بررسی روابط ژنتیکی برخی ارقام و تیپ‌های طبیعی ناشناخته مرکبات شمال ایران با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR

یلدا نقاشی[۱]، بابک باباخانی*[۱]

گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، تنکابن، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۷/۱۶ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۶/۶/۱

چکیده

شناخت تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی در مرکبات برای برنامه ریزی و کاربرد برنامه‌های اصلاحی، حفظ تنوع‌زیستی، ثبت ارقام جدید و انجام مطالعات مولکولی لازم است. در این پژوهش، تنوع ژنتیکی ۲۹ رقم مرکبات شامل ارقام پرتقال، نارنگی، نارنج، پوملو و تیپ‌های طبیعی با استفاده از نشانگرهای ISSR مورد ارزیابی قرار گرفتند. از مجموع ۹۷ باند امتیازدهی شده برای نشانگر ISSR، تعداد ۷۸ باند، معادل ۸۰/۲۲ درصد باندها چندشکل بودند. بیشترین و کمترین درصد چندشکلی به‌ترتیب آغازگرهای ISSR-8 با ۹۰ درصد و ISSR-5 با ۷۳ درصد باند چندشکل نشان دادند. متوسط مقدار PIC در این آزمون ۰/۱۸ بود که بیشترین مقدار PIC متعلق به آغازگرهای ISSR-6 و ISSR-8 با ۰/۲۷ و کمترین میزان متعلق به آغازگر ISSR-1 با ۰/۱۲ بود. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA با ضریب تشابه تطابق ساده، ارقام مورد بررسی را به پنج گروه اصلی طبقه‌بندی کرد. پوملو مجزا از سایر ژنوتیپ‌ها در خوشه ای مجزا قرار داشت. نارنگی انشو سوجی یاما در یک گروه طبقه‌بندی و مجزا از نارنگی کلمانتین قرار گرفته است. همه ژنوتیپ‌های پرتقال رقم‌های سیاورز ۱، سیاورز ۲، سیاورز ۳، سیاورز ٤، تیپ‌های طبیعی ناشناخته، پرتقال پارسون براون و واشنگتن ناول در یک گروه قرار داشتند که قرابت بالایی به هم‌دیگر نشان دادند. نشانگر ملکولی استفاده شده می‌تواند اطلاعات مفیدی درباره سطح چندشکلی و تنوع مرکبات را فراهم کنند، که نشان‌دهنده کاربرد آن در شناسایی ژرم پلاسم مرکبات می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنوتیپ، گروه‌بندی، مرکبات، نشانگر ISSR

*نویسنده مسئول: b.babakhani94@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

تنوع ژنتیکی پایه و اساس اصلاح گیاهان است که از تکامل طبیعی نشأت گرفته و مهمترین جز در پایداری نظام‌های بیولوژی بوده و سازگاری دراز مدت و بقای جمعیت‌های گیاهی را تضمین می‌کند. افزایش تصاعدی جمعیت انسان، عامل اصلی بهره‌برداری بی‌رویه از منابع طبیعی در جهت افزایش تولیدات کشاورزی می‌باشد؛ در بسیاری از موارد این افزایش تولیدات با تخریب منابع زیستی فرسایش شدید ذخایر ژرم پلاسم طبیعی همراه بوده است. حفاظت از تنوع ژنتیکی در همه اکوسیستم‌های گیاهی در سراسر جهان به یک مسئله عمده از نگرانی‌های بین‌المللی تبدیل شده است. ازبین رفتن به طور فزاینده تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی در اثر از بین رفتن زیستگاه‌ها، دسترسی به ژرم پلاسم گیاهان مختلف را تهدید می‌کند چرا که برای تغذیه نسل‌های آینده مورد نیاز هستند. دانستن تنوع ژنتیکی و توزیع آن برای حفاظت و استفاده آن لازم است و به ما در مشخص کردن میزان حفاظت و محل حفاظت کردن و بهبود درک ما از تاکسونومی و منشأ و ارزیابی گونه‌های گیاهی کمک می‌کند (Pradeepreddy et al., 2002). مرکبات بعد از سیب دومین میوه‌ای است که در جهان مورد مصرف عمومی مردم می‌باشد و از دیرباز به‌عنوان بخشی از رژیم غذایی، دارای ارزش فراوانی بوده‌است. مرکبات و محصولات جانبی آن منابعی غنی از ویتامین‌ها، مواد معدنی و فیبر بوده و برخی مواد ضد سرطانی نیز در آنها یافت می‌شود. گسترش وسیع جغرافیایی و میزان بالای تولید مرکبات موجب شده است که این محصول از اهمیت اقتصادی بالایی در جهان برخوردار باشد (Mohammadi and Prasanna 2003). شناخت تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی در مرکبات برای برنامه‌ریزی و کاربرد برنامه‌های اصلاحی، حفظ تنوع‌زیستی،ساختن منابع ژرم‌پلاسم، کنترل فرسایش ژنتیکی، ثبت ارقام جدید و انجام مطالعات مولکولی لازم است (Barkley et al., 2006). همچنین این اطلاعات برای محققان مرکبات و اصلاح کنندگان آن برای مطالعات آینده اهمیت دارد. شناسایی و تفکیک ارقام مختلف می‌تواند ما را در جهت حفظ و ذخایر ژنتیکی و پیشبرد برنامه‌های اصلاحی کمک رساند. بررسی تنوع ژنتیکی جهت مطالعه ژرم پلاسم، تهیه برنامه‌های اصلاحی، بررسی روند تکامل گونه، رده‌بندی و بسیاری مسائل دیگر اهمیت دارد (Naghaviyan et al., 2010). بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین میزان قرابت و نزدیکی ژنتیکی مرکبات موجود در استان مازندران به‌عنوان گام اولیه و اساسی در شناسایی و ارزیابی ارقام، از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد که محقق با صرف حداقل زمان ممکن می‌تواند از پایه‌های ژنتیکی متنوع که در استان وجود دارد در برنامه‌های اصلاحی استفاده نماید. بررسی‌های مولکولی می‌تواند وضعیت قرابت یا فاصله ژنتیکی بین ارقام مشابه با نام‌های متفاوت و یا ارقام متفاوت با نام‌های مشابه را روشن نماید، همچنین ارتباط بین ژنوتیپ‌ها و منشأ احتمالی آنها نیز با استفاده از این روش‌ها به طور دقیق‌تری قابل بررسی است (Dehestani et al., 2007). با توجه به استعداد کشور ما از دیدگاه پرورش و تولید ارقام مرکبات و وجود دشت‌های وسیع برای توسعه این محصول اقتصادی ارزشمند، مطالعه و تحقیق در جهت تعیین میزان تنوع ژنتیکی و شناسایی دقیق ارقام مختلف مرکبات و استفاده از این پتانسیل جهت پیشبرد اهداف مطلوب اصلاحی، لازم و ضروری به‌نظر می‌رسد. وسعت قابل توجه کشور ایران با اقلیم‌های مختلف، تنوع فراوان منابع ژنتیکی گیاهی، وجود خاصیت دگرگشنی در مرکبات و به‌وجود آمدن دورگ‌های طبیعی و نیز وجود صفات بعضاً خوب و مفید در این دورگ‌ها از جمله مقاومت به آفات و

Archive of SID

www.SID.ir

بیماری‌ها و یا وجود صفات مطلوب کمی و کیفی، ضرورت شناسایی و جمع‌آوری این دورگ‌ها و استفاده از آن‌ها در تحقیقات مرکبات را بیش از پیش نمایان می‌کند با داشتن اطلاعات دقیق‌تر ژنتیکی از این محصول می‌توان برای اصلاح و ایجاد ارقام جدید برنامه‌ریزی نمود و ارقام با تولید محصول بالاتر، کیفیت بهتر و مقاوم به سرما و یا به شرایط نامساعد دیگر را ایجاد کرد و حتی نسبت به معرفی ارقام مناسب در سطح وسیع اقدام نمود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری بافت گیاهی: برگ ۲۹ نمونه از مرکبات (جدول ۱) از ایستگاه تحقیقات مرکبات کترا جمع‌آوری گردید. این برگ‌ها از سرشاخه‌های جوان بدون نشانه‌های ظاهری ناشی از اثر عوامل بیماری‌زا و فیزیولوژی و حاصل از رشد فصل جاری بودند. نمونه‌های برگ در اردیبهشت ماه ۹۳ پس از جمع‌آوری به مؤسسه تحقیقات مرکبات کشور منتقل شد و تا زمان استخراج DNA در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جدول ۱: نمونه‌های مرکبات مورد آزمایش

	نام فارسی	نام علمی	کد		نام فارسی	نام علمی	کد
۱	نارنج	*C. aurantium*	G1	۱٦	پوملو	*C. grandis*	G16
۲	پرتقال پارسون براون	*C. sinensis*	G2	۱۷	تیپ طبیعی	*C. sp.*	G61
۳	پرتقال واشنگتن ناول	*C. sinensis*	G3	۱۸	تیپ طبیعی	*C. sp.*	G63
٤	پرتقال سیاورز۱	*C. sinensis*	G4	۱۹	تیپ طبیعی	*C. sp.*	G65
٥	پرتقال سیاورز۲	*C. sinensis*	G5	۲۰	تیپ طبیعی	*C. sp.*	G67
٦	پرتقال سیاورز۳	*C. sinensis*	G6	۲۱	تیپ طبیعی	*C. sp.*	G70
۷	پرتقال سیاورز٤	*C. sinensis*	G7	۲۲	تیپ طبیعی	*C. sp.*	G71
۸	معلم‌کوه(تیپ طبیعی)	*C. sp.*	G8	۲۳	تیپ طبیعی	*C. sp.*	G72
۹	شل‌محله(تیپ طبیعی)	*C. sp.*	G9	۲٤	تیپ طبیعی	*C. sp.*	G73
۱۰	نارنگی اتابکی	*C. reticulata*	G10	۲٥	تیپ طبیعی	*C. sp.*	G74
۱۱	نارنگی انشو سوجی یاما	*C. unshiu*	G11	۲٦	تیپ طبیعی	*C. sp.*	G76
۱۲	نارنگی دانسی	*C. reticulata*	G12	۲۷	تیپ طبیعی	*C. sp.*	G78
۱۳	نارنگی بمی	*C. reticulata*	G13	۲۸	تیپ طبیعی	*C. sp.*	G79
۱٤	نارنگی محلی شمال	*C. reticulata*	G14	۲۹	تیپ طبیعی	*C. sp.*	G80
۱٥	نارنگی کلمانتین نولس	*C. clementina*	G15				

استخراج DNA: جهت استخراج DNA از روش موری و تامپسون (۱۹۸۰) استفاده شد.. مقدار ۰/۳ گرم از نمونه برگی به خوبی در ازت مایع پودر شده و قبل از اینکه از انجماد خارج شود ٦۰۰ میکرولیتر بافر استخراج حاوی ۲ درصد هگزا دسیل تری‌متیل آمونیوم بروماید (CTAB)، ۱/٤ مولار کلریدسدیم، ۲۰ میلی‌مولار EDTA، ۱۰۰ میلی‌مولار تریس PH=۸، ۱درصد سارکوسیل و ۰/٤ درصد مرکاپتواتانول به آن اضافه گردید و به‌مدت ۳۰ دقیقه تا یک ساعت در حمام آب گرم در دمای ٦٥ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از آن ٦۰۰ میکرولیتر کلروفرم-ایزوآمیل الکل (۱:۲٤) به نمونه اضافه و به خوبی مخلوط شده و به

Archive of SID

www.SID.ir

دنبال آن به‌مدت پنج دقیقه در سرعت ۱٤۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس فاز رویی نمونه به دقت جدا شده و به لوله جدیدی منتقل گردید. برای رسوب DNA ٦۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول به نمونه اضافه و بعد از چند بار مخلوط کردن به مدت یک دقیقه در ۱٤۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. بخش روشناوردور ریخته شد و به رسوب باقیمانده بافر تریس–EDTA حاوی ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر RNAas اضافه گردید و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک ساعت نگهداری شد. به نمونه ۲۰۰ میکرولیتر مخلوط فنل و کلروفرم- ایزوآمیل الکل (۱: ۱) اضافه و به‌مدت سه دقیقه در ۱٤۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. بخش روشناور به لوله دیگر منتقل و دوباره این کار تکرار گردید. در مرحله بعد ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم - ایزوآمیل الکل (۱:۲٤) به نمونه اضافه و پس از سه دقیقه سانتریفوژ فاز آبی حذف گردید. برای رسوب DNA، بخش پایینی نمونه با ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۷ درصد سرد و ۱۳۰ میکرولیتر استات آمونیوم ٤ مولار مخلوط و به‌مدت یک ساعت در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در مرحله بعد مخلوط سرد شده به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و سپس بخش بالایی آن به آهستگی دور ریخته و DNA بدست آمده به مدت ۲۰ دقیقه در دمای معمولی اتاق خشک گردید. در پایان DNA در ۵۰ میکرولیتر بافر تریس–EDTA (۱:۱۰) حل شده و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. پس از استخراج DNA و قبل از انجام واکنش PCR جهت بررسی کمیت و کیفیت اسیدهای نوکلئیک، DNA بدست آمده با اسپکتروفتومتر (ND10000) در طول موج ۲٦۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

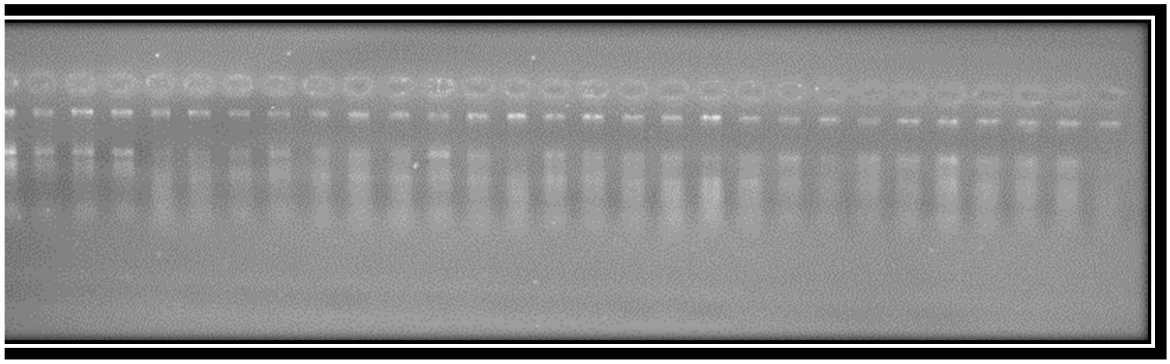
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) توسط دستگاه ترموسایکلر، ۱۰ ISSR که در مطالعات سایر محقیقین کیفیت اللی مناسب ومیزان چندشکلی بالایی را بین ارقام مرکبات نشان داده بودند، استفاده شد. واکنش‌های PCR از مواد تهیه شده از شرکت سیناژن و در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل یک میکرولیتربافر $10x$، ۱/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۰/۲ واحد آنزیم پلی‌مراز، ۰/۵ میکرومولار از هر آغازگر، ۰/۲ میلی‌مولار مخلوط نوکلئوتیدی و ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی، انجام شد. شرایط تکثیر DNA در ابتدا برای هر آغازگر به‌صورت واسرشته‌ساز در در ۹٤ درجه سلسیوس به‌مدت ۵ دقیقه، ٤۰ چرخه شامل واسرشته سازی در ۹٤ درجه سلسیوس به‌مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال برای هرآغازگر ۵۰ درجه سلسیوس به‌مدت ٤۵ ثانیه و توسعه در ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۲ دقیقه و در نهایت ۷ دقیقه توسعه نهایی انجام شد. به‌منظور بررسی و تفکیک محصولات حاصل از تکثیر، از ژل آگارز ۱ درصد استفاده شد. پس از الکتروفورز و رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید، نوارها در زیر نور ماوراءبنفش با استفاده از دستگاه ژل‌داک مشاهده و عکس‌برداری شدند.

نتایج

استخراج DNA: مبنای پژوهش‌های ملکولی داشتن DNA با کیفیت و کمیت مناسب می‌باشد لذا پس از استخراج DNA، کمیت و کیفیت DNA مورد بررسی قرار گرفتند. کیفیت DNA با مشاهده شکل باند مشخص شد (شکل ۱).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱: نمایش کیفیت DNA استخراج شده روی ژل آگارز ۰/۸ درصد

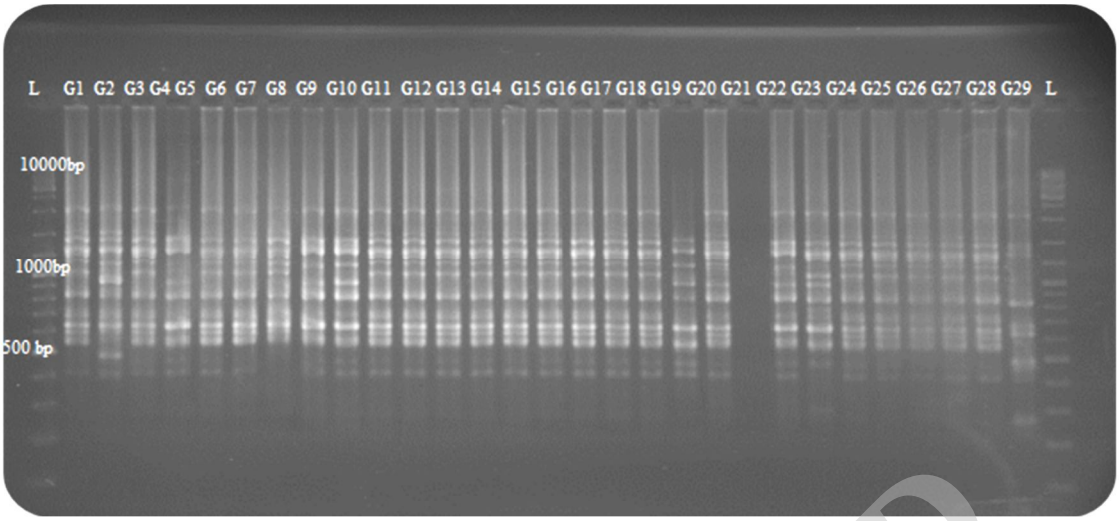
بررسی تنوع ژنتیکی: از مجموع ۹۷ باند امتیازدهی شده برای نشانگر ISSR تعداد ۷۸ باند، معادل ۸۰/۲۲ درصد باندها چندشکل بودند (جدول ۲). بیشترین تعداد باند متعلق به آغازگر ISSR-6 و کمترین تعداد باند مربوط به آغازگر ISSR-2 می‌باشد. بیشترین و کمترین درصد چندشکلی به ترتیب با آغازگرهای ISSR-8 با ۹۰ درصد و ISSR-5 با ۷۳٪ باند دیده شد. متوسط مقدار PIC در این آزمون ۰/۱۸ بود. بیشترین مقدار PIC را آغازگرهای ISSR-6 و ISSR-8 با ۰/۲۷ و کمترین میزان را آغازگر ISSR-1 با ۰/۱۲ نشان دادند. در شکل ۲، چندشکلی مشاهده شده حاصل از تکثیر محصولات PCR با استفاده از آغازگر ISSR-6 روی ژل آگارز نشان داده شده است.

جدول ۲: مشخصات آغازگرهای ISSR استفاده شده در واکنش PCR

ردیف	نام آغازگر	تعداد کل باند	تعداد باند چند شکل	درصد چند شکلی	PIC
۱	ISSR-1	۱۱	۹	۸۱/۸۱	۰/۱۲
۲	ISSR-2	۸	٦	۷۵	۰/۱۷
۳	ISSR-3	۱۲	۱۰	۸۳/۳۳	۰/۱٤
٤	ISSR-4	۱۰	۸	۸۰	۰/۱٤
۵	ISSR-5	۱۵	۱۱	۷۳/۳۳	۰/۲۲
٦	ISSR-6	۱۸	۱۵	۸۳/۳۳	۰/۲۷
۷	ISSR-7	۱۲	۹	۷۵	۰/۱۵
۸	ISSR-8	۱۱	۱۰	۹۰	۰/۲۷
	میانگین	۱۲/۱۲	۹/۷۵	۸۰/۲۲	۰/۱۸

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲: چند شکلی مشاهده شده با نشانگر ISSR-6 در ژنوتیپ‌های مرکبات

تجزیه روابط ژنتیکی

الف) محاسبه بهترین ضریب تشابه و الگوریتم خوشه‌بندی: به منظور گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس داده‌های ISSR، سه ضریب تشابه دایس، جاکارد و تطابق ساده محاسبه گردید. پس از مقایسه همبستگی بین ماتریس‌های تشابه، از هر ماتریس تشابه برای رسم دندروگرام بر اساس الگوریتم‌های UPGMA، اتصال ساده، اتصال کامل، استفاده و برای تک تک دندروگرام‌های حاصل ضریب کوفنتیک محاسبه گردید. بر این اساس، ضریب تشابه دایس و الگوریتم UPGMA عنوان سازگارترین الگوریتم خوشه‌بندی و ضریب تشابه انتخاب شدند (جدول ۳).

جدول ۳: ضرایب کوفنتیک حاصل از الگوریتم‌ها با ضرایب تشابه

	الگوریتم UPGMA	الگوریتم اتصال ساده	الگوریتم اتصال کامل
ضریب تشابه تطابق ساده	۰/۹٦٥	۰/۹۳٦	۰/۹۳۸
ضریب تشابه جاکارد	۰/۹٦۷	۰/۹۳۱	۰/۹٤٤
ضریب تشابه دایس	۰/۹٦	۰/۹٤۸	۰/۹۳٥

ب) تحلیل ماتریس تشابه: نتایج حاصل از ماتریس تشابه نشان داد که کمترین شباهت (۰/۳٦) بین ژنوتیپ‌های پوملو (G16) و پرتقال واشنگتن ناول (G3) و بیشترین شباهت (۰/۹۸) بین دو تیپ طبیعی ناشناخته G72 با G80 و G74 با G73 شد.

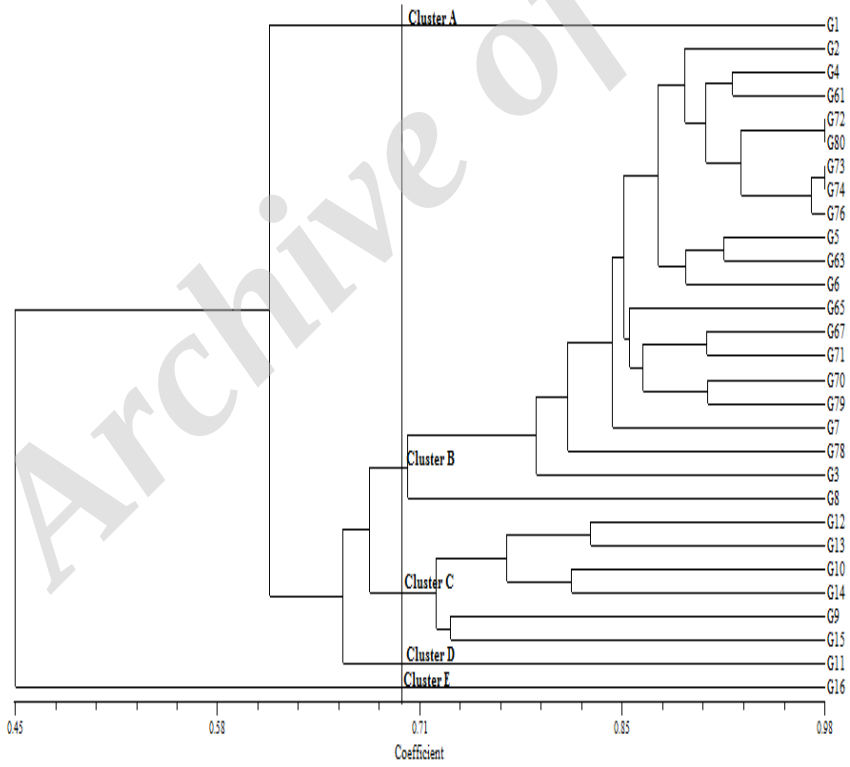
تجزیه خوشه‌ای

تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های مولکولی به روش UPGMA با ضریب تشابه جاکارد انجام گردید (شکل ۳). در دندروگرام ترسیم شده ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در ضریب تشابه ۰/۷۰ در پنج گروه مجزا (A, B, C، D و E) قرار گرفتند.گروه A تنها شامل نارنج (G1) بود که بصورت مجزا قرار گرفت. گروه B بزرگترین گروه بوده و تیپ‌های طبیعی ناشناخته (G8,G61, G63, G65, G67, G70, G71, G72, G73, G74, G76, G78, G79 and G80) و پرتقال‌های سیاورز (G4, G5, G6 and G7)، واشنگتن ناول (G3)

Archive of SID

www.SID.ir

و پارسون براون (G2) در این گروه قرار گرفتند به طوری که در بین ژنوتیپ‌های پرتقال، قرابت ژنتیکی بالایی توسط این نشانگر مشاهده شد. در این گروه تیپ‌های طبیعی ناشناخته G72 و G80 و دو تیپ ناشناخته G74 و G73دارای شباهت ۰/۹۸ بودند که ممکن است این ژنوتیپ‌ها جهش یافته‌هایی باشند که در اثر جهش به وجود آمده‌اند که توسط این نشانگر قابل تفکیک نبودند. ژنوتیپ‌های سیاورز ۲ (G5) و سیاورز ۳ (G6) نسبت به پرتقال واشنگتن ناول (G3) شباهت ۰/۸٤ نشان دادند. گروه C شامل دو زیرگروه است، زیرگروه C1 شامل نارنگی‌های دانسی (G12)، محلی شمال (G14)، بمی (G13) و اتابکی (G10) و زیرگروه D2، نارنگی کلمانتین نولس (G15) و تیپ طبیعی شل محله (G9) را در بر می‌گیرد. در زیرگروه C1 نارنگی‌های دانسی (G12) و بمی (G13)بیشترین شباهت۰/۸۳ را داشتند که نشان دهنده آن است که این دو ژنوتیپ از لحاظ ژنتیکی خیلی مشابه همدیگر هستند. نارنگی شل محله (G9) با نارنگی کلمانتین نولس (G15) در یک زیرگروه با تشابه ۰/۷۳ قرار داشت. گروه D شامل نارنگی انشو سوجی‌یاما (G11) بود.نارنگی انشو سوجی‌یاما (G11) در یک موقعیت کاملا مجزا (گروه D) از گروه B شامل سایر ارقام نارنگی و گروهC شامل مجموع ارقام پرتقال و تیپ های ناشناخته قرار گرفته است. همچنین نارنگی کلمانتین نولس (G15) در گروه B با فاصله بیشتری از سایر ارقام نارنگی و با فاصله نزدیک به تیپ طبیعی شل محله واقع شده است.



شکل ۳: دندوگرام ۲۹ ژنوتیپ مرکبات با استفاده از نشانگر ISSR به روش UPGMA

Archive of SID

www.SID.ir

بحث

آغازگرهای آزمون شده در این مطالعه قادر به تکثیر بیش از ۹۰ درصد مکان‌های هدف در هر ژنوم آزمون شده بودند. این امر بیانگر میزان بالای حفظ توالی آغازگر بین ارقام آزمون شده می‌باشد.در عمل توانایی تکثیر مکان‌های مشابه در ارقام مرکبات توسط این آغازگرها، اجازه مقایسه ژنوم‌ها را در این خانواده می‌دهد (Golein et al., 2012).با توجه به دیرینگی، اهمیت و گوناگونی ذخیره ژنتیکی مرکبات در کشور، به نظر می‌رسد باید توجه ویژه‌ای به بررسی‌های ژنتیکی و اصلاحی آن شود. یکی از ملزومات اساسی اصلاح نباتات، دسترسی و آگاهی از میزان تنوع در ذخیره ژرم پلاسم این گروه ها و تعیین روابط و قرابت آنها است تخمین ترکیب ژنتیک گیاهان و مجموعه‌های ژنتیک و تعیین قرابت بین آنان از گذشته دور معمول بوده است (Naghavi et al., 2010). امروزه پیشرفت ژنتیک مولکولی منتهی به ابداع روشهای مختلف مبتنی بر DNA، برای تعیین چندشکلی‌های ژنتیکی شده است به طوری که به ویژه پس از ابداع PCR و ایجاد روش‌های گوناگون و قدرتمند با استفاده از آن، امکان بررسی دقیق‌تر این چندشکلی‌ها به‌صورت بسیار کارآمد فراهم شده است که از جمله می‌توان روش‌های RAPD، SSR، ISSR، AFLP را نام برد (Golein et al., 2005). مشاهدات در مورد بررسی استفاده از نشانگرهای ISSR در تمایز ژنوتیپ‌ها مشخص می‌نماید که این نشانگر، قادر به تفکیک بین ژنوتیپ‌های بسیار نزدیک بوده و می‌توان با کمترین اشتباه، ژنوتیپ هر رقم را ارزیابی نمود (Noormohammadi et al., 2012; Gharibi et al., 2011). آزمایشات مشابهی در این خصوص توسط محققان دیگر گزارش شده است که نتایج تحقیق به عمل آمده با گزارشات آن‌ها مطابقت دارد (Shahsavar et al., 2007). در پژوهشی با استفاده از نشانگرهای ISSR، IRAP و RAPD تعدادی از ارقام لمون را شناسایی کردند (Guillermo et al., 2004). همچنین مطالعات در تعیین قرابت تعدادی از ژنوتیپ‌های مرکبات در استان فارس با استفاده از نشانگر ISSR بیان کردند که رقم‌های بکرایی و ولکامریانا ۰/۷۸ ضریب شباهت دارند و در یک گروه فیلوژنتیکی قرار می‌گیرند، همچنین ضریب تشابه بین بکرایی و لیموشیرین را ۰/۷٤ اعلام نمودند (Shahsavar et al., 2007). پوملو در این بررسی در خوشه‌ای مجزا قرار داشت. پوملو نقش مهمی در والدین بسیاری از میوه‌های مرکبات از جمله لمون‌ها، پرتقال‌ها و گریپ فروت دارد. بسیاری از مطالعات دیگر با استفاده از نشانگرهای مولکولی مختلف هم این یافته را تأیید کردند (Federici et al., 1998; Nicolosi et al., 2000; Barret and Rhodz, 1976; Barkley et al., 2006). نشانگر ملکولی ISSR، نارنگی انشو سوجی یاما و کلمانتین نولس را در دو گروه مجزا گروه‌بندی کردند. نارنگی انشو وکلمانتین هردو متعلق به‌گروه تانجرین هستند اما نارنگی انشو در برخی خصوصیات مورفولوژی با نارنگی کلمانتین اختلاف دارد و از نوع نارنگی ساتسوما است (Davies and Albrigo, 1994). همه ژنوتیپ‌های سیاورز ۱، سیاورز ۲، سیاورز ۳، سیاورز ٤، تیپ‌های طبیعی ناشناخته، پرتقال پارسون براون و واشنگتن ناول در بررسی ما در یک گروه قرار داشتند که قرابت بالایی به همدیگر نشان دادند. بررسی‌ها نشان داد که تنوع ژنتیکی کمی در بین ژنوتیپ‌های پرتقال با استفاده از نشانگرISSR وجود دارد (Kumar et al., 2010; Shannawaz et al., 2017). همچنین سطح بالایی از تشابه در درون ژنوتیپ‌های پرتقال با استفاده از نشانگر RAPD گزارش شده است (Malik et al., 2012). در پژوهشی ۳٦ رقم مرکبات را با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR مورد بررسی قرار دادند و بیان کردند که شباهت بالایی در بین ارقام پرتقال وجود دارد، این امر بیانگر این دیدگاه است که اکثر واریته‌های پرتقال بر

Archive of SID

www.SID.ir

اثر جهش به وجود آمده اند (Kumar et al., 2010). در نتیجه تحقیق دیگری با استفاده از نشانگر ISSR نشان دادند که اکثریت ارقام پرتقال برخلاف چندشکلی ظاهری، به دلیل جهش‌های رویشی اساس ژنتیکی کمی دارند که این نشانگر مولکولی قادر به تفکیک آنها نمی‌باشد (RouhiGhorabaie et al., 2010). در آزمایش حاضر، تیپ طبیعی معلم کوه شباهت بالایی به پرتقال واشنگتن ناول و سیاورز نشان داد که احتمالا یا بر اثر جهش یا دو رگه‌گیری بین آنها به وجود آمده است که با نتایج جنتی و همکاران (Jannati et al., 2009) مطابقت دارد. همچنین نتایج نشان داد که شل محله یک دورگ طبیعی است که در گروه نارنگی قرار داشت در حالی که مطالعات انجام شده با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD آن را در گروه پرتقال‌ها و بررسی صورت گرفته با نشانگر IRAP آن را در یک گروه مجزا قرار داد که این تفاوت در گروه‌بندی ممکن است به‌دلیل ماهیت مختلف نشانگرهای مولکولی باشد(Golein et al., 2005; Golein et al., 2012).

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج این پژوهش نشان داد که نشانگر ملکولی ISSR استفاده شده می‌تواند اطلاعات مفیدی درباره سطح چند شکلی و تنوع مرکبات را فراهم کنند، که نشان دهنده کاربرد آن در شناسایی ژرم پلاسم مرکبات می‌باشد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از مسئولان محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن که امکان انجام این پژوهش را فراهم نمودند، سپاس‌گزاری می‌گردد.

References

1.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 utility simple sequence repeat markers (SSRs). Theoretical and Applied Genetics, 112: 1519-1531.

2.Barret, H.C. and Rhodes, A.M.A. 1976. Numerical taxonomic study affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. Systematic Botany Journal, 1: 105-136.

3.Davies, F.S. and Albrigo, L.G. 1994. Citrus. CAB International, pp: 254.

4.Dehestani, A., Kazemitabar, S.K. and Rahimian, H. 2007. Assessment of genetic diversity of navel sweet orange cultivars grown in Mazandaran Province Using RAPD Markers. Asian Journal of Plant Science, 6(7):1119-1124.

5.Federici, C.T., Fang, D.Q., Scora, R.W. and Roose, M.L. 1998. Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. Theoretical and Applied Genetics, 96: 812–822.

6.Gharibi, S., Rahimmalek, M., Mirlohi, A., Majidi, M.M., and Sayed Tabatabaei, B.E., 2011. Assessment of genetic diversity in *Achillea millefolium* subsp. Millefolium and achilleamillefoliumsubspel bursensis using morphological and ISSR markers. Medicinal Plants Research, 5: 2413-2423.

7.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. Scientia Horticulturae,148:147–153.

8.Golein, B., Talaie, A., Zamani, Z., Ebadi, A. and Behjatnia, A. 2005. Assessment of Genetic variability in some Iranian sweet oranges (*Citrus sinensis* [L.]Osbeck) and mandarins (Citrus reticulata Blanco) using SSR markers. International Journal of Agricultural and Biology, 7: 169–170.

Archive of SID

www.SID.ir

9.Guillermo, P., Bernet-Pedro, F., Mastre-Jose, A. and Maria, J. 2004. Molecular discrimination of Lemon cultivars. Hort Science, 39 (1): 165-169.
10.Jannati, M., Fotouhi, R., Pourjanabad,A. and Salehi, Z. 2009. Genetic diversity analysis of Iranian citrus varieties using micro satellite (SSR) based markers. Journal of Horticulture and Forestry, 1(7): 120-125.
11.Kumar, S., Jena, S.N. and Nair, N.K. 2010. ISSR polymorphism in Indian wild orange (*Citrus indica*Tanaka, Rutaceae) and related wild species in North-east. Indian Science Horticulture, 123: 350-359.
12.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. Agricultural Research, 1(4):317–324.
13.Mohammadi, S.A. and Prasanna, B.M. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants: Salient statistical tools and considerations. Crop Science, 43: 1235-1248.
14.Murry, M.G. and Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plantDNA. Nucleic Acids Research, 8: 4321-4325.
15.Naghaviyan, M, Ghareh-Yazi, B. and Hosseini, G.H. 2010.Molecular Markers. Tehran University publications. pp. 201.
16.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.Theoretical and Applied Genetics, 100: 1155–1166.
17.Noormohammadi, Z., Fasihee, A., Homaee-Rashidpoor, S., Sheidai, M., Ghasemzadeh-Baraki, S., Mazooji, A. and Tabatabaee-Ardakani, S.Z. 2012. Genetic variation among Iranian pomegranates (*Punica granatum* L.) using RAPD, ISSR and SSR markers. Australian Journal of Crop Sience, 6(2): 268-275.
18.Pradeepreddy, M., Sarla, N. and Siddiq, E.A. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euphytica, 128, 9–17.
19.RouhiGhorabaie, H.R., Ghazvini, F.R., Golein, B. and Nabipour, A.R. 2010.Identification of some *Citrus* accessions in a *Citrus* germplasm utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). Horticulture Environment Biotchnology, 51: 343–347.
20.Shahnawaz, A., Rattanpal, H.S., Kumari, P. and Singh, J. 2017. Study of genetic variability in citrus fruit crop by molecular markers- a review. International Journal of Pure and Applied Bioscience, 5 (1): 111-128.
21.Shahsavar, A.R., Izadpanah, K., Tafazoli, E. and Sayed Tabatabaei, B.E. 2007. Characterization of citrusgermplasm including unknown variants by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Science Horticulture, 112: 310-314.

Archive of SID

www.SID.ir

The Study of some *Citrus* varieties in Northern of Iran by molecular ISSR markers

Naghashi, Y.[1], Babakhani, B.*[1]
[1]Department of Biology, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran

Received: 2016-10-7; Accepted: 2017-8-23

Abstract

Recognition of genetic diversity and kinship relationships in *Citrus* is necessary for planning and applying breeding programs, preserving biodiversity, recording new cultivars, and performing molecular studies. In this study, the genetic diversity of 29 varieties of *Citrus* including: oranges, mandarins, sour orange, pummel, and natural types were investigated by using ISSR marker. In total, 97 bands were obtained using eight primers in which 78 bands were polymorph. The highest and the lowest polymorphism were in ISSR-8 and ISSR-5 with 90% and 73%, respectively. The average polymorphism information content (PIC) was 0.18, which the highest belonged to ISSR-6 and ISSR-8 (0.27) and the lowest belonged to ISSR-1 (0.12). Dendrogram resulting from cluster analysis of UPGMA method with simple matching similarity coefficient classified varieties into five distinct groups. Pummelo was distinguished from the other genotypes in a single cluster. Unshiu mandarin (Sugiyama) was classified into a group and separated from Clemantine mandarin (Nules). All genotypes including Siavaraz 1, Siavaraz 2, Siavaraz 3, Siavaraz 4, natural types, Parson brown orange and Washington navel orange were clustered into the same group and showed high similarity to gather. T of molecular marker can provide useful information about the level of polymorphism and variation in *citrus* fruits which indicating it's apply in detection of citrus germplasm.

***Keywords*:** *Citrus*, Clustering, Genotype Diversity, ISSR Marker

Archive of SID

*Corresponding author; b.babakhani94@yahoo.com

www.SID.ir