

میانگین فراوانی آلل‌ها در ژنوتیپ‌های آسیایی و آمریکایی به ترتیب ۰/۶۷ و ۰/۶۲ بود. درصد مکان‌های ژنی چند شکل (P) در جمعیت‌های انار متفاوت بود، به طوری که بیشترین آن به جمعیت آسیایی و کمترین آن به جمعیت آمریکایی اختصاص داشت. ژنوتیپ‌های آسیایی با میانگین ۲ آلل و ژنوتیپ‌های آمریکایی با میانگین ۱/۹۵ آلل به ترتیب بالاترین و پایین‌ترین تنوع آللی (Na) را به ازاء هر مکان ژنی داشتند. تعداد آلل مؤثر در ژنوتیپ‌های آسیایی ۱/۸۲ و در ژنوتیپ‌های آمریکایی ۱/۶۹ بود. بالاترین میزان نسبت تعداد آلل‌های مؤثر به تعداد آلل‌های مشاهده شده بین ۰/۸۶ تا ۰/۹۵ و با میانگین ۰/۸۸ متغیر بود. میانگین شاخص تنوع ژنتیکی نای و ایندکس شانون در سطح جمعیت‌ها به ترتیب ۰/۴۳ و ۰/۶۲ بود. بالاترین میزان هتروزیگوسیتی قابل انتظار (۰/۴۴) در ژنوتیپ‌های آسیایی مشاهده شد (جدول ۴). براساس نتایج به دست آمده در جمعیت‌های مورد مطالعه هیچ باند اختصاصی که حداقل در ۲۵ درصد از ژنوتیپ‌ها وجود داشته باشد مشاهده نشد (نتایج آورده نشده است). بررسی سایر پارامترهای آماری از جمله *Gst* و *Nm* برای ۲۴ آلل به دست آمده از تجزیه و تحلیل شش آغازگر *SSR* نشان داد که اکثر آن‌ها قابلیت تشخیص بسیار خوبی دارند و می‌تواند جمعیت‌های مورد مطالعه را از یکدیگر تفکیک کنند (جدول ۵)

تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA)

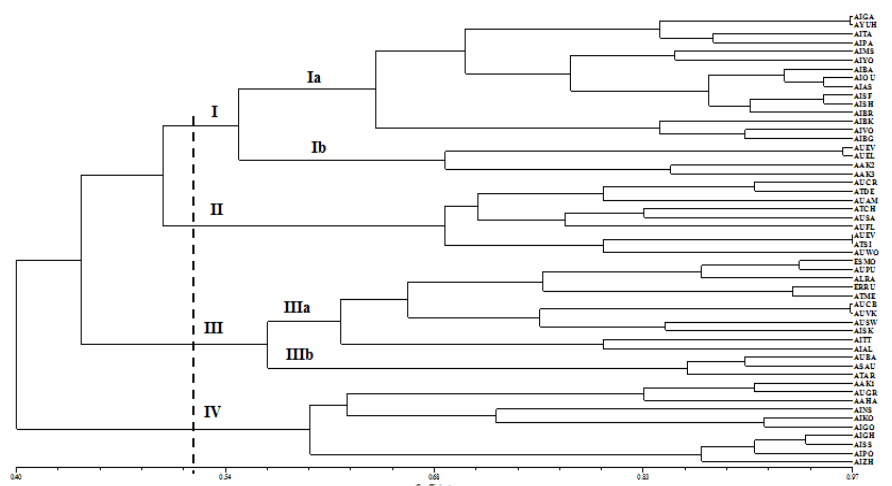
براساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مولکولی (AMOVA) میزان تنوع ژنتیکی کل جمعیت‌های مورد مطالعه ۴/۷۹ بود که از این میزان ۴٪ آن مربوط به تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها و ۹۶٪ مربوط به تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها بود (جدول ۶). نتایج حاصل از بررسی فواصل *FST* بین جمعیت‌ها نشان داد که تمایز ژنتیکی اندک ($FST = 0.015$) و جریان ژنی بالایی (۱۶/۹۴) بین ژنوتیپ‌های متعلق به جمعیت‌های آسیایی و آمریکایی مشاهده شد. تجزیه خوشه‌ای و بررسی روابط ژنتیکی بین جمعیت‌ها و ژنوتیپ‌های مختلف انار

فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های مورد بررسی براساس برآورد *Unbiased* و فاصله ژنتیکی *Nei* محاسبه شد. براساس ضریب تشابه

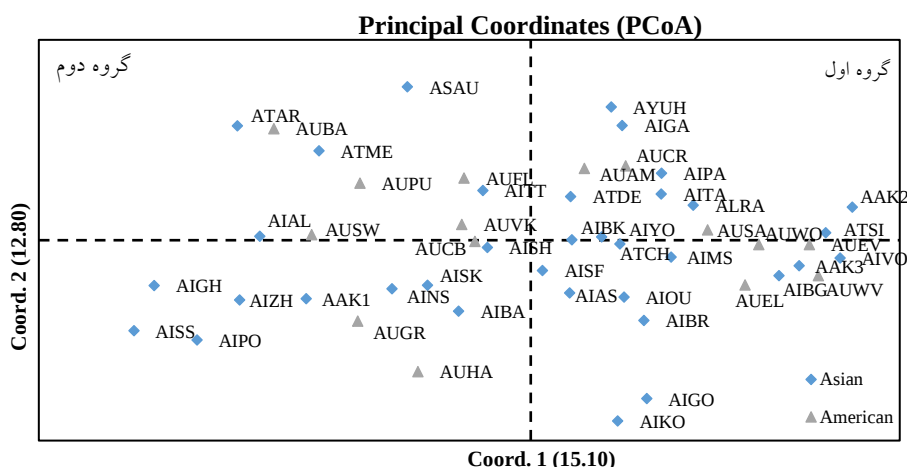
ژنتیکی نی، دو جمعیت مورد مطالعه دارای شباهت ژنتیکی نسبتاً بالایی بین (۰/۹۵) بودند. فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های آسیا و آمریکا ۰/۰۴۵ درصد مشاهده شد. خوشه‌بندی جمعیت‌های مختلف انار به روش COMPLETE و با استفاده از ضریب تشابه Dice صورت پذیرفت. تجزیه خوشه‌ای توانست ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را تا حدودی براساس منشأ جغرافیایی تقسیم‌بندی نماید. براساس نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های مورد بررسی به چهار گروه اصلی تقسیم شدند (شکل ۱). گروه اول اکثر ژنوتیپ‌های آسیایی و دو ژنوتیپ از کشور آمریکا را شامل شد. گروه اول به دو زیر گروه تقسیم شد. زیر گروه اول شامل اکثر ژنوتیپ‌های ایرانی به همراه ژنوتیپ‌های از کشور هند و یمن بود. در این زیر گروه دو ژنوتیپ *Ganesh* و *Unknown* به ترتیب از کشور هند و یمن بیشترین تشابه ژنتیکی را با یکدیگر داشتند. بین ژنوتیپ‌های ایرانی یوسف خانی با اشکذر، شیرین سفید زودرس با شیرین زودرس از نظر ژنتیکی تشابه زیادی با یکدیگر داشتند. زیر گروه دوم نیز ژنوتیپ‌های از کشور آمریکا در کنار ژنوتیپ‌های از کشور افغانستان (قندهار ۲ و ۳) دسته‌بندی شدند. گروه دوم ژنوتیپ‌های از کشور ترکمنستان شامل *Desertnyi*، *Cheranaya Roza* و *Sirenevyi* با ژنوتیپ‌های از کشور آمریکا دسته‌بندی شدند. ژنوتیپ *Sirenevyi* از کشور ترکمنستان در کنار ژنوتیپ *Eve* از آمریکا واقع شد که از نظر ژنتیکی تشابه بالایی با یکدیگر داشتند. گروه سوم شامل دیگر ژنوتیپ‌هایی آمریکا که در کنار ژنوتیپ‌های آسیایی شامل ایران، ترکمنستان، لبنان و سوریه با هم دسته‌بندی شدند. این گروه نیز به دو زیر گروه تقسیم بندی شد. در زیر گروه اول دو ژنوتیپ آمریکایی *Cranberry* و *VKusnyi* از نظر ژنتیکی تشابه زیادی با یکدیگر داشتند. در زیر گروه دوم ژنوتیپی از کشور آمریکا (*Balegal*) با ژنوتیپی از کشور سوریه (*Austin*) و ترکمنستان (*Ariana*) دسته‌بندی شدند. در گروه چهارم ژنوتیپ‌های آسیایی منشأ گرفته از کشور ایران و افغانستان به همراه دو ژنوتیپ از کشور آمریکا (*Hall*, *Granada*) در کنار یکدیگر دسته‌بندی شدند. در این زیر گروه بیشترین تشابه ژنتیکی مربوط به ژنوتیپ‌های قوچاق قم و شیرین شهوار از کشور ایران بود. جهت تعیین تجزیه به بردارهای اصلی (PCoA) از فاصله ژنتیکی استفاده شد. دو محور اصلی ۲۷/۹۰ درصد از واریانس تجمعی را توجیه

کردند. بردارهای اصلی اول و دوم به ترتیب ۱۵/۱۰ و ۱۲/۸۰ درصد از تغییرات کل را به خود اختصاص دادند و توانسته‌اند ۵۰ ژنوتیپ انار مورد بررسی را در دو گروه اصلی تقسیم‌بندی کنند (شکل ۲). گروه اول ژنوتیپ‌ها با منشاء ایرانی در کنار ژنوتیپی از کشور هند،

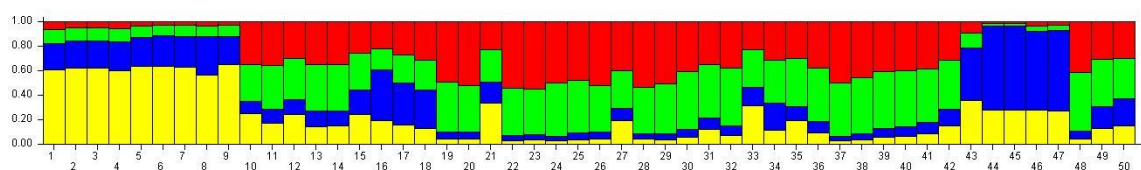
لبنان، یمن، ترکمنستان، افغانستان و چند ژنوتیپ از کشور آمریکا در کنار یکدیگر واقع شدند. در گروه دوم نیز ژنوتیپ‌های آسیایی شامل ژنوتیپ‌های از کشور افغانستان، ترکمنستان، سوریه و ژنوتیپ‌های در کنار یکدیگر قرار گرفتند.



شکل ۱- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌های انار به روش COMPLETE و با استفاده از ضریب تشابه Dice
حرف اول: نام قاره، حرف دوم: نام کشور مبدأ، حرف سوم: نام رقم به اختصار



شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای جمعیت‌های مختلف انار به روش COMPLETE و با استفاده از ضریب تشابه Dice.
حرف اول: نام قاره، حرف دوم: نام کشور مبدأ، حرف سوم: نام رقم به اختصار



شکل ۳- تجزیه کلاستر مبتنی بر مدل Bayesian برای ۵۰ ژنوتیپ انار با ۶ آغازگر SSR

آنالیز ساختاری بین ژنوتیپ‌های مختلف انار

براساس نتایج حاصل، متحمل‌ترین تعداد گروه‌های ژنتیکی $k=4$ در ژرم پلاسما مورد مطالعه در آغازگر SSR شناسایی شد. در بار پلات به‌دست آمده از تجزیه نشانگر SSR تمامی ژنوتیپ‌ها به‌عنوان ژنوتیپ مخلوط شناسایی شدند (شکل ۳).

بحث

ارزیابی ذخایر ژنتیکی گیاهی که از احتمال بالایی برای بیان ژن‌های مفید برخوردار می‌باشند از پیش نیازهای ضروری برای برنامه‌ریزی در جهت بهره‌برداری و حفاظت و پایدار از آنها است. نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر نشان داد که آغازگر SSR می‌تواند با موفقیت تنوع بین ژرم پلاسماهای انار را شناسایی کند که با نتایج پژوهش‌های قبلی (Basaki et al. 2016; Hasnaoui et al. 2010; Zarei and Sahraroo 2018; 2010) مطابقت دارد. میانگین تعداد آلل در هر جایگاه ژنی ۴ بود. این نتایج نشان دهنده بالا بودن سطح پلی‌مورفیسم در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با آغازگر فوق می‌باشد. نتایج به‌دست آمده قابل مقایسه با گزارشات (Zarei and Sahraroo 2012) و (Parvaresh et al. 2012) بر روی ژنوتیپ‌های انار ایران (به‌ترتیب ۲/۹۴ و ۳/۱۷ آلل در هر مکان ژنی) و (Raina et al. 2010) بر روی ژنوتیپ‌های انار تونس (۳/۰۷ آلل در هر مکان ژنی) می‌باشد. (Hasnaoui et al. 2010) بیان کردند که غنای آللی می‌تواند تحت تاثیر اندازه جمعیت، نوع ارقام مورد بررسی و نوع آغازگر قرار گیرد. در این پژوهش میانگین PIC و MI آغازگرها به‌ترتیب ۰/۳۸ و ۱/۵۰ بود. در پژوهش‌های پیشین میزان PIC گزارش شده بر روی ژنوتیپ‌های انار از ایران ۰/۴۳ (Pirseyedi et al. 2010)، تونس ۰/۲۳ (Hasnaoui et al. 2012)، هند ۰/۴۳ (Raina et al. 2013) و ایتالیا ۰/۲۳ (Curro et al. 2010) گزارش شده است. علت پایین بودن میزان PIC در این پژوهش و سایر پژوهش‌ها ممکن است به‌دلیل انتخاب‌های ژنوتیپ‌های اولیه برتر انار در دراز مدت و تکثیر رویشی آنها باشد. نتایج مشابهی توسط سایر پژوهشگران گزارش شده است (Ebrahimi et al. 2010; 2012; Noormohammadi et al. 2012; Pirseyedi et al. 2010) که عنوان کردند باریک شدن خزانه ژنی ژنوتیپ‌های گیاهانی که به روش رویشی تکثیر می‌شوند ممکن است علت کاهش PIC در

بررسی‌های مولکولی باشد (Soriano et al. 2011). از ۶ مکان ژنی ریز ماهواره‌ای، دو آغازگر PGCT001 و PGCT002 بیش‌ترین محتوی اطلاعات چند شکلی و قدرت آغازگر را به خود اختصاص دادند. بنابراین این دو آغازگر از کارایی بالایی در تفکیک ژنوتیپ‌ها نسبت به سایر آغازگرها داشتند بنابراین می‌توان از این دو آغازگر در بررسی تنوع ژنتیکی، نقشه برداری ژنتیکی و مطالعات به‌نژادی ژنوتیپ‌های مختلف انار استفاده کرد. در این پژوهش تعداد آلل‌های مؤثر کمتر از کل آلل‌ها بود که نشان دهنده مشارکت تعداد آلل کمتر در ایجاد تنوع ژنوتیپ‌های انارهای مورد مطالعه می‌باشد. میانگین ایندکس شانون ۰/۶۱ برآورد شد و از نظر شاخص تعداد آلل‌های مؤثر و ایندکس شانون مشاهده شد که آغازگر PGCT005 و PGCT019 به‌ترتیب بیشترین و کمترین مقدار را در بین آغازگرها مورد مطالعه داشته‌اند. با توجه به اینکه تعداد آلل‌های مؤثر و ایندکس شانون با میزان تنوع ژنتیکی رابطه مستقیم دارند، می‌توان نتیجه گرفت که آغازگر PGCT005 بیشترین تنوع ژنتیکی را نسبت به سایر آغازگرها نشان داده است که می‌توان از این آغازگر در پژوهش‌های آتی جهت انتخاب ژنوتیپ‌ها در برنامه‌های به‌نژادی انار استفاده شود. میانگین هتروزیگوسیتی قابل انتظار و هتروزیگوسیتی مشاهده به‌ترتیب ۰/۸۴ و ۰/۲۰ بود. این اختلاف در هتروزیگوسیتی می‌تواند ناشی از تغییر در توزیع فراوانی آللی باشد. همان‌طورکه انتظار می‌رود مکان‌های ژنی با تعداد آلل کمتر تمایل به هتروزیگوسیتی کمتری دارند. برای تمام مکان‌های ژنی میزان هتروزیگوسیتی قابل انتظار بیشتر از میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده بود که نشان دهنده کمبود هتروزیگوت در میان مکان‌های ژنی است که می‌تواند ناشی از کوچک بودن جمعیت‌های مورد مطالعه (Patil et al. 2020) و همچنین مکانیزم گرده افشانی و تکثیر رویشی انار (Hasnaoui et al. 2010) باشد که نتایج فوق با نتایج Sinjare (2015) و (Pirseyedi et al. 2012)، Raina et al. (2031) مطابقت دارد.

براساس نتایج پژوهش فوق، شاخص‌های تنوع محاسبه شده برای جمعیت‌های مورد مطالعه انار پایین بود. با توجه به اینکه در دراز مدت ژنوتیپ‌های انار با فوتیپ برتر از طریق قلمه تکثیر شده‌اند می‌توان آن را دلیلی بر پایین بودن شاخص تنوع در این پژوهش بیان کرد (Noormohammadi et al. 2012). انتخاب درختان با

ویژگی‌های مورفولوژیکی برتر اثر مخرب بیشتری از انتخاب تصادفی بر ساختار ژنتیکی دارد. تغییر ساختار ژنتیکی در نتیجه حذف انتخابی ژن‌های خاص، تغییر فراوانی آلی یا ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها است (Namkoong et al. 2000). بنابراین انتخاب تعداد محدودی درخت براساس ویژگی‌های بارز مورفولوژیکی می‌تواند در دراز مدت منجر به فرسایش ژنتیکی جمعیت‌ها شود. بنابراین فراوانی ژنی و تنوع ژنتیکی آن‌ها رو به کاهش می‌رود (Finkeldey and Ziehe 2004). این مسئله از میزان شاخص تنوع ژنی در میان جمعیت‌های مورد بررسی نیز به‌خوبی قابل استنباط می‌باشد. بیشترین میزان هتروزیگوسیتی مشاهده شده در جمعیت آسیایی مشاهده شد. آسیای میانه، به‌ویژه بخش‌های از ایران، افغانستان و هند خاستگاه اولیه انار محسوب می‌شود و دارای ارقام متنوعی از انار می‌باشند که در محدوده جغرافیایی وسیع‌تری مورد کشت و کار قرار گرفته‌اند (Sarkhosh et al. 2009). در این پژوهش با کاهش میزان F_{st} مقدار N_m افزایش یافت. میزان جریان ژنی بالا می‌تواند دلیلی بر وجود منشاء مشترک بین ژنوتیپ‌ها، پراکنش و مهاجرت آنها توسط انسان باشد (Patil et al. 2018). جریان ژنی بالای بین جمعیت‌های آسیای و آمریکایی مشاهده شد که می‌تواند دلیلی بر منشاء آسیایی ارقام انار آمریکا باشد که در دراز مدت از آسیا به عنوان مخزن ژنی اولیه به آمریکا وارد شده است. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های مولکولی (AMOVA) و آزمون F_{st} نشان داد که سطح بالایی از تنوع ژنتیکی درون جمعیت‌ها (۹۶٪) وجود دارد که می‌تواند دلیلی بر وجود مخزن ژنی اولیه انار در آسیا باشد. فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های آسیایی و آمریکایی اندک بود. انجام تلاقی بین این چنین جمعیت‌های که فاصله ژنتیکی کمتری دارند کارایی کمتری در زمینه تولید ارقام هیبرید و نیز تشکیل جمعیت‌های در حال تفرق خواهند داشت (Popi et al. 2000).

با توجه به نتایج پژوهش حاضر به‌نظر می‌رسد تنوع ژنتیکی ارقام انار به‌طور کامل تابعی از تنوع جغرافیایی نمی‌باشد که دلیل آن می‌تواند به‌دلیل معرفی ژنوتیپ‌های انار از کشورهای آسیایی به سایر نقاط جهان باشد. گزارش شده است که ارقام *Sirenevyi*، *Ariana* و *Medovyi Vahsha* توسط دکتر Gregory از کشور ترکمنستان وارد آمریکا شده و احتمالاً با نام جدید مورد کشت و

کار قرار گرفته‌اند (Volk and Preece 2021). یکی از دلایل دیگر آن ممکن است عدم شناخت منشأ دقیق گیاه باشد. بدین ترتیب این فرضیه تقویت می‌شود که ممکن است انتقال احتمالی ژنوتیپ‌های انار از کشوری به کشور دیگر بر پایه خصوصیات مورفولوژیکی باشد که این امر لزوم دقت در هنگام نام‌گذاری ژنوتیپ‌ها و همچنین لزوم استفاده همزمان از اطلاعات مولکولی و مورفولوژیکی را آشکار می‌سازد. عدم پوشش کافی ژنوم انار با آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش می‌تواند عامل دیگر عدم مشاهده رابطه مشخص بین ژنوتیپ‌های هر گروه بر اساس تقسیم‌بندی جغرافیایی باشد که لزوم استفاده از آغازگرهای که سطح بیشتری از ژنوم را پوشش دهند در این زمینه توصیه می‌شود. عنوان شده است که عدم تطابق کامل تنوع مولکولی با تنوع جغرافیایی جمعیت‌های انار به‌دلیل جابه‌جایی ژرم پلاسمی است که یکی از ویژگی‌های ژنوتیپ‌های انار می‌باشد (Narzary et al. 2009). نتایج مشابه به‌وسیله (Patil et al. 2020)، (Yuan et al. 2018)، (Luo et al. 2009) و Narzary et al. در جمعیت‌های مختلف انار گزارش شده است که نشان دهنده آن است که چندان الگوی مشخصی در تفکیک ژنوتیپ‌ها با توجه به منطقه جغرافیایی مشاهده نشده است. ضریب کوفتیک در این مطالعه $r=0.94$ بود که نشان داد که بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های انار به‌وسیله آغازگر SSR و ترکیب ضریب فاصله Dice و الگوریتم COMPLETE بهترین نتیجه را در پی دارد و همچنین صحت گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها را نشان می‌دهد. در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی، ژنوتیپ‌های ایرانی از تنوع ژنتیکی بالاتری نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها برخوردار بودند. این تنوع ژنتیکی بالا در بین ژنوتیپ‌های آسیایی امکان سازگاری آن‌ها را با شرایط اقلیمی فراهم ساخته است. در بین ژنوتیپ‌های ایرانی یوسف خانی با اشکذر، شیرین سفید زودرس با شیرین زودرس از نظر ژنتیکی تشابه زیادی با یکدیگر داشتند. تبادل ژرم پلاسم‌ها براساس صفات مورفولوژیکی بین استان‌های مختلف ایران ممکن است سبب اشتباهاتی در نام‌گذاری شود که این امر لزوم استفاده همزمان از اطلاعات مولکولی و مورفولوژیکی را آشکار می‌سازد. رابطه ژنتیکی قوی بین ژنوتیپ‌های آمریکایی و ژنوتیپ‌های ترکمنستان مشاهده شد. قرارگیری ارقام مختلف با منشأ جغرافیایی متفاوت در یک گروه به عواملی همچون فرایند

است که می‌توان در مدیریت و حفاظت ژرمپلاس و به‌عنوان یک روش به‌نژادی در انار واقع شود. جهت جلوگیری از فرسایش ژنتیکی حفاظت از جمعیت‌ها ضروری است لذا ایجاد تلاقی بین ژنوتیپ‌های که به‌طور ژنتیکی متفاوتند و یا ژنوتیپ‌ها با منشأ متفاوت لازم به نظر می‌رسد. در نهایت می‌توان بیان کرد که آغازگر SSR از توانای مطلوب برای مطالعه ساختار و تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های انار برخوردار می‌باشد و لذا توصیه می‌شود که از این داده‌های مولکولی به‌عنوان مکمل جهت استفاده مناسب و کارآمد در برنامه‌های اصلاحی این گیاه به‌خصوص برنامه‌های گزینش و هیبریداسیون جهت تهیه ارقام هیبرید و یا جمعیت‌های مورد نیاز برای ترسیم نقشه‌های لینکاژی و همچنین توالی‌یابی باندهای اختصاصی استفاده شود. از طرفی با توجه به هزینه‌های بالای نگهداری ارقام در بانک‌های ژن، پیشنهاد می‌شود که ارقامی که تشابه ژنتیکی زیادی دارند حذف شوند و ارقام با فاصله ژنتیکی بیشتر وارد بانک ژن شوند.

منابع

- Basaki T, Khayam Nekouei, M, Choukanand R, Mardi M (2016) Evaluation of Iranian pomegranate collection using simple sequence repeat and morphological traits. *Crop Breeding Journal* 67:78.
- Belaj A, Munoz-Diez C, Baldoni L, Satovic Z, Barranco D (2010) Genetic diversity and relationships of wild and cultivated olives at regional level in Spain. *Scientia Horticulturae* 124:323-330.
- Curro S, Caruso M, Distefano G, Gentile A, La Malfa S (2010) New microsatellite loci for pomegranate, *Punica granatum* (Lythraceae). *American Journal of Botany* 97:58-60
- Ebrahimi S, Sayed-Tabatabaei BE, Sharifnabi B (2010) Microsatellite isolation and characterization in pomegranate (*Punica granatum* L.). *Iranian Journal of Biotechnology* 8:156-163 (In Farsi).
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14:2611-2620.
- Finkeldey R, Ziehe M (2004) Genetic implications of silvicultural regimes. *Forest Ecology and Management* 197:231-244.
- Giancaspro A, Mazzeo A, Giove LS, Zito D, Marcotuli I, Gallotta A, Colasuonno P, Nigro D, Blanco A, Aradhya M, Gadaleta A, Ferrara G (2017) Exploiting DNA-based molecular tools to assess genetic diversity in pomegranate (*Punica granatum* L.) selections and cultivars. *International*

Journal of Tropical and Subtropical Horticulture 72(5): 292-305.

Hasnaoui N, Mars M, Chibani J, Trifi M (2010) Molecular polymorphisms in Tunisian pomegranate (*Punica granatum* L.) as revealed by RAPD fingerprints. *Journal Diversity* 2:107-114.

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

Karimi HR, Mirdehghan SH (2013) Correlation between the morphological characters of pomegranate (*Punica granatum*) traits and their implications for breeding. *Turkish Journal of Botany* 37:355-362.

Karimi HR, Biniyaz N, Mohammadi Mirik AA, Esmaeilizade M, Hatamean Z (2023) Effect of Rootstock and Scion on Nutrient Uptake of Two Pomegranate Cultivars Rabab-e-Neyriz and Khafr-e-Jahrom. *Journal of Horticultural Science* 56:791-802 (In Farsi).

Koehmstedt AM, Aradhya MK, Soleri D, Smith JL, Polito VS (2011) Molecular characterization of genetic diversity, structure, and differentiation in the olive (*Olea europaea* L.) germplasm collection of the United States Department of Agriculture. *Genetic Resources and Crop Evolution* 58: 519-531.

Luo X, Cao S, Hao Z, Hou L, Cao D, Zhang J, Li H, Niu J, Xue H, Chen L (2018) Analysis of genetic structure in a

نتیجه‌گیری کلی

سطح تنوع ژنتیکی یک گونه می‌تواند به طول چرخه زندگی، روش‌های تکثیر، محدوده جغرافیایی و جریان ژن بستگی داشته باشد. در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی ژنوتیپ‌های ایرانی از تنوع بالاتری برخوردار بودند. به‌نظر می‌رسد این ژنوتیپ‌ها در طول دوره تکاملی و سازگاری به مناطق رشدی خود از نظر برخی از ژن‌ها و حتی آلل‌ها دستخوش تغییرات ژنتیکی شده‌اند و به موازات آن تنوع آللی در ژنوتیپ‌ها افزایش یافته است. تنوع ژنتیکی بالا سبب ایجاد مقاومت بیشتر به شرایط نامساعد محیطی در این ژنوتیپ‌ها شده

- large sample of pomegranate (*Punica granatum* L.) using fluorescent SSR markers. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 93(6):1-7.
- Mir MM, Sofi AA, Singh DB, Khan FU (2007) Evaluation of pomegranate cultivars under temperate conditions of Kashmir Valley. Indian Journal Horticulture 64:150-154.
- Morris J (2007). A molecular phylogeny of the Lythraceae and inference of the evolution of heterostyly. Ph.D. thesis. Kent State University, Ohio.
- Moradi Ashour B, Shiran B, Hooshmand S (2019) Evaluation of Genetic Variation and Heritability of Some Fruit Traits in Pomegranate Genotypes. Journal of Horticultural Science 32(4):555-566 (In Farsi)
- Mousavi Deraz Mahalle SM, Zeynalabedini M, Marashi SH (2013) The Survey of Genetic Diversity & Population Structure Analysis of Iranian Sweet Pomegranate (*Punica granatum* L.) Germplasm Using SSR Markers. Agricultural Biotechnology Journal 5(4):137-150 (In Farsi)
- Murry M, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8:4321-4325.
- Namkoong G, Koshy, MP, Aitken S (2000) Selection. In: Young A, Boshier D and Boyle T, (Eds.). Forest Conservation Genetics: Principles and Practice. CSIRO and CABI, Collingwood pp, 101-111.
- 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.
- Nei M, Li W (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 76:5269-5273.
- Noormohammadi Z, Fasihee A, Homaei-Rashidpoor S, Sheidai M, Ghasemzadeh Baraki S, Mazooji A, Tabatabaee-Ardakani Z (2012) Genetic variation among Iranian pomegranates (*Punica granatum* L.) using RAPD, ISSR and SSR markers. Australian Journal of Crop Science 6:268-275
- Parvareh 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.
- Patil PG, Singh NV, Parashuram S, Bohra A, Mundewadikar DM, Sangnure VR, Babu KD, Jyotsana S (2020) Genome wide identification, characterization and validation of novel miRNA- based SSR markers in pomegranate (*Punica granatum* L.). Physiology and Molecular Biology of Plants 26:683-696.
- Peakall R, Smouse PE, Huff DR (1995) Evolutionary implications of allozyme and RAPD variation in diploid populations of uffalograss *Buchloë dactyloides*. Molecular Ecology 4:135-147.
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in excel population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Resources 6:288-295.
- Pirseyedi SM, Valizadehghan S, Mardi M, Ghafari MR, Mahmoodi P, Zahravi M, Zeinalabedini M, Khayam Nekoui SM (2010) Isolation and characterization of novel microsatellite markers in pomegranate (*Punica granatum* L.). International Journal of Molecular Sciences 11:2010-2016.
- Popi J, Rajnpreht J, Kannenberg LW, Pauls KP (2000) Random amplified polymorphic DNA-based evaluation of diversity in the hierarchical, Open-Ended Population Enrichment Maize Breeding System. Crop Science 40:619-625.
- Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding 2:225-238.
- Raina D, Dhillon WS, Gill PPS (2013) Molecular marker based charac terization and genetic diversity of pomegranate genotypes. Indian Journal of Horticulture 70:469-474
- Rohlf FJ (1998) NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system. Applied Biostatistics Inc., Exeter Software, Setauket, New York.
- Prevost A, Wilkinson M (1999) A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. Theoretical and Applied Genetics 98:107-112
- Sarkhosh A, Zamani Z, Fatahi R, Ranjbar H (2009) Evaluation of genetic diversity among Iranian soft-seed pomegranate accessions by fruit characteristics and RAPD markers. Scientia Horticulture 3:313-319.
- Sarkhosh A, Zmani Z, Fatahi R, Ebadi A (2006) RAPD Markers reveal polymorphism among some Iranian Pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes. Science Direct Scientia Horticulatural 111:24-29.
- Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New york, USA
- Sarri V, Baldoni L, Porceddu A, Cultrera NGM, Contento A, Frediani M, Belaj A, Trujillo I, Cionini PG (2006) Microsatellite markers are powerful tools for discriminating among olive cultivars and assigning them to defined populations. Genome 49:1606-1615.
- Sheidai M, Saneghi A, Shahreiyari ZH, Noormohammadi Z, Farahanei F, Tabatabaei Ardakane S (2008) RAPD and cytogenetic study of some pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars. International Journal of Cytology Cytosystematics and Cytogenetics 6:68-73.
- Sepahvand M, Zahedi B, Ehteshamnia A (2017) Evaluation of Pomegranate (*Punica granatum* L.) genotypes in Lorestan province. ranian Journal of Horticultural Science 48:447-458 (In Farsi).
- Sinjare D (2015) Application of microsatellite SSR markers in a number of pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars in kurdistan region/duhok province. International Journal of Chemical and Biomolecular Science 3:117-122.
- Soriano JM, Zuriaga E, Rubio P, Llacer G, Infante R, Badenes ML 2010 Development and characterization of microsatellite markers in pomegranate (*Punica granatum* L.). Molecular Breeding 27:119-128.
- Struss D, Boritzki M, Glozerk K, Southwick SM (2001) Detection of genetic diversity among population of sweet cherry. Horticultural Science and Biotechnology 76:362-367.
- Volkan O, Akca Y, Ercisli S, Gozlekci S (2015) Genotype selection for physico-chemical fruit traits in pomegranate

(*Punica granatum* L.) In Turkey. Acta Science 14(2);123-132.

Volk GM, Preece GE (2021) Field Tour of the USDA National Clonal Germplasm Repository for Tree Fruit, Nut Crops, and Grapes in Davis, California. Colorado State University Publishing, 570p.

Weising K, Nybon H, Wolff K, Kahl, G (2005) *DNA fingerprinting in plants: Principles, methods and applications*. CRC Press, Boca Raton, United States of America .

Yeh FC, Yang RC, Boyle T (1999) Popgene version 1.31, Microsoft window-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta and Centre for International Forestry Research.

Yuan Z, Fang Y, Zhang T, Fei Z, Han F, Liu C, Liu M, Xiao W, Zhang W, Wu S, Zhang M, Ju Y, Xu H, Dai H, Liu Y, Chen Y, Wang L, Zhou J, Guan D, Yan M, Xia Y, Huang X, Liu D, Wei H, Zheng H (2018) The pomegranate (*Punica granatum* L.) genome provides insights into fruit quality

and ovule developmental biology. Plant Biotechnology Journal 16:1363-1374.

Yuan Z h, 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.

Zarei A, Sahraroo A (2018) Molecular characterization of pomegranate (*Punica granatum* L.) accessions from Fars province of Iran using microsatellite markers. Horticulture, Environment, and Biotechnology 59:239-249.

Zarei F, Karimi HR, Mirdehghan SH, Mohammadi Mirik AA (2018) Genetic diversity among Iranian pomegranate (*Punica granatum* L.) varieties by morphological markers. Iranian Journal of Horticultural Science 48:811-821 (In Farsi).

Zarkti H, Ouabbou H, Hilali A, Udupa SM (2010) Detection of genetic diversity in moroccan durum wheat accessions using agro-morphological traits and microsatellite markers. African Journal of Agricultural Research 5:1837-1844.