مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

بررسی روابط ژنتیکی بین ارقام ناشناخته و تجاری مرکبات با استفاده از نشانگر ملکولی ISSR

بهروز گلعین*[1]، مالک قاسمی[1]، جواد فتاحی مقدم[2]، اسماعیل غلامیان[3]

1- استادیاران پژوهشی بخش تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، موسسه تحقیقات مرکبات کشور، رامسر

2- استادیار پژوهشی بخش تحقیقات فنی و مهندسی، موسسه تحقیقات مرکبات کشور، رامسر

3- مربی پژوهشی بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، موسسه تحقیقات مرکبات کشور، رامسر

آدرس نویسندگان: رامسر، موسسه تحقیقات مرکبات کشور، کد پستی 33113-46917

تاریخ دریافت: 1391/05/09، تاریخ پذیرش: 1392/09/22

چکیده

اطلاع از روابط فیلوژنتیک و تنوع ژنتیکی 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. با توجه به اینکه نشانگرهای ملکولی می‌توانند در تعیین روابط ژنتیکی مفید باشند، در این پژوهش جهت بررسی میزان تنوع و قرابت ژنتیکی 55 ژنوتیپ مرکبات شامل 43 ژنوتیپ ناشناخته بومی همراه با 12 رقم تجاری، از نشانگرهای ISSR استفاده شد. در مجموع، تعداد 92 نوار چندشکل با میانگین 9/2 نوار به ازاء هر آغازگر شناسایی شد. درصد چندشکلی آغازگرها از مقدار 75 در آغازگر BDB(CA)7C تا 100 در آغازگر (AC)8YT متغیر بود. بررسی دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA با ضریب تشابه جاکارد، ژنوتیپ‌های مورد بررسی را به نه گروه (A، B، C، D، E، F، G، H و I) طبقه‌بندی کرد. ارقام پرتقال، نارنگی و 25 ژنوتیپ ناشناخته در گروه A، گریپ‌فروت و نه ژنوتیپ ناشناخته در گروه B، پوملو، دارابی و هفت ژنوتیپ ناشناخته در گروه C، نارنج و یک ژنوتیپ ناشناخته به ترتیب در گروه D و E با ضریب تشابه 0/54 نسبت به همدیگر، بالنگ در گروه F، لمون اروکا در گروه G، یک ژنوتیپ ناشناخته به طور مستقل در گروه H و لیموشیرین و مکزیکن لایم در گروه I قرار گرفتند. تجزیه تنوع ژنتیکی و تعیین روابط خویشاوندی در مرکبات، اطلاعات مفیدی را برای برنامه‌های بهنژادی، انتخاب و حفظ ارقام فراهم می‌کند.

کلمات کلیدی: *ارقام مرکبات، نشانگر ملکولی، روابط فیلوژنتیک.*

* نویسنده مسئول: بهروز گلعین تلفن: 09113945261 Email: bgoleincitrus@yahoo.com

مقدمه

مرکبات گروه بزرگی از میوه‌ها و شامل انواع پرتقال (*Citrus sinensis*)، نارنگی (*C. reticulata*)، لیمو (*C. aurantifolia*)، لمون (*C. limon*)، گریپ‌فروت (*C. paradisi*) و پوملو (*C. grandis*) است. تولید مرکبات در مناطق مختلف جهان و میزان بالای تولید آن موجب شده که این محصول در جهان از اهمیت اقتصادی زیادی برخوردار باشد بطوری که امروزه در تجارت جهانی، مرکبات دومین صنعت بزرگ میوه است. ایران با دارا بودن 290 هزار هکتار و تولید بیش از 4/2 میلیون تن مرکبات از نظر سطح زیرکشت و میزان تولید در بین کشورهای تولیدکننده مرکبات به ترتیب مقام هشتم و هفتم را داراست و این جایگاه نسبتاً خوبی در بین 140 کشور مرکبات‌خیز دنیا است (Golein & Adouli, 2011). مرکبات یکی از مهم‌ترین جنس‌های میوه‌های نیمه‌گرمسیری است که گونه‌های متعددی از آن در کشورهای مختلف مورد کشت قرار می‌گیرند (Davies & Albrigo, 1994). تنوع ژنتیکی فراوان و روابط خویشاوندی پیچیده‌ای بین این گونه‌ها وجود دارد که اساساً به دلیل انجام دگرگرده‌افشانی‌های مکرر و سازگاری بین گونه‌های مختلف جنس *Citrus* و همچنین با سایر جنس‌های دیگر این خانواده، ایجاد جهش‌های جوانه‌ای، سابقه طولانی کشت و کار مرکبات و پراکنش گسترده آن در دنیا می‌باشد (Scora, 1975).

یکی از پایه‌های اساسی بهنژادی گیاهان، دسترسی و آگاهی از میزان تنوع در مجموعه‌های ژنتیکی و مراحل مختلف پروژه‌های بهنژادی است. تخمین ترکیب ژنتیکی مرکبات و مجموعه‌های ژنتیکی و قرابت بین آن‌ها از گذشته دور معمول بوده است (Barkley *et al.*, 2006). مشخص شدن رده‌بندی و تنوع ژنتیکی در مرکبات جهت تعیین روابط ژنتیکی، شناسایی ژرم‌پلاسم، کنترل فرسایش ژنتیکی، ایجاد برنامه‌های بهنژادی و ثبت ارقام جدید، امری مهم و ضروری می‌باشد (Herrero *et al.*, 1996). یکی از پیامدهای اجتناب‌ناپذیر کشاورزی مدرن که مبتنی بر استفاده از واریته‌های اصلاح شده با حداکثر عملکرد و کیفیت قابل قبول می‌باشد، کاهش تنوع ذخایر ژنتیکی بوده است. بنابراین امروزه آگاهی از تنوع ژنتیکی و مدیریت منابع ژنتیکی بومی و وارداتی بعنوان اجزاء مهم پروژه‌های بهنژادی نبات تلقی می‌گردند (Krueger & Roose, 2003). درگذشته، مطالعات روابط فیلوژنتیک میان جنس‌ها و گونه‌های مرکبات تنها بر اساس خصوصیات مورفولوژی انجام می‌گرفت (Nicolosi *et al.*, 2000)، اما استفاده از خصوصیات مورفولوژی به تنهایی، جهت تعیین و شناسایی میان ارقام مرکبات کاری دشوار است و علاوه بر آن، این صفات تحت تأثیر محیط قرار می‌گیرند. بنابراین استفاده

از نشانگرهای مولکولی به طور گسترده‌ای در مطالعه روابط فیلوژنتیک و تنوع ژنتیکی در گیاهان مختلف استفاده گردیده است (Fang *et al.*, 1998). امروزه تعیین تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای ملکولی آسان‌تر، کم هزینه‌تر، تکرارپذیرتر و قابل اعتمادتر از نشانگرهای مرفولوژی است. از میان این نشانگرها، می‌توان به نشانگر ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) اشاره نمود. نشانگر ISSR خصوصیات ریزماهواره‌ها را نشان می‌دهد، اما نیازی به یک توالی برای سنتز آغازگر ندارد و هم‌چنین از مزایای نشانگرهای تصادفی نیز برخوردار است (Meloni *et al.*, 2006). این نشانگر معمولاً چندشکلی بالایی را نشان می‌دهد (Bornet & Branchard, 2001). این تکنیک در زمینه‌های تنوع ژنتیکی، مطالعات فیلوژنتیک، تعیین نقشه ژنی، شناسایی گونه‌ها یا واریته‌ها و تکامل بیولوژی در دامنه وسیعی از گونه‌ها و جنس‌های مرکبات کاربرد دارد. برای مثال می‌توان به پژوهش‌های انجام شده زیر اشاره نمود: Gulsen & Roose (2001) از آیزوزایم‌ها و نشانگرهای مولکولی SSR و ISSR جهت بررسی تنوع ژنتیکی و ارتباط فیلوژنتیک میان 24 رقم لمون (*C. limon*) استفاده نمودند و تنوع کمی میان آنها مشاهده نمودند. در پژوهشی تنوع ژنتیکی میان 48 نارنج سه‌برگ (*Poncirus trifoliata*) که به صورت رویشی تکثیر شده بودند با استفاده از هفت مکان ژنی آیزوزایم، 38 ترکیب RFLP و 11 نشانگر ISSR تعیین شد. در میان نشانگرها، ISSR چندشکلی بالایی را نشان داد و در نهایت 48 ژنوتیپ نارنج سه‌برگ به چهار گروه اصلی دسته‌بندی شدند (Fang *et al.*, 1997). در پژوهشی دیگر تنوع ژنتیکی و ارتباط فیلوژنتیک میان 33 ژنوتیپ تجاری و ناشناخته مرکبات استان فارس با استفاده از نشانگرهای ISSR بررسی گردید. نشانگر ISSR به خوبی توانست روابط بین ژنوتیپ‌های مذکور را آشکار سازد (Shahsavar *et al.*, 2007). در ایران با تلاش محققین و باغداران پیشرو، بیوتیپ‌های مختلف پرتقال، لیمو، گریپ‌فروت و نارنگی که از طریق جهش، دورگ‌گیری‌های طبیعی و تغییرات ژنتیکی بوجود آمده‌اند، جمع‌آوری شده‌اند و در کلکسیون‌های شمال و جنوب کشور نگهداری می‌شوند. پایش‌های انجام شده در این کلکسیون‌ها عمدتاً بر اساس صفات مرفولوژی بوده و تحقیقات ژنتیکی چندانی بر روی آنها انجام نشده است و اطلاعات دقیقی از روابط ژنتیکی و خویشاوندی بین این ژنوتیپ‌ها و با ارقام تجاری وجود ندارد. با توجه به اینکه تعدادی از این ژنوتیپ‌ها بر اساس 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 این ژنوتیپ‌ها و ارتباط آنها با ارقام تجاری با استفاده از نشانگر ISSR است که در کلکسیون مرکبات کترا موجود می‌باشند.

مواد و روش‌ها

الف- مواد گیاهی و استخراج DNA

برای انجام این آزمایش، برگ 55 نمونه مرکبات از ایستگاه تحقیقات مرکبات کترا (تنکابن) جمع‌آوری شد (جدول 1). این برگ‌ها از سرشاخه‌های جوان بدون نشانه‌های ظاهری ناشی از اثر عوامل بیماریزا و فیزیولوژیک بودند. 5-6 برگ سالم جوان از هر گیاه جمع‌آوری و تا زمان استخراج DNA در فریزر در دمای 80- درجه سلسیوس نگهداری شد. استخراج DNA به روش Murry & Thompson (1980) انجام گرفت. پس از استخراج DNA و قبل از انجام واکنش PCR، جهت بررسی کمیت و کیفیت اسیدهای نوکلئیک، DNA بدست آمده با اسپکتروفتومتر (ND1000) در طول موج جذب 260 نانومتر اندازه‌گیری شد. همچنین برای تصدیق و تائید نتایج بدست آمده مجدداً با روش الکتروفورز روی ژل آگارز 0/8 درصد مورد بررسی قرار گرفت.

جدول 1- ارقام مرکبات استفاده شده در آزمایش.

Table 1- Plant material used in this study.

ردیف No.	کد گیاه Plant code	نام علمی گیاه Genotype name	نام عمومی Cultivar or common name
1~43	G1~G43	*Citrus* spp	نامشخص (Unknown)
44	G44	*Citrus paradisi*	گریپ‌فروت دانکن (Duncan grapefruit)
45	G45	*Citrus sinensis*	پرتقال والنسیا (Valencia orange)
46	G46	*Citrus grandis*	دارابی (Darabi)
47	G47	*Citrus grandis*	پوملو (Pummelo)
48	G48	*Citrus sinensis*	پرتقال سیاورز (Siavaraz orange)
49	G49	*Citrus limettioides*	لیموشیرین (Sweet lime)
50	G50	*Citrus aurantifolia*	لیمو آب شیراز (Mexican lime)
51	G51	*Citrus aurantium*	نارنج (Sour orange)
52	G52	*Citrus clementina*	نارنگی کلمانتین (Clementine mandarin)
53	G53	*Citrus reticulata*	نارنگی دنسی (Dancy mandarin)
54	G54	*Citrus medica*	بالنگ (Citron)
55	G55	*Citrus limon*	لمون اروکا (Eureka lemon)

ب- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) توسط ترموسایکلر (MJ RESEARCH, PTC-200) با 10 آغازگر ISSR (جدول 2) که در مطالعات سایر محققین، کیفیت آللی مناسب و میزان چندشکلی بالایی را بین ارقام مرکبات نشان داده بودند، استفاده شد. واکنش‌های PCR با استفاده از مواد تهیه شده از شرکت سیناژن و در حجم 10 میکرولیتر شامل یک میکرولیتر بافر 10X، 1/5 میلی‌مولار کلرید منیزیم، 0/2 واحد آنزیم *Taq* DNA Polymerase، 0/5 میکرومولار از هر آغازگر، 0/2 میلی‌مولار مخلوط نوکلئوتیدی (dNTPs) و 50 نانوگرم DNA ژنومی، انجام شد. شرایط تکثیر DNA در ابتدا برای هر آغازگر به صورت واسرشته‌سازی اولیه در 94 درجه سلسیوس به مدت 5 دقیقه، 40 چرخه شامل واسرشته‌سازی در 94 درجه سلسیوس به مدت 30 ثانیه، دمای اتصال برای هر آغازگر50 درجه سلسیوس به مدت 45 ثانیه و توسعه در 72 درجه سلسیوس به مدت 2 دقیقه و در نهایت 7 دقیقه توسعه نهایی انجام شد. به منظور بررسی و تفکیک محصولات حاصل از تکثیر، از ژل آگارز با غلظت 1/5 درصد استفاده شد. پس از الکتروفورز و رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید، نوارها در زیر نور ماوراءبنفش با استفاده از دستگاه ژل‌داک مشاهده و عکس‌برداری شدند.

جدول 2: توالی آغازگرها، تعداد نوارهای چندشکل و درصد چندشکلی محاسبه شده برای آغازگرها.

Table 2- Sequences of primers, Number of polymorphic bands and Polymorphism percent.

کد آغازگر Primer code	توالی Sequence	تعداد نوار چندشکل Number of polymorphic bands	درصد چندشکلی Polymorphism (%)
N1	HVH (GA)7T	14	87.5
N2	BDB (CA)7C	3	75
N3	DBDA (CA)7	8	80
N4	(GA)8YG	12	80
N5	(AG)8YT	7	77
N6	(AG)8YC	8	88
N7	(AC)8YG	12	92
N8	(AC)8YA	10	90
N9	(AC)8YT	9	100
N10	(CA)8RG	9	81
میانگین Mean	---	9.2	85

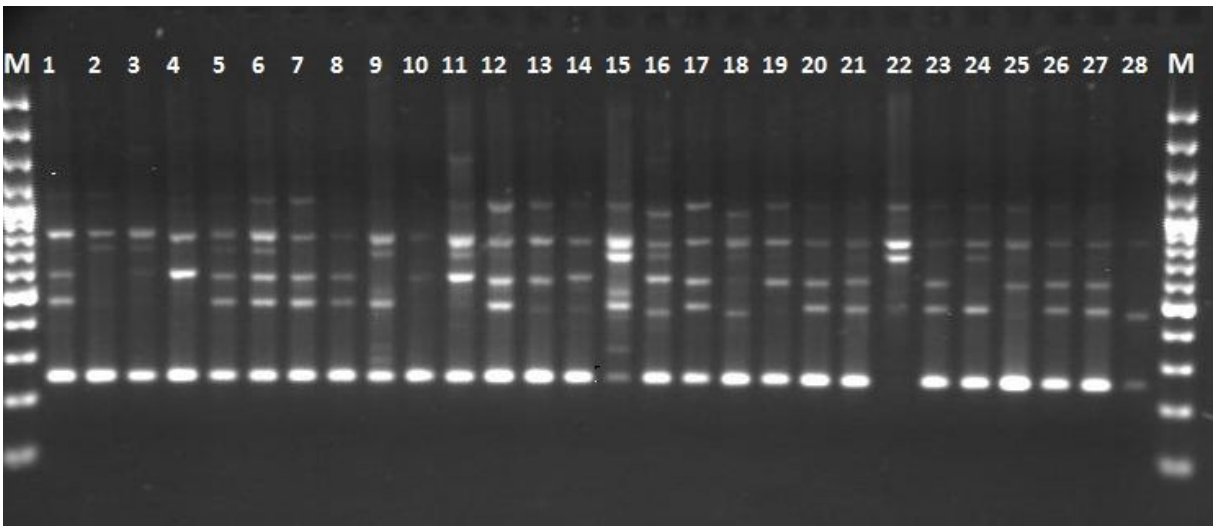
ج- تجزیه داده‌ها

جهت امتیازدهی نوارها از نرم افزار Adobe Photoshop استفاده شد. الگوی نواری حاصل به صورت وجود یا عدم وجود نوارها در محصول PCR با اعداد یک و صفر امتیازدهی شدند. تجزیه خوشه‌ای به روش گروه‌های وزنی جفت‌نشده (UPGMA) و با ضریب تشابه جاکارد انجام شد. تجزیه تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار NTSYS pc ver 2.02 و POPGENE ver 1.31 انجام گرفت.

نتایج و بحث

الف- بررسی آماره‌های تنوع ژنتیکی

با استفاده از 10 آغازگر ISSR، روابط فیلوژنتیک 55 ژنوتیپ مرکبات مورد بررسی قرار گرفت. شکل 1 نتایج حاصل از تکثیر PCR 28 نمونه با استفاده از آغازگر N6 را نشان می‌دهد. آغازگرهای مورد نظر توانستند در مجموع 92 نوار چندشکل را با میانگین 9/2 نوار به ازاء هر آغازگر، تکثیر کنند. تعداد نوارهای تکثیر شده توسط هر آغازگر بین 14-3 عدد بود که بیشترین آن با 14 نوار مربوط به آغازگر N1 و کمترین آن مربوط به آغازگر N2 بود (جدول 2). درصد چندشکلی آغازگرها از مقدار 75 در آغازگر BDB(CA)7C تا 100 در آغازگر (AC)8YT متغیر بود (جدول 2).



شکل 1- الگوی نواری حاصل از تکثیر DNA ژنومی مرکبات توسط آغازگر N6 در آزمون ISSR. M: نشانگر اندازه. شماره‌های 1-28 مربوط به ژنوتیپ‌های مورد مطالعه است.

Figure 1- ISSR amplified with the primer N6. M: DNA ladder100bp plus; Lanes 1-28 are ISSR products of the citrus accessions.

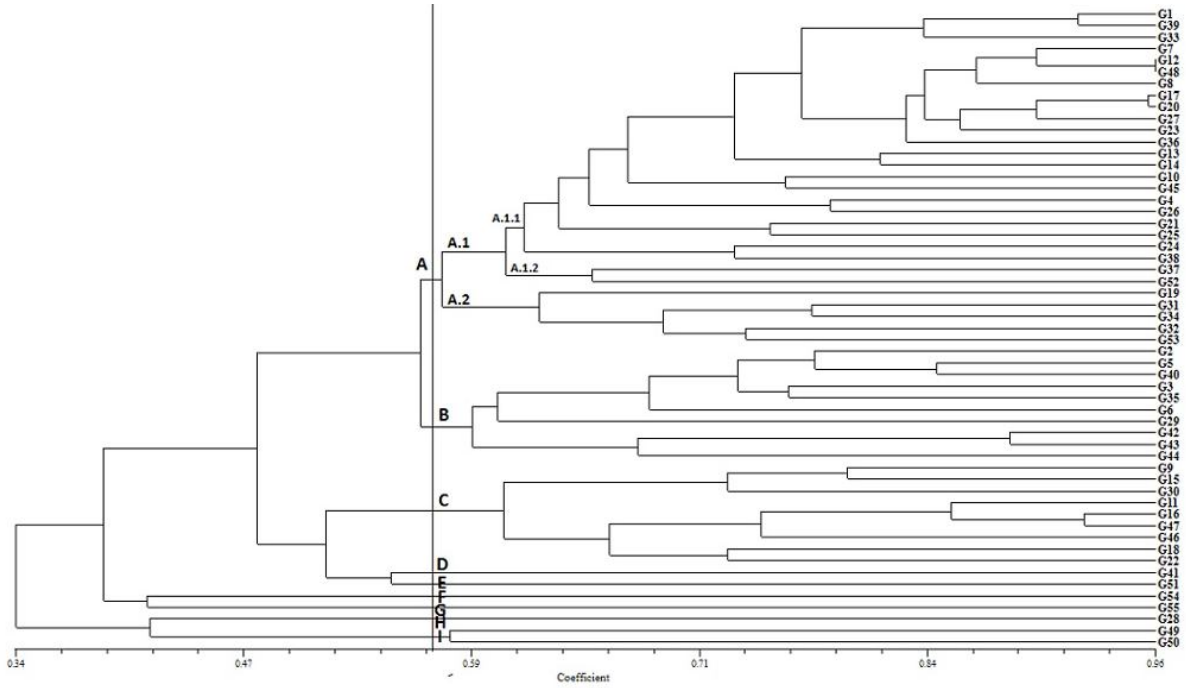
ب- تجزیه روابط ژنتیکی

تجزیه خوشه‌ای 55 ژنوتیپ مورد مطالعه بر اساس روش UPGMA انجام شد. پس از برش دندروگرام در ضریب تشابه 0/54 یعنی در محلی که بتواند گروه‌های متمایز از هم را شامل شود، ژنوتیپ‌ها در نه خوشه اصلی A، B، C، D، E، F، G، H و I دسته‌بندی شدند (شکل 2).

گروه بزرگ A دارای دو زیرگروه A.1 و A.2 است که با ضریب تشابه 0/57 از یکدیگر جدا شده‌اند. زیرگروه A.1 سپس به دو زیرگروه فرعی A.1.1 و A.1.2 تقسیم شد. زیرگروه فرعی A.1.1 شامل ژنوتیپ‌های G1، G39، G33، G7، G12، پرتقال سیاورز (G48)، G8، G17، G20، G27، G23، G36، G13، G14، G10، پرتقال والنسیا (G45)، G4، G26، G21، G25، G24 و G38 است. با توجه به این‌که برخی از ژنوتیپ‌ها مانند G1 با G39، G12 و G48 با G7، G17 با G20 قرابت زیادی با همدیگر نشان دادند، آنها احتمالاً موتانت‌هایی هستند که در اثر جهش سوماتیکی بوجود آمده‌اند یا ژنوتیپ‌های مشابه نوسلار همدیگر هستند. برخی مطالعات نشان داده‌اند که پرتقال‌ها به‌طور ژنتیکی یک بیوتیپ هستند. با مطالعه 10 رقم پرتقال مشخص شد که الگوی باند کروموزومی در 10 کلون هتروزیگوس است، ولی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره تفاوتی در این 10 رقم مشاهده نشد (Luro, *et al.*, 1995). این نتایج می‌تواند دلیلی بر منشاء مونوفیلیتیک (متحدالاصل) پرتقال باشد که بوسیله جهش سوماتیکی و انتخاب کلون برتر دنبال شده است. از طرفی در این زیرگروه فرعی، برخی از ژنوتیپ‌ها قرابت بالایی با پرتقال‌های سیاورز و والنسیا ندارند که احتمالاً آنها دورگ‌هایی از پرتقال هستند. Barret & Rhods (1976) فقط سه گونه از جنس *Citrus* شامل گونه‌های *C. reticulata*، *C. medica* و *C. grandis* را به عنوان گونه‌های اصلی پیشنهاد و بیان کردند که سایر گونه‌ها، دورگ‌های حاصل از این گونه‌های اصلی هستند. داده‌های بدست آمده از نشانگرهای مولکولی این نظریه را تأیید می‌کند (Federici, *et al.*, 1998; Nicolosi *et al.*, 2000).

زیرگروه فرعی A.1.2 ژنوتیپ‌های G37 و نارنگی کلمانتین (G52) را در بر می‌گیرد که با ضریب تشابه ژنتیکی 0/60 از زیرگروه فرعی A.1.1 یعنی گروه پرتقال جدا شده است. الگوی باند ریزماهواره‌ای مشابه‌ای میان پرتقال و نارنگی مشاهده شده است که بیانگر روابط خویشاوندی نزدیک این دو گونه است (Luro *et al.*, 1995). نتایج حاصل از پژوهش‌های دیگر 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 0/60 با پرتقال دارد (Barret & Rhodes, 1976; Green *et al.*, 1986). ژنوتیپ‌های G19، G31، G34، G32 و نارنگی دنسی (G53) در زیرگروه

A.2 قرار گرفتند. این گروه و نارنگی کلمانتین (G52) دارای ضریب تشابه 0/57 هستند. در میان نارنگی‌ها قرابت ژنتیکی بالایی وجود دارد و نتایج حاصل از نشانگرهای مولکولی این عقیده را تأیید می‌کند (Filho *et al.*, 1998; Biswas *et al.*, 2010).



شکل 2- تجزیه کلاستر 55 ژنوتیپ مرکبات با استفاده از نشانگر ISSR به روش UPGMA.

Figure 2- Dendrogram of 55 genotypes of citrus using ISSR markers based on UPGMA.

نارنگی یکی از سه گونه اصلی مرکبات است (Barret & Rhodes, 1976) و نتایج بدست آمده از نشانگرهای مولکولی RAPD و SCAR نتوانست منشأ و والد آن را مشخص نماید (Moore, 2001). 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 (Filho *et al.*, 1998).

خوشه B شامل ژنوتیپ‌های G2، G5، G40، G3، G35، G6، G29، G42، G43 و گریپ‌فروت دانکن (G44) است. قرابت درون‌گونه‌ای در گریپ‌فروت بسیار بالا است (Barret & Rhodes, 1976). در پژوهشی که از نشانگر مولکولی ISSR جهت بررسی هفت رقم گریپ‌فروت استفاده شده بود، تنها یک رقم با سایر ارقام اختلاف داشته که تحت تأثیر جهش

قرار گرفته بود (Fang & Roose, 1997). با توجه به شکل 2، قرابت ژنتیکی بسیار بالایی بین ژنوتیپ‌های گروه B و گریپ‌فروت وجود ندارد، بنابراین احتمال می‌رود ژنوتیپ‌های مذکور دورگ‌هایی از گریپ‌فروت باشند. از طرفی نتایج مطالعات RAPD و SCAR نشان داد که گریپ‌فروت از تلاقی میان پرتقال و پوملو ایجاد شده است (Nicolosi *et al.*, 2000) و نتایج بدست آمده در این پژوهش نیز هماهنگ با این مطلب می‌باشد.

ژنوتیپ‌های G9، G15، G30، G11، G16، پوملو (G47)، دارابی (G46)، G18 و G22 در گروه C دسته‌بندی شدند. به جز ژنوتیپ G16 که با 0/92 ضریب تشابه، شباهت بالایی به پوملو دارد، ژنوتیپ‌های دیگر قرابت بالایی را به پوملو نشان ندادند. پوملو یکی دیگر از سه گونه اصلی مرکبات است و قرابت درون‌گونه‌ای بالایی در میان آنها وجود دارد (Barret & Rhodes, 1976). این با تمایل به خودبارور بودن در پوملوها که به دلیل هموزیگوس بودن آنها فرض می‌شود همخوانی دارد. نتایج بدست آمده از آیزوزایم‌ها تأیید کننده این فرضیه است و پوملو در 10 مکان ژنی مورد بررسی هموزیگوس بود (Torres *et al.*, 1978). بنابراین در حالی که ژنوتیپ G16 احتمالاً یک جهشی از پوملو یا یک دورگ طبیعی بین پوملو و رقمی دیگر است، اما ژنوتیپ‌های دیگر این گروه می‌توانند دورگ‌هایی باشند که پوملو به عنوان یکی از والدین آنها است.

خوشه D شامل ژنوتیپ G41 است که قرابت بیشتری با نارنج (G51) در گروه E نشان داده است. قرابت درون‌گونه‌ای بالایی در میان ارقام نارنج وجود دارد اگرچه هتروزیگوس هستند (Barret & Rhodes, 1976). در پژوهش ما ضریب تشابه ژنوتیپ G41 و نارنج (G51) 0/54 است که احتمالاً ژنوتیپ G41 دورگی از نارنج است. گزارش شده که نارنج از تلاقی میان نارنگی و پوملو ایجاد شده است (Barret & Rhodes, 1976) و اطلاعات بدست آمده از نشانگر مولکولی PCR-RFLP این موضوع را تأیید می‌کند (Asadi Abkenar, 2007). نتایج این مطالعه نیز نشان داد که نارنج در ضرایب تشابه 0/51 و 0/47 به ترتیب از پوملو و گروه نارنگی‌ها جدا شده است. در گذشته دور از نارنج تنها به عنوان گیاه زینتی و دارویی استفاده می‌شد، در حال حاضر نیز تنها به عنوان پایه از این گونه استفاده می‌شود و این باعث شده تا انتخاب میان ارقام برتر انجام نشود (Moore, 2001). ژنوتیپ بالنگ (G54) به صورت انفرادی در گروه F قرار گرفت. بالنگ نیز یکی از سه گونه اصلی مرکبات است و به عنوان منشأ سایر مرکبات شناخته شده است (Barret & Rhodes, 1976).

لمون اروکا (G55) به تنهایی در خوشه G قرار گرفت. نتایج بدست آمده از نشانگر مولکولی ISSR در بررسی میان شش رقم لمون نشان داد

که لمون‌ها پلی‌فیلتیک هستند و از گونه‌های مختلف بوجود آمده‌اند (Fang & Roose, 1997) و همچنین درصد هتروزیگوسیتی در آنها بالا می‌باشد (Herrero *et al*., 1996). گزارشات حاکی از این هستند که لمون‌ها دورگ حاصل از تلاقی میان لایم و بالنگ هستند، اما به لحاظ ژنتیکی قرابت بیشتری نسبت به بالنگ دارند (Barret & Rhodes, 1976) و یا دورگ حاصل از بالنگ و نارنج می‌باشند (Gulsen & Roose, 2001). نتایج بدست آمده در این پژوهش نیز مؤید این موضوع است زیرا لمون اروکا در ضرایب تشابه 0/41 از بالنگ و 0/34 از لایم تفکیک شد.

ژنوتیپ G28 به صورت مستقل در خوشه H قرار گرفت. این ژنوتیپ با هیچ‌یک از نمونه‌های شاهد مورد بررسی در این مطالعه قرابت نشان نداد، که احتمالاً دورگی است که به‌طور طبیعی بوجود آمده است. مرکبات به انجام دورگ‌گیری میان گونه‌ها و بدون هیچ مشکلی شناخته شده هستند (Iwamasa *et al*., 1988). همچنین ممکن است که این ژنوتیپ موتانتی باشد که در اثر جهش سوماتیکی ایجاد شده و با نشانگرهای استفاده شده در این مطالعه قابل تمیز نیست. امکان ایجاد جهش سوماتیکی در گونه‌های جنس *Citrus* وجود دارد (Moore, 2001). اهمیت این جهش‌ها زمانی مشخص می‌شود که به این حقیقت توجه شود که اکثر گونه‌های کشت شده مرکبات بر اساس تکثیر رویشی ازدیاد شده‌اند (Herrero *et al*., 1996). در گروه I لیمو شیرین (G49) و لیمو آب شیراز (G50) جای گرفتند. ارقام لایم (اسیدی) و لیمو شیرین به عنوان لایم در نظر گرفته می‌شوند (Soost & Roose, 1996). دورگ‌گیری‌های طبیعی بین گونه‌ها و جهش‌های جوانه‌ای زیادی در اعضاء جنس *Citrus* وجود دارد (Moore, 2001) که این جهش‌ها باعث ایجاد تنوع در ارقام می‌شوند.

در مجموع نشانگرهای ISSR استفاده شده در این مطالعه قادر به تکثیر توالی هدف در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بودند. نشانگرهای حاضر توانستند روابط ژنتیکی در گروه مورد مطالعه را تقریباً بطور واضحی مشخص کنند. این با نتایج گزارشات (Fang & Roose, 1997; Shahsavar *et al*., 2007; Biswas *et al*., 2010; Marak & Laskar, 2010) که اعلام کردند، نشانگر ملکولی ISSR ابزاری قدرتمند در تجزیه ژنتیکی مرکبات است، مطابقت دارد. از آنجایی که مناطق شمالی کشور عمدتاً زیر کشت ارقام پرتقال و نارنگی می‌باشد، بنابراین جهش یا دورگ‌گیری‌های طبیعی نیز در این دو گونه زیاد بوده و به این دلیل، اکثر ژنوتیپ‌های ناشناخته مورد بررسی در گروه پرتقال و نارنگی قرار گرفتند. نشانگرهای مولکولی دیگر مانند PCR-RFLP و SSR ممکن است بتوانند در تعیین والدین مادری و تکمیل دقیق‌تر قرابت این ژنوتیپ‌ها کمک نماید.

سپاسگزاری

این مقاله برگرفته از پروژه تحقیقاتی پایان‌یافته با شماره فروست 40222 مورخ 90/12/22 موسسه تحقیقات مرکبات کشور است که از حمایت مالی آن مجموعه قدردانی می‌شود.

منابع

Asadi Abkenar A, Isshiki S, Matsumoto R (2007). Comparative analysis of organelle DNAs acid citrus grown in Japan using PCR-RFLP method. Genetic Resources and Crop Evolution 55: 487-492.

Barkley NA, Roose ML, Krueger RR, Federici CT (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.

Barret HC, Rhodes AM (1976). A numerical taxonomic study affinity relationships in cultivated Citrus and its close relatives. Systematic Botany 1: 105-136.

Biswas MK, Xu Q, Deng XX (2010). Utility of RAPD, ISSR, IRAP and REMAP markers for the genetic analysis of *Citrus* spp. Scientia Horticulturae 124: 254-261.

Bornet B, Branchard M (2001). Non-anchored simple sequence repeat markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. Plant Molecular and Biology Report 19: 209-215.

Davies FS, Albrigo LG (1994). Citrus. CAB International.

Fang DQ, Krueger RR, Roose ML (1998). Phylogenetic relationships among selected Citrus germplasm accession revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) markers. Journal of the American Society for Horticultural science 123: 612-617.

Fang DQ, Roose ML (1997). Identification of closely related Citrus cultivars with intersimple sequence repeat markers. Theoretical and Applied Genetics 95:408-417.

Fang DQ, Roose ML, Krueger RR, Federici CT (1997). Fingerprinting trifoliate orange germplasm accessions with isozymes, RFLPs, and inter-simple sequence repeat markers. Theoretical and Applied Genetics 95: 211-219.

Federici CT, Fang DQ, Scora RW, Roose MR (1998). Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. Theoretical and Applied Genetics 94: 812-822.

Filho HD, Machado CMA, Targon MLPN, Moreira MCPQDG, Pompeu J (1998). Analysis of the genetic diversity among mandarins (*Citrus spp*.) using RAPD markers. Euphytica 102: 133-139.

Golein B, Adouli B (2011). Citrus 1. Novin Poya Press, Tehran, Iran (In Farsi).

Green RM, Vardi A, Galun E (1986). The plastome of Citrus: physical map, variation among Citrus cultivars and species and comparison with related genera. Theoretical and Applied Genetics 72: 170-177.

Gulsen O, Roose ML (2001). Chloroplast and nuclear genome analysis of the parentage of lemons. Journal of the American Society for Horticultural science 126: 210-215.

Herrero R, Asins MJ, Carbonell EA, Noyarro I (1996). Genetic diversity in the Orange subfamily Aurantioideae. I. Intra species and intragenus genetic variability. Theoretical and Applied Genetics 92: 596-606.

Iwamasa M, Nito N, Ling JT (1988). Intra and inter generic hybridization in the orange subfamily Aurantioidea. Proc. of International Society Citriculture 123-130.

Krueger RR, Roose ML (2003). Use of Molecular markers in the management of Citrus germplasm resource. Journal of the American Society for Horticultural Science 128: 827-837.

Kumar S, Jena SN, Nair NK, (2010). ISSR polymorphism in Indian wild orange (*Citrus indica* Tanaka, Rutaceae) and related wild species in North-east India. Scientia Horticulturae 123: 350-359.

Luro F, Laigrent F, Bove JM, Ollitrault, P (1995). DNA amplified fingerprinting, a useful tool for determination of genetic origin and diversity analysis in Citrus. Hort Science 30:1063-1067.

Meloni M, Perini D, Filigheddu R, Binelli G (2006). Genetic variation in five Mediterranean populations of *Juniperus phoenicea* as revealed by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. Annals of Botany 97: 299-304.

Moore GA (2001). Oranges and lemons: clues to the taxonomy of *Citrus* from molecular markers. Trends in Genetic. 17: 536-540.

Murry MG, Thompson WF (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8: 4321-4325.

Nicolosi E, Deng ZN, Gentile A, La Malfa S, Continella G, Tribulato E (2000). Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. Theoretical and Applied Genetics 100: 1155-1166.

Scora RW (1975). On the history and origin of *Citrus*. Bulletin of the Torrey Botanical Club 102: 369-375.

Shahsavar AR, Izadpanah K, Tafazoli E, Sayed Tabatabaei BE (2007). Characterization of citrus germplasm including unknown variants by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Scientia Horticulturae 112: 310-314.

Soost RK, Roose ML (1996). Citrus, In: Janick J, Moor JN (Eds.), Fruit Breeding, Vol. 1: Tree and Tropical Fruits, John Wiley and Sons, Inc. pp. 257-323.

Torres AM, Soost R, Diedenhofen U (1978). Leaf isozymes as genetic markers in Citrus. American Journal of Botany 65: 869-881.

Genetic analysis between unknown *Citrus* accessions and commercially important cultivars using ISSR marker

Golein B[*1], Ghasemi M. [1], Fattahi Moghadam J. [2], Gholamian E.[3]

[1] Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Improvement, Iran Citrus Research Institute, Ramsar, Iran.
[2] Assistant Professor, Department of Technical and Engineering, Iran Citrus Research Institute, Ramsar, Iran.
[3] M. Sc., Department of Plant Protection, Iran Citrus Research Institute, Ramsar, Iran.

Abstract

Understanding phylogenic relationships and genetic diversity in citrus is considered to be important in clarifying their genetic relationships, germplasm characterization and the registration of new varieties. There are some *Citrus* accessions in the country citrus collections which have been classified merely based on their morphological traits and much genetic research has not been done. Molecular markers would help to infer their relations with known cultivars. In the present research work, phylogenic relationships among 55 citrus genotypes including 43 unknown local genotypes and 12 commercially important citrus varieties were investigated through ISSR markers. In total, 10 ISSR primers produced 92 polymorphic bands with average of 9.2 bands per primer. Polymorphism percent of each primer varied from 75 in primer BDB(CA)7C to 100 in primer (AC)8YT. Genetic similarities among accessions were calculated according to Jaccard Similarity Index and used to construct a dendrogram based on the unweighted pair groups method arithmetic averages (UPGMA), which put the 55 samples into nine major groups i.e. (A, B, C, D, E, F, G, H and I). Orange, mandarin and 25 unknown genotypes into group A, grapefruit and 9 unknown genotypes into group B, Pummelo, Darabi and seven unknown genotypes into group C, sour orange and an unknown genotype into groups D & E, citron into group F, Eureka lemon into group G, an unknown genotype into group H and sweet lime and Mexican lime into group I were clustered. Genetic diversity and phylogenetic analysis in citrus, provide useful information for further breeding programs, collection, preservation and utilization.

Keywords: *Citrus cultivars, Molecular marker, Phylogenetic relationship.*

[*] Corresponding Author: Golein B. Tel: 09113945261 Email: bgoleincitrus@yahoo.com