نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیست و یکم، شماره چهارم، ۱۳۹۳
http://jopp.gau.ac.ir

بررسی چندشکلی ژنوتیپ‌های مرکبات با استفاده از نشانگر مولکولی رپید

*هاجر عابدین‌پور[۱]، غلامعلی رنجبر[۲]، نادعلی بابائیان جلودار[۳] و بهروز گلعین[۴]

[۱]دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری،
[۲]دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری،
[۳]استاد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری،
[۴]دانشیار، مؤسسه تحقیقات مرکبات کشور، رامسر

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/٤/۲۹

چکیده

شناسایی تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی، برای دست‌یابی به ارقام مطلوب در مرکبات مهم و ضروری است. در این پژوهش از نشانگر RAPD جهت تعیین تنوع ژنتیکی میان ۲۹ ژنوتیپ مرکبات استفاده شد. با ۱۹ آغازگر استفاده شده تعداد ۲٤۸ باند چند شکل ایجاد گردید که بیشترین باند تکثیر شده ۱۹ عدد و مربوط به آغازگر OPA-07 بود، در حالی‌که آغازگر OPA–05 با هشت باند کمترین قطعات چندشکل را نشان داد. متوسط تعداد باند چندشکل برای هر آغازگر ۱۳ باند برآورد گردید. تجزیه داده‌ها توسط نرم‌افزار NTsys با استفاده از ضریب تشابه جاکارد، میزان تشابه محاسبه شده بر اساس باندهای چندشکل را در دامنه‌ای از ۰/۱٤ تا ۰/۹۷ با میانگین تشابه ۰/٦۲ نشان داد. تجزیه خوشه‌ای بر پایه ماتریس تشابه جاکارد و با روش UPGMA صورت گرفت. بر اساس تجزیه خوشه‌ای، در ضریب تشابه ۰/٤۹ ژنوتیپ‌های مرکبات مورد مطالعه به پنج گروه تقسیم شدند. بر اساس ماتریس تشابه، کمترین شباهت (۰/۱٤) مربوط به دو ژنوتیپ پوملو و نارنگی محلی و بیشترین شباهت (۰/۹۷) مربوط به دو تیپ طبیعی ناشناخته G74 و G73 بود. با بررسی دندروگرام نشان داده شد که پوملو و نارنگی به‌عنوان گونه‌های حقیقی مرکبات در خوشه‌های مجزا قرار دارند. تعیین تنوع ژنتیکی در مرکبات، اطلاعات مفیدی را برای برنامه‌های به‌نژادی، انتخاب و حفظ ارقام فراهم می‌کند.

واژه‌های کلیدی: تجزیه خوشه‌ای، تنوع ژنتیکی، ماتریس تشابه، مرکبات، RAPD

*مسئول مکاتبه: h_abedinpour@ymail.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

مرکبات یکی از مهم‌ترین محصولات باغبانی به‌شمار می‌روند. کشور ایران با تولید تقریبی ٤/۲ میلیون تن مرکبات جز هفت کشور عمده تولیدکننده این محصول در دنیا می‌باشد و در بین استان‌های کشور، استان مازندران با ٤٥/۱ درصد از کل تولید این محصول، بیشترین مقدار تولید را دارا است (گلعین و عدولی، ۲۰۱۱).

مرکبات گیاهان درختی، درختچه‌ای از خانواده Rutaceae و زیرخانواده Aurantioideae می‌باشند (سوست وروز، ۱۹۹٦). مرکبات دارای ۲n=۱۸ کروموزوم بوده و اندازه ژنوم آن حدود $۵/٦۳\times۱۰^{۸}$ جفت باز می‌باشد (کلتافیلهو و همکاران، ۱۹۹۸). تاریخچه طولانی کشت، پراکندگی وسیع، انجام دگرگرده‌افشانی‌های مکرر و سازگاری بین گونه‌های مختلف جنس *Citrus* و همچنین با سایر جنس‌های دیگر این خانواده، زیاد بودن جهش جوانه، وجود پدیده آپومیکسی در برخی گونه‌ها، دورگه‌های طبیعی و مصنوعی زیادی که در این گیاه ایجاد شده، باعث گردیده ارقام بسیار زیادی از انواع مرکبات در جهان وجود داشته باشد که شناسایی دقیق و مطمئن آن‌ها یک مشکل قابل توجه در صنعت مرکبات‌کاری محسوب می‌شود. از طرفی برای اصلاح و تولید ارقام مناسب نیاز به داشتن قدرت انتخاب بالا بین گیاهان ضروری است و این خود مستلزم شناسایی مواد گیاهی و تنوع موجود در بین آن‌ها است (نیکولوسی و همکاران، ۲۰۰۰؛ فنگ و همکاران، ۱۹۹۸). بنابراین مشخص شدن تنوع ژنتیکی و روابط‌خویشاوندی در مرکبات جهت برنامه‌ریزی و کاربرد برنامه‌های اصلاحی، حفظ تنوع زیستی، ایجاد منابع ژرم‌پلاسم، کنترل فرسایش ژنتیکی، ثبت ارقام جدید و انجام مطالعات مولکولی لازم است (بارکلی و همکاران، ۲۰۰٦).

پیشرفت در بیوتکنولوژی، به‌ویژه در زیست‌شناسی مولکولی ابزار بسیار مهمی را برای بهبود مدیریت و حفاظت از منابع ژنتیکی فراهم می‌کند. استفاده از نشانگرهای مولکولی به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی در مطالعات ژنتیک جمعیت به‌عنوان یک ابزار مهم مطرح است. یکی از نشانگرهای مولکولی جهت بررسی تنوع ژنتیکی موجود بین ارقام، نشانگر RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) است که از قدرت مناسبی برای مطالعه تنوع بین ارقام برخوردار است. این نشانگر به‌دلیل ساده بودن، ارزیابی آسان و سریع رایج است. همچنین برای طراحی آغازگر نیازی به دانستن اطلاعات اولیه درباره توالی DNA نیست و می‌توانند برای تکثیر تعداد زیاد قطعات DNA به‌کار روند. این نشانگرها دارای توزیع تصادفی در سراسر ژنوم هستند. علاوه‌بر این، نیاز به مقدار کمی از DNA برای تکثیر PCR در

Archive of SID

www.SID.ir

RAPD است (ویلیامز و همکاران، ۱۹۹۰). در پژوهش‌های متعددی، تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنتیک میان ژنوتیپ‌های مرکبات با استفاده از نشانگر RAPD بررسی شده است.

کلتافیلهو و همکاران (۱۹۹۸) تنوع ژنتیکی ۳۵ رقم نارنگی با نشانگر RAPD بررسی نمودند و نتیجه گرفتند که تشابه ژنتیکی در گروه نارنگی‌ها بالا (۰/۷۷) بود اما تشابه آن‌ها به دیگر گونه‌های مرکبات حقیقی خیلی کم (۰/۲۷) بود. آن‌ها گزارش کردند که نارنگی یکی از گونه‌های حقیقی مرکبات است. همچنین در مطالعه‌ای دیگر نیکولوسی و همکاران (۲۰۰۰) روابط فیلوژنتیکی و منشأ ژنتیکی مهم‌ترین گونه‌های مرکبات را با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD، SCAR و cpDNA تعیین نموده و نشان دادند که جنس فورچونلا به جنس سیتروس نزدیک‌تر است. دهستانی و همکاران (۲۰۰۷) تنوع ژنتیکی ۵۲ نمونه شامل سه گروه از پرتقال‌های ناول (*Citrus sinensis*) در استان مازندران را توسط ۲۰ نشانگر RAPD مورد بررسی قرار دادند و چند شکلی بالایی (۷۰/۱۳) را گزارش کردند. آبکنار و همکاران (۲۰۰۳) تشابه ژنتیکی و روابط بین ۳۱ رقم مرکبات اسیدی شامل نارنج، یوزو و خویشاوندان آن‌ها را به کمک نشانگر RAPD بررسی کردند. نتایج این بررسی نشان داد که نارنج از یوزو و خویشاوندان آن‌ها فاصله دارد. سیرانگوسا و همکاران (۲۰۰۶) از نشانگرهای ISSR و RAPD برای شناسایی، بررسی تنوع ژنتیکی و روابط بین ۱۸ رقم محلی و خارجی نارنج در ایتالیا استفاده کردند. تنوع ژنتیکی بالایی را در ارقام خارجی و تنوع ژنتیکی پایینی در ارقام محلی مشاهده کردند. بیس‌واز و همکاران (۲۰۱۱) با استفاده از نشانگرهای RAPD، IRAP، REMAP و ISSR تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی بین مرکبات و ژنوتیپ‌های خویشاوند را مورد بررسی قرار دادند. در بین نشانگرهای مورد استفاده، نشانگر RAPD بیشترین باند چند شکل را تولید کرد. مالیک و همکاران (۲۰۱۲) تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنتیکی ۲۲ رقم پرتقال را با استفاده از صفات مورفولوژی و نشانگر RAPD مورد بررسی قرار دادند. تشابه ژنتیکی بین ارقام در دامنه‌ای از ۰/٤٨ تا ۱ بود. نتایج این پژوهش حاکی از این است که تنوع ژنتیکی کمی در درون ارقام پرتقال وجود دارد.

در ایران با تلاش پژوهش‌گران و باغداران پیشرو، تیپ‌های مختلف پرتقال، لیمو، گریپ‌فروت و نارنگی که از طریق جهش، دورگ‌گیری‌های طبیعی و تغییرات ژنتیکی به‌وجود آمده‌اند، جمع‌آوری شده‌اند و در کلکسیون‌های شمال و جنوب کشور نگهداری می‌شوند. پایش‌های انجام شده در این کلکسیون‌ها عمدتاً براساس صفات مرفولوژی بوده و تحقیقات ژنتیکی چندانی روی آن‌ها انجام نشده است و اطلاعات دقیقی از روابط ژنتیکی و خویشاوندی بین این ژنوتیپ‌ها و با ارقام تجاری وجود

Archive of SID

www.SID.ir

ندارد. با توجه به این‌که تعدادی از این ژنوتیپ‌ها براساس حدس و یا بر مبنای برخی صفات ظاهری نام‌گذاری شده‌اند و از وضعیت تعدادی دیگر نیز اطلاعاتی در دست نیست. هدف از این مطالعه بررسی و شناسایی برخی از ژنوتیپ‌های نارنگی و پرتقال و ارتباط آن‌ها با ارقام تجاری با استفاده از نشان‌گر RAPD است تا در صورت امکان بتوان با ایجاد بستر مناسب برای مطالعات ژنتیکی با بهره‌گیری از پتانسیل موجود، در جهت اهداف اصلاحی مرکبات استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی این پژوهش شامل نمونه‌هایی از کلکسیون ایستگاه تحقیقات مرکبات تنکابن (کترا) می‌باشد که خصوصیات مرفولوژی آن‌ها در جدول ۱ آمده است.

استخراج DNA: DNA ژنومی از نمونه‌های برگی با استفاده از روش موری و تامسون (۱۹۸۰) استخراج گردید. به‌منظور بررسی کیفیت و کمیت DNAی استخراج شده از نمونه‌های مورد بررسی، از دو روش اسپکتروفتومتری (NanoDrop 1000) و الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد استفاده شد. نمونه‌های DNA ژنومی که دارای کمیت و کیفیت بالا بودند، برای PCR انتخاب شدند.

انجام آزمایش RAPD: در این پژوهش ۳۰ آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی مورد آزمایش قرار گرفت و از بین آن‌ها ۱۹ آغازگر که دارای وضوح باندی و چند شکلی مناسب بودند، انتخاب و جهت مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۲ آمده است. واکنش‌های PCR با استفاده از مواد تهیه شده از شرکت سیناژن و در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر PCR Buffer×10، ۱/۵ میکرولیتر کلریدمنیزیم ۵۰ میلی‌مولار، یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase، ۱ میکرومولار آغازگر، مخلوط نوکلئوتیدی (dNTPs) ۰/۲ میلی‌مولار و ۲ میکرولیتر از DNA ژنومی با غلظت ۲۰ نانوگرم بر میکرولیتر انجام پذیرفت. چرخه حرارتی واکنش PCR به‌صورت یک چرخه ۳ دقیقه‌ای در ۹٤ درجه سانتی‌گراد، ٤۰ چرخه شامل ۹٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه، ۳۷-۳۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱/۵ دقیقه و مرحله تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷ دقیقه می‌باشد. بعد از انجام PCR نمونه‌ها تا زمان انجام الکتروفورز در ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- مشخصات گیاه‌شناسی انواع ژنوتیپ‌های مرکبات مورد استفاده.

نام عمومی	نام علمی گیاه	کدگیاه	نوع گل	رنگ‌گل	طول دمبرگ (سانتی‌متر)	عرض پهنک (سانتی‌متر)	طول پهنک (سانتی‌متر)	حاشیه پهنک	شکل میوه	رنگ پوست	تعداد بذر	وزن‌میوه (گرم)	طول میوه (میلی‌متر)	قطرمیوه (میلی‌متر)
نارنج	Citrus aurantium	G1	دوجنسی	سفید	۲/۳۱	۳/۹۱	۹/۱۳	صاف	کروی	نارنجی	۲۰ تا ۵۰	۱۵۵/۲۳	۷۳/۵۲	۷۳/۷۸
پرتقال مارس	Citrus sinensis	G2	دوجنسی	سفید	۱/۸۵	٤/۸۱	۹/۹٤	کنگره‌دار	کروی	نارنجی روشن	٤-۱	۲۲٦/۸	۸۰/۱	۸۰/۷
پرتقال تامسون	Citrus sinensis	G3	دوجنسی	سفید	۱/۳۲	٤/۳۹	۹/۱۷	کنگره‌دار	بیضوی	نارنجی	٤-۱	۳۳٦/۸۸	۹۷/۱۲	۸۵/٤۰
پرتقال سیاورز۱	Citrus sinensis	G4	دوجنسی	سفید	۱/۲۲	٤/۱۹	۸/۳٦	صاف	کروی	زرد تیره	۱۰ تا ۱۹	۱۸٤/۰۱	٦۹/۱۵	۷٤/۳۱
پرتقال سیاورز۲	Citrus sinensis	G5	دوجنسی	سفید	۱/۲۱	۳/۸۲	۷/۲۷	کنگره‌دار	کروی	زرد تیره	۱۰ تا ۱۹	۳۳۸/۱۷	۷۷/۰۷	۸۰/۲۷
پرتقال سیاورز۳	Citrus sinensis	G6	دوجنسی	سفید	۱/۳۵	۳/٦۹	۸/۰۵	کنگره‌دار	کروی	نارنجی	۲۰ تا ۵۰	۱۸٤/٤۸	۷۰/۵۰	۷٤/۹۷
پرتقال سیاورز٤	Citrus sinensis	G7	دوجنسی	سفید	۱/٤۷	٤/۱٤	۸/۰۸	کنگره‌دار	کروی	نارنجی	۵ تا ۹	۱۷۰/۷۲	۷۱/۱٤	۷۱/۸۸
معلم کوه (تیپ طبیعی)	Citrus sinensis	G8	دوجنسی	سفید	۱/۱۹	۵/۳۸	۹/۰۹	کنگره‌دار	پخت	نارنجی	۲۰ تا ۵۰	۲۰۱/۷٤	٦۱/۲٤	۷۸/۰۲
شل محله (تیپ طبیعی)	Citrus sinensis	G9	دوجنسی	سفید	۱/۵۰	۳/۳۸	۸/۸۲	کنگره‌دار	بیضوی	نارنجی	۵ تا ۹	۲٦۳/۳۰	۱۰۱/٤٦	۸۹/٦۳
نارنگی اتابکی	Citrus reticulata	G10	دوجنسی	سفید	۰/۹۸	۳/۲۱	۷/۰۷	کنگره‌دار	گلابی شکل	نارنجی	۱۰ تا ۱۹	۹۵/۵٦	٦۵/۰۵	۵۹
نارنگی انشو	Citrus unshiu	G11	دوجنسی	سفید	۱/۷۳	۳/٦۷	۸/۷۹	کنگره‌دار	پخت	نارنجی	٤-۱	۱۸۳/۱٦	۷۳/۸۸	٦٤/۷۰
نارنگی دانسی	Citrus reticulata	G12	دوجنسی	سفید	۱/۲۲	۳/۸۱	۷/۰۸	کنگره‌دار	گلابی شکل	نارنجی تیره	۵ تا ۹	۷۹/٦۳	۵۷/۳۹	٦۲/۷۳
نارنگی بمی	Citrus reticulata	G13	دوجنسی	سفید	۰/۹۳	۲/۵۹	۵/٦۸	کنگره‌دار	پخت	نارنجی	بی بذر	۱۰۵/٦۵	۵۵/۲۱	٦۸/٤۳
نارنگی محلی	Citrus reticulata	G14	دوجنسی	سفید	۰/۹۷	۲/۹۹	٦/۹۸	کنگره‌دار	پخت	نارنجی	۱۰ تا ۱۹	۸۰/۱۲	٥٦/۷۹	٦٦/۰٦
نارنگی کلمانتین	Citrus clementina	G15	دوجنسی	سفید	۱/۰۳	۳/۱۹	۸/٤۸	صاف	بیضوی	نارنجی	٤-۱	۱۳/۳٦	۳٤/۳٦	۲۵/۷٦
پوملو	Citrus grandis	G16	دوجنسی	سفید	۱/۵	٦	۱۰/۵	کنگره‌دار	کروی	سبز- زرد	۵ تا ۹	۹۷۰/٤	۱۵۵/٤۳	۱٤٤
تیپ طبیعی	Citrus sp.	G61	دوجنسی	سفید	۱/۱۳	٤/٤٤	۱۰/۳۱	کنگره‌دار	کروی	نارنجی روشن	٤-۱	۱۸۰/۲۲	٦۹/۳۳	۷۰/٤۷
تیپ طبیعی	Citrus sp.	G63	دوجنسی	سفید	۱/۰۱	٤/۱٦	۹/۷۰	مضرس	کروی	نارنجی	٤-۱	۱۳٤/۵٦	٦۵/۳۳	٦۵/۸۸
تیپ طبیعی	Citrus sp.	G65	دوجنسی	سفید	۱/۲۳	٤/۳۰	۹/۲۱	کنگره‌دار	کروی	نارنجی روشن	٤-۱	۱۷۹/٤۳	٦۹/۸٤	۷۰/۱۳
تیپ طبیعی	Citrus sp.	G67	دوجنسی	سفید	۱/٦۳	٤/۱۹	۸/۹٤	صاف	گلابی شکل	نارنجی روشن	۱۰ تا ۱۹	۱۷۹/۱۰	۷۷/۰۷	۷۰/۲٦
تیپ طبیعی	Citrus sp.	G70	دوجنسی	سفید	۱/۳۵	۵/۰٦	۱۰/۱٦	مضرس	گلابی شکل	نارنجی روشن	۵ تا ۹	۲٦۲/۲۷	۸۷/۵۳	۸۰/۷٦
تیپ طبیعی	Citrus sp.	G71	دوجنسی	سفید	۱/۸۲	٤/٦۷	۹/٦٦	صاف	بیضوی	نارنجی	۱۰ تا ۱۹	۱٤۹/٦٦	۷۱/۷۰	٦۵/۷۷
تیپ طبیعی	Citrus sp.	G72	دوجنسی	سفید	۱/۵۱	٤/٤۸	۹/۵۷	مضرس	کروی	نارنجی تیره	۲۰ تا ۵۰	۲۰۰/۵۰	۷۰/۳۱	۷٦/۰۸
تیپ طبیعی	Citrus sp.	G73	دوجنسی	سفید	۲/۰۳	٤/٤۷	۹/۳۲	صاف	کروی	نارنجی	۱۰ تا ۱۹	۲۰۵/۸۲	۸۱/۱۹	۸۱/۸۰
تیپ طبیعی	Citrus sp.	G74	دوجنسی	سفید	۱/٦۱	۵/٦۳	۱۰/۷٤	صاف	گلابی شکل	زرد تیره	٤-۱	۲۷۳/۵۷	۹۲/۱۳	۸۱/٤٤
تیپ طبیعی	Citrus sp.	G76	دوجنسی	سفید	۱/۳۰	٤/۰۳	۸/۷۵	کنگره‌دار	کروی	نارنجی روشن	۱۰ تا ۱۹	۱۸۰/۵۰	٦۷/۸۳	۷۲/۹۳
تیپ طبیعی	Citrus sp.	G78	دوجنسی	سفید	۲/۱۳	٤/٦۰	۹/٤۸	کنگره‌دار	کروی	نارنجی روشن	۱۰ تا ۱۹	۲٤۱/۷٤	۸۳/٦۲	۷۸/۹۹
تیپ طبیعی	Citrus sp.	G79	دوجنسی	سفید	۱/۳٦	۵/۱۳	۱۰/۲۰	مضرس	کروی	نارنجی روشن	۵ تا ۹	۲۵۵/۷۲	۷۹/۸۹	۸۱/۰۵
تیپ طبیعی	Citrus sp.	G80	دوجنسی	سفید	۲/۲۵	٤/٦۲	۹/۵۵	مضرس	کروی	نارنجی	۱۰ تا ۱۹	۲۰۵/۹۸	۷۳/۹۹	۷۸/۲۵

www.SID.ir

الکتروفورز محصول واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در توان ۹۰ وات به‌مدت ۲ ساعت انجام شد. سپس ژل تشکیل شده با اتیدیوم بروماید (۱۰ µg/ml) به‌مدت ۱۵ دقیقه رنگ‌آمیزی و بعد از ۲ تا ۳ بار شست و شو با آب دوبار تقطیر زیر نور UV یا طول موج ۲۵۰ نانومتر مشاهده شد و با استفاده از دستگاه Gel doc شرکت UVP آمریکا عکس‌برداری صورت گرفت.

تجزیه آماری: امتیازدهی باندهای تکثیر شده براساس حضور یا عدم حضور به‌ترتیب با اعداد یک و صفر صورت گرفت. ماتریس تشابه نمونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار NTsys-pc (Version 2.02) (رولف، ۲۰۰۰) و توسط ضریب تشابه جاکارد محاسبه گردید (جاکارد، ۱۹۰۸). بر اساس تجزیه خوشه‌ای حاصل از ماتریس تشابه، دندروگرام توسط روش UPGMA ترسیم گردید (اسنیس و سوکال، ۱۹٦۳). ماتریس کوفنتیک نیز جهت بررسی میزان انطباق تجزیه‌خوشه‌ای با داده‌ها محاسبه و ماتریس‌تشابه با ماتریس کوفنتیک مقایسه شد و ضریب همبستگی کوفنتیک نیز محاسبه گردید. همچنین پارامتر محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) نیز برای هر جفت آغازگر محاسبه شد. مقادیر PIC برای هر آغازگر بر پایه رابطه $PIC=\sum [2Pi\ (1-Pi)]$ محاسبه گردید. به‌طوری که F_i برابر با فراوانی آلل تکثیر شده و (1-Fi) فراوانی آلل غایب در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

نوزده آغازگر انتخاب شده از بین ۳۰ آغازگر RAPD، در مجموع ۲٦۹ قطعه را تکثیر نمودند که از بین آن‌ها ۲٤۸ باند دارای چندشکلی و وضوح مناسب برای نمره‌دهی بودند (جدول ۲). بیشترین باند چند شکل مربوط به آغازگر OPA-07 با ۱۹ عدد و کمترین باند چندشکل مربوط به آغازگر OPA-05 با ۸ عدد بود. متوسط تعداد باند چندشکل برای هر آغازگر ۱۳ باند و متوسط درصد چندشکلی آغازگرها ۹۱/۸۲ درصد بود. بیشترین و کمترین مقادیر محتوای چندشکل (PIC) به‌ترتیب ۰/۳۰۹ برای آغازگر 0PM-14 و ۰/۱۲۰ برای آغازگر 0PE-09 بود، میانگین PIC مقدار عددی ۰/۲۳ را نشان داد. بالا بودن میزان PIC نشان‌دهنده سطح بالای تمایز می‌باشد.

نتایج حاصل از ماتریس تشابه نشان داد که کمترین شباهت (۰/۱٤) بین ژنوتیپ‌های پوملو (G16) و نارنگی محلی (G14) و بیشترین شباهت (۰/۹۷) بین دو تیپ طبیعی ناشناخته G74 و G73 وجود دارد. میانگین تشابه بین کل ژنوتیپ‌ها نیز برابر ۰/٦۲ به‌دست آمد که نشان دهنده تنوع بالا بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی می‌باشد. در محاسبه ضریب‌کوفنتیک که نشان‌دهنده همبستگی بین ماتریس و

Archive of SID

www.SID.ir

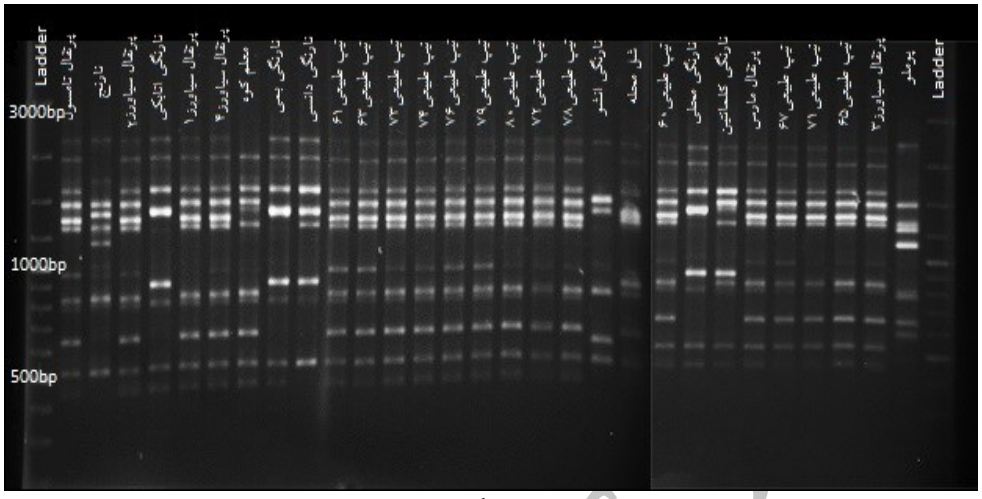
دندروگرام حاصله می‌باشد، مقدار r=۰/۹۸۹۸ به‌دست آمد که بیانگر همبستگی بالا ماتریس تشابه و ماتریس حاصل از دندروگرام می‌باشد.

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای RAPD استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR).

ردیف	نام آغازگر	توالی آغازگر ′۳ ←′۵	تعداد کل باند	تعداد باند چندشکل	درصد چندشکلی	PIC
۱	OPB-12	CCTTGACGCA	۱۵	۱۳	۸۶/۶۶	۰/۲۱۶
۲	OPE-09	CTTCACCCGA	۱۶	۱۶	۱۰۰	۰/۱۲۰
۳	OPA-04	AATCGGGCTG	۱۵	۱۴	۹۳/۳۳	۰/۲۶۳
۴	OPA-07	GAAACGGGTG	۱۹	۱۹	۱۰۰	۰/۲۳۵
۵	OPA-08	GTGACGTAGG	۱۰	۹	۹۰	۰/۲۸۲
۶	OPA-19	CAAACGTCGG	۱۲	۱۱	۹۱/۶۶	۰/۲۶۷
۷	OPG-05	CTGAGACGGA	۱۱	۹	۸۱/۸۱	۰/۲۴۷
۸	OPG-06	GTGCCTAACC	۱۶	۱۴	۸۷/۵	۰/۲۲۶
۹	OPB-08	GTCCACACGG	۱۴	۱۲	۸۵/۷۱	۰/۲۱۵
۱۰	OPA-12	TCGGCGATAG	۱۳	۱۲	۹۲/۳۰	۰/۲۴۹
۱۱	OPA-05	AGGGGTCTTG	۹	۸	۸۸/۸۸	۰/۲۲۴
۱۲	OPA-18	AGGTGACCGT	۱۹	۱۸	۹۴/۷۳	۰/۱۹۷
۱۳	OPM-11	GTCCACTGTG	۱۷	۱۵	۸۸/۲۳	۰/۲۶۵
۱۴	OPM-14	AGGGTCGTTC	۱۲	۱۲	۱۰۰	۰/۳۰۹
۱۵	OPM-18	CACCATCCGT	۱۱	۱۰	۹۰/۹۰	۰/۱۸۹
۱۶	OPG-04	AGCGTGTCTG	۱۶	۱۵	۹۳/۷۵	۰/۲۶۷
۱۷	OPC-07	GTCCCGACGA	۱۶	۱۵	۹۳/۷۵	۰/۲۲۳
۱۸	OPA-10	GTGATCGCAG	۱۶	۱۵	۹۳/۷۵	۰/۲۱۳
۱۹	OPA-09	GGGTAACGCC	۱۲	۱۱	۹۱/۶۶	۰/۲۶۶
میانگین	-	-	۱۴/۱۵	۱۳/۰۵	۹۱/۸۲	۰/۲۳

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- چندشکلی مشاهده شده با نشانگر OPA-07 در ژنوتیپ‌های مرکبات.

تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های مولکولی به روش UPGMA با ضریب تشابه جاکارد انجام گردید (شکل ۲). در دندروگرام ترسیم شده (شکل ۲) ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در ضریب تشابه ۰/٤۹ یعنی در محلی که شامل گروه‌های متمایز از هم بود، در پنج گروه مجزا (A, B, C, D and E) قرار گرفتند. گروه اول شامل نارنج (G1) بود که در یک گروه مجزا قرار گرفت و تشابه ۰/٤۲ و ۰/۲٦ به‌ترتیب به گروه نارنگی و پوملو (G16) نشان داد که با نتایج مطالعات قبلی مطابقت داشت. نارنج به‌عنوان یک دورگ از نارنگی و پوملو در مطالعات قبلی گزارش شده بود (بارت و رودز، ۱۹۷٦؛ بارکلی و همکاران، ۲۰۰٦؛ آبکنار و همکاران، ۲۰۰۷). گروه B شامل نارنگی انشو (G11) بود. در این بررسی نارنگی انشو و کلمانتین در دو گروه متفاوت از هم با ضریب تشابه ۰/٤۱ قرار گرفته‌اند. کلتافیلهو و همکاران (۱۹۹۸) در بررسی تنوع ژنتیکی میان ۳۵ رقم نارنگی با استفاده از نشانگر RAPD به نتیجه مشابهی دست یافتند و گزارش کردند که نارنگی انشو و نارنگی کلمانتین به دو دسته متفاوت تعلق دارند. گروه C بزرگ‌ترین گروه و تیپ‌های طبیعی ناشناخته (G61, G63, G65, G67, G70, G71, G72, G73, G74, G76, G78, G79 and G80) و پرتقال‌های سیاورز (G4, G5, G6 and G7)، تامسون (G3) و مارس (G2) در این گروه قرار گرفتند، به‌طوری که در بین ژنوتیپ‌های پرتقال، قرابت ژنتیکی بالایی وجود داشت. در همین راستا سطح بالایی از شباهت ژنتیکی در درون ارقام پرتقال با استفاده از نشانگر RAPD گزارش شده است (مالیک و همکاران، ۲۰۱۲). در این گروه دو تیپ طبیعی ناشناخته G74 و G73 شباهت بالایی (۰/۹۷) را نسبت به یکدیگر دارند اما از نظر خصوصیات ظاهری

Archive of SID

www.SID.ir

میوه تیپ طبیعی ناشناخته G74 گلابی شکل در حالی‌که میوه تیپ طبیعی G73 کروی‌شکل می‌باشد. شباهت بالای ژنتیکی این ژنوتیپ‌ها نشان‌دهنده این است که این ژنوتیپ‌ها احتمالاً نوسلار[1] (شبیه به اصل) همدیگر هستند یا ممکن است در اثر جهش به‌وجود آمده باشند که با استفاده از نشانگر مذکور قابل تمایز نیستند. تیپ‌های طبیعی G65، G67، G70، G71 و پرتقال سیاورز ۳ با پرتقال‌های تامسون و مارس شباهت بالایی (۰/۸۸) را نشان دادند در حالی‌که از لحاظ مورفولوژی در خصوصیات میوه و برگ و بذر با هم تفاوت دارند. نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهد که اکثر پرتقال‌ها به‌وسیله جهش از یک جد مشترک به‌دست آمده‌اند. علاوه‌بر اختلاف در خصوصیات ظاهری، تنوع ژنتیکی کمی در پرتقال‌ها مشاهده شده است (فنگ و روز، ۱۹۹۷). با مطالعه ۱۰ رقم پرتقال مشخص شد که الگوی باند کروموزومی در ۱۰ کلون هتروزیگوس است، ولی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره تفاوتی در این ۱۰ رقم مشاهده نشد (لورو و همکاران، ۱۹۹۵). این نتایج می‌تواند دلیلی بر منشاء مونوفیلیتیک (متحدالاصل) پرتقال باشد که به‌وسیله جهش سوماتیکی و انتخاب کلون برتر دنبال شده است (فتوحی و فتاحی، ۲۰۱۰).

نتایج این مطالعه، نشان داد که شل‌محله (G9) تشابه زیادی (۰/٦۸) به سیاورز ۳ دارد، در حالی‌که در خصوصیات میوه با هم فرق داشتند. معلم کوه (G8) شباهت بالایی به سیاورز ۲ و تامسون داشت که با نتایج جنتی و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت دارد. آن‌ها با استفاده از نشانگرهای SSR شباهت معلم‌کوه به تامسون و سیاورز را گزارش کردند و بیان داشتند که این ژنوتیپ احتمالاً در اثر دورگ‌گیری بین آن‌ها و یا در اثر جهش جوانه به‌وجود آمده است. شباهت بالایی در بین ژنوتیپ‌های پرتقال محلی سیاورز نسبت به پرتقال تامسون از لحاظ ژنتیکی مشاهده شد. احتمالاً این ژنوتیپ‌ها در اثر جهش سوماتیکی وجود آمده‌اند که در مطالعات قبلی هم توسط نشانگرهای SSR محققان گزارش شده است (کیانوش و همکاران، ۲۰۰۹؛ جنتی و همکاران، ۲۰۰۹؛ روحی‌قرابایی و همکاران، ۲۰۱۰).

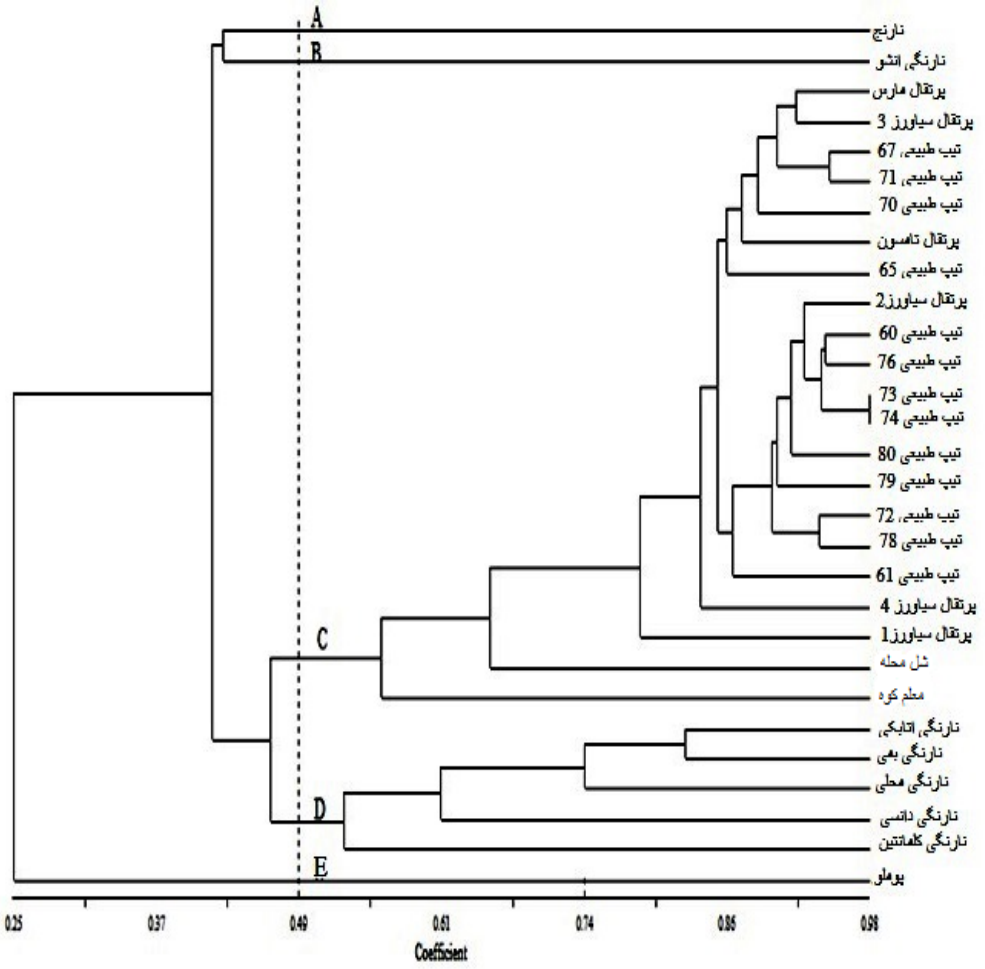
گروه D شامل دو زیرگروه است. زیرگروه D1 شامل نارنگی کلمانتین (G15) و زیرگروه D2 نارنگی‌های دانسی (G12)، محلی (G14)، بمی (G13) و اتابکی (G10) را در بر می‌گیرد. در زیر گروه D2 نارنگی‌های اتابکی و بمی بیشترین شباهت (۰/۸۲) را نسبت به هم نشان دادند در حالی‌که از لحاظ مورفولوژی تفاوت زیادی با هم دارند. نارنگی‌بمی دارای شکل پخت، قاعده مقعر، سر فرورفته، پوست ناهموار و بی بذر است و نارنگی اتابکی گلابی‌شکل، گردن‌دار، پوست زبر و بذردار می‌باشد. همچنین نارنگی محلی با نارنگی بمی از لحاظ مورفولوژی و هم از نظر ژنتیکی تشابه نسبتاً بالایی

1- Nucellar

Archive of SID

www.SID.ir

(۰/۷٤) داشتند. در میان نارنگی‌ها قرابت ژنتیکی بالایی وجود دارد و نتایج حاصل از نشانگرهای مولکولی این عقیده را تأیید می‌کند (کلتافیلهو و همکاران، ۱۹۹۸؛ بیس‌واز و همکاران، ۲۰۱۱). نارنگی یکی از سه گونه اصلی مرکبات است (بارت و رودز، ۱۹۷٦) و نتایج به‌دست آمده از نشانگرهای مولکولی RAPD و SCAR نتوانست منشأ و والد آن را مشخص نماید (مور، ۲۰۰۱). به‌نظر محققین نارنگی‌ها متعلق به یک گونه می‌باشند که شامل ارقام مختلف و تعداد زیادی از دورگ‌ها با تفاوت ژنتیکی نسبت به یکدیگر هستند (کلتافیلهو و همکاران، ۱۹۹۸).



شکل ۲- گروه‌بندی ۲۹ ژنوتیپ مرکبات با استفاده از نشانگر RAPD به روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد.

www.SID.ir

پوملو (G16) به‌صورت مجزا در گروه E قرار گرفت که شباهت کمی (۰/۲۵) را نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها نشان داد. پوملو به‌عنوان گونه حقیقی در مرکبات گزارش شده است (بارت و رودز، ۱۹۷٦). با بررسی دندروگرام در این تحقیق تأیید می‌شود که پوملو و نارنگی به‌عنوان گونه‌های حقیقی مرکبات در خوشه‌های مجزا قرار گرفته‌اند.

به‌طور کلی، باتوجه به نتایج این پژوهش به‌نظر می‌رسد RAPD می‌تواند به‌عنوان یک روش مولکولی ساده مبتنی‌بر PCR و نسبتاً مطمئن و قابل اعتماد در تعیین سطح تنوع ژنتیکی در مرکبات به‌کار رود. اگرچه بررسی مورفولوژی ژنوتیپ‌های تحت بررسی و انطباق آن با نتایج حاصل از نشانگرهای مولکولی نیز بسیار مفید واقع خواهد شد. به‌علاوه استفاده از نشانگرهای مولکولی دیگر به‌ویژه نشانگرهای هم‌بارز برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه و مقایسه آن با نتایج نشانگر RAPD جهت بررسی بهتر ژنوتیپ‌های مرکبات پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از مؤسسه تحقیقات مرکبات کشور جهت همکاری در این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1.Abkenar, A.A., Isshiki, S., and Matsumoto, R. 2007. Comparative analysis of organelle DNAs acid citrus grown in Japan using PCR-RFLP method. Gen. Resour. Crop Evo. 55: 487–492.
2.Abkenar, A.A., Isshiki, S., Tashiro, Y. 2004. Phylogenetic relationships in the ‘‘true citrus fruit trees’’ revealed by PCR-RFLP analysis of cpDNA. Sci. Hort. 102: 233–242.
3.Barkley, N.A., Roose, M.L., Krueger, R.R., and Federici, C.T. 2006. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). Theo. Appl. Gen. 112: 1519–1531.
4.Barrett, H.C., and Rhodes, A.M. 1976. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated Citrus and its close relatives. System. Bot. 1: 105–136.
5.Biswas, M.K., Xu, Q., and Deng, X.X. 2010. Utility of RAPD, ISSR, IRAP and REMAP marker for the genetic analysis of Citrus spp. Sci. Hort. 124: 254–261.
6.Coletta Filho, H.D., Machado, M.A., Targon, M.L.P.N., Moreita, J.r., MCPQDG, and Pompea, J. 1998. Analysis of the genetic diversity among mandarins (*Citrus spp.*) using RAPD markers. Euphytica, 102: 133–139.

Archive of SID

www.SID.ir

7.Dehestani, A., Kazemitabar, S.K., and Rahimian, H. 2007. Assesment of Genetic Diversity of Navel Sweet Orange Cultivars Grown in Mazandaran Province Using RAPD Markers. Asian J. Plant Sci. 6(7): 1119-1124.
8.Fang, D.Q., and Roose, M.L. 1997. Identification of closely related Citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. Theo. Appl. Gen. 95: 408–417.
9.Fang, D.Q., Krueger, R.R., and Roose, M.L. 1998. Phylogenetic relationships among selected Citrus germplasm accessions revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 123: 612-617.
10.Fotouhi Ghazvini, R., Fattahi Moghadam, J. 2010. Citrus growing in Iran. Guilan University Press, Rasht, Iran. (In Persian)
11.Golein, B., Adouli, B. 2011. Citrus 1. Novin Poya Press, Tehran, Iran. (In Persian)
12.Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles. 44: 223-270.
13.Jannati, M., Fotouhi, R., Pourjan Abad, A., and Salehi, Z. 2009. Genetic diversity analysis of Iranian citrus varieties using micro satellite (SSR) based markers. J. Hort. Forestry. 1(7): 120-125.
14.Kianoush, S., Babaeian Jelodar, N., and Asadi Abkenar, A. 2009. Evaluation of genetic diversity in citrus germless using microsatellite (SSR) Markers. J. Agri. Sci. Nat. Res. 15(6):109-117. (In Persian)
15.Luro, F., Laigret, F., Bove, J.M., and Ollitrault, P. 1995. DNA amplified fingerprinting, a useful tool for determination of genetic origin and diversity analysis in Citrus. Sci. Hort. 30: 1063–1067.
16.Malik, S.K., Rohini, M.R., Kumar, S., Choudhary, R., Pal, D., and Chaudhury, R. 2012. Assessment of Genetic Diversity in Sweet Orange [*Citrus sinensis*(L.) Osbeck] Cultivars of India Using Morphological and RAPD Markers. Agri. Res. 1(4): 317–324.
17.Moore, G.A. 2001. Oranges and lemons: clues to the taxonomy of Citrus from molecular markers. Trends Gen. 17: 536–540.
18.Murray, M.G., and Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 8: 4321–4325.
19.Nicolosi, E., Deng, Z.N., Gentile, A., La Malfa, S., Continella, G., and Tribulato, E. 2000. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. Theo. Appl. Gen. 100: 1155–1166.
20.Rohlf, F.J. 1998. NTSYS-pc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.02. Exeter Publications, Setauket, New York.
21.Rouhi Ghorabaie, H.R., Fotouhi Ghazvini, R., Golein, B., and Nabipour, A.R. 2010. Identification of some Citrus accessions in a Citrus germplasm utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). Hort. Environ. Biotech. 51: 343–347.

Archive of SID

www.SID.ir

22. Siragusa, M., Pasquae, F., Abbate, L., and Tusa, N. 2006. Identification of Sour Orange Accessions and Evaluation of their Genetis Variability by Molecular Marker Analysis. Sci. Hort. 42(1): 84-89.
23. Sneath, P.H.A., and Sokal, R.R. 1963. The Principles and Practice of Numerical Classification. WH Freeman, San Francisco.
24. Soost, R.K., and Roose, M.L. 1996. Citrus In: Fruit Breeding. Tree and Tropical Fruits, L. John Wiley and Sons, Pp: 257–323. University Press, Rasht, Iran. (In Persian)
25. William, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphism amplifed by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18: 6531-6535.

Archive of SID

www.SID.ir

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. Plant Prod. Res. Vol. 21 (4), 2014
http://jopp.gau.ac.ir

Assessment of polymorphism in citrus genotypes using RAPD molecular markers

***H. Abedinpour[1], G.A. Ranjbar[2], N. Babaeian Jelodar[3] and B. Golein[4]**
[1]M.Sc. Student, Dept. of Plant Breeding and Agricultural Biotechnology, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [2]Associated Prof., Dept. of Plant Breeding and Agricultural Biotechnology, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [3]Professor, Dept. of Plant Breeding and Agricultural Biotechnology, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [4]Associated Prof., Citrus Research Institute, Ramsar, Iran
Received: 01/21/2014 ; Accepted: 07/20/2014

Abstract

It is important to identify the genetic diversity and phylogenic relationships for achieving desirable citrus cultivars. In present study RAPD markers were used to determine genetic diversity among 29 citrus genotypes. From 19 used primers, 248 polymorphic bands were amplified. Primers OPA-07 and OPA-05 (with 19 and 8 amplified bands), produced maximum and minimum polymorphic bands, respectively. The average number of polymorphic bands was estimated as 13 for each primer. Similarity among samples was calculated using NTsys software and Jaccard coefficient. Rang of similarity was 0.14-0.97 based on polymorphic bands with average of 0.62. Cluster analysis has been done based on Jaccard's similarity matrix and the UPGMA method. Cluster analysis has divided citrus genotypes into five separate groups. According to the similarity matrix results, the lowest similarity (0.14) was belonged to local mandarin and Pommelo and the highest similarity (0.97) was belonged to unknown natural types G74 and G73. In current research, Pommelo and mandarin confirmed as true species of citrus in distinct cluster. Determination of genetic diversity in citrus provides useful information for breeding programs, selection and improving cultivars.

Keywords: Citrus, Cluster analysis, Genetic diversity, RAPD, Similarity matrix

*****Corresponding author; h_abedinpour@ymail.com

Archive of SID
www.SID.ir