تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی – ملکولی
دوره چهارم، شماره شانزدهم، پائیز ۱۳۹۳

Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی تنوع ژنتیکی ارقام ناشناخته و تجاری مرکبات شمال کشور با استفاده از نشانگر SSR

هاجر بخشی‌پور میانده[۱]، ایرج مهرگان[۲]، بهروز گلعین[۳]، سارا سعادتمند[۲]

۱. *دانشجوی دکتری دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران و مدرس دانشگاه پیام نور مرکز رامسر*
۲. *استادیار و عضو هیأت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران*
۳. *استادیار و عضو هیأت علمی مؤسسه تحقیقات مرکبات کشور، رامسر*

Archive of SID

چکیده

سابقه و هدف: اطلاع از روابط فیلوژنتیک و تنوع ژنتیک در مرکبات جهت تشخیص روابط ژنتیکی، شناسایی ژرم‌پلاسم و ثبت ارقام جدید، امری مهم و ضروری می‌باشد. در کلکسیون‌های مرکبات کشور، تعدادی بیوتیپ وجود دارد که شناسایی آنها عمدتاً بر اساس صفات مرفولوژی بوده و تحقیقات ژنتیکی چندانی بر روی آنها انجام نشده است. نشانگرهای ملکولی می‌توانند در این زمینه مفید باشند.

مواد و روش‌ها: به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی بین ۴۵ ژنوتیپ از ارقام ناشناخته و تجاری مرکبات موجود در ایستگاه تحقیقات کترا، از نشانگر SSR استفاده گردید. استخراج DNA از برگ‌های جوان مرکبات با روش موری و تامسون انجام شد و سپس تکثیر با ده جفت آغازگر ریزماهواره صورت گرفت. محصولات تکثیر شده با استفاده از ژل پلی‌آکریلامید ۶٪ دارای اوره ۷ مولار و تحت شرایط واسرشتگی تفکیک شده و با رنگ‌آمیزی نیترات نقره قابل رویت گردید. الگوی باندی براساس حضور باند (یک) یا عدم حضور باند (صفر) نمره‌دهی شده و محتوای اطلاعات چندشکلی برای هر جفت نشانگر محاسبه گردید و با استفاده از نرم‌افزار NTSYS ، فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌ها براساس ضریب تشابه جاکارد محاسبه وروش تجزیه خوشه‌ای دورترین همسایه برای گروه‌بندی استفاده شد.

یافته‌ها: میانگین چندشکلی ۰/۶۸۵ برآورد شد. تعداد آلل‌ها از ۳ تا ۱۳متغیر بوده و در مجموع ۷۲ آلل شناسایی شد. تجزیه کلاستر ۴۵ ژنوتیپ مورد بررسی را براساس نشانگرهای SSR به شش گروه تقسیم نمود. ارقام پرتقال، نارنگی و ۲۴ ژنوتیپ ناشناخته در گروه A، گریپ‌فروت و پوملو و نارنج و شش ژنوتیپ ناشناخته در گروه B، سه ژنوتیپ ناشناخته در گروه C، دو ژنوتیپ ناشناخته و یوزو به ترتیب در گروه‌های D و E و در نهایت ارقام لیمو و بالنگ و دو ژنوتیپ ناشناخته در گروه F قرار گرفتند.

نتیجه‌گیری: هر یک از این نشانگرها سطوح مختلفی از تنوع را در سطح ژنوم ارایه می‌دهند که می‌تواند در مدیریت ژرم‌پلاسم و ذخایر توارثی مفید باشد. تجزیه تنوع ژنتیک و روابط خویشاوندی در مرکبات، اطلاعات مفیدی را برای برنامه‌های به‌نژادی، انتخاب و ثبت ارقام جدید فراهم می‌کند.

واژه‌های کلیدی: ارقام مرکبات، روابط خویشاوندی، ژرم‌پلاسم، نشانگر مولکولی

مقدمه

مرکبات عموماً به گونه‌های مختلفی از جنس *Citrus L*. (خانواده Rutaceae) اطلاق می‌شود. مرکبات در ایران شامل گروه بزرگی از میوه‌ها از جمله پرتقال Citrus sinensis، نارنگی .C reticulata، لایم .*C. aurantifolia*، گریپ فروت .C paradisi،

نویسنده مسئول : هاجر بخشی‌پور میانده
پست الکترونیکی: Hajar.bakhshipour@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله: ۹۲/۰۴/۲۹
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۳/۰۳/۰۳

www.SID.ir

دارابی C. grandis می‌باشد. گسترش وسیع جغرافیایی و میزان بالای تولید مرکبات موجب شده است که این محصول از اهمیت اقتصادی زیادی در جهان برخوردار باشد. در دنیای جدید، مرکبات دومین صنعت بزرگ میوه در تجارت جهانی بوده و می‌تواند در اقلیم‌های گرمسیری و نیمه‌گرمسیری که خاک مناسب، گرمای متوسط و رطوبت دائمی داشته باشند گسترش بیابند (۱). امروزه دو عامل فرسایش ژنتیکی و آسیب‌پذیری ژنتیکی به شدت محصولات زراعی و باغی را تحت تأثیر قرار داده است، لذا از مهم‌ترین وظایف یک اصلاح‌گر، توجه به ذخایر ژنتیکی و استفاده بهینه از این ذخایر و تنوع موجود در جهت بهبود کمی و کیفی محصولات است. تخمین ترکیب ژنتیکی مرکبات و مجموعه‌های ژنتیکی و قرابت بین آنها ازگذشته دور معمول بوده است (۲). مشخص شدن رده‌بندی، روابط فیلوژنتیک و تنوع ژنتیکی در مرکبات جهت تعیین روابط ژنتیکی، شناسایی ژرم‌پلاسم، کنترل فرسایش ژنتیکی، ایجاد برنامه‌های اصلاحی و ثبت ارقام جدید، امری مهم و حیاتی می‌باشد (۱۶). نشانگرهای مولکولی که برای شناسایی نوترکیب‌های ژنتیکی استفاده می‌شوند، می‌توانند تا حد زیادی ارزیابی و انتخاب نتاج مورد نظر را سرعت ببخشند. علاوه بر این، شناسایی نشانگرهایی که با صفت مورد نظر پیوستگی دارند باعث می‌شود که انتخاب نتاج در برنامه‌های اصلاحی بر اساس ژنوتیپ و خیلی زود قابل اجرا باشد. بر این اساس هزینه ارزیابی و احداث باغ از طریق حذف زود هنگام ژنوتیپ‌های ناخواسته کاهش یافته، انتقال ژن‌های مطلوب در میان ارقام رو به افزایش گذاشته و انتخاب ژن‌های مطلوب از درون ژرم‌پلاسم وحشی بیشتر خواهد شد (۳۲). مطالعات متعددی نشان داده‌اند که نشانگرهای DNA قدرت تمایز بیشتری نسبت به نشانگرهای مرفولوژیکی و پروتئینی دارا می‌باشند (۳۱). دلیل این امر در این نکته نهفته است که نشانگرهای DNA قادرند علاوه بر اختلافات موجود در توالی‌های کدکننده تفاوت‌های بین توالی‌های غیرکدکننده را نیز نمایان سازند. به همین دلیل این نشانگرها برای تخمین تنوع ژنتیکی و تعیین قرابت بین مجموعه‌های گیاهان مورد استفاده قرار گرفته است (۱). فراوانی ریزماهواره‌ها در ژنوم، سطح بالای تنوع آللی درجایگاه‌های ریزماهواره‌ای و سهولت به‌کارگیری این نشانگرها، آنها را از نشانگرهای ژنتیکی مشهور ساخته است. ویژگی دیگر ریزماهواره‌ها، هم‌بارز بودن آنها و امکان تشخیص افراد هتروزیگوت از هموزیگوت است (۲۱ و ۲۵). امروزه تعیین تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای ملکولی آسان‌تر، کم‌هزینه‌تر، تکرارپذیرتر و قابل اعتمادتر از نشانگرهای مرفولوژی است.

نشانگرهای ملکولی به عنوان ابزاری مهم در مرکبات در دامنه وسیعی از مطالعات شامل تجزیه پیوستگی، تهیه نقشه‌های ژنتیکی، تجزیه آرایه‌بندی، تعیین خویشاوندی ژنتیکی و شناسایی ارقام به‌کار گرفته شده‌اند. برای مثال می‌توان به پژوهش‌های انجام شده زیر اشاره نمود: ریما و همکاران (۲۸)، طی شناسایی و تخمین تنوع ژنتیکی در مرکبات تأیید کردند که نشانگرهای RAPD و SSR قادرند چندشکلی قابل قبولی را آشکار سازند و بر پایه آن می‌توان ژنوتیپ‌ها و گونه‌های مرکبات را به درستی از هم متمایز ساخت. گولسن و روز (۱۳) از آیزوزایم‌ها و نشانگرهای مولکولی SSR و ISSR جهت بررسی تنوع ژنتیک و ارتباط فیلوژنتیک میان ۲۴ رقم لمون (*C. limon*) استفاده نمودند. کورازانانز و همکاران (۵)، در یک مطالعه ۳۸ رقم گریپ‌فروت به همراه ۳ رقم پوملو را توسط نشانگرهای RAPD و ریزماهواره SSR مطالعه کردند. بارکلی و همکاران (۲)، از نشانگر ریزماهواره SSR جهت بررسی تنوع ژنتیکی در کلکسیون ژرم‌پلاست مرکبات دانشگاه کالیفرنیا استفاده نمودند و توانستند به خوبی گونه‌های مختلف جنس Citrus را با استفاده از این نشانگر از هم متمایز کنند.

کوهلرسانتوز و همکاران(۱۵)، در یک مطالعه در برزیل، ارقام مختلف نارنگی محلی را با کمک نشانگرهای مورفولوژیک و نشانگرهای SSR بررسی کردند. پانگ و همکاران (۲۶)، دریک تحقیق روابط خویشاوندی ۲۹ گونه از جنس‌های مهم تیره سداب شامل جنس‌های Citrus, Poncirus, Fortunella, Microcitrus و Eremocitrus را به کمک نشانگرهای ریزماهواره *SSR* مطالعه کردند. رویز و همکاران(۲۹)، جهت انتخاب گیاه-چه‌های جنسی از نوسلارها، از نشانگر SSR استفاده کردند و نتایج حاصله را با نتایج ایزوزیم‌ها مقایسه کردند. نتایج این تحقیقات نشان داده است که SSR نشانگر قدرتمندی در متمایز نمودن گونه‌های مرکبات دارای رابطه خویشاوندی هستند و می‌توانند روابط خویشاوندی میان ارقام تجاری و ژنوتیپ‌های ناشناخته ژرم‌پلاسم مرکبات را مشخص نمایند. در میان نشانگرهای ملکولی قابل دسترس مانند RAPD، ISSR، *SSR* و AFLP از نشانگرهای SSR در به‌نژادی ژنتیکی گیاهان استفاده زیادی شده است. نشانگر SSR به دلیل چندشکلی بالا، وراثت هم‌بارز، پایداری و تکرارپذیری زیاد از نشانگرهای قابل اعتماد در بررسی تنوع ژنتیکی، مطالعه فیلوژنی، شناسایی ژرم‌پلاسم و تهیه نقشه‌های ژنتیکی مرکبات به‌کار رفته‌اند (۱۸). در ارتباط با مطالعات انجام شده توسط سایر محققین نتایج کار آن‌ها حذف شده است تنها به فعالیت انجام شده اشاره گردید.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و استخراج *DNA* ژنومیک

برای انجام این آزمایش، برگ ۴۵ نمونه مرکبات از ایستگاه تحقیقات مرکبات کترا (تنکابن) جمع‌آوری شد (جدول۱). این برگ‌ها از سرشاخه‌های جوان بدون نشانه‌های ظاهری ناشی از اثر عوامل بیماری‌زا و فیزیولوژیک بودند. ۶-۵ برگ سالم جوان از هر گیاه جمع‌آوری و تا زمان استخراج DNA در فریزر در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. استخراج DNA به روش موری و تامسون (۲۰) انجام گرفت. در این روش ابتدا به نمونه برگی پودر شده در ازت مایع، بافر استخراج اضافه گردید. برای جداسازی فاز رویی و آبی، از کلروفرم - ایزوآمیل الکل (به نسبت ۲۴ به ۱) و برای رسوب DNA از اتانول ۹۷٪ و سرد استفاده شد. در پایان، DNA در بافر (Tris- EDTA) TE به نسبت ۱۰ به ۱ حل شده و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. پس از استخراج DNA و قبل از انجام هر گونه واکنش‌های PCR، جهت بررسی کمیت و غلظت DNA ژنوم، از جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر (نانو دراپ ND1000) استفاده شد. نمونه‌های DNA که نسبت جذب نوری ۲۸۰ به ۲۶۰ آنها بین ۲-۱/۷ بودند، انتخاب شدند. برای تعیین کیفیت DNA*های* استخراج شده، نمونه‌ها با روش الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸ درصد مورد بررسی قرار گرفتند..

جدول ۱: ارقام گیاهی استفاده شده در آزمایش

ردیف	کد گیاه	نام علمی گیاه	نام عمومی
1~33	G1~G33	*Citrus* spp	نامشخص (Unknown)
34	G34	*Citrus limon*	لمون اروکا (EureKa lemon)
35	G35	*Citrus reticulata*	نارنگی دنسی (Dancy mandarin)
36	G36	*Citrus clementina*	نارنگی کلمانتین (Clementine mandarin)
37	G37	*Citrus limettioides*	لیموشیرین (Sweet lime)
38	G38	*Citrus medica*	بالنگ (Citron)
39	G39	*Citrus aurantifolia*	لیمو آب شیراز (Mexican lime)
40	G40	*Citrus junos*	یوزو (Yuzo)
41	G41	*Citrus aurantium*	نارنج (Sour orange)
42	G42	*Citrus grandis*	پوملو (Pummelo)
43	G43	*Citrus sinensis*	پرتقال خونی (Moro orange)
44	G44	*Citrus paradisi*	گریپ‌فروت دانکن (Duncan grapefruit)
45	G45	*Citrus sinensis*	پرتقال تامسون (Thomson Navel orange)

Archive of SID

www.SID.ir

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) با آغازگر SSR

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (MJ Research, PTC200) با ۱۰ جفت آغازگر SSR (۲۳) اختصاصی مرکبات که در مطالعات سایر محققین کیفیت آللی مناسب و میزان چندشکلی بالایی را بین ارقام مرکبات نشان داده بودند، انجام گرفت. آغازگرهای لازم در این تحقیق از شرکت سیناژن تهیه شد. مشخصات این آغازگرها در جدول۲ نشان داده شده است. واکنش PCR در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر DNA رقیق شده(۵۰ نانوگرم)، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط نوکلئوتیدی، ۱/۲۵میکرولیتر از هر دو آغازگر رو به جلو و آغازگر برعکس به غلظت۱µl ۱۰، ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیم، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10 x) و ۰/۲ میکرولیتر DNA polymerase *Taq*، انجام شد. شرایط تکثیر DNA در ابتدا برای هر جفت آغازگر به صورت واسرشته سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۶ چرخه شامل واسرشته‌سازی در ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال برای هر جفت آغازگر ۴۵-۶۳/۵ درجه سانتیگراد(متفاوت برای هر جفت آغازگر) به مدت ۳۰ ثانیه و توسعه در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت ۴ دقیقه توسعه نهایی انجام شد. فرآورده‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به نسبت مساوی با فورمامید (۹۸ درصد) مخلوط و مقدار ۱۰ میکرولیتر از آن بر روی ژل پلی‌آکریلامید واسرشته‌ساز استاندارد ۶ درصد(در دستگاه Bio Rad, Squi-Gen GT) بارگذاری و با توان ثابت ۱۲۰ وات به مدت ۳۰-۴۵ دقیقه بسته به طول جایگاه‌ها الکتروفورز انجام و رنگ‌آمیزی با استفاده از روش نیترات نقره انجام شد(۴).

جدول۲. توالی جفت آغازگرهای ریزماهواره مورد استفاده

ردیف	لوکوس	توالی آغازگر روبه جلو (َ۵-َ۳) F-Primer	توالی آغازگر روبه جلو (َ۳-َ۵) R-Primer	واحد تکراری
۱	CAC23	ATCACAATTACTAGCAGCGCC	TTGCCATTGTAGCATGTTGG	CAC
۲	CAC33	GGTGATGCTGCTACTGATGC	CAATTGTGAATTTGTGATTCCG	CAC
۳	CCSM18	GTGATTGCTGGTGTCGTT	AACAGTTGATGAAGAGGAAG	AG
۴	CT19	CGCCAAGCTTACCACTCACTAC	GCCACGATTTGTAGGGGATAG	CT
۵	GT03	GCCTTCTTGATTTACCGGAC	TGCTCCGAACTTCATCATTG	GT
۶	TAA1	GACAACATCAACAACAGCAAGAGC	AAGAAGAAGAGCCCCCATTAGC	TAA
۷	TAA15	GAAAGGGTTACTTGACCAGGC	CTTCCCAGCTGCACAAGC	TAA
۸	TAA27	GGATGAAAAATGCTCAAAATG	TAGTACCCACAGGGAAGAGAGC	TAA
۹	TAA41	AGGTCTACATTGGCATTGTC	ACATGCAGTGCTATAATGAATG	TAA
۱۰	TC26	CTTCCTCTTGCGGAGTGTTC	GAGGGAAAGCCCTAATCTCA	TC

Archive of SID

www.SID.ir

آنالیز داده ها

برای بدست آوردن اندازه آلل‌ها و تعیین انواع آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها، از تصاویر اسکن شده استفاده شد. جهت امتیازدهی باندها از نرم افزار Adobe photoshop استفاده شد. باندهای چندشکلی حاصل بر اساس وجود یا عدم وجودشان به روش صفر و یک امتیازدهی شدند. با استفاده از نرم افزار NTSYS pc ver 2.02 و با روش جاکارد ماتریس تشابه آنها تشکیل و دندروگرام حاصل به روش UPGMA Cluster analysis ترسیم و تجزیه شد(شکل۱). تجزیه کلاستر به روش گروه‌های جفتی وزن نشده صورت گرفت.

شکل۱. باندهای چند شکلی نشانگر TC26روی ژل آکریلامید

یافته‌ها

در این پژوهش، تنوع ژنتیکی ۴۵ ژنوتیپ از گونه‌های مختلف جنس *Citrus* شامل ارقام ناشناخته و تجاری با استفاده از ۱۰ نشانگرهای SSR (توالی‌های ساده تکراری) بررسی شدند. غلظت‌های DNA با اسکپتروفتومتر(نانودراپ ۱۰۰۰ ND) درجذب ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. غلظت DNA استخراج شده به روش CTAB بین ۴۰۰ تا ۱۵۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر برآورده شد. غلظت‌های بدست آمده برای انجام واکنش SSR مناسب بودند و تمامی نمونه‌ها پس از رقیق‌سازی با غلظت پایه۱۲/۵ ng/ul مورد استفاده قرار گرفتند. جفت آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق در مجموع ۷۲ آلل تولید کردند. تعداد آلل شناسایی شده در هر مکان ژنی بین ۱۳-۳ آلل بود که بیشترین آن مربوط به مکان ژنی TC29 و کم‌ترین آن مربوط به مکان ژنی CAC23 بود. با توجه به جدول۳، مکان TAA27 ۱۰۰٪ هتروزیگوسیتی نشان داد و کم‌ترین مقدار هتروزیگوسیتی مربوط به مکان CAC23 و معادل با ۰/۰۲۲ بود. میانگین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده برابر با ۰/۵۲ بود. پارامتر دیگری که مورد محاسبه قرار گرفت محتوای اطلاعاتی چندشکلی بود (PIC) که با استفاده از تعداد فراوانی آلل‌ها در هر مکان ژنی، قدرت تفکیک آن را مشخص می‌کند (۱). به استثناء CAC23 (۰/۲۷۲) که چندشکلی پایینی نشان داد، تمام مکانها چندشکلی نسبتاً خوبی با میانگین ۰/۶۸۵ نشان دادند که بیشترین میزان چندشکلی مربوط به مکان TC26 معادل ۰/۸۹۱ بود(جدول ۳).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳: آغازگرها، اندازه آلل، آلل‌های مشاهده شده، محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)،

هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_{obs})

آغازگر	آلل‌های مشاهده شده	PIC	H_{obs}
CAC23	۳	۰/۲۷۲	۰/۰۲۲
CAC33	۵	۰/۵۸۱	۰/۷۵
CCSM18	۵	۰/۷۱۳	۰/۱۶۲
CT19	۱۱	۰/۸۵۳	۰/۷۴۴
GT03	۹	۰/۸۲۴	۰/۳۳۳
TAA1	۹	۰/۸۳۳	۰/۳۵۷
TAA15	۵	۰/۵۶۲	۰/۵۸۱
TAA27	۵	۰/۵۸۱	۱
TAA41	۶	۰/۷۵۹	۰/۷۶۹
TC26	۱۳	۰/۸۷۹	۰/۴۸۸
Mean	۷/۲	۰/۶۸۵	۰/۵۲

بحث

تجزیه خوشه‌ای ۴۵ ژنوتیپ مورد مطالعه بر اساس روش گروه‌های جفتی وزن نشده انجام شد. پس از برش دندروگرام در ضریب تشابه ۰/۲۶، ژنوتیپ‌ها در شش خوشه اصلی A، B، C، D، E و F دسته‌بندی شدند (شکل۲). ارقام پرتقال(G43,G45)، نارنگی(G35,G36) و ۲۴ ژنوتیپ ناشناخته در گروه A قرار گرفتند. الگوی باند ریزماهواره‌ای مشابه‌ای میان پرتقال و نارنگی مشاهده شده است که بیانگر روابط خویشاوندی نزدیک این دو گونه است(۱۷). نتایج حاصل از پژوهش بارت و رودز (۳) نشان می‌دهد که پرتقال از تلاقی پوملو و نارنگی بوجود آمده است. نتایج بدست آمده در این مطالعه نیز این فرضیه را تأیید می‌کند زیرا نارنگی قرابت ژنتیکی ۰/۵۳ با پرتقال دارد. نارنگی یکی از سه گونه اصلی مرکبات است(۳و۱۱). به نظر محققین نارنگی‌ها متعلق به یک گونه می‌باشند که شامل ارقام مختلف و تعداد زیادی از دورگ‌ها با تفاوت ژنتیکی نسبت به یکدیگر هستند(۹). مطالعاتی که فدرسی و بارکلی انجام دادند این نتیجه حاصل شد که ارقام هیبرید و غیرهیبرید نارنگی نمی‌توانند در یک گروه قرار گیرند. نتایج این پژوهش نشان داد که ارقام نارنگی در یک گروه اما در دو زیر گروه مشخص جای گرفتند(۸ و۲). با توجه به این‌که برخی از ژنوتیپ‌ها مانند G7 با G8، G26 و G27 ، G31 با G32 و G33 قرابت زیادی(بالای ۸۰ درصد) با یکدیگر دارند، آن‌ها احتمالاً موتانت‌هایی هستند که در اثر جهش سوماتیکی بوجود آمده‌اند یا ژنوتیپ‌های مشابه نوسلار همدیگر هستند(۲۴). برخی مطالعات نشان داده‌اند که

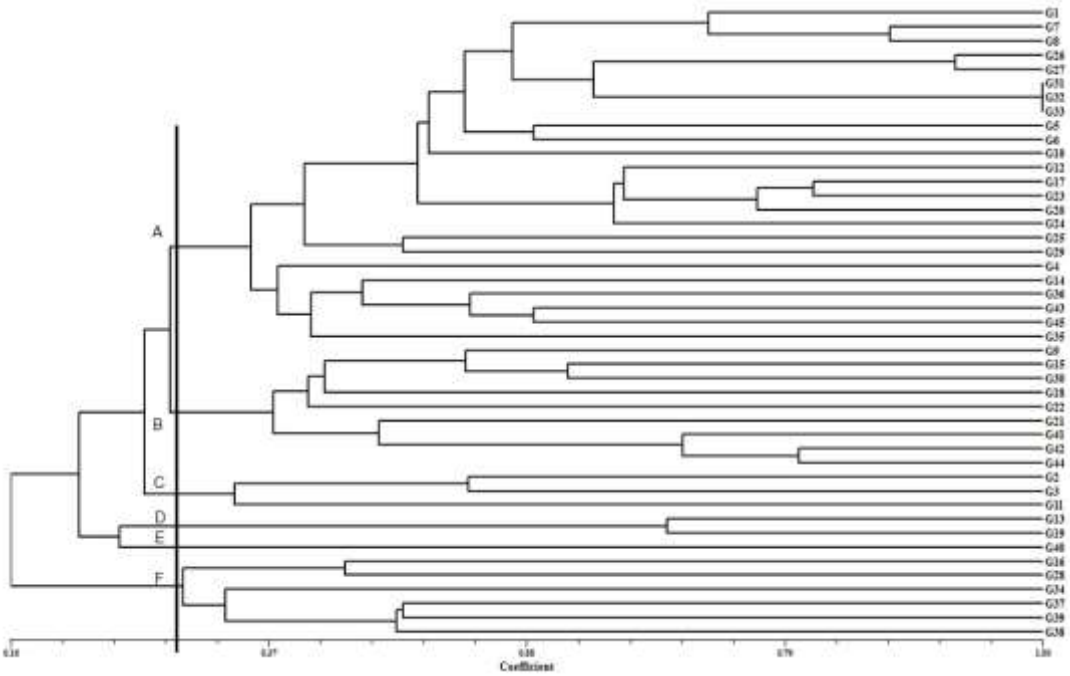
Archive of SID

www.SID.ir

پرتقال‌ها به‌طور ژنتیکی یک بیوتیپ هستند. این نتایج می‌تواند دلیلی بر منشاء مونوفیلیتیک (متحدالاصل) پرتقال باشد که بوسیله جهش سوماتیکی و انتخاب کلون برتر دنبال شده است. گروه B به دو زیر گروه تقسیم می‌شود که در زیر گروه دوم گریپ‌فروت(G44) و پوملو(G42) در کنار هم قرار گرفتند. قرابت درون‌گونه‌ای در گریپ‌فروت بسیار بالا است(۳). زمانی که از آیزوزایم‌ها جهت بررسی ۱۳ رقم گریپ‌فروت استفاده شد، هیچ اختلافی میان ارقام دیده نشد(۳۲). فانگ و روز (۷) از نشانگر مولکولی ISSR جهت بررسی ۷ رقم گریپ‌فروت استفاده نمودند و گزارش کردند که تنها یک رقم با سایر ارقام اختلاف نشان داده که تحت تأثیر جهش قرار گرفته بود. نتایج مطالعات RAPD و SCAR نشان داد که گریپ‌فروت از تلاقی میان پرتقال و پوملو ایجاد شده است(۱۰، ۲۲و۲۴). نتایج بدست آمده در این مطالعه نیز این فرضیه را تایید می‌کند و گریپ‌فروت در ضریب تشابه ۰/۸۱ از پوملو جدا شده است. از طرفی دیگر نارنج(G41) با ضریب تشابه ۰/۷۰ از پوملو و گریپ‌فروت جدا می‌گردد. مطالعات حاکی از آن است که نارنج‌ها هیبریدهای طبیعی نارنگی و پوملو هستند(۳و۳۰). در این گروه قرابت ژنتیکی بالایی بین ارقام ناشناخته و ارقام تجاری وجود ندارد. ژنوتیپ های G2، G11، G3 در خوشه C جای گرفتند. این ژنوتیپ‌ها با هیچ‌یک از نمونه‌های شاهد مورد بررسی دراین مطالعه قرابت نشان ندادند. بارکلی پیشنهاد کرد ارقام حاصل از تلاقی جنسی، تنوع ژنتیکی بسیار بالایی نسبت به ارقام آپومیکسی دارند، بنابراین روابط اجدادی آنها کمتر شناخته شده است(۲). دو ژنوتیپ ناشناخته G13، G19 در گروه D و یوزو به تنهایی در گروه E قرار گرفت. خوشه F شامل ارقام لیمو و بالنگ و ژنوتیپ‌های G16، G23 است. تمام ارقام لیمو و لایم در کنار بالنگ در یک خوشه جای گرفتند. این الگوی گروه‌بندی در مطالعات قبلی نیز بدست آمده است(۲۲و۸) و با نتایج حاصل از این مطالعه مشابه است. نتایج بدست آمده حاکی از آن است که لمون‌ها دورگ حاصل از تلاقی میان لایم و بالنگ هستند، اما به لحاظ ژنتیکی قرابت بیشتری نسبت به لایم دارند و یا دورگ حاصل از بالنگ و نارنج می‌باشند(۱۲و۱۴). یافته‌های حاصل در این پژوهش نیز مؤید این موضوع است زیرا لمون اروکا در ضرایب تشابه ۰/۳۶ از بالنگ و ۰/۴۷ از لایم تفکیک شد. بالنگ یکی از سه گونه اصلی مرکبات است و به عنوان منشأ سایر مرکبات شناخته شده است (۳). تقریباً همه آغازگرها مورد استفاده در این تحقیق چندشکلی بالایی نشان دادند. این آغازگرها قادر به تکثیر بیش از ۹۰٪ مکانهای هدف در هر ژنوم آزمون شده بودند. این امر بیانگر میزان بالای حفظ توالی آغازگر بین ارقام مورد مطالعه می‌باشد. مطالعات بارکلی و همکاران (۲) نیز موید این مطلب است. آنها از ۲۴ جفت آغازگر SSR جهت مطالعه روی ۳۷۰ ژنوتیپ مرکبات دانشگاه کالیفرنیا استفاده کردند. دامنه محتوای اطلاعات چندشکلی(PIC) محاسبه شده بین ۰/۲ تا ۰/۹ بود. در تحقیق آها، میانگین هتروزیگوسیتی در کل جمعیت مورد مطالعه، ۰/۴۲ بود که بیش‌ترین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده مربوط به مکان ژنی TAA41 و کمترین آن مربوط به مکان ژنی ACO1 و معادل با ۰/۱۳ بود. بررسی ساختار و میزان تنوع ژنتیک در ذخایر توارثی گیاهی، یکی از قدمهای اولیه در اکثر برنامه‌های اصلاحی می‌باشد. دندروگرام‌های حاصل تصویر واضحی از روابط بین ژنوتیپ‌ها را نشان داد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که نشانگرهایSSR ابزار بسیار قدرتمندی برای برآورد میزان تنوع ژنتیک درون و بین گونه‌ای و ارزیابی روابط خویشاوندی آنها، و همچنین تمایز ژنتیک و شناسایی ارقام می‌باشند که می‌توانند برای مدیریت ذخایر توارثی از طریق شناسایی نمونه‌های تکراری، ارزیابی خلوص بذور و نمونه‌های همنام مورد استفاده قرار گیرند. نتایج حاصل از مطالعات ابتسام بیانگر این مطلب است که از نشانگرهای SSR و RAPD می‌توان در تعیین ژنوم خاصی در برنامه‌های بهنژادی استفاده کرد(۶). بررسی‌ها نشان می‌دهد که ریزماهواره‌ها چندشکلی بیشتری ایجاد می‌کند، به طوری‌که امکان گروه‌بندی در تجزیه خوشه‌ای آسانتر می‌شود. ریما و وافا در تحقیقات خود بر مرکبات Syria به این نتیجه رسیدند که کارایی بسیار بالای نشانگرهای SSR جهت شناسایی ارقام مختلف مرکبات و نحوه اشتقاق این ارقام از هم بسیار مفید است(۲۷). تجزیه تنوع ژنتیک و تعیین روابط خویشاوندی در مرکبات، اطلاعات مفیدی را برای برنامه‌های بهنژادی، انتخاب و حفظ ارقام فراهم می‌کند. از آنجایی که میزان جهش‌های جوانه در مرکبات بالا بوده (۱۹)، و از طرفی نشانگرهای SSR در مسیر تولیدمثل جنسی و نوترکیبی ایجاد می‌شوند، بنابراین در درختانی مانند مرکبات که از طریق غیرجنسی تکثیر می‌شوند، لازم است از نشانگرهای بارز مانند ISSR و PCR-RFLP که در آنها قدرت تشخیص جهش به فرآیند میوز بستگی ندارد، استفاده گردد.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۲: تجزیه کلاستر ۴۵ ژنوتیپ مرکبات با استفاده از نشانگر SSR به روش گروه‌های جفتی وزن نشده

سپاسگزاری

نویسندگان بر خود واجب می‌دانند که از تمامی مسئولین و دست‌اندرکاران مؤسسه تحقیقات مرکبات کشور برای فراهم نمودن امکانات و شرایط مناسب جهت انجام این پژوهش تقدیر و تشکر نمایند

منابع

۱- گلعین ب، عدولی ب. مرکبات (کاشت). انتشارات نوین پویا، ۱۳۹۰. ۱۶۲ صفحه.

2. Barkley NA, Roose ML, Krueger RR, Federici CT. Assessing Genetic Diversity and Population Structure in a *Citrus* Germplasm Collection Utilizing Simple Sequence Repeat Markers (SSRs). Theor. Appl. Genet, 2006; 112:1519-1531.

3- Barret HC, Rhodes AM. A Numerical Taxonomic Study Affinity Relationships in Cultivated *Citrus* and its Close Relatives. Syst Bot, 1976; 1:105-136.

4- Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Greesshoff PM. Fast and Sensitive Silver Staining of DNA in Polyacrylamide Gels. Annal Biochem, 1991; 19: 680-683.

5- Corazza-Nunes MJ, Machado MA, Nunes WMC, Cristofani M, Targon MLPN. Assessment of Genetic Variability in Grapefruits (*Citrus paradisi* Macf.) and Pummelos (*Citrus maxima* Burm. Merr.) Using RAPD and SSR Markers. Euphytica, 2002; 126, 169–176.

6- Ebtsam MH. Genetic Diversity of Some Citrus Varieties Based on Microsatellite and RAPD Molecular Markers in Egypt**.** World J Agri Sci, 2013; 9 (4), 316-324.

7- Fang DQ, Roose ML. Identification of Closely Related *Citrus* Cultivars with inter Simple Sequence Sepeat Markers. Theor Appl Genet, 1997; 95:408-417.

8. Federici CT, Fang DQ, Scora RW, Roose ML. Phylogenetic Relationships within the Genus *Citrus* (Rutaceae) and Related Genera as Revealed by RFLP and RAPD Analysis. Theor Appl Genet, 1998; 94: 812–822.

9- Filho HDC, Machado MA, Targon MLPN, Moreira MCPQDG, Pompeu J. Analysis of the Genetic Diversity among Mandarins (*Citrus spp*.) using RAPD markers. Euphytica, 1998; 102: 133-139.

10- Gmitter FG, Grosser JW, Moore AG, 1992.*Citrus*. Pp. 335-369. In: Hammerschlag FA and Litz RE (eds.). Biotechnology of Perennial Fruit Crops. CAB International, Wallingford, Oxon.

Archive of SID

www.SID.ir

11- Golein B, Nazeryan M, Babakhani B. Assessing Genetic Variability in Male Sterile and Low Fertile *Citrus* Cultivars Utilizing Simple Sequence Repeat Markers (SSRs). Afric J Biotechnol, 2011; 11: 1632-1638.
12- Graham J, McNicol RJ, McNicole JW. A Comparision of Methods for the Estimation of Genetic Diversity in Strawberry Cultivars. Theor Appl Genet, 1996; 93: 402-406.
13- Gulsen O, Roose ML. Chloroplast and Nuclear Genome Analysis of the Parentage of Lemons. J Am Soc Hort Sci, 2001; 126: 210–215.
14- Herrero R, Asins MJ, Carbonell EA, Novarro L. Genetic Diversity in the Orange Subfamily Aurantioideae. I. Intraspecies and Intragenus Genetic Variability. Theor Appl Genet, 1996; 92: 596-606.
15- Koehler-Santos P, Dornelles ALC, Freitas LB. Characterization of Mandarin *Citrus* Germplasm from Southern Brazil by Morphological and Molecular Analyze. Pesq. Agropec. Bras, 2003; 38: 797-806.
16- Krueger RR, Roose ML. Use of Moleculare Markers in the Management of *Citrus* Germplasm Resource. J Am Soc Hort Sci, 2003; 128: 827-837.
17- Luro F, Laigrent F, Bove JM, Ollitrault P. DNA Amplified Fingerprinting, a Useful Tool for Determination of Genetic Origin and Diversity Analysis in *Citrus*. Hort Sci, 1995; 30: 1063-1067.
18- Matsuyama T, Omura M, Akihama, T. Distribution of Rutaceae Specific Repeated Sequences Isolated from *Citrus* Genomes. Ann of Bot, 2001; 87: 845-849.
19- Moore GA. Oranges and Lemons: Clues to the Taxonomy of *Citrus* from Molecular Markers. Trends in Genetic, 2001; 17: 536-540.
20- Murry MG, Thompson WF. Rapid Isolation of High Molecular Weight Plant DNA. Nucleic Acids Res, 1980; 8: 4321-4325.
21. Narvel JM, Wen-chy C, Fehr WR, Shoemaker RC. Development of Multiplex Sets of Simple Sequence Repeat DNA Markers Covering the Soybean Genome. Mol Breeding, 2000; 6:175-183.
22- Nicolosi E, Deng ZN, Gentile A, La Malfa S, Continella G, Tribulato E. *Citrus* Phylogeny and Genetic Origin of Important Species as Investigated by Molecular Markers. Theor Appl Genet, 2000; 100: 1155–1166.
23- Novelli, V.M., Cristofani, M., Souza, A.A., Marcos, A., Machado, M.A. (2006). Development and characterization of polymorphic microsatellite markers for the sweet orange (*Citrus sinensis* L, Osbeck). Genet. Mol. Biol, 29: 90–96.
24. Ollitrault F, Terol J, Pina JA., Navarro L, Talon M, Ollitrault P. Development of SSR Markers from *Citrus clementina* (Rutaceae) BAC end Sequences and Interspecific Transferability in *Citrus*. Am J Bot, 2010; e124–e129. 2010.
25. Ovesna J, Polakova K, Leisova L. DNA Analyses and their Applications in Plant Breeding. Czech J Genet Plant Breed, 2002; 38:29-40.
26- Pang XM, Hu CG, Deng XX. Phylogenetic Relationships among *Citrus* and its Relatives as Revealed by SSR Markers. Acta Genetica Sinica, 2003; 30:81-87.
27- Rima AM, Wafaa C. Assessment of Genetic Variability within the Genus *Citrus* in Syria Using SSR Markers. Am J Exp Agri, 2014; 4(8): 939-950.
28- Rima AM, Waffa C, Fassal D. Characterization and Estimation of Genetic Diversity in *Citrus* Rootstocks. Agri Bio, 2011; 36: 571-575.
29- Ruiz C, Bretó PM, Asíns MJ. A quick Methodology to Identify Sexual Seedlings in *Citrus* Breeding Programs Using SSR Markers. Euphytica, 2000; 112:89-94.
30- Scora RW. On the History and Origin of *Citrus*. Bull. Torr. Bot. Club, 1975; 102:369–375.
31- Smith JSC, Chin ECL, Shu H, Smith OS, Wall SJ. An Evaluation of the Utility of SSR Loci as Molecular Markers in Maize (*Zea mays* L.): Comparison with Data from RFLPs and Pedigree. Theor Appl Genet, 1997; 95, 163-173.
32- Torres AM, Soost R, Diedenhofen U. Leaf Isozymes as Genetic Markers in *Citrus*. Am J Bot, 1978; 65: 869-881.

Archive of SID

www.SID.ir