



دانشگاه گورگان، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی گورگان

نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیست و یکم، شماره چهارم، ۱۳۹۳
<http://jopp.gau.ac.ir>

بررسی چندشکلی ژنوتیپ‌های مرکبات با استفاده از نشانگر مولکولی ریید

*هاجر عابدین پور^۱، غلامعلی رنجبر^۲، نادعلی بابائیان جلودار^۳ و بهروز گل‌عین^۴

^۱دانشجوی کارشناسی ارشد گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری،
^۲دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری،
^۳استاد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری،
^۴دانشیار، مؤسسه تحقیقات مرکبات کشور، رامسر

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۴/۲۹

چکیده

شناسایی تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی، برای دستیابی به ارقام مطلوب در مرکبات مهم و ضروری است. در این پژوهش از نشانگر RAPD جهت تعیین تنوع ژنتیکی میان ۲۹ ژنوتیپ مرکبات استفاده شد. یا ۱۹ آغازگر استفاده شده تعداد ۲۴۸ باند چند شکل ایجاد گردید که بیشترین باند تکثیر شده ۱۹ عدد و مربوط به آغازگر OPA-07 بود، در حالی که آغازگر OPA-05 با هشت باند کمترین قطعات چندشکل را نشان داد. متوسط تعداد باند چندشکل برای هر آغازگر ۱۳ باند برآورد گردید. تجزیه داده‌ها توسط نرم‌افزار NTsys با استفاده از ضریب تشابه جاکارد، میزان تشابه محاسبه شده بر اساس باندهای چندشکل را در دامنه‌ای از ۰/۱۴ تا ۰/۹۷ با میانگین تشابه ۰/۶۲ نشان داد. تجزیه خوشه‌ای بر پایه ماتریس تشابه جاکارد و با روش UPGMA صورت گرفت. بر اساس تجزیه خوشه‌ای، در ضریب تشابه ۰/۴۹ ژنوتیپ‌های مرکبات مورد مطالعه به پنج گروه تقسیم شدند. بر اساس ماتریس تشابه، کمترین شباهت (۰/۱۴) مربوط به دو ژنوتیپ پوملو و نارنگی محلی و بیشترین شباهت (۰/۹۷) مربوط به دو تیپ طبیعی ناشناخته G74 و G73 بود. با بررسی دندروگرام نشان داده شد که پوملو و نارنگی به‌عنوان گونه‌های حقیقی مرکبات در خوشه‌های مجزا قرار دارند. تعیین تنوع ژنتیکی در مرکبات، اطلاعات مفیدی را برای برنامه‌های به‌نژادی، انتخاب و حفظ ارقام فراهم می‌کند.

واژه‌های کلیدی: تجزیه خوشه‌ای، تنوع ژنتیکی، ماتریس تشابه، مرکبات، RAPD

*مسئول مکاتبه: h_abedinpour@ymail.com

مقدمه

مرکبات یکی از مهم‌ترین محصولات باغبانی به‌شمار می‌روند. کشور ایران با تولید تقریبی ۴/۲ میلیون تن مرکبات جز هفت کشور عمده تولیدکننده این محصول در دنیا می‌باشد و در بین استان‌های کشور، استان مازندران با ۴۵/۱ درصد از کل تولید این محصول، بیشترین مقدار تولید را دارا است (گل‌عین و عدولی، ۲۰۱۱).

مرکبات گیاهان درختی، درختچه‌ای از خانواده Rutaceae و زیرخانواده Aurantioideae می‌باشند (سوست و روز، ۱۹۹۶). مرکبات دارای $2n=18$ کروموزوم بوده و اندازه ژنوم آن حدود $5/63 \times 10^8$ جفت باز می‌باشد (کلتافیلهو و همکاران، ۱۹۹۸). تاریخچه طولانی کشت، پراکندگی وسیع، انجام دگرگرده‌افشانی‌های مکرر و سازگاری بین گونه‌های مختلف جنس *Citrus* و همچنین با سایر جنس‌های دیگر این خانواده، زیاد بودن جهش جوانه، وجود پدیده آپومیکیسی در برخی گونه‌ها، دورگه‌های طبیعی و مصنوعی زیادی که در این گیاه ایجاد شده، باعث گردیده ارقام بسیار زیادی از انواع مرکبات در جهان وجود داشته باشد که شناسایی دقیق و مطمئن آن‌ها یک مشکل قابل توجه در صنعت مرکبات‌کاری محسوب می‌شود. از طرفی برای اصلاح و تولید ارقام مناسب نیاز به داشتن قدرت انتخاب بالا بین گیاهان ضروری است و این خود مستلزم شناسایی مواد گیاهی و تنوع موجود در بین آن‌ها است (نیکولوسی و همکاران، ۲۰۰۰؛ فنگ و همکاران، ۱۹۹۸). بنابراین مشخص شدن تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی در مرکبات جهت برنامه‌ریزی و کاربرد برنامه‌های اصلاحی، حفظ تنوع زیستی، ایجاد منابع ژرم‌پلاسم، کنترل فرسایش ژنتیکی، ثبت ارقام جدید و انجام مطالعات مولکولی لازم است (بارکلی و همکاران، ۲۰۰۶).

پیشرفت در بیوتکنولوژی، به‌ویژه در زیست‌شناسی مولکولی ابزار بسیار مهمی را برای بهبود مدیریت و حفاظت از منابع ژنتیکی فراهم می‌کند. استفاده از نشانگرهای مولکولی به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی در مطالعات ژنتیک جمعیت به‌عنوان یک ابزار مهم مطرح است. یکی از نشانگرهای مولکولی جهت بررسی تنوع ژنتیکی موجود بین ارقام، نشانگر RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) است که از قدرت مناسبی برای مطالعه تنوع بین ارقام برخوردار است. این نشانگر به‌دلیل ساده بودن، ارزیابی آسان و سریع رایج است. همچنین برای طراحی آغازگر نیازی به دانستن اطلاعات اولیه درباره توالی DNA نیست و می‌توانند برای تکثیر تعداد زیاد قطعات DNA به‌کار روند. این نشانگرها دارای توزیع تصادفی در سراسر ژنوم هستند. علاوه بر این، نیاز به مقدار کمی از DNA برای تکثیر PCR در

RAPD است (ویلیامز و همکاران، ۱۹۹۰). در پژوهش‌های متعددی، تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنتیک میان ژنوتیپ‌های مرکبات با استفاده از نشانگر RAPD بررسی شده است.

کلثافیلهو و همکاران (۱۹۹۸) تنوع ژنتیکی ۳۵ رقم نارنگی با نشانگر RAPD بررسی نمودند و نتیجه گرفتند که تشابه ژنتیکی در گروه نارنگی‌ها بالا (۰/۷۷) بود اما تشابه آن‌ها به دیگر گونه‌های مرکبات حقیقی خیلی کم (۰/۲۷) بود. آن‌ها گزارش کردند که نارنگی یکی از گونه‌های حقیقی مرکبات است. همچنین در مطالعه‌ای دیگر نیکولوسی و همکاران (۲۰۰۰) روابط فیلوژنتیکی و منشأ ژنتیکی مهم‌ترین گونه‌های مرکبات را با استفاده از نشان‌گرهای مولکولی RAPD، SCAR و cpDNA تعیین نموده و نشان دادند که جنس فورچونلا به جنس سیتروس نزدیک‌تر است. دهستانی و همکاران (۲۰۰۷) تنوع ژنتیکی ۵۲ نمونه شامل سه گروه از پرتقال‌های ناول (*Citrus sinensis*) در استان مازندران را توسط ۲۰ نشان‌گر RAPD مورد بررسی قرار دادند و چند شکلی بالایی (۷۰/۱۳) را گزارش کردند. آبکنار و همکاران (۲۰۰۳) تشابه ژنتیکی و روابط بین ۳۱ رقم مرکبات اسیدی شامل نارنج، یوزو و خویشاوندان آن‌ها را به کمک نشان‌گر RAPD بررسی کردند. نتایج این بررسی نشان داد که نارنج از یوزو و خویشاوندان آن‌ها فاصله دارد. سیرانگوسا و همکاران (۲۰۰۶) از نشان‌گرهای ISSR و RAPD برای شناسایی، بررسی تنوع ژنتیکی و روابط بین ۱۸ رقم محلی و خارجی نارنج در ایتالیا استفاده کردند. تنوع ژنتیکی بالایی را در ارقام خارجی و تنوع ژنتیکی پایینی در ارقام محلی مشاهده کردند. بیس‌واز و همکاران (۲۰۱۱) با استفاده از نشان‌گرهای RAPD، IRAP، REMAP و ISSR تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی بین مرکبات و ژنوتیپ‌های خویشاوند را مورد بررسی قرار دادند. در بین نشان‌گرهای مورد استفاده، نشان‌گر RAPD بیشترین باند چند شکل را تولید کرد. مالیک و همکاران (۲۰۱۲) تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنتیکی ۲۲ رقم پرتقال را با استفاده از صفات مورفولوژی و نشان‌گر RAPD مورد بررسی قرار دادند. تشابه ژنتیکی بین ارقام در دامنه‌ای از ۰/۴۸ تا ۱ بود. نتایج این پژوهش حاکی از این است که تنوع ژنتیکی کمی در درون ارقام پرتقال وجود دارد.

در ایران با تلاش پژوهش‌گران و باغ‌داران پیشرو، تیپ‌های مختلف پرتقال، لیمو، گریپ‌فروت و نارنگی که از طریق جهش، دورگ‌گیری‌های طبیعی و تغییرات ژنتیکی به وجود آمده‌اند، جمع‌آوری شده‌اند و در کلکسیون‌های شمال و جنوب کشور نگهداری می‌شوند. پایش‌های انجام شده در این کلکسیون‌ها عمدتاً براساس صفات مورفولوژی بوده و تحقیقات ژنتیکی چندانی 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 این که تعدادی از این ژنوتیپ‌ها براساس 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 ژنوتیپ‌های نارنگی و پرتقال و ارتباط آن‌ها با ارقام تجاری با استفاده از نشان‌گر RAPD است تا در صورت امکان بتوان با ایجاد بستر مناسب برای مطالعات ژنتیکی با بهره‌گیری از پتانسیل موجود، در جهت اهداف اصلاحی مرکبات استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی این پژوهش شامل نمونه‌هایی از کلکسیون ایستگاه تحقیقات مرکبات تنکابن (کترا) می‌باشد که خصوصیات مرفولوژی آن‌ها در جدول ۱ آمده است.

استخراج DNA: DNA ژنومی از نمونه‌های برگگی با استفاده از روش موری و تامسون (۱۹۸۰) استخراج گردید. به منظور بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از نمونه‌های مورد بررسی، از دو روش اسپکتروفتومتری (NanoDrop 1000) و الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد استفاده شد. نمونه‌های DNA ژنومی که دارای کمیت و کیفیت بالا بودند، برای PCR انتخاب شدند.

انجام آزمایش RAPD: در این پژوهش ۳۰ آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی مورد آزمایش قرار گرفت و از بین آن‌ها ۱۹ آغازگر که دارای وضوح بانندی و چند شکلی مناسب بودند، انتخاب و جهت مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۲ آمده است. واکنش‌های PCR با استفاده از مواد تهیه شده از شرکت سیناژن و در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر 10×PCR Buffer، ۱/۵ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی‌مولار، یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase، ۱ میکرومولار آغازگر، مخلوط نوکلئوتیدی (dNTPs) ۰/۲ میلی‌مولار و ۲ میکرولیتر از DNA ژنومی با غلظت ۲۰ نانوگرم بر میکرولیتر انجام پذیرفت. چرخه حرارتی واکنش PCR به صورت یک چرخه ۳ دقیقه‌ای در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ چرخه شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، ۳۷-۳۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱/۵ دقیقه و مرحله تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه می‌باشد. بعد از انجام PCR نمونه‌ها تا زمان انجام الکتروفورز در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

جدول ۱ - مشخصات گیاهشناسی انواع ژنوتیپ‌های مرکبات مورد استفاده.

قطریه (میلی‌متر)	طول میوه (میلی‌متر)	وزن میوه (گرم)	تعداد بذر	رنگ پوست	شکل میوه	حاشیه پهک	طول پهک (سانتی‌متر)	عرض پهک (سانتی‌متر)	طول دمبرگ (سانتی‌متر)	رنگ گل	کد گیاه	نام علمی گیاه	نام عمومی
۷۳/۷۸	۷۳/۵۲	۱۵۵/۳۳	۵۰ تا ۶۰	نارنجی	کروی	صاف	۹/۱۳	۳/۹۱	۲/۳۱	سفید	G1	Citrus aurantium	نارنج
۸۰/۷	۸۰/۱	۲۳۶/۸	۴-۱	نارنجی روشن	کروی	کنگه‌دار	۹/۴۴	۴/۸۱	۱/۸۵	سفید	G2	Citrus sinensis	پرتقال مارس
۸۵/۴۰	۹۷/۱۲	۳۳۶/۸۸	۴-۱	نارنجی	بیضی	کنگه‌دار	۹/۱۷	۴/۴۹	۱/۳۲	سفید	G3	Citrus sinensis	پرتقال تامسون
۷۴/۳۱	۶۹/۱۵	۱۸۴/۰۱	۱۹ تا ۱۰	زرد تیره	کروی	صاف	۸/۳۷	۴/۱۹	۱/۲۲	سفید	G4	Citrus sinensis	پرتقال سیاورزا
۸۰/۲۷	۷۷/۰۷	۳۳۷/۱۷	۱۹ تا ۱۰	زرد تیره	کروی	کنگه‌دار	۷/۲۷	۳/۸۲	۱/۲۱	سفید	G5	Citrus sinensis	پرتقال سیاورزا ۲
۷۴/۹۷	۷۰/۵۰	۱۸۴/۴۸	۵۰ تا ۶۰	نارنجی	کروی	کنگه‌دار	۸/۰۵	۳/۹۹	۱/۳۵	سفید	G6	Citrus sinensis	پرتقال سیاورزا ۳
۷۱/۸۸	۷۱/۱۴	۱۷۰/۷۲	۹ تا ۵	نارنجی	کروی	کنگه‌دار	۸/۰۸	۴/۱۴	۱/۴۷	سفید	G7	Citrus sinensis	پرتقال سیاورزا ۴
۷۸/۰۲	۶۱/۱۴	۲۰۱/۷۴	۵۰ تا ۶۰	نارنجی	پخت	کنگه‌دار	۹/۰۹	۵/۳۸	۱/۱۹	سفید	G8	Citrus sp.	معلم کوه (تیپ طبیعی)
۸۹/۳۳	۱۰۱/۴۶	۳۳۳/۳۰	۹ تا ۵	نارنجی	بیضی	کنگه‌دار	۸/۸۲	۳/۳۸	۱/۵۰	سفید	G9	Citrus sp.	شل محله (تیپ طبیعی)
۵۹	۶۵/۰۵	۹۵/۵۶	۱۹ تا ۱۰	نارنجی	گلادی شکل	کنگه‌دار	۷/۰۷	۳/۲۱	۰/۹۸	سفید	G10	Citrus reticulata	نارنگی اناجی
۷۴/۷۰	۷۳/۸۸	۱۸۳/۱۶	۴-۱	نارنجی تیره	پخت	کنگه‌دار	۸/۹۹	۳/۲۷	۱/۳۳	سفید	G11	Citrus unshiu	نارنگی انشو
۶۲/۸۳	۵۷/۴۹	۷۹/۶۳	۹ تا ۵	نارنجی تیره	گلادی شکل	کنگه‌دار	۷/۰۸	۳/۸۱	۱/۲۲	سفید	G12	Citrus reticulata	نارنگی دانسی
۶۷/۴۳	۵۵/۲۱	۱۰۵/۶۵	بی بذر	نارنجی	پخت	کنگه‌دار	۵/۶۸	۲/۵۹	۰/۹۳	سفید	G13	Citrus reticulata	نارنگی همی
۶۶/۰۶	۵۶/۷۹	۸۰/۱۲	۱۹ تا ۱۰	نارنجی	پخت	کنگه‌دار	۶/۹۸	۲/۹۹	۰/۹۷	سفید	G14	Citrus reticulata	نارنگی محلی
۶۵/۷۶	۳۴/۳۶	۱۲/۳۶	۴-۱	نارنجی	بیضی	صاف	۸/۴۸	۳/۱۹	۱/۰۳	سفید	G15	Citrus elementina	نارنگی کلماشتین
۱۴۴	۱۵۵/۴۳	۹۷/۰۴	۹ تا ۵	سبز - زرد	کروی	کنگه‌دار	۱۰/۵	۶	۱/۵	سفید	G16	Citrus grandis	پوملو
۷۰/۴۷	۶۹/۳۳	۱۸۰/۲۲	۴-۱	نارنجی روشن	کروی	کنگه‌دار	۱۰/۳۱	۴/۴۴	۱/۱۳	سفید	G61	Citrus sp.	تیپ طبیعی
۶۵/۸۸	۶۵/۳۳	۱۳۴/۵۶	۴-۱	نارنجی	کروی	مضرس	۹/۷۰	۴/۱۶	۱/۰۱	سفید	G63	Citrus sp.	تیپ طبیعی
۷۰/۱۳	۶۹/۷۴	۱۷۹/۴۳	۴-۱	نارنجی روشن	کروی	کنگه‌دار	۹/۲۱	۴/۳۰	۱/۳۳	سفید	G65	Citrus sp.	تیپ طبیعی
۷۰/۶۶	۷۷/۰۷	۱۷۹/۱۰	۱۹ تا ۱۰	نارنجی روشن	گلادی شکل	صاف	۸/۹۴	۴/۱۹	۱/۶۳	سفید	G67	Citrus sp.	تیپ طبیعی
۸۰/۷۶	۸۷/۵۳	۶۲۲/۲۷	۹ تا ۵	نارنجی روشن	گلادی شکل	مضرس	۱۰/۱۶	۵/۰۶	۱/۳۵	سفید	G70	Citrus sp.	تیپ طبیعی
۶۵/۷۷	۷۱/۷۰	۱۴۹/۶۶	۱۹ تا ۱۰	نارنجی	بیضی	صاف	۹/۶۶	۴/۷۷	۱/۸۲	سفید	G71	Citrus sp.	تیپ طبیعی
۶۶/۰۸	۷۰/۳۱	۲۰۰/۵۰	۵۰ تا ۶۰	نارنجی تیره	کروی	مضرس	۹/۵۷	۴/۴۸	۱/۵۱	سفید	G72	Citrus sp.	تیپ طبیعی
۸۱/۸۰	۸۱/۱۹	۲۰۵/۸۲	۱۹ تا ۱۰	نارنجی	کروی	صاف	۹/۳۲	۴/۴۷	۲/۰۳	سفید	G73	Citrus sp.	تیپ طبیعی
۸۱/۴۴	۹۲/۱۳	۲۳۳/۵۷	۴-۱	زرد تیره	گلادی شکل	صاف	۱۰/۷۴	۵/۶۳	۱/۶۱	سفید	G74	Citrus sp.	تیپ طبیعی
۷۲/۹۳	۶۷/۸۳	۱۸۰/۵۰	۱۹ تا ۱۰	نارنجی روشن	کروی	کنگه‌دار	۸/۵۵	۴/۰۳	۱/۳۰	سفید	G76	Citrus sp.	تیپ طبیعی
۷۸/۹۹	۸۳/۶۲	۲۴۱/۷۴	۱۹ تا ۱۰	نارنجی روشن	کروی	کنگه‌دار	۹/۴۸	۴/۶۰	۲/۱۳	سفید	G78	Citrus sp.	تیپ طبیعی
۸۱/۰۵	۷۹/۸۹	۲۵۵/۷۲	۹ تا ۵	نارنجی روشن	کروی	مضرس	۱۰/۲۰	۵/۱۳	۱/۳۶	سفید	G79	Citrus sp.	تیپ طبیعی
۷۸/۲۵	۷۳/۹۹	۲۰۵/۹۸	۱۹ تا ۱۰	نارنجی	کروی	مضرس	۹/۵۵	۴/۶۲	۲/۲۵	سفید	G80	Citrus sp.	تیپ طبیعی

الکتروفورز محصول واکنش PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در توان ۹۰ وات به مدت ۲ ساعت انجام شد. سپس ژل تشکیل شده با اتیدیوم بروماید (۱۰ µg/ml) به مدت ۱۵ دقیقه رنگ‌آمیزی و بعد از ۲ تا ۳ بار شست و شو با آب دوبار تقطیر زیر نور UV یا طول موج ۲۵۰ نانومتر مشاهده شد و با استفاده از دستگاه Gel doc شرکت UVP آمریکا عکس برداری صورت گرفت.

تجزیه آماری: امتیازدهی باندهای تکثیر شده براساس حضور یا عدم حضور به ترتیب با اعداد یک و صفر صورت گرفت. ماتریس تشابه نمونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار NTsys-pc (Version 2.02) (رولف، ۲۰۰۰) و توسط ضریب تشابه جاکارد محاسبه گردید (جاکارد، ۱۹۰۸). بر اساس تجزیه خوشه‌ای حاصل از ماتریس تشابه، دندروگرام توسط روش UPGMA ترسیم گردید (اسنيس و سوکال، ۱۹۶۳). ماتریس کوفتیک نیز جهت بررسی میزان انطباق تجزیه‌خوشه‌ای با داده‌ها محاسبه و ماتریس تشابه با ماتریس کوفتیک مقایسه شد و ضریب همبستگی کوفتیک نیز محاسبه گردید. همچنین پارامتر محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) نیز برای هر جفت آغازگر محاسبه شد. مقادیر PIC برای هر آغازگر بر پایه رابطه $PIC = \sum [2P_i (1 - P_i)]$ محاسبه گردید. به طوری که F_i برابر با فراوانی آل تکثیر شده و $(1 - F_i)$ فراوانی آل غایب در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

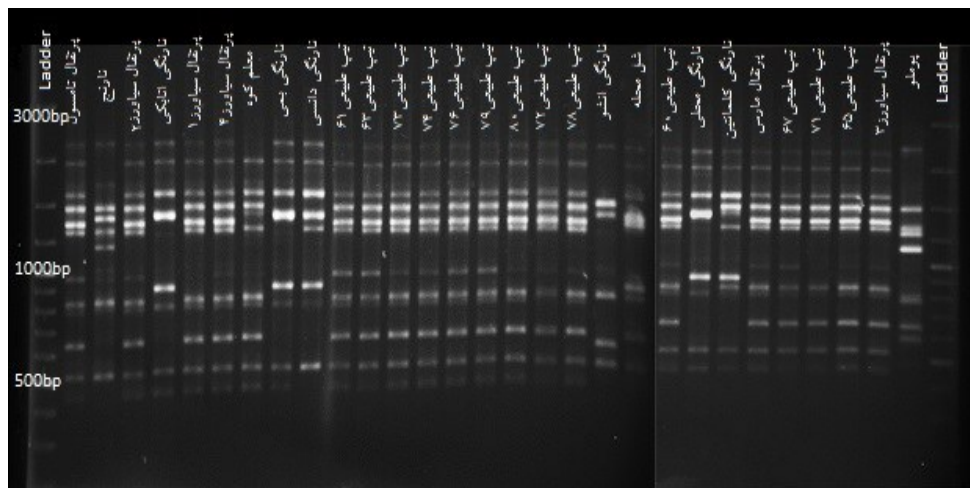
نوزده آغازگر انتخاب شده از بین ۳۰ آغازگر RAPD، در مجموع ۲۶۹ قطعه را تکثیر نمودند که از بین آن‌ها ۲۴۸ باند دارای چندشکلی و وضوح مناسب برای نمره‌دهی بودند (جدول ۲). بیشترین باند چند شکل مربوط به آغازگر OPA-07 با ۱۹ عدد و کمترین باند چندشکل مربوط به آغازگر OPA-05 با ۸ عدد بود. متوسط تعداد باند چندشکل برای هر آغازگر ۱۳ باند و متوسط درصد چندشکلی آغازگرها ۹۱/۸۲ درصد بود. بیشترین و کمترین مقادیر محتوای چندشکل (PIC) به ترتیب ۰/۳۰۹ برای آغازگر OPM-14 و ۰/۱۲۰ برای آغازگر OPE-09 بود، میانگین PIC مقدار عددی ۰/۲۳ را نشان داد. بالا بودن میزان PIC نشان‌دهنده سطح بالای تمایز می‌باشد.

نتایج حاصل از ماتریس تشابه نشان داد که کمترین شباهت (۰/۱۴) بین ژنوتیپ‌های پوملو (G16) و نارنگی محلی (G14) و بیشترین شباهت (۰/۹۷) بین دو تیپ طبیعی ناشناخته G74 و G73 وجود دارد. میانگین تشابه بین کل ژنوتیپ‌ها نیز برابر ۰/۶۲ به دست آمد که نشان‌دهنده تنوع بالا بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی می‌باشد. در محاسبه ضریب کوفتیک که نشان‌دهنده همبستگی بین ماتریس و

دندروگرام حاصله می‌باشد، مقدار $r=0/9898$ به دست آمد که بیانگر همبستگی بالا ماتریس تشابه و ماتریس حاصل از دندروگرام می‌باشد.

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای RAPD استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR).

PIC	درصد چندشکلی	تعداد باند چندشکل	تعداد کل باند	توالی آغازگر ۳' → ۵'	نام آغازگر	ردیف
۰/۲۱۶	۸۶/۶۶	۱۳	۱۵	CCTTGACGCA	OPB-12	۱
۰/۱۲۰	۱۰۰	۱۶	۱۶	CTTCACCCGA	OPE-09	۲
۰/۲۶۳	۹۳/۳۳	۱۴	۱۵	AATCGGGCTG	OPA-04	۳
۰/۲۳۵	۱۰۰	۱۹	۱۹	GAAACGGGTG	OPA-07	۴
۰/۲۸۲	۹۰	۹	۱۰	GTGACGTAGG	OPA-08	۵
۰/۲۶۷	۹۱/۶۶	۱۱	۱۲	CAAACGTCGG	OPA-19	۶
۰/۲۴۷	۸۱/۸۱	۹	۱۱	CTGAGACGGA	OPG-05	۷
۰/۲۲۶	۸۷/۵	۱۴	۱۶	GTGCCTAACC	OPG-06	۸
۰/۲۱۵	۸۵/۷۱	۱۲	۱۴	GTCCACACGG	OPB-08	۹
۰/۲۴۹	۹۲/۳۰	۱۲	۱۳	TCGGCGATAG	OPA-12	۱۰
۰/۲۲۴	۸۸/۸۸	۸	۹	AGGGGTCTTG	OPA-05	۱۱
۰/۱۹۷	۹۴/۷۳	۱۸	۱۹	AGGTGACCGT	OPA-18	۱۲
۰/۲۶۵	۸۸/۲۳	۱۵	۱۷	GTCCACTGTG	OPM-11	۱۳
۰/۳۰۹	۱۰۰	۱۲	۱۲	AGGGTCGTTC	OPM-14	۱۴
۰/۱۸۹	۹۰/۹۰	۱۰	۱۱	CACCATCCGT	OPM-18	۱۵
۰/۲۶۷	۹۳/۷۵	۱۵	۱۶	AGCGTGTCTG	OPG-04	۱۶
۰/۲۲۳	۹۳/۷۵	۱۵	۱۶	GTCCCCGACGA	OPC-07	۱۷
۰/۲۱۳	۹۳/۷۵	۱۵	۱۶	GTGATCGCAG	OPA-10	۱۸
۰/۲۶۶	۹۱/۶۶	۱۱	۱۲	GGGTAACGCC	OPA-09	۱۹
۰/۲۳	۹۱/۸۲	۱۳/۰۵	۱۴/۱۵	-	-	میانگین



شکل ۱- چندشکلی مشاهده شده با نشانگر OPA-07 در ژنوتیپ‌های مرکبات.

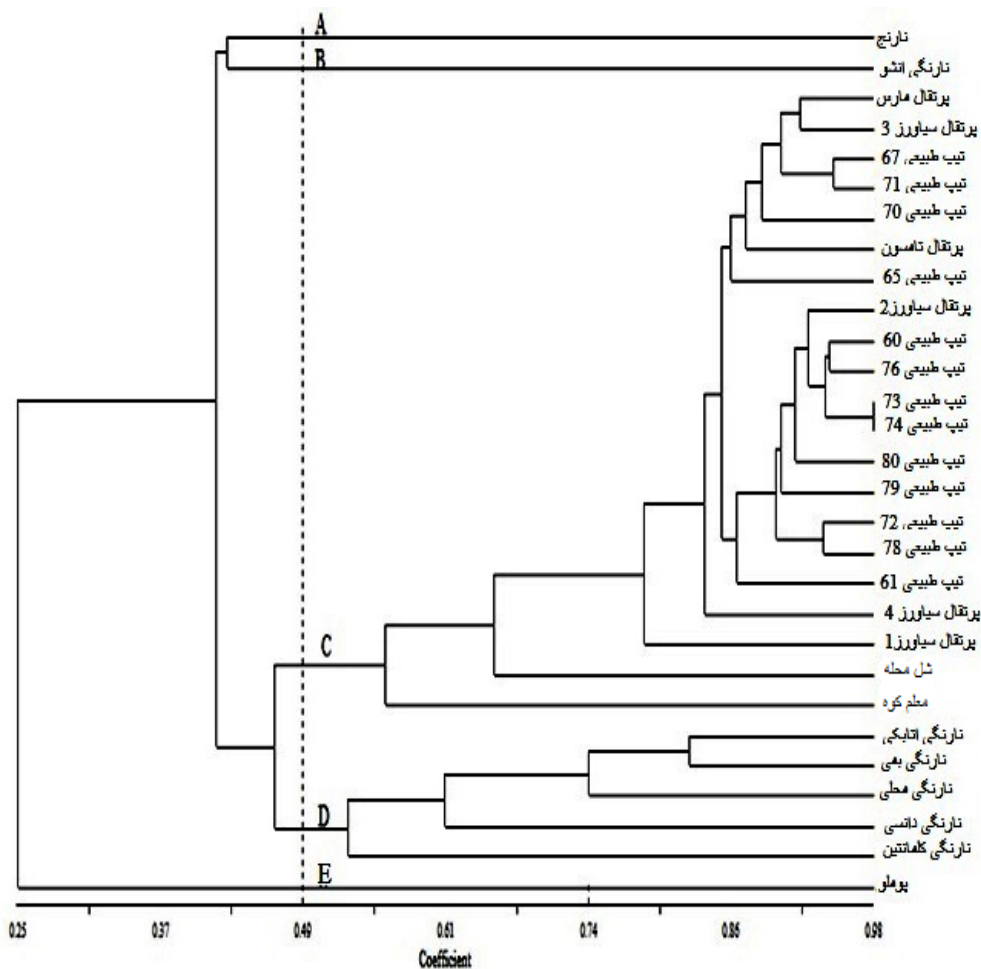
تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های مولکولی به روش UPGMA با ضریب تشابه جاکارد انجام گردید (شکل ۲). در دندروگرام ترسیم شده (شکل ۲) ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در ضریب تشابه ۰/۴۹ یعنی در محلی که شامل گروه‌های متمایز از هم بود، در پنج گروه مجزا (A, B, C, D and E) قرار گرفتند. گروه اول شامل نارنج (G1) بود که در یک گروه مجزا قرار گرفت و تشابه ۰/۲۶ و ۰/۴۲ تشابه اول به ترتیب به گروه نارنگی و پوملو (G16) نشان داد که با نتایج مطالعات قبلی مطابقت داشت. نارنج به عنوان یک دورگ از نارنگی و پوملو در مطالعات قبلی گزارش شده بود (بارت و رودز، ۱۹۷۶؛ بارکلی و همکاران، ۲۰۰۶؛ آبکنار و همکاران، ۲۰۰۷). گروه B شامل نارنگی انشو (G11) بود. در این بررسی نارنگی انشو و کلمانتین در دو گروه متفاوت از هم با ضریب تشابه ۰/۴۱ قرار گرفته‌اند. کلتافیلهو و همکاران (۱۹۹۸) در بررسی تنوع ژنتیکی میان ۳۵ رقم نارنگی با استفاده از نشانگر RAPD به نتیجه مشابهی دست یافتند و گزارش کردند که نارنگی انشو و نارنگی کلمانتین به دو دسته متفاوت تعلق دارند. گروه C بزرگ‌ترین گروه و تیپ‌های طبیعی ناشناخته (G61, G63, G65, G67, G70, G71, G72, G73, G74, G76, G78, G79 and G80) و پرتقال‌های سیاورز (G4, G5, G6 and G7)، تامسون (G3) و مارس (G2) در این گروه قرار گرفتند، به طوری که در بین ژنوتیپ‌های پرتقال، قرابت ژنتیکی بالایی وجود داشت. در همین راستا سطح بالایی از شباهت ژنتیکی در درون ارقام پرتقال با استفاده از نشانگر RAPD گزارش شده است (مالیک و همکاران، ۲۰۱۲). در این گروه دو تیپ طبیعی ناشناخته G73 و G74 شباهت بالایی (۰/۹۷) را نسبت به یکدیگر دارند اما از نظر خصوصیات ظاهری

میوه تیپ طبیعی ناشناخته G74 گلابی شکل در حالی که میوه تیپ طبیعی G73 کروی شکل می باشد. شباهت بالای ژنتیکی این ژنوتیپها نشان دهنده این است که این ژنوتیپها احتمالاً نوسلاراً (شبهه به اصل) همدیگر هستند یا ممکن است در اثر جهش به وجود آمده باشند که با استفاده از نشانگر مذکور قابل تمایز نیستند. تیپهای طبیعی G65، G67، G70، G71 و پرتقال سیاورز ۳ با پرتقالهای تامسون و مارس شباهت بالایی (۰/۸۸) را نشان دادند در حالی که از لحاظ مورفولوژی در خصوصیات میوه و برگ و بذر با هم تفاوت دارند. نتایج بررسیها نشان می دهد که اکثر پرتقالها به وسیله جهش از یک جد مشترک به دست آمده اند. علاوه بر اختلاف در خصوصیات ظاهری، تنوع ژنتیکی کمی در پرتقالها مشاهده شده است (فنگ و روز، ۱۹۹۷). با مطالعه ۱۰ رقم پرتقال مشخص شد که الگوی باند کروموزومی در ۱۰ کلون هتروزیگوس است، ولی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره تفاوتی در این ۱۰ رقم مشاهده نشد (لورو و همکاران، ۱۹۹۵). این نتایج می تواند دلیلی بر منشاء مونوفیلیتیک (متحدالاصل) پرتقال باشد که به وسیله جهش سوماتیکی و انتخاب کلون برتر دنبال شده است (فتوحی و فتاحی، ۲۰۱۰).

نتایج این مطالعه، نشان داد که شل محله (G9) تشابه زیادی (۰/۶۸) به سیاورز ۳ دارد، در حالی که در خصوصیات میوه با هم فرق داشتند. معلم کوه (G8) شباهت بالایی به سیاورز ۲ و تامسون داشت که با نتایج جنتی و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت دارد. آنها با استفاده از نشانگرهای SSR شباهت معلم کوه به تامسون و سیاورز را گزارش کردند و بیان داشتند که این ژنوتیپ احتمالاً در اثر دورگ گیری بین آنها و یا در اثر جهش جوانه به وجود آمده است. شباهت بالایی در بین ژنوتیپهای پرتقال محلی سیاورز نسبت به پرتقال تامسون از لحاظ ژنتیکی مشاهده شد. احتمالاً این ژنوتیپها در اثر جهش سوماتیکی وجود آمده اند که در مطالعات قبلی هم توسط نشانگرهای SSR محققان گزارش شده است (کیانوش و همکاران، ۲۰۰۹؛ جنتی و همکاران، ۲۰۰۹؛ روحی قرابایی و همکاران، ۲۰۱۰).

گروه D شامل دو زیرگروه است. زیرگروه D1 شامل نارنگی کلماتین (G15) و زیرگروه D2 نارنگی های دانسی (G12)، محلی (G14)، بمی (G13) و اتابکی (G10) را در بر می گیرد. در زیر گروه D2 نارنگی های اتابکی و بمی بیشترین شباهت (۰/۸۲) را نسبت به هم نشان دادند در حالی که از لحاظ مورفولوژی تفاوت زیادی با هم دارند. نارنگی بمی دارای شکل پخت، قاعده مقعر، سر فرورفته، پوست ناهموار و بی بذر است و نارنگی اتابکی گلابی شکل، گردن دار، پوست زبر و بذر دار می باشد. همچنین نارنگی محلی با نارنگی بمی از لحاظ مورفولوژی و هم از نظر ژنتیکی تشابه نسبتاً بالایی

(۰/۷۴) داشتند. در میان نارنگی‌ها قرابت ژنتیکی بالایی وجود دارد و نتایج حاصل از نشانگرهای مولکولی این عقیده را تأیید می‌کند (کلثافیلهو و همکاران، ۱۹۹۸؛ بیس‌واز و همکاران، ۲۰۱۱). نارنگی یکی از سه گونه اصلی مرکبات است (بارت و رودز، ۱۹۷۶) و نتایج به‌دست آمده از نشانگرهای مولکولی RAPD و SCAR نتوانست منشأ و والد آن را مشخص نماید (مور، ۲۰۰۱). به‌نظر محققین نارنگی‌ها متعلق به یک گونه می‌باشند که شامل ارقام مختلف و تعداد زیادی از دورگ‌ها با تفاوت ژنتیکی نسبت به یکدیگر هستند (کلثافیلهو و همکاران، ۱۹۹۸).



شکل ۲- گروه‌بندی ۲۹ ژنوتیپ مرکبات با استفاده از نشانگر RAPD به روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد.

پوملو (G16) به صورت مجزا در گروه E قرار گرفت که شباهت کمی (۰/۲۵) را نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها نشان داد. پوملو به عنوان گونه حقیقی در مرکبات گزارش شده است (بارت و رودز، ۱۹۷۶). با بررسی دندروگرام در این تحقیق تأیید می‌شود که پوملو و نارنگی به عنوان گونه‌های حقیقی مرکبات در خوشه‌های مجزا قرار گرفته‌اند.

به طور کلی، باتوجه به نتایج این پژوهش به نظر می‌رسد RAPD می‌تواند به عنوان یک روش مولکولی ساده مبتنی بر PCR و نسبتاً مطمئن و قابل اعتماد در تعیین سطح تنوع ژنتیکی در مرکبات به کار رود. اگرچه بررسی مورفولوژی ژنوتیپ‌های تحت بررسی و انطباق آن با نتایج حاصل از نشانگرهای مولکولی نیز بسیار مفید واقع خواهد شد. به علاوه استفاده از نشانگرهای مولکولی دیگر به ویژه نشانگرهای هم‌بارز برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه و مقایسه آن با نتایج نشانگر RAPD جهت بررسی بهتر ژنوتیپ‌های مرکبات پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از مؤسسه تحقیقات مرکبات کشور جهت همکاری در این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

1. Abkenar, A.A., Isshiki, S., and Matsumoto, R. 2007. Comparative analysis of organelle DNAs acid citrus grown in Japan using PCR-RFLP method. Gen. Resour. Crop Evo. 55: 487–492.
2. Abkenar, A.A., Isshiki, S., Tashiro, Y. 2004. Phylogenetic relationships in the “true citrus fruit trees” revealed by PCR-RFLP analysis of cpDNA. Sci. Hort. 102: 233–242.
3. 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 utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). Theo. Appl. Gen. 112: 1519–1531.
4. Barrett, H.C., and Rhodes, A.M. 1976. A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated Citrus and its close relatives. System. Bot. 1: 105–136.
5. Biswas, M.K., Xu, Q., and Deng, X.X. 2010. Utility of RAPD, ISSR, IRAP and REMAP marker for the genetic analysis of Citrus spp. Sci. Hort. 124: 254–261.
6. Coletta Filho, H.D., Machado, M.A., Targon, M.L.P.N., Moreita, J.r., MCPQDG, and Pompea, J. 1998. Analysis of the genetic diversity among mandarins (*Citrus spp.*) using RAPD markers. Euphytica, 102: 133–139.

7. 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 J. Plant Sci.* 6(7): 1119-1124.
8. Fang, D.Q., and Roose, M.L. 1997. Identification of closely related Citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theo. Appl. Gen.* 95: 408–417.
9. Fang, D.Q., Krueger, R.R., and Roose, M.L. 1998. Phylogenetic relationships among selected Citrus germplasm accessions revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123: 612-617.
10. Fotouhi Ghazvini, R., Fattahi Moghadam, J. 2010. Citrus growing in Iran. Guilan University Press, Rasht, Iran. (In Persian)
11. Golein, B., Adouli, B. 2011. Citrus 1. Novin Poya Press, Tehran, Iran. (In Persian)
12. Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles.* 44: 223-270.
13. Jannati, M., Fotouhi, R., Pourjan Abad, A., and Salehi, Z. 2009. Genetic diversity analysis of Iranian citrus varieties using micro satellite (SSR) based markers. *J. Hort. Forestry.* 1(7): 120-125.
14. Kianoush, S., Babaeian Jelodar, N., and Asadi Abkenar, A. 2009. Evaluation of genetic diversity in citrus germless using microsatellite (SSR) Markers. *J. Agri. Sci. Nat. Res.* 15(6):109-117. (In Persian)
15. Luro, F., Laigret, F., Bove, J.M., and Ollitrault, P. 1995. DNA amplified fingerprinting, a useful tool for determination of genetic origin and diversity analysis in Citrus. *Sci. Hort.* 30: 1063–1067.
16. 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. *Agri. Res.* 1(4): 317–324.
17. Moore, G.A. 2001. Oranges and lemons: clues to the taxonomy of Citrus from molecular markers. *Trends Gen.* 17: 536–540.
18. Murray, M.G., and Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8: 4321–4325.
19. 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. *Theo. Appl. Gen.* 100: 1155–1166.
20. Rohlf, F.J. 1998. NTSYS-pc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.02. Exeter Publications, Setauket, New York.
21. Rouhi Ghorabaie, H.R., Fotouhi Ghazvini, R., Golein, B., and Nabipour, A.R. 2010. Identification of some Citrus accessions in a Citrus germplasm utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *Hort. Environ. Biotech.* 51: 343–347.

22. Siragusa, M., Pasquae, F., Abbate, L., and Tusa, N. 2006. Identification of Sour Orange Accessions and Evaluation of their Genetic Variability by Molecular Marker Analysis. *Sci. Hort.* 42(1): 84-89.
23. Sneath, P.H.A., and Sokal, R.R. 1963. *The Principles and Practice of Numerical Classification*. WH Freeman, San Francisco.
24. Soost, R.K., and Roose, M.L. 1996. Citrus In: *Fruit Breeding. Tree and Tropical Fruits*, L. John Wiley and Sons, Pp: 257–323. University Press, Rasht, Iran. (In Persian)
25. William, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.



Gorgan University of Agricultural
Sciences and Natural Resources

J. Plant Prod. Res. Vol. 21 (4), 2014

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

Assessment of polymorphism in citrus genotypes using RAPD molecular markers

***H. Abedinpour¹, G.A. Ranjbar², N. Babaeian Jelodar³ and B. Golein⁴**

¹M.Sc. Student, Dept. of Plant Breeding and Agricultural Biotechnology, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, ²Associated Prof., Dept. of Plant Breeding and Agricultural Biotechnology, Sari University of Agricultural Sciences and Natural

Resources, ³Professor, Dept. of Plant Breeding and Agricultural Biotechnology,

Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources,

⁴Associated Prof., Citrus Research Institute, Ramsar, Iran

Received: 01/21/2014 ; Accepted: 07/20/2014

Abstract

It is important to identify the genetic diversity and phylogenic relationships for achieving desirable citrus cultivars. In present study RAPD markers were used to determine genetic diversity among 29 citrus genotypes. From 19 used primers, 248 polymorphic bands were amplified. Primers OPA-07 and OPA-05 (with 19 and 8 amplified bands), produced maximum and minimum polymorphic bands, respectively. The average number of polymorphic bands was estimated as 13 for each primer. Similarity among samples was calculated using NTsys software and Jaccard coefficient. Rang of similarity was 0.14-0.97 based on polymorphic bands with average of 0.62. Cluster analysis has been done based on Jaccard's similarity matrix and the UPGMA method. Cluster analysis has divided citrus genotypes into five separate groups. According to the similarity matrix results, the lowest similarity (0.14) was belonged to local mandarin and Pommelo and the highest similarity (0.97) was belonged to unknown natural types G74 and G73. In current research, Pommelo and mandarin confirmed as true species of citrus in distinct cluster. Determination of genetic diversity in citrus provides useful information for breeding programs, selection and improving cultivars.

Keywords: Citrus, Cluster analysis, Genetic diversity, RAPD, Similarity matrix

*Corresponding author; h_abedinpour@ymail.com