دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارسنجان

مجله علمی پژوهشی اکوفیزیولوژی گیاهی
سال دوازدهم، شماره چهل و یکم، ۱۳۹۹

بررسی تنوع ژنتیکی برخی ارقام مرکبات شمال ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی ریز ماهواره

بابک باباخانی[۱]، یلدا نقاشی[۲]، سید افشین حسینی بلداجی[۳]، مهدیه هوشنی[۲]

دریافت: ۹۵/۸/۸ پذیرش: ۹۸/۲/۱۰

چکیده

در این مطالعه تنوع ژنتیکی ۲۹ رقم مرکبات شامل ارقام پرتقال، نارنگی، نارنج، پوملو و تیپ‌های طبیعی از طریق تنوع در توالی‌های تکراری کوتاه با استفاده از ۸ جفت آغازگر ریز ماهواره ای مورد ارزیابی قرار گرفت. DNAژنومی استخراج شده از نمونه‌های گیاهی با این آغازگرها تکثیر و محصولات حاصل با استفاده از ژل پلی اکریل آمید واسرشته ساز الکتروفورز شدند. از مجموع ۹۷ باند امتیازدهی شده برای نشانگر ISSR، تعداد ۷۸ باند معادل ۸۰/۲۲ درصد باندها چند شکل بودند. بیشترین و کمترین درصد چند شکلی به ترتیب آغازگرهای ISSR-8با ۹۰٪ و ISSR-5 با ۷۳٪ باند چند شکل نشان دادند. 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 ۰/۱۲نشان دادند. بررسی دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA با ضریب تشابه تطابق ساده، ارقام مورد بررسی را به پنج گروه اصلی طبقه بندی کرد. پوملو در بررسی ما در خوشه‌ای مجزا قرار داشت. نشانگر مولکولی ISSR نارنگی انشو سوجی یاما و کلمانتین نولس را در دو گروه مجزا قرار داد. مشاهدات در مورد بررسی استفاده از نشانگرهای ISSR در تمایز ژنوتیپ‌ها مشخص می‌نماید که این نشانگر، قادر به تفکیک بین ژنوتیپ‌های بسیار نزدیک نیز می‌باشد و می‌توان با کمترین اشتباهی ژنوتیپ هر رقم را ارزیابی نمود.

واژه‌های کلیدی: مرکبات، نشانگر ISSR، تنوع ژنتیکی، گروه بندی

باباخانی، ب.، ی. نقاشی س.ا. حسینی بلداجی و م. هوشنی. ۱۳۹۹. بررسی تنوع ژنتیکی برخی ارقام مرکبات شمال ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی ریز ماهواره. مجله اکوفیزیولوژی گیاهی. ۴۱: ۲۸۰-۲۷۱.

۱- گروه زیست شناسی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، مازندران، ایران- مسئول مکاتبات. b.babakhani94@yahoo.com

۲- گروه زیست شناسی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، مازندران، ایران

۳- گروه زیست شناسی، واحد یادگار امام، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

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 بهره برداری بی رویه از منابع طبیعی در جهت افزایش تولیدات کشاورزی می‌باشد؛ در بسیاری از موارد، این افزایش تولیدات با تخریب منابع زیستی و فرسایش شدید ذخایر ژرم پلاسم طبیعی همراه بوده است (محمدی و پارسانا، ۲۰۰۳). حفاظت از تنوع ژنتیکی در همه اکوسیستم‌های گیاهی در سراسر جهان به یک مسئله عمده از نگرانی‌های بین المللی تبدیل شده است. از بین رفتن به طور فزاینده تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی در اثر از بین رفتن زیستگاه ها، 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 مان از تاکسونومی و منشأ و ارزیابی گونه‌های گیاهی کمک می‌کند (یوزن و همکاران، ۲۰۱۲). مرکبات بعد از سیب دومین میوه‌ای است که در جهان مورد مصرف عمومی مردم می‌باشد و از دیرباز به عنوان بخشی از رژیم غذایی، دارای ارزش فراوانی بوده است. مرکبات و محصولات جانبی آن منابعی غنی از ویتامین‌ها، مواد معدنی و فیبر بوده و برخی مواد ضد سرطانی نیز در آن ها یافت می‌شود. گسترش وسیع جغرافیایی و میزان بالای تولید مرکبات موجب شده است که این محصول از اهمیت اقتصادی بالایی در جهان برخوردار باشد (سوست و روز، ۱۹۹٦). 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 (بارکلی و همکاران، ۲۰۰٦). شناسایی و تفکیک ارقام مختلف می‌تواند ما را در جهت حفظ و ذخایر ژنتیکی و پیشبرد برنامه های اصلاحی کمک رساند. بررسی تنوع ژنتیکی جهت مطالعه ژرم پلاسم، تهیه برنامه‌های اصلاحی، بررسی روند تکامل گونه، رده بندی و بسیاری مسائل دیگر اهمیت دارد (نقوی و همکاران، ۱۳۸۸) بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین میزان قرابت و نزدیکی ژنتیکی مرکبات موجود در استان مازندران به عنوان 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 برنامه های اصلاحی استفاده نماید. بررسی-های مولکولی می‌تواند وضعیت قرابت یا فاصله ژنتیکی بین ارقام مشابه با نام‌های متفاوت و یا ارقام متفاوت با نام های مشابه را روشن نماید، همچنین ارتباط بین ژنوتیپ‌ها و منشأ احتمالی آنها نیز با استفاده از این روش‌ها به طور دقیق‌تری قابل بررسی است (دهستانی و همکاران، ۲۰۰۷). 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 بوجود آمدن دو رگ‌های طبیعی و نیز وجود صفات خوب و مفید در این دو رگ‌ها از جمله مقاومت به آفات و بیماری‌ها و یا وجود صفات مطلوب کمی و کیفی، ضرورت شناسایی و جمع‌آوری این دو رگ‌ها و استفاده از آن‌ها در تحقیقات مرکبات را بیش از پیش نمایان می کند (شفیعی زرگر، ۱۳۸٤). بنابراین با داشتن اطلاعات دقیق‌تر ژنتیکی از این محصول می‌توان برای اصلاح و ایجاد ارقام جدید برنامه ریزی 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 روش ها

جمع آوری نمونه گیاهی

برگ ۲۹ نمونه از مرکبات از ایستگاه تحقیقات مرکبات کترا جمع آوری 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 ۹٤ پس از جمع‌آوری به مؤسسه تحقیقات مرکبات کشور منتقل شد و تا زمان استخراج DNA در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری شدند (جدول ۱).

جدول ۱- نمونه‌های 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 سیاورز ۱	*C. sinensis*	G4	۱۹	تیپ طبیعی	*C. sp.*	G65
٥	پرتقال سیاورز ۲	*C. sinensis*	G5	۲۰	تیپ طبیعی	*C. sp.*	G67
٦	پرتقال سیاورز ۳	*C. sinensis*	G6	۲۱	تیپ طبیعی	*C. sp.*	G70
۷	پرتقال سیاورز ٤	*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

استخراج DNA به روش موری و تامسون (۱۹۸۰) با مقداری تغییرات انجام گرفت، برای این کار از ۰/۳ گرم نمونه برگی پودر شده استفاده شد. نمونه برگی به خوبی در ازت مایع پودر شده و قبل از این که از انجماد خارج شود ٦۰۰ میکرولیتر بافر استخراج حاوی ۲٪ هگزا دسیل تری متیل آمونیوم بروماید (CTAB) ، ۱/٤ مولار کلرید سدیم، ۲۰ میلی مولارEDTA، ۱۰۰ میلی‌مولار بافر تریس ۱۰۰ میلی‌مولار با PH=۸، ۱٪ سارکوسیل و ۰/٤٪ مرکاپتواتانول به آن اضافه گردید و به مدت 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 دنبال آن به مدت پنج دقیقه در سرعت ۱٤۰۰۰ دور در دقیقه (g=۱۷۰۰۰) 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 روشناور دور ریخته شد و به رسوب باقیمانده بافر تریس– EDTA حاوی ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر RNAas اضافه گردید و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت یک ساعت نگهداری شد. به نمونه ۲۰۰ میکرو لیتر مخلوط فنل و کلروفرم– ایزوآمیل الکل (۱: ۱) اضافه و به مدت 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 ٥۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۷٪ سرد و ۱۳۰ میکرولیتر استات آمونیوم ٤ مولار مخلوط و به مدت یک ساعت در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در مرحله بعد مخلوط سرد شده به مدت ۱٥ 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 ٥۰ میکرو لیتر 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 زنجیره ای پلیمراز (PCR)

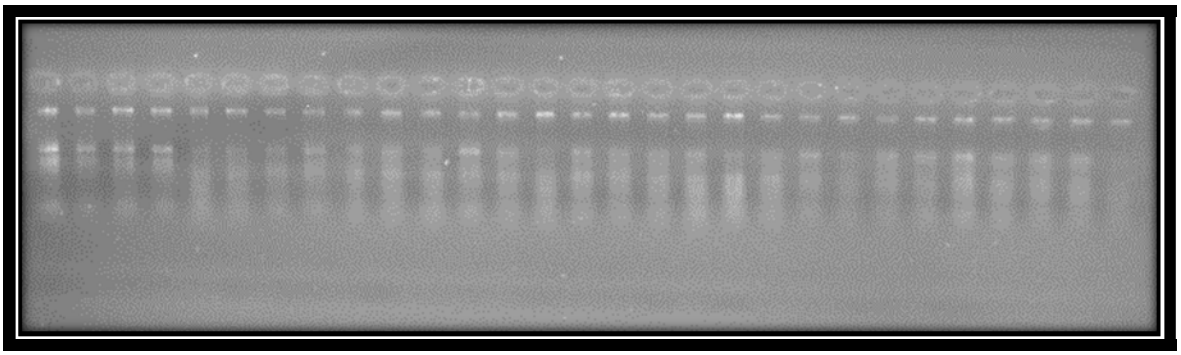
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توسط دستگاه ترموسایکلر، ۱۰ ISSRکه در مطالعات سایر محقیقین کیفیت اللی مناسب و میزان چندشکلی بالایی را بین ارقام مرکبات نشان داده بودند، استفاده شد. واکنش‌های PCR از مواد تهیه شده از شرکت

سیناژن و در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل میکرولیتر شامل یک میکرولیتر بافرx۱۰، 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 تکثیرDNA در ابتدا برای هر آغازگر به صورت واسرشته سازی اولیه در ۹٤ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، ٤۰ چرخه شامل واسرشته سازی در ۹٤ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال برای هر آغازگر ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ٤۵ ثانیه و توسعه در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه و در نهایت ۷ دقیقه توسعه نهایی انجام شد. به منظور بررسی وتفکیک محصولات حاصل از تکثیر، از ژل آگارز۱ درصد استفاده شد. پس از الکتروفورز و رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید، نوارها در زیر نور ماوراءبنفش با استفاده ازدستگاه ژل داک مشاهده و عکس برداری شدند.

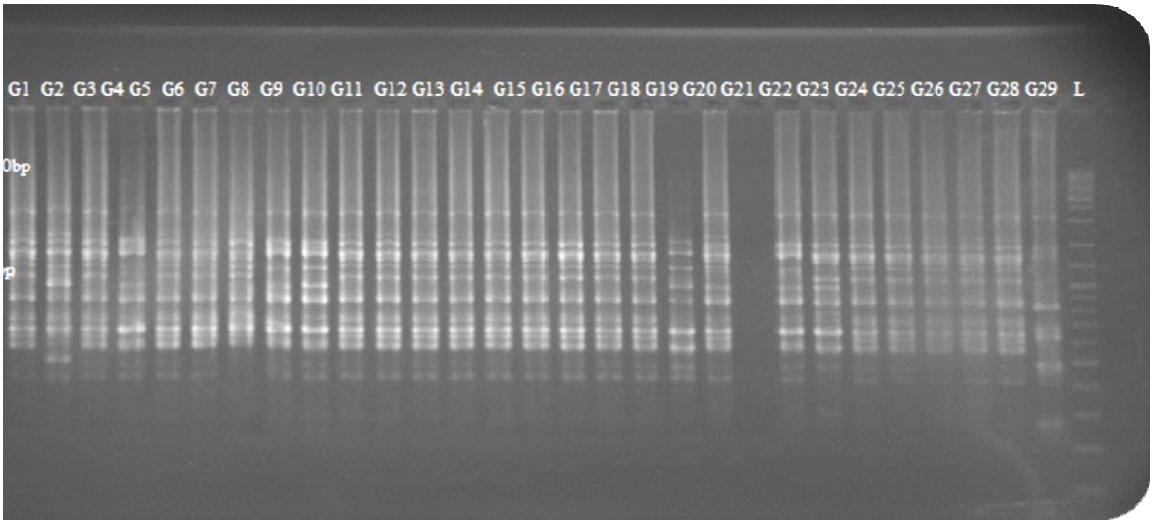
نتایج و بحث

استخراج DNA

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



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



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

بررسی آماره‌های تنوع ژنتیکی

از مجموع ۹۷ باند امتیاز دهی شده برای نشانگر ISSR تعداد ۷۸ باند، معادل ۸۰/۲۲ درصد باندها چند شکل بودند (جدول ۲). بیشترین تعداد باند متعلق به آغازگر ISSR-6 و کمترین تعداد باند مربوط به آغازگر ISSR-2 می باشد. بیشترین و کمترین درصد چند شکلی به ترتیب آغازگرهای ISSR-8 با ۹۰٪ و ISSR-5 با ۷۳٪ باند چند شکل نشان دادند. 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، چند شکلی 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

جدول ۳- ضرایب کوفنتیک حاصل از الگوریتم‌ها با ضرایب تشابه

	الگوریتم UPGMA	الگوریتم اتصال ساده	الگوریتم اتصال کامل
ضریب تشابه تطابق ساده	۰/۹٦۵	۰/۹۳٦	۰/۹۳۸
ضریب تشابه جاکارد	۰/۹٦۷	۰/۹۳۱	۰/۹٤٤
ضریب تشابه دایس	۰/۹٦	۰/۹٤۸	۰/۹۳۵

تجزیه روابط ژنتیکی

الف- محاسبه بهترین ضریب تشابه و الگوریتم خوشه بندی

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 دندروگرام-های حاصل ضریب کوفنتیک محاسبه گردید. بر این اساس، ضریب تشابه دایس و الگوریتم UPGMA عنوان سازگارترین الگوریتم خوشه بندی و ضریب تشابه انتخاب شدند (جدول ۳).

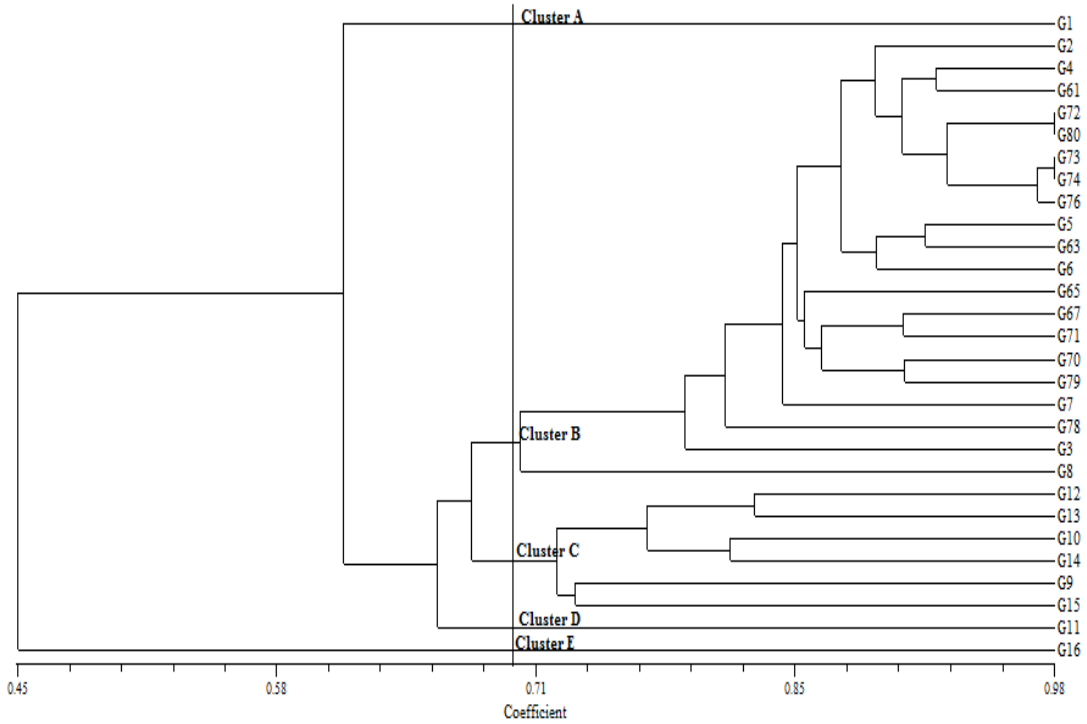
ب- تحلیل ماتریس تشابه

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 G72با G80 و G74 با G73 می‌باشد.

تجزیه خوشه‌ای

تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های مولکولی به روش UPGMA با ضریب تشابه جاکارد انجام گردید. در دندروگرام ترسیم شده ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در ضریب تشابه ۰/۷۰ در پنج گروه مجزا (A, B, C, D, E) قرار گرفتند. گروه اول شامل نارنج (G1) بود که در یک گروه مجزا قرار گرفت. گروه B بزرگ‌ترین گروه و تیپ‌های طبیعی ناشناخته (G8,G61, G63, G65, G67, G70, G71, G72, G73, G74, G76, G78, G79 , G80) و پرتقال‌های سیاورز (G4, G5, G6 ,G7)، واشنگتن ناول (G3) 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 تیپ-های طبیعی ناشناخته G72 و G80 و دو تیپ ناشناخته G74 و G73 دارای 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، زیر گروه C1 شامل نارنگی‌های دانسی (G12)، محلی شمال

(G14)، بمی (G13) و اتابکی (G10) و زیر گروه D2، نارنگی کلمانتین نولس (G15) و تیپ طبیعی شل محله (G9) را در بر می‌گیرد. در زیر گروه C1 نارنگی های دانسی (G12) و بمی (G13) بیشترین شباهت ۰/۸۳ را داشتند که نشان دهنده آن است که این دو ژنوتیپ از لحاظ ژنتیکی خیلی مشابه همدیگر هستند. 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) و نارنگی کلمانتین نولس (G15) در این مطالعه در دو گروه مجزا قرار گرفتند. پوملو (G16) هم به طور مجزا در گروه E قرار گرفت (شکل ۳).



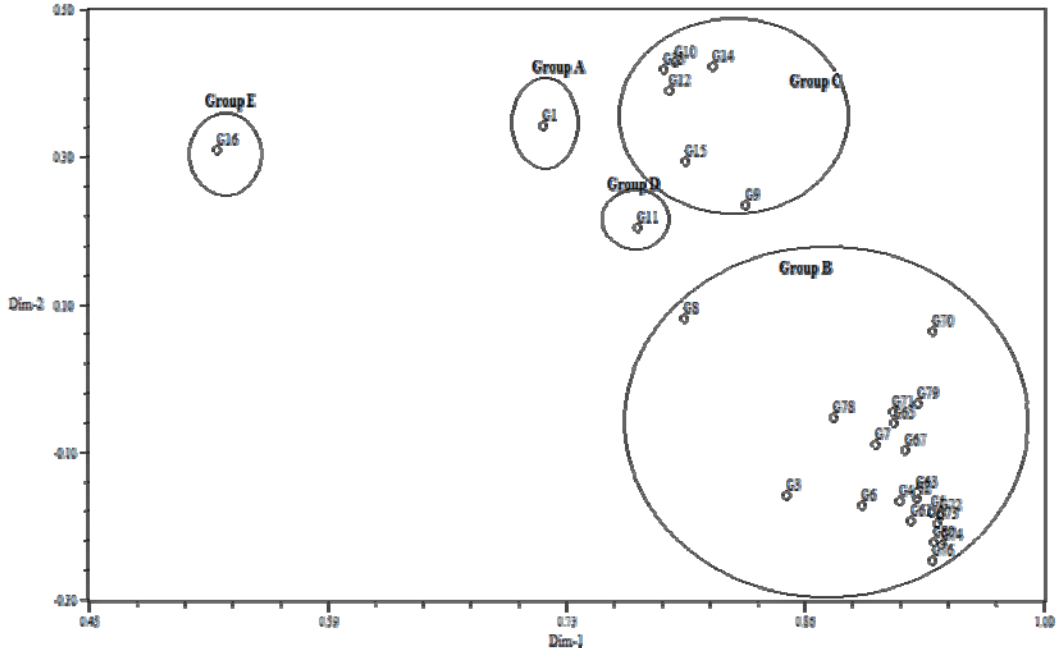
شکل ۳- دندوگرام ۲۹ ژنوتیپ مرکبات با استفاده از نشانگرISSR به روش UPGMA

تجزیه به مولفه‌های اصلی

نتایج تجزیه به مولفه‌های اصلی شامل مقادیر ویژه، واریانس نسبی و واریانس تجمعی هر مولفه در جدول ٤ نشان داده شده است. در این تجزیه، سه مولفه اصلی توانستند مجموعاً ۸۳/۱۸ درصد از واریانس کل را توجیه نمایند. مولفه اول، مولفه دوم و مولفه سوم به ترتیب ۷۵/۳٦ درصد، ۵/۳۸ درصد و ۲/٤٤ درصد از واریانس را توجیه نمودند. به منظور نمایش دو بعدی الگوی تنوع در بین ژنوتیپ های مورد مطالعه، نمودار دو بعدی بر اساس دو مولفه اول و دوم رسم گردید (شکل ٤). نتایج تجزیه به مولفه‌های اصلی با نتایج مربوط به تجزیه خوشه‌ای کاملاً مطابقت داشت. ژنوتیپ‌های مورد مطالعه همانند تجزیه خوشه‌ای در پنج گروه قرار گرفتند.

جدول ٤- تجزیه به مولفه‌های اصلی

	مقادیر ویژه	واریانس نسبی	واریانس تجمعی
مولفه اول	۲۱/۸۵	۷۵/۳٦	۷۵/۳٦
مولفه دوم	۱/۵٦	۵/۳۸	۸۰/۷٤
مولفه سوم	۰/۷	۲/٤٤	۸۳/۱۸



شکل ٤- نمایش دو بعدی تجزیه به مولفه های اصلی بر اساس مولفه اول و دوم

نتیجه‌گیری

آغازگرهای آزمون شده در این مطالعه قادر به تکثیر بیش از ۹۰ ٪ مکان‌های هدف در هر ژنوم آزمون شده بودند. این امر بیانگر میزان بالای حفظ توالی آغازگر بین ارقام آزمون شده می-باشد. این که آغازگر قادر به تکثیر DNA هدف نیست، ممکن است به دلیل جهش نقطه‌ای، افزایش و یا حذف در بین نواحی اتصال آغازگر به DNA باشد که مانع از جفت شدن آغازگر به DNA می‌شود، در نتیجه از تکثیر موفقیت آمیز این مکان جلوگیری می‌کند (گلعین، ١٣٨٤) در عمل، توانایی تکثیر مکان های مشابه در ارقام مرکبات توسط این آغازگرها، اجازه مقایسه ژنوم‌ها را در این خانواده می‌دهد. 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 پایه‌های اساسی اصلاح نباتات، دسترسی و آگاهی از میزان تنوع در مجموعه‌های ژنتیک و مراحل مختلف پروژه‌های اصلاحی است. تخمین ترکیب ژنتیک گیاهان و مجموعه‌های ژنتیک و تعیین قرابت بین آنان از گذشته دور معمول بوده است (نقوی و همکاران، ۱۳۸۸) امروزه پیشرفت ژنتیک مولکولی منتهی به ابداع روش‌های مختلف مبتنی بر DNA، برای تعیین چند شکلی‌های 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 چند شکلی‌ها به صورت بسیار کارآمد فراهم شده است که از جمله می‌توان RAPD، SSR، ISSR، AFLP و... را نام برد (گلعین و همکاران ۲۰۱۲). مشاهدات در مورد بررسی استفاده از نشانگرهای ISSR در تمایز ژنوتیپ‌ها مشخص می‌نماید که این نشانگر، قادر به تفکیک بین ژنوتیپ-های بسیار نزدیک بوده و می‌توان با کمترین اشتباه، ژنوتیپ هر رقم را ارزیابی نمود. آزمایشات مشابهی در این خصوص توسط محققان دیگر (شهسوار و همکاران، ۲۰۰۷؛ فنگ و روز، ۱۹۹۷) گزارش شده است که نتایج تحقیق به عمل آمده با گزارشات آن ها مطابقت دارد. برنت و همکاران (٢٠٠٤)، با استفاده از نشانگرهای ISSR، IRAP و RAPD تعدادی از ارقام لمون را شناسایی کردند. شهسوار و همکاران (۲۰۰۷) در تعیین قرابت تعدادی از ژنوتیپ‌های مرکبات در استان فارس با استفاده از نشانگر ISSR بیان کردند که بکرایی و ولکامریانا ۰/۷۸ ضریب شباهت دارند و در یک گروه فیلو ژنتیکی قرار می‌گیرند، همچنین اعلام نمودند که ضریب تشابه بین بکرایی و لیموشیرین ۰/٧٤ است. پوملو در این بررسی در خوشه‌ای مجزا قرار داشت. پوملو نقش مهمی در والدین بسیاری از میوه‌های مرکبات از جمله لمون‌ها، پرتقال ها و گریپ فروت دارد. بسیاری از مطالعات دیگر با استفاده از نشانگرهای مولکولی مختلف هم این یافته را تأیید کردند (قنبری و همکاران ۲۰۰۹). نشانگر ملکولی ISSR، نارنگی انشو سوجی یاما و کلمانتین نولس را در دو گروه مجزا گروه بندی کردند. نارنگی انشو و کلمانتین هردو

متعلق به گروه ماندارین هستند اما نارنگی انشو در برخی خصوصیات مورفولوژی با نارنگی کلمانتین اختلاف دارد و از نوع نارنگی ساتسوما است. مطالعات انجام گرفته با استفاده از نشانگرهای مختلف هم نارنگی ها را در دو گروه قرار دادند (یوزن، ۲۰۱۱؛ کامپوس و همکاران، ۲۰۰۵). همه ژنوتیپ‌های سیاورز ۱، سیاورز ۲، سیاورز ۳، سیاورز ٤، تیپ‌های طبیعی ناشناخته، پرتقال پارسون براون و واشنگتن ناول در بررسی انجام شده در یک گروه قرار داشتند که قرابت بالایی به همدیگر نشان دادند. فنگ و روز (۱۹۹۷) تنوع ژنتیکی کمی در بین ژنوتیپ‌های پرتقال با استفاده از نشانگر ISSR یافتند، همچنین سطح بالایی از تشابه در درون ژنوتیپ های پرتقال با استفاده از نشانگر RAPD گزارش شده است (مالیک و همکاران، ۲۰۱۲). تریپلولیت لیس و همکاران (۲۰۱۳)، 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 اثر جهش به وجود آمده اند. همچنین بررسی‌ها با استفاده از نشانگر ISSR نشان دادند که اکثریت ارقام پرتقال بر خلاف چند شکلی ظاهری، به دلیل جهش های رویشی اساس ژنتیکی کمی دارند که این نشانگر مولکولی قادر به تفکیک آن ها نمی‌باشد (روحی قربائی و همکاران ۲۰۱۰). در آزمایش حاضر، معلم کوه شباهت بالایی به پرتقال واشنگتن ناول و سیاورز نشان داد که احتمالا یا بر اثر جهش یا دو رگ‌گیری بین آن ها به وجود آمده است که با نتایج جنتی و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت دارد. شل محله یک دو رگ طبیعی است که در گروه نارنگی قرار داشت و در بررسی با نشانگر RAPD در گروه پرتقال ها قرار گرفت، در حالی که با نشانگر IRAP آن در یک گروه مجزا قرار داشت که این تفاوت در گروه بندی ممکن است به دلیل ماهیت مختلف نشانگرهای مولکولی باشد. نشانگر ملکولی استفاده شده می‌تواند طلاعات مفیدی درباره سطح چند شکلی و تنوع مرکبات را فراهم کنند، که نشان دهنده کاربرد آن در شناسایی ژرم پلاسم مرکبات می باشد.

تقدیر و تشکر

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

منابع

شفیعی زرگر، ع.، ر. اسلامی زاده. ۱۳۸٤. ارزیابی و شناسایی درختان مرکبات دارای تنوع ژنتیکی بارز در منطقه شمال خوزستان. چهارمین کنگره علوم باغبانی ایران. ۱۷–۱۹ آبان ماه، دانشگاه فردوسی مشهد،۷٦ صفحه.

گلعین ب. ۱۳۸٤. شناسایی و جداسازی ریزماهواره های مرکبات به منظور تشخیص هیبریدها و ارزیابی پرتقال و نارنگی ایرانی. پایان نامه دکترا. دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران. ۱۱۷

نقوی، م. ر.، ب. قره یاضی .، ق. حسینی سالکده. ۱۳۸۸. نشانگرهای مولکولی. انتشارات دانشگاه تهران. ۳۳۰-۳۳٤ .

Barkley, N.A., M.L. Roose, R.R. Krueger and C.T. Federici. 2006. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). Theor. Appl. Genet. 112: 1519–1531.

Bernet, G.P., P.F. Mestre, J.A. Pina and M.J. Asins. 2004. Molecular discrimination of lemon cultivars. HortSci. 39: 165-169.

Campos, E.T., M.A.G. Espinosa, M.L. Warburton, A.S. Varela and A.V. Monter. 2005. Characterization of Mandarin (*Citrus* spp.) using morphological and AFLP markers. Interciencia. 30 (11):687-693.

Dehestani, A., S.k. Kazemitabar and H. Rahimian. 2007. Assessment of Genetic Diversity of Navel Sweet Orange Cultivars Grown in Mazandaran Province Using RAPD Markers. Asi. J. of Plant Sci. 6(7):1119-1124.

Fang, D.Q. and M.L. Roose .1997. Identification of closely related Citrus cultivars with intersimple sequence repeat markers. Theor. Appl. Genet. 95: 408–417.

Ghanbari, A., .N.B. Jelodar and H. Rahimiyan. 2009. Studying genetic diversity in Satsuma (*Citrus unshiu*) mandarin utilizing microsatellite markers. Int. J. of Agr. Res. 4(2):88-96.

Golein, B., M. Bigonah, M. Azadvar and M. Golmohammadi. 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.

Jannati, M., R. Pourjanabad and Z. Salehi. 2009. Genetic diversity analysis of Iranian citrus varieties using micro satellite (SSR) based markers. J of Hort and Forest. 1(7): 120-125.

Malik, S.K., M.R. Rohini, S. Kumar, R. Choudhary, D. Pal, and R. Chaudhury. 2012. Assessment of genetic diversity in sweet orange [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck] cultivars of India using morphological and RAPD markers. Agri. Res. 1(4):317–324.

Mohammadi, S.A. and B.M. Prasanna. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants: Salient statistical tools and considerations. Crop Sci. 43: 1235-1248.

Murry, M.G., and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 8: 4321-4325.

Rouhi Ghorabaie, H.R., F.R. Ghazvini, B. Golein and A.R. Nabipour. 2010. Identification of some Citrus accessions in a Citrus germplasm utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). Hort. Envir. Biotchnol. 51: 343–347.

Shahsavar, A.R., K. Izadpanah, E. Tafazoli and B.E.S. Tabatabaei .2007. Characterization of citrus germplasm including unknown variants by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Sci. Hort. 112: 310-314.

Soost, R.K. and M.L. Roose .1996. Citrus In: Fruit Breeding. Tree and Tropical Fruits. John Wiley and Sons, pp. 257–323.

Tripolitsiotis, C., N. Nikoloudakis, A. Linos and M. Hagidimitriou. 2013. Molecular Characterization and Analysis of the Greek Citrus Germplasm. Not. Bot. Hort. Agri. 41(2):463-471.

Uzun, A., O. Gulsen, U. Seday, T. Yesiloglu, Y. Aka-kacar and O. Tuzcu. 2011. Investigation of genetic relationshipsamong trifoliata oranges and their hybrid relatives based on ISSR markers. Rom. Biotechnol. Lett. 4:6430-6438.

Uzun, A., O. Gulsen, T. Yesiloglu, Y. Aka-Kacar and O. Tuzcu .2012. Distinguishing grapefruit and pummelo accessions using ISSR markers. Czech J. Genet. Plant Breed. 46: 170–177.

The ggenetic diversity of some citrus varieties using microsatellite molecular markers

B. Babakhani[1], Y. Naghashi[1], S.A. Hosseini Boldaji[2], M. Hoshani[1]

Received: 2016-10-29 Accepted: 2019-4-28

Abstract

The genetic diversity of 29 varieties of citrus, including varieties of orange, mandarin, bergamot, pomelo and natural types through a variety of short repetitive sequences using 8 microsatellite markers were evaluated. Genomic DNA extracted from the samples using the amplification and products using polyacrylamide gel electrophoresis instruments were Vasrshth. A total of 97 bands were scored for marker ISSR, 78 bands were polymorphic bands of 22/80 percent. The highest and lowest percentage of polymorphic ISSR-8 primers respectively with 90% and 73% polymorphic ISSR-5, respectively. The average value of PIC was 18/0 in this test. Most of the PIC into primer ISSR-6 and ISSR-8 with 27/0 and lowest primer ISSR-1 with 12/0 respectively. Study dendrogram of cluster analysis UPGMA method with simple matching coefficient, cultivars classified into five main groups. Pomelo in our study were in a separate cluster. ISSR molecular marker Satsuma mandarin and clementine Nvls Suji Yama were grouped into two distinct groups. Views about the use of ISSR markers to differentiate genotypes indicate that the indicator is able to differentiate between genotypes are very close and with the fewest mistakes possible genotypes evaluated each figure.

Key words: Citrus, marker ISSR, genetic diversity, category

1- Department of Biology, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Mazandaran, Iran
2- Department of Biology, Yadegare- Imam Khomeini (RAH) Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran