



دانشگاه گوارش و منابع گیاهی

نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی

جلد بیست و هفتم، شماره دوم، ۱۳۹۹

۷۳-۸۵

<http://jopp.gau.ac.ir>

DOI: 10.22069/jopp.2020.16171.2463

## بررسی تنوع ژنتیکی برخی ژنوتیپ‌های مرکبات ایران بر اساس

### خصوصیات و نشانگرهای مولکولی ISSR و PCR-RFLP

\*بابک عدولی<sup>۱</sup>، بهروز گل‌عین<sup>۲</sup> و سمانه راهب<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup>استادیار پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری، رامسر، ایران،

<sup>۲</sup>دانشیار پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری، رامسر، ایران،

<sup>۳</sup>محقق پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری، رامسر، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۳۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۱۶

#### چکیده

**سابقه و هدف:** ژرم‌پلاسما مرکبات ایران تنوع ژنتیکی گسترده‌ای دارد که ناشی از دگرگرده‌افشانی، سابقه طولانی ازدیاد بذری و فراوانی جهش‌های ژنتیکی است. برای تعیین وضعیت رده‌بندی، روابط فیلوژنتیک و فاصله ژنتیکی بین افراد این ذخیره ارزشمند ژنتیکی باید از ویژگی‌های مورفولوژی در کنار نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA استفاده کرد. در پژوهش حاضر برای کسب اطلاعاتی در مورد درجه قرابت ژنتیکی موجود بین ۷۹ ژنوتیپ ناشناخته محلی مرکبات موجود در کلکسیون ایستگاه تحقیقاتی کترا و تعیین فاصله نسبی آن‌ها از ۱۸ رقم تجاری، سه نوع نشانگر (ریخت‌شناسی، ISSR و PCR-RFLP) مورد استفاده قرار گرفت.

**مواد و روش‌ها:** مطالعه حاضر به‌صورت پژوهشی سه‌ساله و به‌منظور دستیابی به اطلاعات شناسنامه‌ای ۷۹ ژنوتیپ محلی ناشناخته و ۱۸ رقم تجاری مرکبات (شاهد)، تعیین روابط فیلوژنتیک و فاصله ژنتیکی آن‌ها با یکدیگر انجام گرفت. این پژوهش بر اساس بررسی مقایسه‌ای تعداد ۱۹ صفت رویشی و ۴۰ صفت زایشی و تجزیه DNA کلروپلاستی مبتنی بر نشانگرهای ISSR و PCR-RFLP نمونه‌های برگی انجام گرفت. میانگین سه‌ساله صفات ریخت‌شناسی بر اساس استانداردهای توصیف‌نامه‌ای ثبت گردید. به‌منظور انجام مطالعات مولکولی، استخراج DNA از نمونه‌های برگی هر ژنوتیپ انجام و مقدار DNA با استفاده از نانودراپ در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. تجزیه خوشه‌ای داده‌های ریخت‌شناسی و مولکولی بر اساس داده‌های جفت‌نشده (UPGMA) و ضریب تشابه جاکارد صورت گرفت و اختلاف بین ژنوتیپ‌ها بر مبنای کدگذاری و رتبه‌بندی آن‌ها صورت پذیرفت.

**یافته‌ها:** نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای داده‌های ریخت‌شناسی و مولکولی با نرم‌افزارهای NTSYS-pc و POPGENE نشان داد که همه ژنوتیپ‌ها می‌توانند بر اساس صفات ظاهری و نشانگرهای ISSR و PCR-RFLP به‌ترتیب در ضریب تشابه‌های ۴۰، ۵۳ و ۶۰ درصد به ۱۲، ۹ و ۵ خوشه اصلی طبقه‌بندی شوند. طبق داده‌های ریخت‌شناسی، اولین خوشه (A) به دو زیرگروه تقسیم شد که یکی از آن‌ها شامل ۳ رقم لیمو بود. در خوشه دوم (B) همه ارقام پرتقال و نارنگی و در خوشه سوم (C) بالنگ،

\* مسئول مکاتبه: b.adouli@areeo.ac.ir

دارایی و گریپ‌فروت دانکن قرار داشتند. نتایج حاصل از تجزیه نشانگر ISSR نشان داد که درصد چند شکلی ژنوتیپ‌های بررسی شده از ۹۲ درصد تا ۵۳ درصد به ترتیب برای نشانگرهای N10 و N1 متغیر بود و تعداد قابل توجهی از آن‌ها قرابت نزدیکی با پرتقال داشته‌اند. نتایج این مطالعه هم‌چنین نشان داد که کامکوات بر اساس مشخصات مولکولی و صفات ظاهری جنسی متمایز از خانواده مرکبات است و می‌تواند در گروهی مجزا قرار بگیرد. از سوی دیگر، پرتقال‌ها، گریپ‌فروت‌ها و پوملوا همگی در یک گروه بودند و با این واقعیت که گریپ‌فروت‌ها دورگ‌هایی از پرتقال و پوملو هستند انطباق دارد. به این ترتیب، درجه مشابهت ژنوتیپ‌های ناشناخته محلی با یکدیگر و با رقم‌های شاهد تعیین شد. علاوه بر این، تمایز سه گونه *C. reticulata*، *C. medica* و *C. maxima* نیز به خوبی ممکن شد.

**نتیجه‌گیری:** داده‌های حاصل از اندازه‌گیری صفات ریخت‌شناسی و مولکولی ژنوتیپ‌های ناشناخته مرکبات کلکسیون کترا می‌تواند اطلاعات شناسنامه‌ای هر ژنوتیپ ناشناخته محلی را مشخص و هم‌چنین فاصله ژنتیکی و روابط فیلوژنتیک آن‌ها را با یکدیگر و با رقم‌های تجاری تعیین کند. به این ترتیب، می‌توان در آینده بر اساس نتایج حاصله، گزینشی کارآمد از والدین تلاقی‌ها را برای دستیابی به اهداف برنامه‌های اصلاحی و ایجاد ارقام جدید ممکن کرد.

**واژه‌های کلیدی:** تجزیه خوشه‌ای، ذخایر ژنتیکی، صفات ریخت‌شناسی، نشانگرهای مولکولی

#### مقدمه

ظاهری و ویژگی‌های مولکولی ژرم‌پلاسم مرکبات کشور نسبت به تعیین وضعیت رده‌بندی و روابط فیلوژنتیک افراد آن اقدام کرد (۱۴). نشانگرهای ریخت‌شناسی که تا سه دهه اخیر برای تهیه نقشه‌های ژنتیکی صفات ظاهری مانند پاکوتاهی، زالی و شکل برگ مورد استفاده بوده‌اند برای رسیدن به چنین هدفی به تنهایی کافی نیستند زیرا محدودیت‌های زیادی مانند متأثر بودن از شرایط محیطی و مرحله رشد و نمو گیاه داشته و ضمن آن که اغلب به صفات کیفی با توارث غالب/مغلوب مربوط می‌شوند، مشمول رتبه‌بندی نیز هستند (۱۸). بنابراین برای تکمیل این نشانگرها و دستیابی به اطلاعات دقیق‌تر باید از ابزار دیگری در حوزه زیست‌شناسی مولکولی استفاده کرد که یکی از بنیادی‌ترین آن‌ها نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA است (۸). قدرت تمایز این نشانگرها بیشتر از نشانگرهای ریخت‌شناسی و حتی پروتئینی بوده و می‌تواند با آشکارسازی اختلاف‌های موجود در توالی‌های کدکننده و غیرکدکننده نقش مهمی در تعیین

مرکبات محصولاتی درختی و درختچه‌ای از خانواده Rutaceae و بومی مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری با گسترش وسیع جغرافیایی هستند. در حال حاضر تولید مرکبات به دومین صنعت میوه جهان تبدیل شده و سطح کشتی معادل ۱۰ میلیون هکتار با تولید بالغ بر ۱۴۶ میلیون تن را به خود اختصاص داده است که در این میان، سهم ایران در تولید و سطح کشت جهانی به ترتیب معادل ۳/۷ و ۳/۳ درصد است (۶ و ۹). تنوع ژنتیکی گسترده مرکبات ایران که تا حدود زیادی حاصل درصد بالای دگرگشتی، وفور جهش‌های خودبخودی و سابقه طولانی تکثیر بذری می‌باشد، طیف وسیعی از شکل، اندازه و رنگ میوه مرکبات را ایجاد کرده و ژرم‌پلاسم ارزشمندی را برای برنامه‌های اصلاحی فراهم آورده است (۸). از آنجایی که اجرای برنامه‌های به‌نژادی نیازمند دسترسی به اطلاعاتی جامع از تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم و تخمین دقیقی از قرابت بین افراد آن است (۱۸ و ۲۰) باید با شناخت کافی از خصوصیات

تشکیل گروه‌هایی مستقل از یکدیگر، قرابت بیش‌تری با جنس *Citrus* که گونه‌های آن در سه خوشه اصلی طبقه‌بندی بود داشته‌اند (۲). در پژوهش دیگری، شهسوار و همکاران (۲۰۰۴) با هدف شناسایی و تعیین روابط فیلوژنتیک موجود بین ۳۳ ژنوتیپ از ارقام تجاری و انواع ناشناخته مرکبات، نشانگرهای ISSR را برای متمایز کردن گونه‌هایی با روابط خویشاوندی نزدیک مفید تشخیص دادند (۲۲). نتایج گزارش گل‌عین و همکاران (۲۰۱۲) از به‌کارگیری نشانگرهای SSR و PCR-RFLP نیز توانست منجر به تشخیص رافلمون به‌عنوان یکی از والدین رقم بکرایی که تا مدت‌ها ناشناخته مانده بود شود (۱۱). در پژوهش حاضر برای معلوم کردن چندشکلی‌های ژنتیکی موجود در ژنوتیپ‌های طبیعی و ناشناخته مرکبات کلکسیون کترا و تعیین فاصله نسبی آن‌ها از ارقام تجاری موجود، پژوهشی سه‌ساله با کمک نشانگرهای مورفولوژی، ISSR و PCR-RFLP انجام شد تا از اطلاعات حاصل از تجزیه خوشه‌ای داده‌ها بتوان گام مهمی در مسیر اهداف اصلاحی مرکبات برداشت.

### مواد و روش‌ها

این پژوهش سه‌ساله در محل کلکسیون مرکبات ایستگاه کترا (۳۶ درجه عرض شمالی و ۵۰ درجه طول شرقی با ارتفاع ۶۰ متر از سطح دریا) متعلق به پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری واقع در ۱۸ کیلومتری شهر تنکابن در (طی سال‌های ۱۳۹۵ تا ۱۳۹۷) انجام گرفته است. هدف از این پژوهش، گروه‌بندی ۷۹ ژنوتیپ ناشناخته مرکبات شمال کشور (کدهای G1 تا G79) و تعیین قرابت ژنتیکی آن‌ها با یکدیگر و با ۱۸ رقم تجاری (شاهد) بوده است. هر یک از ژنوتیپ‌های طبیعی و همچنین رقم‌های تجاری شاهد که شامل پرتقال سیاورز (G<sub>۸۰</sub>)، سلطان مرکبات

قرابت بین افراد مجموعه‌های گیاهی داشته باشند (۱۰). در بین نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA، نشانگرهای ISSR به‌عنوان روشی ساده، سریع، کارآمد و بسیار تکرارپذیر استفاده گسترده‌ای در تجزیه و تحلیل دقیق، سریع و ارزان تعداد زیادی جایگاه‌های ژنی را داشته و در آشکارسازی تنوع ژنتیکی کاربرد زیادی دارند (۲۱). PCR-RFLP نیز یکی دیگر از نشانگرهای مبتنی بر DNA است که اگرچه در مقایسه با توالی‌یابی مستقیم دقت کم‌تری دارد اما روشی ساده و ارزان برای شناسایی و تفکیک گونه‌هاست (۱۵).

از سوابق تحقیقاتی مربوط به کاربرد نشانگرهای ژنتیکی در مطالعه ژرم‌پلاسم مرکبات می‌توان به ارزیابی ۳۷ رقم نارنگی محلی کشور برزیل با کمک نشانگرهای مورفولوژی اشاره کرد که منجر به تجاری تشخیص دادن اغلب آن‌ها شد (۱۳). در پژوهش دیگری تعداد ۶۳ رقم نارنگی از کلکسیون مرکبات کشور مکزیک به کمک ۲۰ صفت کمی و ۱۰ صفت کیفی مربوط به برگ، گل و میوه بررسی و معلوم شد که این ارقام با توجه به گستردگی بالای تنوع ژنتیکی می‌توانند ماده اولیه مناسبی برای برنامه‌های به‌نژادی باشند (۴). نتایج پژوهش دیگری که با نشانگرهای ISSR و PCR-RFLP به بررسی روابط خویشاوندی موجود بین ۶۸ گونه از جنس سیتروس انجام گرفت نشان داد که اختلاف ژنتیکی ۱۴ ژنوتیپ پرتقال، یک ژنوتیپ گریپ‌فروت و پنج ژنوتیپ لیمو با سایر افراد جمعیت بسیار بیش‌تر است (۳). اسدی‌آبکنار و همکاران (۲۰۱۲) نیز با تجزیه PCR-RFLP که روی DNA کلروپلاستی انجام گرفت موفق به نمایش روابط فیلوژنتیک موجود بین ۳۰ نمونه از مرکبات حقیقی شدند. آن‌ها با تشکیل درخت فیلوژنی براساس UPGMA و ماتریس تشابه دایس نشان دادند که سه جنس *Clymenia* و *Fortunella*، *Poncirus* ضمن

تجزیه خوشه‌ای شدند. به این ترتیب، اختلاف بین ژنوتیپ‌ها به شیوه رتبه‌دهی و با الگوی کدگذاری ژنوتیپ‌ها تعیین شد. اندازه‌گیری آماره‌های توصیفی متغیرهای مورد بررسی نیز با نرم‌افزار SPSS 21.0 انجام شد.

برای بررسی‌های مولکولی، استخراج DNA نمونه‌های برگ‌ی به روش موری و تامسون (۱۹۸۰) انجام و غلظت DNA به صورت اسپکتوفتومتری (نانو دراپ) با اندازه‌گیری سطح جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر مشخص شد و سپس نمونه‌هایی که دارای کمیت و کیفیت مناسب بودند انتخاب شدند. برای این منظور، ابتدا DNA استخراج شده با دستگاه الکتروفورز افقی BioRAD روی ژل آگارز دو درصد حاوی TBE به ابعاد ۱۵×۱۵ سانتی‌متر بررسی و تنها آن‌هایی که یک بانده ضخیم در قسمت بالایی ژل بدون کشیدگی ایجاد کرده بودند برای مرحله بعد انتخاب شدند. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از دستگاه ترموسایکلر (Applied Biosystem 9700) حاوی ۹۶ چاهک و ۱۰ آغازگر ISSR (جدول ۱) که در مطالعات قبلی بالاترین محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) را به خود اختصاص داده بودند (شهسوار و همکاران، ۲۰۰۴) استفاده شد. در این بررسی، تعداد سه جفت آغازگر کلروپلاستی (جدول ۲) توصیه شده توسط اسدی و همکاران (۲۰۱۲) و هفت آنزیم برشی شامل HinfI, BsuRI (HaeIII), MSPI (HpaII), Hin6I, HindIII, TaqI به کار برده شد. دسته‌بندی افراد براساس داده‌های مولکولی پس از تشکیل ماتریس صفر و یک با کمک دو نرم‌افزار NTSYS-pc و POPGENE انجام شد و تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA با ضریب تشابه جاکارد که بیش‌ترین ضریب همبستگی کوفتیک (۰/۷۸) را داشت، صورت گرفت.

(G<sub>۸۱</sub>)، گریپ‌فروت دانکن (G<sub>۸۲</sub>)، لیموی لیسبون (G<sub>۸۳</sub>)، پرتقال والنسیا (G<sub>۸۴</sub>)، پرتقال گروس‌سانگین (G<sub>۸۵</sub>)، دارابی (G<sub>۸۶</sub>)، نارنج (G<sub>۸۷</sub>)، بالنگ (G<sub>۸۸</sub>)، نارنگی کلمانتین (G<sub>۸۹</sub>)، کامکوات (G<sub>۹۰</sub>)، پرتقال تامسون‌ناول (G<sub>۹۱</sub>)، یوزو (G<sub>۹۲</sub>)، نارنگی انشو (G<sub>۹۳</sub>)، نارنگی دنسی (G<sub>۹۴</sub>)، پرتقال واشنگتن‌ناول (G<sub>۹۵</sub>)، لیموشیرین (G<sub>۹۶</sub>) و لیمو عمانی (G<sub>۹۷</sub>) بودند با پنج تکرار تک درختی در ردیف‌هایی مجزا در زمین مستقر بودند. میانگین سه‌ساله ۱۹ صفت رویشی (حاصل از بررسی شکل کلی تاج و اندازه‌گیری ۳۰ برگ از هر درخت) و ۴۰ صفت زایشی (حاصل از ۳۰ گل و ۱۰ میوه از هر درخت) مطابق با الگوی توصیف‌نامه مرکبات برای انجام تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها مورد استفاده قرار گرفت. صفات ریخت‌شناسی ثبت شده شامل عادت رشدی درخت، زاویه شاخه با تنه، تراکم شاخه، شکل تاج، رنگ نوک شاخه، تراکم و شکل تیغ، تقسیم برگ، شکل کلی و حاشیه پهنک، وضعیت نوک برگ، طول و عرض پهنک، طول دم‌برگ، شکل و پهنای گوشوارک، اتصال پهنک به دم‌برگ، زمان گل‌دهی، نوع و رنگ گل؛ طول دم‌گل؛ تعداد و ابعاد گلبرگ؛ قطر کاسبرگ؛ رنگ بساک؛ طول نسبی بساک به کلاله؛ فصل باردهی؛ شکل میوه؛ شکل قاعده و نوک میوه؛ رنگ، بافت و ضخامت پوست میوه؛ وزن و ابعاد میوه؛ نسبت طول به قطر میوه؛ چسبندگی میان‌بر به گوشت؛ وضوح غدد ترش‌حی در پوست میوه؛ رنگ میان‌بر؛ وضعیت حضور هاله و خامه در نوک میوه؛ تعداد پره‌ها؛ ضخامت و چسبندگی دیواره پره‌ها؛ وضعیت محور میانی میوه؛ رنگ و بافت گوشت؛ طول و ضخامت کیسه‌های ترش‌حی؛ تعداد، شکل، رنگ و بافت سطح بذر بود که با نرم‌افزار NTSYS-pc بر اساس روش گروه‌های جفتی وزن‌نشده (UPGMA) و ضریب تشابه جاکارد

جدول ۱- آغازگرهای ISSR استفاده شده در آزمایش مولکولی.

**Table 1. ISSR primers used in molecular experiment.**

کد آغازگر primer code	آغازگر primer	کد آغازگر primer code	آغازگر primer
N1	HVH (GA)7T	N6	(AG)8YC
N2	BDB (CA)7C	N7	(AC)8YG
N3	DBDA (CA)7	N8	(AC)8YA
N4	(GA)8YG	N9	(AC)8YT
N5	(AG)8YT	N10	(CA)8RG

جدول ۲- آغازگرهای کلروپلاستی استفاده شده در آزمایش.

**Table 2. Chloroplast primers used in the experiment.**

کد code	آغازگر primer	توالی Sequence
1	rbcL	5'-ATGTCACCACAAACAGAACTAAAGCAAGT-3'
2	ORF106	5'-ACTACAGATCTCATACTACCCC-3'
3	trnD	5'-ACCAATTGAACTACAATCCC-3'
4	trnT	5'-CTACCACTGAGTTAAAAGGG-3'
5	trnH	5'-ACGGGAATTGAACCCGCGCA-3'
6	trnk	5'-CCGACTAGTTCGGGTTCGA-3'

تغییرات (۱۰ درصد) مربوط به صفت طول به قطر میوه‌ها بوده است. در مجموع، بالا بودن ضریب تغییرات صفات اندازه‌گیری شده در این پژوهش می‌تواند نشانه قابل اطمینانی برای گسترده‌گی دامنه تنوع ژنتیکی افراد مورد بررسی باشد که از نظر اهداف به‌نژادی بسیار ارزشمند است.

### نتایج و بحث

نتایج حاصل از اندازه‌گیری صفات مورفولوژی: بررسی مقادیر حداقل، حداکثر، میانگین، انحراف معیار و ضریب تغییرات مربوط به ۱۳ صفت ریخت‌شناسی برگ و میوه در جدول ۳ نشان داده شده است. بالاترین ضریب تغییرات مربوط به دو صفت تعداد بذر (۵۵ درصد) و نسبت طول به عرض پهنک (۴۹ درصد) بوده و در مقابل، پایین‌ترین ضریب

جدول ۳- آماره‌های توصیفی متغیرهای مورد بررسی در ژنوتیپ‌های مختلف.

Table 3. Descriptive statistics of variables studied in different genotypes.

ضریب تغییرات (%) CV%	انحراف معیار Standard Deviation	دامنه تغییرات Range	حداکثر Maximum	میانگین Mean	حداقل Minimum	صفات Characters
42	5.73	23.4	23.2	13.6	0.16	ضخامت پوست میوه (mm) Peel thickness (mm)
20	60	547.57	560.93	293.75	13.36	وزن میوه (gr.) Fruit weight (gr.)
23	30.15	189.1	221.64	126.4	32.54	طول میوه (mm) Fruit Length (mm)
35	40.78	191.2	216.96	116.51	25.76	قطر میوه (mm) Fruit diameter (mm)
10	0.11	0.65	1.39	1.02	0.74	نسبت طول به قطر میوه Length per Diameter ratio
55	5.03	24	25	9	1	تعداد بذر میوه Seed number
17	20.2	121.8	164.2	112.42	42.04	طول پهنک (mm) Blade length (mm)
24	28.28	171.54	196.21	115.31	24.67	عرض پهنک (mm) Blade diameter (mm)
49	1.01	1.44	2.69	2.03	1.25	طول به عرض پهنک L/D of leaf
24	5.2	24.21	23.51	21.31	8.3	طول گلبرگ (mm) Petal length (mm)
35	4.3	10.86	16.75	12.01	5.89	عرض گلبرگ (mm) Petal diameter (mm)
40	2.01	6.19	7.97	5.02	1.78	طول به عرض گلبرگ L/D of petal
24	80	542.4	590.67	322.45	48.27	وزن میوه (gr.) Fruit weight (gr.)

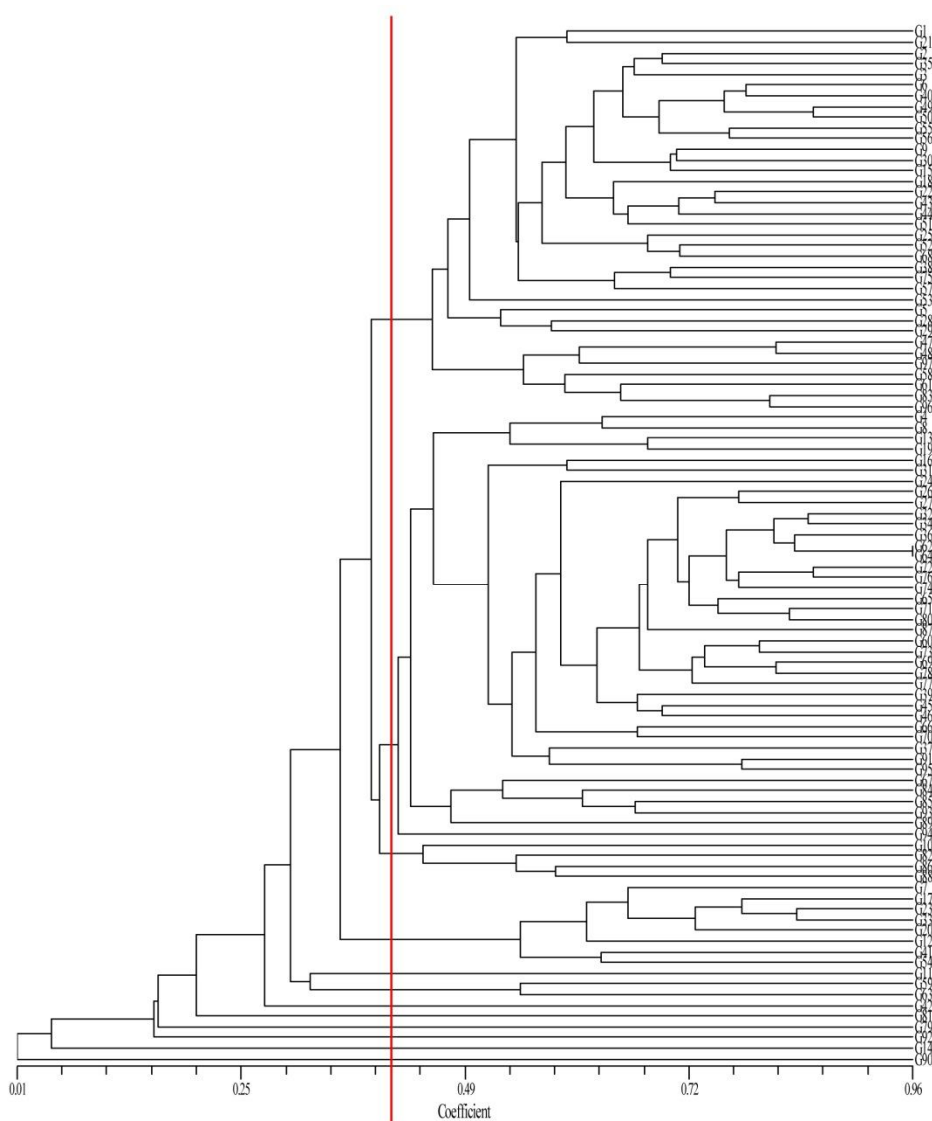
ژنوتیپ محلی و بدون هیچ رقم تجاری) و A<sub>2</sub> (مشمول بر سه رقم لیمو) تقسیم کرد. در این دندروگرام هم‌چنین بین لیمو شیرین و لیموی اورکا ضریب تشابه ۸۰ درصد و بین لیمو عمانی و دو لیموی دیگر ضریب تشابه ۵۵ درصد دیده می‌شود.

خوشه دوم (B) با ۴۰ ژنوتیپ شامل تمام ارقام پرتقال و نارنگی بوده و در ضریب تشابه ۴۲ درصد به دو زیرگروه B<sub>1</sub> و B<sub>2</sub> قابل تقسیم است. خوشه سوم (C) با چهار ژنوتیپ، شامل بالنگ، دارابی و

برش فرضی دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای صفات ریخت‌شناسی (شکل ۱) در ضریب تشابه ۴۱ درصد می‌تواند همه ژنوتیپ‌ها را به ۱۲ خوشه اصلی (A تا L) دسته‌بندی نماید. به این ترتیب، بخش اعظم ژنوتیپ‌های ناشناخته محلی همراه با حدود دوسوم ارقام تجاری شاهد در خوشه‌های اول (با ۳۶ ژنوتیپ) و دوم (با ۴۰ ژنوتیپ) قرار می‌گیرند. در این شکل، خوشه اول (A) را می‌توان با برشی فرضی در ضریب تشابه ۴۵ درصد به دو زیرخوشه A<sub>1</sub> (شامل ۲۹

ناشناخته بوده و سایر خوشه‌ها به غیر از خوشه ششم (F) که از دو ژنوتیپ تشکیل شده است تنها شامل یک ژنوتیپ هستند. سه رقم تجاری شدوک، یوزو و کامکوات نیز که خصوصیات ظاهری متفاوت‌تری با سایر ارقام تجاری شاهد داشته‌اند در خوشه‌هایی مجزا (به ترتیب خوشه‌های هشتم، دهم و دوازدهم) که فاقد هر رقم تجاری دیگری هستند قرار گرفته‌اند.

گریپ‌فروت دانکن بوده و در واقع خوشه پوملوه‌است. این خوشه در ضریب تشابه ۴۵ درصد به دو زیرگروه  $C_1$  و  $C_2$  قابل تقسیم بوده و هر سه رقم تجاری فوق در زیرگروه  $C_2$  قرار می‌گیرند. شکل ۱ هم‌چنین نشان می‌دهد که ضریب تشابه بین دارابی و بالنگ برابر ۵۹ درصد و بین این دو رقم با گریپ‌فروت دانکن ۵۵ درصد است که مطابقت خوبی با صفات ظاهری آن‌ها دارد. خوشه چهارم (D) شامل هشت ژنوتیپ



شکل ۱- دندروگرام ژنوتیپ‌های مرکبات بر اساس صفات ریخت‌شناسی با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA.

Fig. 1. Dendrogram of citrus genotypes according to morphological traits using Jaccard's similarity coefficient and UPGMA method.

نتایج بررسی‌های مولکولی نشان داده است که آغازگرهای آزمون شده هسته و کلروپلاست قادر به تکثیر بیش از ۹۰ درصد مکان‌های هدف در ژنوم‌های مورد بررسی هستند که نشان‌دهنده حفظ توالی آغازگر در بین درصد بالایی از ارقام آزمون شده است (۱۵). هر ۱۰ آغازگر استفاده شده در این پژوهش، قطعاتی قابل امتیازدهی تولید کردند که میزان چند شکلی این قطعات در جدول ۴ نشان داده شد. از کل نشانگرهای موجود در مجموع ۱۲۰ نوار ایجاد شد که از این تعداد، ۹۵ نوار چندشکلی داشتند. میانگین مکان‌های چندشکل ۹/۵ و درصد چند شکلی به دست آمده از ۹۲ درصد برای نشانگر N10 تا ۵۳ درصد برای نشانگر NI متغیر و دارای میانگینی برابر با ۷۷/۹۳ درصد بود. درصد نسبتاً بالای چندشکلی ایجاد شده و استناد به گزارش ژانگ و همکاران (۲۰۰۶) که دسترسی به سطح بالای چندشکلی را عاملی کلیدی برای ارزیابی کارآمد تنوع ژنتیکی می‌داند، می‌توان دریافت که این نشانگرها به خوبی در شناسایی و تفکیک ژنوتیپ‌ها عمل کرده‌اند.

بر اساس گزارش‌های قبلی، خصوصیات برگی مرکبات می‌تواند شاخص خوبی در ارزیابی‌های ریخت‌شناسی باشد (۲۴) و ثابت شده است که خصوصیات ظاهری بال از کارایی بالایی برای تفکیک ژنوتیپ‌ها و تشخیص گونه و رقم برخوردار است. به عنوان مثال، در گریپ‌فروت و پوملو برگ‌ها بال کاملی داشته ولی برگ‌های بالنگ فاقد بال است. در مقابل، رنگ گل اگرچه تنوع بالایی ندارد، اما در انواع گرمسیری مثل لیموها و بالنگ برخلاف اغلب ارقام دیگر، ارغوانی‌رنگ است. وجود برخی صفات کمیاب دیگر از جمله زیاد بودن بیش از حد تعداد پرچم‌ها در مقایسه با تعداد گلبرگ‌ها که در انواع لیمو دیده می‌شود، هم‌چنین ضعیف بودن اتصال پوست به گوشت میوه در اغلب نارنگی‌ها، تک‌جینی و درشت بودن بذرها در انواع پوملو و بزرگی قابل توجه میوه‌ها در گریپ‌فروت‌ها و شدوک‌ها می‌توانند در گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مرکبات تا حدود زیادی کارساز باشند. با همه این اوصاف، صفات ظاهری به تنهایی نمی‌توانند در تعیین قرابت ژنتیکی افراد یک جمعیت کافی بوده (۸) لازم است در اغلب موارد از نشانگرهای مولکولی در کنار صفات ظاهری استفاده شود.

جدول ۴- آماره‌های تنوع ژنتیکی مربوط به ۱۱ نشانگر ISSR.

Table 4. Genetic diversity statistics for 11 ISSR markers.

تنوع ژنی (H) Genetic Diversity	محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) Polymorphism Information Capacity	تعداد نوارهای مؤثر (Ne) Number of effective bands	درصد چندشکلی Polymorphism (%)	نوارهای چندشکل Number of polymorphic bands	تعداد کل نوارها Total number of bands	آغازگرها Primers
0.2	0.27	1.1	53.84	7	13	N1
0.3	0.47	1.44	88.8	8	9	N2
0.34	0.48	1.52	91.66	11	12	N3
0.28	0.3	1.34	83.33	5	6	N4
0.27	0.39	1.45	80	12	15	N5
0.21	0.27	1.2	57	5	7	N6
0.29	0.26	1.5	78.57	11	14	N7
0.23	0.29	1.31	66.66	10	15	N8
0.3	0.49	1.29	86.66	13	15	N9
0.36	0.49	1.63	92.85	13	14	N10
2.7	3.8	13.8	779.3	95	120	مجموع
0.27	۰.۳۸	1.38	77.93	9.5	12	میانگین



بودن منشأ پرتقال‌ها و مسئول دانستن جهش‌ها و انتخاب کلون‌های برتر برای تفرق موجود باشد. از طرفی، عدم قرابت بالای برخی از ژنوتیپ‌ها با پرتقال‌های سیاوز و والنسیا می‌تواند نشان‌دهنده این موضوع باشد که آن‌ها دورگ‌هایی از پرتقال هستند. کامکوات بر اساس خصوصیات مولکولی نیز مانند نتایج حاصل از صفات ظاهری، به‌عنوان یک جنس مجزا از خانواده مرکبات از سایر ارقام و ژنوتیپ‌ها تفکیک شد و در طبقه‌ای مجزا قرار گرفت. از طرف دیگر، پرتقال‌ها، گریپ‌فروت و دارابی همگی در یک گروه قرار گرفتند که نشان‌دهنده قرابت نزدیک آن‌هاست و با این واقعیت که گریپ‌فروت‌ها در واقع دورگ‌هایی از پرتقال و پوملو (دارابی) هستند انطباق خوبی دارد. شکل ۲ هم‌چنین نشان می‌دهد که نارنگی‌های کلمانین و انشو اگرچه هر دو از نوع ماندارین‌ها بوده و در گروه A قرار گرفته‌اند، اما چون متعلق به گونه‌های مختلفی هستند، بر اساس داده‌های مولکولی نیز از یکدیگر به خوبی جدا شده‌اند که با نتایج گزارش شده توسط فیلهو و همکاران (۱۹۹۸) نیز انطباق کامل دارد (۷). نشانگرهای استفاده شده در این پژوهش توانستند در تأیید گزارش‌های فانگ و همکاران (۱۹۹۷)، کروجر و روز (۲۰۰۳) و شهسوار و همکاران (۲۰۰۷)، درجه قرابت ژنوتیپ‌ها را با یکدیگر به خوبی نشان بدهند (۱۴ و ۲۳). نشانگرهای کلروپلاستی هم‌چنین قرابت بالای برخی ژنوتیپ‌های ناشناخته محلی را با پرتقال ثابت کرده و معلوم شد که ژنوتیپ‌های  $G_{79}$ ،  $G_{70}$ ،  $G_{71}$ ،  $G_{72}$  و  $G_{74}$  در گروه پرتقال‌ها قرار دارند. بر اساس این نتایج، نارنگی‌های کلمانین و دنسی با ضریب تشابه ۸۵ درصد با ژنوتیپ‌های  $G_4$ ،  $G_{14}$ ،  $G_{19}$  و  $G_{37}$  در یک گروه قرار گرفته‌اند ولی از نارنگی انشو کاملاً جدا هستند.

بنابراین با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان از نشانگر ISSR و به‌خصوص نشانگرهایی که درصد چندشکلی بالاتری را تولید کرده‌اند به‌عنوان ابزاری مناسب در برنامه‌های اصلاحی مرکبات استفاده کرد. نتایج مشابهی پیش از این توسط کومار و همکاران (۲۰۱۰) گزارش شده و درصد چندشکلی نشانگرهای ISSR را در بررسی تنوع ژنتیکی ارقام بومی و غیر بومی پرتقال، بین ۷۵ تا ۹۴ درصد اعلام کرده بودند (۱۵). نتایج جدول ۴ هم‌چنین با یافته‌های گل‌عین و همکاران که درصد چند شکلی را بین نشانگرهای مختلف ISSR از ۷۵ تا ۱۰۰ درصد اعلام کرده بودند مطابقت دارد (۱۲). بر اساس این جدول، بالاترین محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) که از شاخص‌های مهم برای مقایسه قدرت تمایزایی نشانگرهاست در نشانگرهای N9 و N10 وجود دارد که نشانه چندشکلی زیاد در یک جایگاه نشانگری است که در تمایز ژنوتیپ‌های با خویشاوندی نزدیک کارآمدی بالایی دارد.

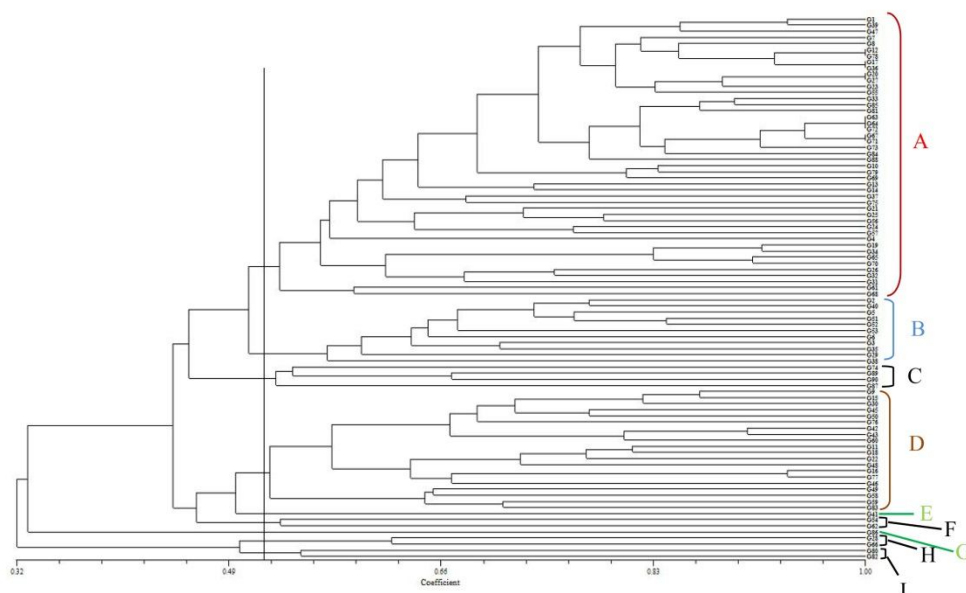
**گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر مبنای نشانگر ISSR با استفاده از تجزیه خوشه‌ای:** تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها با نرم‌افزار NTSYS-pc به روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد که بیش‌ترین ضریب همبستگی کوفتیک (۰/۷۸) را داشت انجام شد. برش دندروگرام حاصل (شکل ۲) در ضریب تشابه ۰/۵۳ توانست همه ژنوتیپ‌ها را در ۹ گروه اصلی (A, B, C, D, E, F, G, H و I) قرار بدهد. نتایج حاصل از به‌کارگیری این نشانگر ثابت کرد که تعدادی از ژنوتیپ‌ها قرابت بالایی با پرتقال داشته و در گروه پرتقال‌ها قرار گرفته‌اند. این ژنوتیپ‌ها ممکن است نوسالزهایی از یکدیگر و یا حاصل جهش‌های سوماتیکی باشند (۱۵) که تأییدی برای نظریه یکسان

تشخیص تفاوت‌های موجود بین انواع پرتقال وجود نداشت اما تمایز بین سه گونه *C. reticulata*، *C. medica* و *C. maxima* که در گزارش‌های قبلی به‌عنوان گونه‌های اصلی مرکبات پیشنهاد شده بود به خوبی ممکن گردید (۳).

نتایج استفاده از نشانگر PCR-RFLP: نمونه‌های حاصل از PCR نمونه‌های آزمایشی که با آنزیم‌های *HinfI*، *HindIII*، *BsuRI*، *TaqI*، *Hin6I* و *MspI* به مدت ۴ ساعت (طبق دستور شرکت سازنده) در دماهای خاص هر آنزیم برش خورده و روی ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی TBE بارگذاری شده‌اند در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج دسته‌بندی افراد با استفاده از تجزیه خوشه‌ای که با نرم‌افزار NTSYS-pc و به روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد انجام گرفت در شکل ۳ نشان داده شده است. برش فرضی این دندروگرام در ضریب تشابه ۰/۶ موجب تفکیک کلیه ژنوتیپ‌های بررسی شده به ۵ گروه اصلی (A، B، C، D و E) شده است.

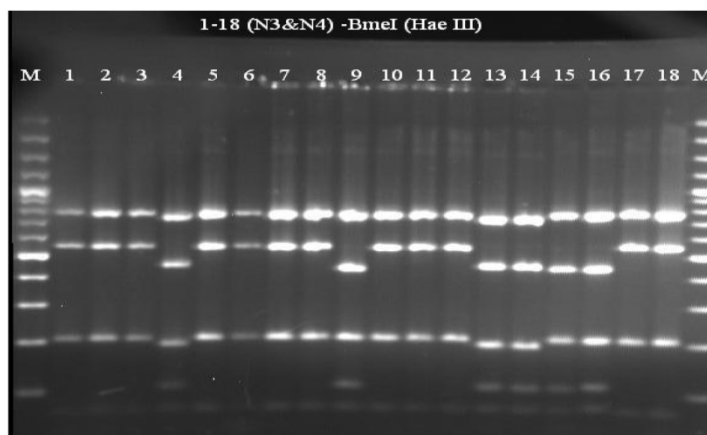
گزارش‌های قبلی از کاربرد نشانگرهای مولکولی RAPD و SSR تأییدکننده همین نتیجه بوده و نشان داده‌اند که نارنگی‌های کلمانتین و انشو به دو دسته متفاوت تعلق دارند (۷ و ۱۱).

اگرچه نشانگرهای کلروپلاستی استفاده شده در پژوهش اخیر، برای شناسایی والدین ارقام موردنظر نشانگر مناسبی محسوب می‌شوند ولی در پژوهش حاضر نتوانستند قرابت ژنوتیپ‌ها به نمونه‌های شاهد را به خوبی نشان دهند. بررسی صفات ریخت‌شناسی و نشانگرهای مولکولی استفاده شده در این پژوهش، درجه قرابت ژنوتیپ‌ها را به نمونه‌های شاهد به خوبی نشان دادند، هر چند که تفاوت‌هایی در نتایج به دست آمده از بررسی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی مشاهده شد که می‌تواند ناشی از بالا بودن دقت نشانگرهای مولکولی باشد. به هر حال، با استفاده از صفات ظاهری امکان تفکیک ارقام پرتقال و نارنگی از یکدیگر به خوبی مهیا شد و بر اساس اطلاعات حاصل از تجزیه داده‌های مولکولی اگرچه امکان



شکل ۲- دندروگرام حاصل از نشانگر ISSR برای ژنوتیپ‌های مرکبات با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA.

Fig. 2. Obtained dendrogram from the ISSR marker for citrus genotypes using Jaccard's similarity coefficient and UPGMA method.

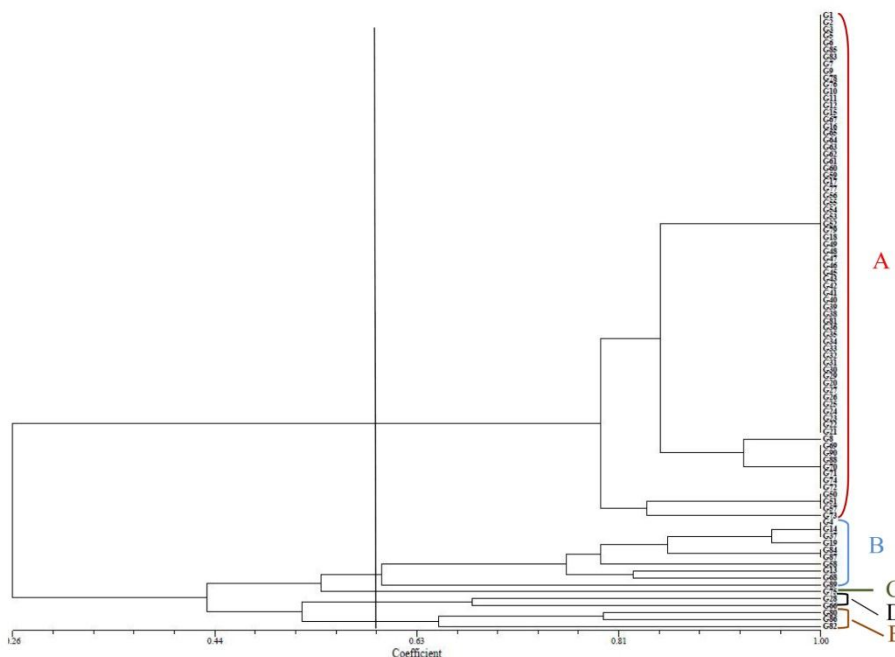


شکل ۳- الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد حاصل از PCR نمونه DNA برش خورده با آنزیم BmeI در ۱۸ ژنوتیپ. نشانگر: Thermo Scientific GeneRuler, 100bp.

Fig. 3. Agarose gel (1.5%) electrophoresis of degenerate PCR products obtained with BmeI restricted enzyme from 18 genotypes. Marker: Thermo Scientific GeneRuler 100 bp.

پرتقال‌های والنسیاواشنگتن ناول نیز بود. در خوشه B که زیرگروه قابل تقسیم است، نارنگی‌های کلمانتین و دنسی به همراه پنج ژنوتیپ دیگر در یک زیرگروه و دو ژنوتیپ ناشناخته به دو نیز در زیرگروه دوم قرار گرفتند. نارنگی انشو در خوشه C و بالنگ و کامکوات در یک زیرگروه از خوشه E قرار گرفتند.

خوشه A به دو زیرگروه و هر زیرگروه نیز خود به دو زیرگروه فرعی تقسیم شدند. زیرگروه فرعی اول در نخستین زیرگروه A شامل ۵۹ ژنوتیپ و دربرگیرنده پوملو، لیموشیرین، پرتقال‌های سیاورز و گروس سانگین و هم‌چنین لیموی اروکا و گریپ‌فروت دانکن بود. زیرگروه فرعی دوم از اولین زیرگروه A نیز تنها دارای هشت ژنوتیپ و شامل نارنج و



شکل ۴- دندروگرام حاصل از نشانگر PCR-RFLP با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA.

Fig. 4. Obtained dendrogram from the PCR-RFLP marker using Jaccard's similarity coefficient and UPGMA method.

## نتیجه‌گیری کلی

بر اساس اطلاعات حاصل از اندازه‌گیری خصوصیات ریخت‌شناسی و ملکولی ژنوتیپ‌های ناشناخته مرکبات کلکسیون کترا ضمن معرفی شناسنامه‌ای جامع از صفات ظاهری ژنوتیپ‌های ناشناخته و طبیعی مرکبات موجود در این کلکسیون، امکان تعیین ارتباط فیلوژنتیک ژنوتیپ‌های ناشناخته محلی را با یکدیگر و با ارقام تجاری مشخص شد. نشانگرهای ریخت‌شناسی قادر به تمایز بین ارقام پرتقال و نارنگی بودند، در صورتی که نشانگرهای ملکولی تمایزی را بین انواع پرتقال‌ها قائل نشدند. نشانگرهای ریخت‌شناسی قادر به تمایز بین ارقام پرتقال و نارنگی بودند، در صورتی که نشانگرهای مولکولی نتوانستند بین پرتقال‌ها تفاوتی قائل شوند. سه گونه اصلی مرکبات شامل *C. reticulata*، *C. medica* و *C. maxima* نیز بر اساس هر دو دسته از نشانگرهای ریخت‌شناسی و مولکولی در گروه‌های متمایزی قرار گرفتند.

نتایج حاصل از تجزیه داده‌های ریخت‌شناسی نشان داد که بالاترین ضریب تغییرات مربوط به دو صفت تعداد بذر (۵۵ درصد) و نسبت طول به عرض پهنک (۴۹ درصد) بوده و در مقابل، پایین‌ترین ضریب تغییرات (۱۰ درصد) مربوط به صفت طول به قطر میوه‌ها بوده است. در مجموع، بالا بودن ضریب تغییرات صفات اندازه‌گیری‌شده در این پژوهش می‌تواند نشانه قابل اطمینانی برای گستردگی دامنه تنوع ژنتیکی افراد مورد بررسی باشد که از نظر اهداف به‌نژادی بسیار ارزشمند است. تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها که بر اساس نشانگر ISSR صورت گرفت، توانست همه ژنوتیپ‌ها را در ۹ گروه اصلی (A, B, C, D, E, F, G, H و I) قرار بدهد و هم‌چنین تجزیه خوشه‌ای حاصل از نشانگر RFLP ژنوتیپ‌های بررسی‌شده را توانست در ۵ گروه اصلی (A, B, C, D و E) گروه بندی کند. نتایج حاصل از تجزیه هر دو نشانگر تقریباً با هم مشابه بودند.

## منابع

1. Adouli, B. 2004. Descriptor of Citrus. Citrus and Subtropical Fruits Research Center. 46p. (In Persian)
2. Asadi-Abkenar, A., Isshiki, S. and Tashiro, Y. 2004. Phylogenetic relationships in the "true citrus fruit trees" revealed by PCR-RFLP analysis of cpDNA. Sci. Hort. 102: 233-242.
3. Asadi-Abkenar, A., Sharghi, E., Mardi, M. and Khankahdani, H. 2012. Study on polymorphism of chloroplastic DNA in Iranian local lemon genotypes by PCR-RFLP Method. Proc. 8<sup>th</sup>. Biotech. Conf. and 4<sup>th</sup> National Biosec. Conf. 4p. (In Persian)
4. Campos, E.T., Espinosa, M.A.G., Warburton, M.L., Varela, A.S. and Monter, A.V. 2005. Characterization of mandarin (*Citrus* spp.) using morphological and AFLP markers. Interciencia. Venezuela. 15: 687-693.
5. Coelho, R.I., Lopes, J.S., Groth, D. and Souza, E.A. 2001. Morphological characterization of plants, fruits, seeds and seedlings of mandarin (*Citrus reticulata*) with natural occurrence in South of Espirito Santo State. Rev. Bras. Sem. 23: 294-301.
6. F.A.O. Commodities and Trade Division. 2016. Citrus fruit fresh and processed annual statistics. CCP:CI/13 Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
7. Filho, H.D.C., Machado, M.A., Targon, M.L.P.N., Moreira, M.C.P.Q.D.G. and Pompeu, J. 1998. Analysis of the genetic diversity among mandarins (*Citrus* spp.) using RAPD markers. Euphytica. 102: 133-139.
8. Gmitter, F.G., Grosser, J.W. and Moore, A.G. 1992. Citrus. In: Biotechnology of Perennial Fruit Crops. Hammerschlag,

- F.A. and Litz, R.E. (eds.). CAB International, Wallingford, Oxon. Pp: 335-369.
9. Golein, B. and Adouli, B. 2008. Citrus (Culture). Citrus and Subtropical Fruits Research Center. 160p. (In Persian)
  10. Golein, B. 2012. Diversity investigation of Iranian Citrus natural biotypes. Citrus and Subtropical Fruits Research Center. 75p. (In Persian)
  11. Golein, B., Bigonah, M., Azadvar, M. and Golmohammadi, M. 2012. Analysis of genetic relationship between 'Bakraee' (*Citrus* sp.) and some known *Citrus* genotypes through SSR and PCR-RFLP markers. *Sci. Hort.* 148: 147-153.
  12. Golein, B., Ghasemi, M., Fattahi-Moghadam, J. and Gholamian, E. 2012. Genetic analysis between unknown Citrus accessions and commercially important cultivars using ISSR marker. *J. Agric. Biotech.* 5: 4. 112-123. (In Persian)
  13. Kohler-Santos, P., Dornelles, A. and Freitas, L. 2003. Characterization of mandarin citrus germplasm from Southern Brazil by morphological and molecular analysis. *Agropec. Bras. Brasilia.* 38: 797-806.
  14. Krueger, R. and Roose, M.L. 2003. Use of molecular markers in the management of citrus germplasm resources. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128: 827-837.
  15. Kumar, S., Narayan Jena, S. and Nair, N.K. 2010. ISSR polymorphism in Indian wild orange (*Citrus indica* Tanaka, Rutaceae) and related wild species in North-east India. *Sci. Hort.* 123: 350-359.
  16. Mohammadi, S.A. 2015. Workshop on Molecular Techniques for Plant Variety Protection, Tabriz University, 48p. (In Persian)
  17. Moore, G.A. 2001. Oranges and lemons. Clues to taxonomy of *Citrus* from molecular markers. *Trends Genet.* 17: 536-540.
  18. Naghavi, M.R., Gharayazi, B. and Hoseini-Salkadeh, B. 2005. Principles of genetics. University of Tehran Press. 334p. (In Persian)
  19. Nicolosi, E., Deng, Z., Gentile, A. and La Malfa, S. 2000. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 100: 1155-1166.
  20. Ray, P.K. 2002. Citrus. In: *Breeding Tropical and Subtropical Fruits.* Springer-Verlag Narosa Publishing House, 338p.
  21. Reddy, P.M., Sarla, N. and Siddig, E.A. 2002. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica.* 128: 9-17.
  22. Shahsavar, A., Izadpanah, K., Tafazzoli, E. and Sayed-Tabatabaei, B.E. 2005. Evaluation of genetic variability of limes and lemons in the Fars province by morphological traits and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Iranian J. Hort. Sci. Tech.* 5: 4. 177-188.
  23. Shahsavar, A.R., Izadpanah, K., Tafazzoli, E. and Sayed-Tabatabaei, B.E. 2007. Characterization of citrus germplasm including unknown variants by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Sci. Hort.* 112: 310-314.
  24. Soost, R.K. and Roose, M.L. 1996. Citrus, In: Janick, J. and Moore, J.N. (eds.), *Fruit breeding, vol. I: Tree and Tropical Fruits,* John Wiley and Sons Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, Pp: 257-323.

*Arc*