

Assessment of genetic diversity in *Citrus sinensis* by ISSR marker and retrotransposon

Abbas Rajabi¹, Habibollah Samizadeh Lahiji^{*2}, Mohammad Mohsenzadeh Golfazani³

1. M.Sc. Student, Dept. of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.
E-mail: abbasrajabi1373@gmail.com
2. Corresponding Author, Professor, Dept. of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. E-mail: hsamizadeh@yahoo.com
3. Assistant Prof., Dept. of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.
E-mail: mohsenzadeh_mohammad@yahoo.com

Article Info

Article type:

Full Length Research Paper

Article history:

Received: 05.07.2021

Revised: 09.06.2021

Accepted: 12.01.2021

Keywords:

Analysis detection
function,

Cluster analysis,

PIC,

Simple matching coefficient

ABSTRACT

Background and Objectives: Determining the classification, phylogenetic relationships, and genetic diversity in citrus is critical to determining genetic relationships, identifying germplasm, controlling genetic erosion, establishing breeding programs, and registering new cultivars. Researchers believe that genetic diversity is very important and is an essential part of any breeding program. The use of molecular techniques to assess DNA level, genetic diversity, and genetic distance is widely used in germplasm samples. Therefore, the aim of this study was to investigate the genetic diversity of orange genotypes using molecular markers.

Materials and Methods: In order to investigate the genetic diversity, 40 orange genotypes of Rudsar city in Guilan province were evaluated. DNA extraction from young leaf samples was performed using the Edward method with slight modifications. After DNA extraction of genotypes, polymerase chain reaction (PCR) was performed with 15 primers. Amplified genomic DNA images were analyzed and the data were entered into Excel software as a matrix. Polymorphic information content, marker index, effective multiple ratio, number of effective alleles, Shannon index and straw gene diversity were also examined.

Results: The 15 primers used in this study were able to create a total of 140 bands, of which 101 were polymorphic bands, including TOS-1 and TOS-2 primers with 9 bands, UBC811 primer and UBC8821 + UBC826 hybrid primer with 4 bands created the least number of polymorphic strips. Primers TOS-1, UBC813, UBC823 and TOS-2 and UBC811 with the highest PIC value, best markers and high values of effective allele, Shannon index, straw gene diversity were as the top primers to study genetic diversity in this study, respectively. Based on the results, the markers used were able to evaluate the genetic diversity of genotypes. The content of polymorphic information in this study ranged from 0.22 to 0.45. Principal coordinate analysis showed that the first three components were able to explain a total of 29.08% of the total variance. Cluster analysis by the farthest neighbor method divided 40 orange genotypes into five distinct groups based on similarities and differences. The grouping accuracy obtained from the cluster analysis was confirmed by the Fisher linear focal detection function 100%. The markers used in this study showed acceptable polymorphism. Also, the study of morphological traits and

molecular markers used in this study showed the degree of similarity and differences of genotypes, although there were differences in the results of morphological and molecular studies that can be observed. Due to the high accuracy of molecular markers. However, using appearance and morphology, it was possible to distinguish orange genotypes from each other.

Conclusion: The results of this study showed that there is a high genetic diversity among orange genotypes. Due to the fact that the markers used in this study showed acceptable polymorphism, they can be used in future research on this plant and other citrus plants. In general, according to the results of this study, that ISSR and retrotransposon primers can be used as a simple molecular method based on PCR and relatively safe and reliable in determining the level of genetic diversity and phylogenetic relationships in citrus.

Cite this article: Rajabi, Abbas, Samizadeh Lahiji, Habibollah, Mohsenzadeh Golfazani, Mohammad. 2022. Assessment of genetic diversity in *Citrus sinensis* by ISSR marker and retrotransposon. *Journal of Plant Production Research*, 29 (2), 119-136.



© The Author(s).

DOI: 10.22069/JOPP.2021.19141.2828

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

ارزیابی تنوع ژنتیکی پرتقال *Citrus sinensis* با استفاده از نشانگر ISSR و رتروترانسپوزون

عباس رجبی^۱، حبیب‌ا... سمیع‌زاده لاهیجی^{۲*}، محمد محسن‌زاده گل‌فزانی^۳

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. رایانامه: abbasrajabi1373@gmail.com
۲. نویسنده مسئول، استاد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. رایانامه: hsamizadeh@yahoo.com
۳. استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. رایانامه: mohsenzadeh_mohammad@yahoo.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی - پژوهشی	سابقه و هدف: مشخص شدن رده‌بندی، روابط فیلوژنتیک و تنوع ژنتیکی در مرکبات جهت تعیین روابط ژنتیکی، شناسایی ژرم‌پلاسم، کنترل فرسایش ژنتیکی، ایجاد برنامه‌های اصلاحی و ثبت ارقام جدید، امری مهم و حیاتی است. پژوهش‌گران معتقدند که تنوع ژنتیکی از اهمیت بسیار بالایی برخوردار بوده و جز اساسی هر برنامه اصلاحی است. استفاده از تکنیک‌های مولکولی برای ارزیابی در سطح DNA، تنوع ژنتیکی و فاصله ژنتیکی در نمونه‌های ژرم‌پلاسم به‌طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد. بنابراین هدف از این پژوهش بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های پرتقال به کمک نشانگرهای مولکولی است.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۱۷ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۰/۰۶/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۱۰	مواد و روش‌ها: این پژوهش به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۴۰ ژنوتیپ پرتقال شهرستان رودسر در استان گیلان مورد ارزیابی گرفت. استخراج DNA از نمونه‌های برگ جوان با استفاده از روش ادوارد با اندکی تغییر انجام شد. پس از استخراج DNA ژنوتیپ‌ها، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با ۱۵ آغازگر صورت گرفت. تصاویر DNA ژنومی تکثیر شده مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و داده‌ها به صورت یک ماتریس وارد نرم‌افزار اکسل شد. محتوای اطلاعات چندشکلی، شاخص نشانگری، نسبت چندگانه مؤثر، تعداد آلل مؤثر، شاخص شانون و تنوع ژنی نیز بررسی شدند.
واژه‌های کلیدی: تجزیه تابع تشخیص، تجزیه خوشه‌ای، ضریب تطابق ساده، PIC	یافته‌ها: پانزده آغازگر مورد استفاده در این مطالعه توانستند در مجموع ۱۴۰ باند ایجاد کنند که از این تعداد ۱۰۱ باند چند شکل بودند که از این بین آغازگرهای TOS-1 و TOS-2 با ۹ نوار بیش‌ترین و آغازگر UBC811 و آغازگر ترکیبی UBC821+UBC826 با ۴ نوار کم‌ترین تعداد نوار چند شکل را ایجاد کردند. آغازگرهای TOS-1، UBC813، UBC823 و TOS-2

و UBC811 به ترتیب با داشتن بالاترین مقدار PIC، بهترین شاخص‌های نشانگری و مقادیر بالای تعداد آلل مؤثر، شاخص شانون، تنوع ژنی نی به‌عنوان آغازگرهای برتر جهت بررسی تنوع ژنتیکی در این پژوهش معرفی شدند. بر اساس نتایج به‌دست آمده نشانگرهای مورد استفاده توانستند تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌ها را به خوبی ارزیابی کنند. محتوای اطلاعات چند شکل در این پژوهش بین ۰/۲۲ تا ۰/۴۵ متغیر بود. تجزیه به مختصات اصلی نشان داد که سه مؤلفه اول توانستند در مجموع ۲۹/۰۸ درصد از واریانس کل را توجیه کنند. تجزیه خوشه‌ای به روش دورترین همسایه ۴۰ ژنوتیپ پرتقال را بر اساس تشابه و تفاوت در پنج گروه مجزا قرار داد. صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای توسط تابع تشخیص کانونی به روش خطی فیشر ۱۰۰ درصد تأیید شد. نشانگرهای به‌کار رفته در این پژوهش چندشکلی قابل‌قبولی را نشان دادند. بررسی صفات ریخت‌شناسی و نشانگرهای مولکولی استفاده شده در این پژوهش درجه قرابت و تفاوت ژنوتیپ‌ها را به خوبی نشان داد هرچند که تفاوت‌هایی در نتایج به‌دست آمده از بررسی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی مشاهده شد که می‌تواند ناشی از بالا بودن دقت نشانگرهای مولکولی باشد. به‌طورکلی در این پژوهش استفاده از صفات ظاهری و ریخت‌شناسی امکان تفکیک ژنوتیپ‌های پرتقال از یکدیگر به خوبی محیا شد.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که تنوع ژنتیکی بالایی در بین ژنوتیپ‌های پرتقال وجود دارد. با توجه به این‌که نشانگرهای به‌کار رفته در این پژوهش چندشکلی قابل‌قبولی را نشان دادند می‌توان در پژوهش‌های آینده روی این گیاه و سایر گیاهان تیره مرکبات از آن‌ها استفاده کرد. به‌طورکلی با توجه به نتایج این پژوهش آغازگرهای ISSR و رتروترانسپوزون می‌توانند به عنوان یک روش مولکولی ساده مبتنی بر PCR و نسبتاً مطمئن و قابل اعتماد در تعیین سطح تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنتیک در مرکبات به کار روند.

استناد: رجیبی، عباس، سمیع‌زاده لاهیجی، حبیب‌ا...، محسن‌زاده گل‌فزانی، محمد (۱۴۰۱). ارزیابی تنوع ژنتیکی پرتقال *Citrus sinensis* با استفاده از نشانگر ISSR و رتروترانسپوزون. نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی، ۲۹ (۲)، ۱۳۶-۱۱۹.

DOI: 10.22069/JOPP.2021.19141.2828



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

و ... استفاده می‌شود (۹ و ۱۰). در میان نشانگرها، توالی‌های تکراری ساده یا ریزماهواره‌ها دارای کارکرد خاص برای شناسایی ژرمپلاسم هستند زیرا آن‌ها دارای پلی‌مورفیسم بالا و توالی حفاظت‌شده هتروزیگوس هستند که می‌توان به عنوان نشانگرهای غالب از آن‌ها استفاده کرد (۱۱). نشانگرهای ISSR از توالی‌های ریزماهواره استفاده می‌کند که بسیار متغیر هستند و همه جا در ژنوم توزیع می‌شوند و در عین حال قابلیت استفاده بیش‌تری نسبت به RAPDها داشته از لحاظ زمان و هزینه نسبت به استفاده از AFLPs به‌صرفه‌تر است. همه این‌ها باعث می‌شود ISSR نشانگر ژنتیکی ایده آل برای مطالعات مختلف به ویژه در مورد تنوع ژنتیکی باشد. همه این‌ها باعث می‌شود ISSR نشانگر ژنتیکی ایده‌آل برای مطالعات مختلف به ویژه در مورد تنوع ژنتیکی باشد. از دیگر مزایای استفاده از نشانگر ISSR این است که نشانگرهای ریزماهواره اختصاصی بوده و نیاز به هیچ‌گونه اطلاعات توالی برای سنتز آغازگر ندارد (۱۲). مشاهدات در مورد بررسی استفاده از نشانگرهای ISSR در ایجاد تفکیک بین ژنوتیپ‌های مرکبات مشخص می‌نماید که این نشانگر، قادر به تفکیک بین ژنوتیپ‌های بسیار نزدیک بوده و می‌تواند با کم‌ترین اشتباه ژنوتیپ هر رقم را بررسی نمود هم‌چنین این نشانگرها قادرند چند شکلی قابل‌قبولی را آشکار سازند و بر پایه آن می‌توان ژنوتیپ‌ها و گونه‌های مرکبات را به درستی از هم متمایز ساخت (۱۳ و ۱۴). عابدین‌پور و همکاران تنوع ژنتیکی ۲۹ ژنوتیپ مرکبات را با استفاده از ۵ نشانگر IRAP (رتروترانسپوزون) ارزیابی کردند. نتایج این پژوهش نشان داد که روش‌های انگشت نگاری مبتنی بر رتروترانسپوزون ابزار مفیدی برای توصیف سریع مرکبات و جنس‌های مربوط به آن است. این روش می‌تواند به طور کارآمد برای حفاظت و مدیریت منابع ژنتیکی ژرمپلاسم مرکبات مورد استفاده قرار گیرد.

پرتقال با نام علمی *Citrus sinensis* از تیره Rutaceae است. مرکبات یکی از گسترده‌ترین محصولات میوه در سطح جهان است که دارای ارزش اقتصادی بوده و برای سلامتی مفید است. مرکبات در مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری جهان تولید می‌شود (۱). گرچه اسرار تاریخ و منشأ مرکبات حل نشده باقی مانده است اما برخی پژوهش‌گران معتقدند جنس *Citrus* بومی مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری آسیا بوده و از بخش‌های خاصی از جنوب شرقی آسیا از جمله چین، هند، و مجمع‌الجزایر مالایی منشأ گرفته است (۲). در دنیای جدید، مرکبات دومین صنعت بزرگ میوه در تجارت جهانی بوده و می‌توانند در اقلیم‌های گرمسیری و نیمه‌گرمسیر که خاک مناسب، گرمای متوسط و رطوبت دائمی داشته باشند گسترش بیابند (۳). گسترش وسیع جغرافیایی و میزان بالای تولید مرکبات موجب شده است که این محصول یکی از اقتصادی‌ترین محصولات میوه‌ای در جهان به شمار رود (۴). مشخص شدن رده‌بندی، روابط فیلوژنتیک و تنوع ژنتیکی در مرکبات جهت تعیین روابط ژنتیکی، شناسایی ژرمپلاسم، کنترل فرسایش ژنتیکی، ایجاد برنامه‌های اصلاحی و ثبت ارقام جدید، امری مهم و حیاتی است (۵). شناخت تنوع ژنتیکی برای طراحی استراتژی‌های حفاظت از اهمیت اساسی برخوردار است، زیرا هدف اصلی، حفاظت از طیف وسیع تنوع ژنتیکی و ذخایر ژنتیکی جهت پیشبرد اهداف تکاملی است (۶). تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی بین یا میان جمعیت‌های مختلف، گونه‌ها و افراد برای ارزیابی ژرمپلاسم ضروری است (۷). پژوهش‌گران معتقدند که تنوع ژنتیکی از اهمیت بسیار بالایی برخوردار بوده و جز اساسی هر برنامه اصلاحی است (۸). از تکنیک‌های مولکولی برای ارزیابی در سطح DNA، تنوع ژنتیکی و فاصله ژنتیکی، خصوصیات ژرمپلاسم، شناسایی ژنتیکی گیاه، مطالعه ژنوم، تجزیه فیلوژنتیکی

رابطه با تنوع ژنتیکی در دنیا صورت گرفته و با توجه به این‌که هنوز ژرم پلاسماهای پرتقال داخل کشور از نظر نشانگر مولکولی به‌طور کامل بررسی نشده بنابراین در این پژوهش با هدف بررسی تنوع ژنتیکی، کنترل فرسایش ژنتیکی و بررسی دقیق‌تر مولکولی ۴۰ ژنوتیپ پرتقال شهرستان رودسر (یکی از مهم‌ترین مناطق تولید مرکبات در شمال کشور) مورد بررسی قرار گرفتند و برای گروه‌بندی آن‌ها از آغازگرهای ISSR و رتروترانسپوزون استفاده شد تا از نقطه‌نظر این نشانگرها وضعیت تنوع ژنتیکی تعدادی از ژنوتیپ‌های ژرم پلاسما موجود تعیین گردد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۴۰ ژنوتیپ پرتقال شهرستان رودسر در استان گیلان در سال ۱۳۹۹ انجام گرفت. ابتدا برگ‌های جوان از جمعیت‌های پرتقال از مناطق مختلف این شهرستان شامل ۱۲ ژنوتیپ از بخش رحیم‌آباد (G1 تا G12)، ۱۲ ژنوتیپ از بخش کلاچای (G13 تا G24)، ۱۰ ژنوتیپ از منطقه طول لات (G25 تا G34) و ۶ ژنوتیپ از منطقه سموش (G35 تا G40) که هر کدام از ژنوتیپ‌ها از باغ‌های مختلف بودند جمع‌آوری شدند (جدول ۱).

(۱۵). از نشانگر ریزماهواره SSR جهت بررسی تنوع ژنتیکی در کلکسیون ژرم پلاسما مرکبات دانشگاه کالیفرنیا استفاده نمودند و توانستند به خوبی گونه‌های مختلف جنس *Citrus* را با استفاده از این نشانگر از هم متمایز کنند (۸). روترانسپوزون‌ها فراوان‌ترین و گسترده‌ترین عناصر جابه‌جا شونده در ژنوم یوکاریوت‌ها هستند که برخلاف ترانسپوزون‌ها از طریق رونویسی پی‌درپی، رونویسی معکوس و در نهایت تولید cDNA جدید، کپی‌های خود را در نواحی جدید ژنومی درج می‌کنند و کپی‌های قبلی در جای خود پایدار باقی می‌مانند. این عناصر جابه‌جا شونده تقریباً در تمام نواحی کروموزومی پراکنده، دارای توزیع وسیع و تصادفی در کروموزوم‌های گیاهی و دارای چندشکلی پایدار و بسیار زیاد در بین و داخل گونه‌های گیاهی بوده که استفاده از آن‌ها را ایده‌آل می‌سازد (۱۶). بیسواز و همکاران شباهت ژنتیکی مبتنی بر ISSR و رتروترانسپوزون را در جنس مرکبات و گونه‌های مرتبط بررسی کردند. هر دو نشانگر IRAP و REMAP تنوع قابل‌توجهی را در بین ژنوتیپ‌های مورد نظر به نمایش گذاشتند. به طور کلی تجزیه و تحلیل IRAP، ISSR و REMAP باعث ایجاد ۱۱۳ باند مختلف شد که ۹۴ باند چند شکل بودند (۱۷). نظر به بررسی‌های زیادی که در

جدول ۱- مشخصات مناطق نمونه‌برداری شده برای بررسی تنوع ژنتیکی پرتقال.

Table 1. Characteristics of the sampled areas to study the genetic diversity of oranges.

ردیف Row	نام منطقه Area name	تعداد ژنوتیپ‌های نمونه‌برداری شده Number of genotypes sampled	طول جغرافیایی Longitude	عرض جغرافیایی Latitude	ارتفاع Altitude
1	کلاچای Kelachay	12	50.29	37.07	-19
2	رحیم‌آباد Rahimabad	12	50.32	37.01	137
3	سموش Somoush	10	50.32	37.00	100
4	طول لات Tool lot	6	50.29	36.99	99

زمان مصرف در فریز ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA به دست آمده از دستگاه اسپکتوفتومتری نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز یک درصد استفاده شد. در این مطالعه برای تکثیر DNA ژنومی از ۱۰ آغازگر ISSR و ۲ رتروترانسپوزون ساخت شرکت Generay و ۳ ترکیب آغازگری استفاده شد. به منظور انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز^۱ مخلوط ۱۲ میکرولیتری شامل ۶ میکرولیتر محلول آماده سیناکلون (dNTPs, PCR buffer, Taq DNA Polymerase و MgCl₂)، ۱ میکرولیتر آغازگر، ۱ میکرولیتر DNA و ۴ میکرولیتر آب مقطر آماده شد. سپس نمونه‌ها توسط سانتریفیوژ کوتاه به خوبی مخلوط شدند. چرخه حرارتی PCR شامل واسرشته‌سازی اولیه DNA ژنومی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه که هر چرخه شامل ۳۰ ثانیه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و واسرشته‌سازی، ۳۰ ثانیه اتصال آغازگر به DNA و واسرشته شده (بسته به آغازگر متفاوت بود و در جدول ۲ آورده شد)، ۳۰ ثانیه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای گسترش رشته DNA و در نهایت ۷ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای گسترش نهایی بود. محصول واکنش PCR روی ژل ۱/۵ درصد آگارز بارگذاری شد. برای رنگ‌آمیزی از ماده سیف استین^۲ و برای عکس برداری از دستگاه Gel Doc با نور UV استفاده شد. تصاویر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و الگوی بانندی بر اساس وجود یا عدم وجود باندها به ترتیب با یک و صفر امتیازدهی شدند. داده‌های حاصل به صورت یک ماتریس ۴۰×۱۴۰ وارد نرم‌افزار Excel شد که در آن ۴۰ تعداد ژنوتیپ پرتقال و ۱۴۰ تعداد باند مشاهده شده بود. در این پژوهش جهت محاسبه درصد چندشکلی تعداد نوارهای چند شکل بر تعداد کل نوارها تقسیم شد. میزان اطلاعات چند شکلی^۳

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 پس از جمع‌آوری با مخزن محتوی نیتروژن مایع به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان منتقل شد و تا زمان استخراج DNA در فریز ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج DNA از نمونه‌های برگ جوان با استفاده از روش ادوارد و همکاران (۱۸) با اندکی تغییر به صورت زیر انجام شد. ابتدا حدود ۰/۵ تا ۰/۷ گرم از برگ‌های جوان در هاون چینی و با افزودن نیتروژن مایع به خوبی آسیاب شد. سپس ۷۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (Tris-HCl ۲۰۰ میلی مولار با PH=۷/۵، NaCl ۲۵۰ میلی مولار، EDTA ۲۵ میلی مولار، SDS ۵ درصد (w/v)) درون هاون ریخته تا با نمونه پودر شده مخلوط شده و بعد به تیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل گردید سپس تیوپ‌ها در حمام آب گرم قرار گرفتند. در ادامه ۳۰۰ میکرولیتر کلروفورم ایزوآمیل الکل (به نسبت ۱:۲۴) به تیوپ اضافه شد و برای این‌که مواد به طور یکنواخت با هم مخلوط شوند ورتکس انجام شد. در مرحله بعد سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای محیط انجام شد. فاز بالایی با احتیاط برداشته شد و به تیوپ جدید ۱/۵ میلی‌لیتری جدید منتقل شد. سپس هم حجم فاز بالایی برداشته شده به تیوپ ایزوپروپانول سرد افزوده و به آرامی تکان داده شدند تا کلاف DNA تشکیل شود. بعد به مدت ۵ دقیقه تیوپ‌ها روی یخ قرار گرفتند. به منظور رسوب دهی DNA سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه انجام گرفت سپس مایع بالایی دور ریخته شد و تیوپ‌ها در دمای آزمایشگاه قرار داده شدند تا خشک شوند. پس از خشک شدن ۶۰ میکرولیتر بافر TE به تیوپ‌ها اضافه شد تا DNA رسوب یافته حل شود. در نهایت DNA نمونه‌ها تا

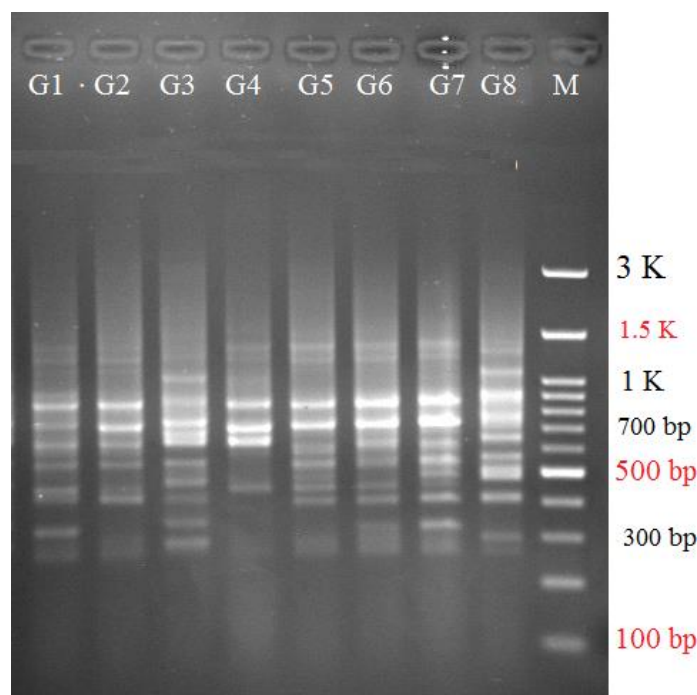
1- Polymerase chain reaction
2- Safe Stain
3- PIC

ژنوتیپ‌ها، فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌ها و رسم نمودار خوشه‌ای از نرم‌افزار NTSYSpc.2.02 استفاده شد. جهت تجزیه به مختصات اصلی از نرم‌افزار GenStat نسخه ۱۲ و جهت تجزیه تابع تشخیص از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ استفاده شد.

نتایج و بحث

پانزده آغازگر مورد استفاده در این مطالعه توانستند در مجموع ۱۴۰ باند ایجاد کنند که از این تعداد ۱۰۱ باند چند شکل بودند. تعداد باندهای چندشکل هر آغازگر از ۴ تا ۹ متغیر بود (جدول ۱). نمونه الگوی باندهای DNA تکثیر شده از ژنوتیپ‌های پرتقال در شکل ۱ نشان داده شده است.

آغازگرها از طریق معادله نشانگرهای نوع غالب $PIC=1-\sum p_i^2$ (p برابر با فراوانی آلل هر جایگاه ژنی برای ژنوتیپ‌ها است) محاسبه گردید. شاخص نشانگری^۱ که بیانگر میزان چند شکلی بوده و می‌تواند به عنوان شاخصی جهت برآورد کارایی یک نشانگر در یک ژرم پلاسما ناشناخته استفاده گردد، با استفاده از رابطه $MI=PIC \times EMR$ به دست آمد. نسبت چندگانه مؤثر^۲ که بیانگر تعداد جایگاه‌های ژنی چند شکل موجود در یک ژرم پلاسما می‌باشد بر اساس رابطه $EMR=np \times \beta$ محاسبه شد که np تعداد کل نوارها که np تعداد نوارهای چند شکل و β نسبت تعداد نوار چند شکل به تعداد کل نوار است (۱۹). جهت محاسبه شاخص تنوع ژنتیکی شانون و نی و تعداد آلل مشاهده شده از نرم‌افزار popgene 1.32 استفاده شد. همچنین جهت ارزیابی آغازگرها، میزان تنوع بین



شکل ۱- الگوی باندهای حاصل از تکثیر نتایج DNA ژنومی ژنوتیپ‌های مختلف پرتقال با استفاده از آغازگر UBC826.

Fig. 1. Bonding pattern of amplified genomic DNA results of different orange genotypes using UBC826 primer.

1- Marker Index

2- Effective Multiplex Ratio

بیشترین تعداد مکان ژنی یا قطعه تکثیر یافته با ۱۳ باند توسط آغازگر UBC812 و کمترین تعداد مکان ژنی با ۶ باند توسط آغازگر UBC817 به دست آمد. میانگین تعداد کل باندهای مشاهده شده به ازای هر آغازگر ۹/۳۳ و میانگین تعداد باندهای چند شکل

به ازای هر آغازگر معادل ۶/۷۳ به دست آمده است. بیشترین درصد چند شکلی توسط آغازگر TOS-2 با ۹۰ درصد و کمترین درصد چند شکلی توسط آغازگر UBC811 با ۴۴/۴ درصد به دست آمد. (جدول ۲).

جدول ۲- آغازگرهای مورد استفاده، دمای اتصال (TM)، تعداد کل باندها، تعداد باندهای چند شکلی، درصد چند شکلی و توالی آغازگرها در ژنوتیپ‌های پرتقال مورد مطالعه.

Table 2. Primers used annealing temperature, total number of bands, number of polymorphic bands, polymorphic percentage and the sequence of primers in the studied orange genotypes.

ردیف Row	نام Name	دمای اتصال آغازگرها Annealing temperature	تعداد کل باندها Total number of bands	تعداد باند چندشکل Number of Polymorphic bands	درصد چندشکلی Polymorphic percentage	توالی آغازگرها Sequence of primers 5' → 3'
1	TOS-1	50.74	11	9	81.8	TGTTGGGAATAGTCCCACA
2	TOS-2	44.72	10	9	90	TGTTGAATAGTTCCACATT
3	UBC811	43.21	9	4	44.4	GAGAGAGAGAGAGAGAC
4	UBC812	42.07	13	8	61.5	GAGAGAGAGAGAGAGAA
5	UBC813	42.02	7	5	71.4	CTCTCTCTCTCTCTT
6	UBC814	40.97	8	6	75	CTCTCTCTCTCTCTA
7	UBC815	43.17	9	7	77.7	CACACACACACACAT
8	UBC816	47.23	10	7	70	CACACACACACACAT
9	UBC817	47.53	6	5	83.3	CACACACACACACAA
10	UBC821	44.86	10	7	70	TCTCTCTCTCTCTCG
11	UBC823	44.15	11	8	72.7	TCTCTCTCTCTCTCC
12	UBC826	49.56	12	8	66.6	ACACACACACACACC
13	TOS-1+ UBC812	42.72	9	8	88.8	TGTTGGGAATAGTCCCACA + GAGAGAGAGAGAGAGAA
14	UBC815+ UBC817	43.17	8	6	75	CTCTCTCTCTCTCTG+ CACACACACACACAA
15	UBC821+ UBC826	44.86	7	4	57.1	TCTCTCTCTCTCTCG+ ACACACACACACACC
کل Total			140	101	72.14	
میانگین Average			9.33	6.73		

ژنوتیپ‌ها را مشخص کنند و می‌توان از آن‌ها برای تجزیه مجموعه ژرم پلاسما دیگر ژنوتیپ‌های پرتقال در پژوهش‌های بعدی استفاده کرد. از طرف دیگر آغازگر TOS-2 با کم‌ترین مقدار محتوای اطلاعات چندشکل توانایی قابل قبولی در جداسازی ژنوتیپ‌ها نداشتند. به‌منظور تعیین کارایی نشانگرها در بروز چندشکلی، شاخص نشانگری و نسبت چندگانه مؤثر محاسبه شد. بیش‌ترین میزان نسبت چندگانه مؤثر برای آغازگر TOS-2 (۸/۱) و کم‌ترین میزان برای آغازگر UBC811 (۱/۷) بود. هم‌چنین آغازگرهای TOS-1 و UBC811 دارای بیش‌ترین (۳/۳۱) و کم‌ترین (۰/۷۶) مقدار شاخص نشانگری بودند (جدول ۳).

میزان PIC در این پژوهش بین ۰/۲۲ تا ۰/۴۵ متغیر بود و میانگین محتوی اطلاعات چند شکل ۰/۴ است. بالاترین مقدار محتوای اطلاعات چند شکل مربوط به آغازگرهای TOS-1، UBC813 و UBC823 به میزان ۰/۴۵ و کم‌ترین مقدار متعلق به آغازگر TOS-2 به میزان ۰/۲۲ بود (جدول ۳). مقدار بالای PIC آغازگرها نشان‌دهنده کارایی زیاد این آغازگرها در تمایز ژنوتیپ‌های مورد استفاده در این پژوهش است که نشان‌دهنده سودمندی این آغازگرها برای بررسی تنوع ژنتیکی پرتقال است. بنابراین آغازگرهای TOS-1، UBC813 و UBC823 با داشتن بالاترین مقدار محتوای اطلاعات چندشکل، بهتر از سایر آغازگرها توانستند فاصله ژنتیکی

جدول ۳- محتوای اطلاعات چند شکل (PIC)، نسبت چندگانه مؤثر (EMR)، شاخص نشانگری (MI)، تعداد آلل مؤثر، شاخص شانون و تنوع ژنی نی در جایگاه ISSR در ژنوتیپ‌های پرتقال مورد مطالعه.

Table 3. Polymorphic information content, effective multiple ratios, marking index, the number of effective alleles, Shannon index and Nei gene diversity at ISSR locus in studied orange genotypes.

ردیف Row	نام آغازگرها Primers Name	شاخص نشانگری MI	نسبت چندگانه مؤثر EMR	محتوای اطلاعات چندشکل PIC	تعداد آلل مؤثر The number of effective alleles	شاخص شانون Shanon index	تنوع ژنی نی Nei gene diversity
1	TOS-1	3.31	7.3	0.45	1.61	0.55	0.36
2	TOS-2	1.78	8.1	0.22	1.14	0.23	0.11
3	UBC811	0.76	1.7	0.43	1.9	0.66	0.47
4	UBC812	1.87	4.92	0.38	1.64	0.56	0.37
5	UBC813	1.6	3.5	0.45	1.72	0.59	0.40
6	UBC814	1.89	4.5	0.42	1.53	0.50	0.32
7	UBC815	2.34	5.4	0.43	1.45	0.48	0.30
8	UBC816	2.15	4.9	0.44	1.57	0.53	0.40
9	UBC817	1.6	4.1	0.40	1.59	0.54	0.36
10	UBC821	1.61	4.9	0.33	1.34	0.38	0.23
11	UBC823	2.61	5.8	0.45	1.63	0.55	0.36
12	UBC826	1.97	5.33	0.37	1.64	0.55	0.37
13	TOS-1+ UBC812	2.98	7.1	0.42	1.81	0.62	0.43
14	UBC815+ UBC817	1.84	4.5	0.41	1.66	0.57	0.38
15	UBC821+ UBC826	0.96	3.28	0.42	1.46	0.48	0.30
میانگین Average	-	1.95	5.02	0.40	1.57	0.51	0.34

(۲۳). سولو و همکاران با استفاده از نشانگرهای SSR، SSCP و ISSR تنوع ژنتیکی در بین انواع جهش یافته لیمو و ماندارین را شناسایی و بررسی کردند. نتایج نشان داد که نشانگرهای مورد استفاده توانستند ابزار مهمی برای تشخیص ژنوتیپ‌های جهش یافته باشند و برای مطالعات فیلوژنتیک مفید هستند (۲۴). یو و همکاران در پژوهشی در کشور چین تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت ۲۷۴ نمونه گریپ فروت چینی (دارابی) (*Citrus maxima*) که از ۱۲ استان در طول ۴ سال جمع‌آوری شده بود را بررسی کردند. نشانگرهای SSR به خوبی توانستند تنوع ژنتیکی و ساختار ۲۷۴ نمونه را تجزیه و تحلیل کنند. میزان محتوای اطلاعات چندشکل در این پژوهش ۰/۴۱ بود. این مطالعه توانست بیش در مورد تنوع ژنتیکی را ارائه دهد، ژنوم آینده را تسهیل کند و برنامه پرورش پوملو (گریپ فروت چینی) را ترویج کند (۲۵). پال و همکاران در پژوهشی تغییرات ژنتیکی و روابط ماندارین (نارنگی) (*Citrus reticulate blanco*) با استفاده از نشانگرهای ریخت‌شناسی و مولکولی بررسی کردند. در این پژوهش علاوه بر صفات ریخت‌شناختی از ۱۵ و ۱۱ نشانگر RAPD و ISSR برای استنباط در مورد تمایز ژنتیکی و روابط بین ۲۵ رقم استفاده شد. نتایج پژوهش نشان داد که از نشانگرهای ریخت‌شناختی و مولکولی می‌توان برای تعیین تنوع و ارتباط ژنتیکی و برنامه‌های اصلاحی در نارنگی استفاده کرد (۲۶). لامبراردو و همکاران در پژوهشی تنوع ژنتیکی ۸ رقم نارنج (*Citrus aurantium*) را با استفاده از نشانگر ISSR مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند. نتایج این پژوهش قابلیت اطمینان و تکرارپذیری نشانگرهای ISSR را در تمایز این ارقام و سایر مرکبات تأیید کرد. اگرچه برخی از تفاوت‌های ریخت‌شناسی در تمایز ارقام وجود داشت اما برخی ارقام چندشکلی قابل توجهی نداشتند که این امر نشان می‌دهد جهش بدون تغییر قابل توجهی در طول DNA آن‌ها رخ داده باشد (۲۷). راهب و

یکی از مهم‌ترین شاخص‌ها برای ارزیابی تنوع ژنی در بین ژنوتیپ‌ها و جمعیت‌ها، شاخص تنوع ژنی است (۲۰). برآورد شاخص نی نشان داد که میزان تنوع ژنی بین ۰/۱۱ تا ۰/۴۷ متغیر بود و آغازگرهای UBC811 دارای بیش‌ترین مقدار تنوع (۰/۴۷) و TOS-2 دارای کم‌ترین مقدار تنوع (۰/۱۱) بودند. میانگین تنوع ژنی در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه ۰/۳۴ بود (جدول ۳). در این پژوهش میانگین ضریب شانون ۰/۵۱ است که نشان‌دهنده تنوع متوسط در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بود. آغازگرهای UBC811، UBC812 + TOS-1 و UBC813 به ترتیب دارای بیش‌ترین میزان شاخص شانون بودند، این نشان‌دهنده این است که آغازگرهای فوق می‌توانند تنوع ژنتیکی درون جمعیتی را بهتر توجه کنند. هم‌چنین بیش‌ترین و کم‌ترین تعداد آلل مؤثر به ترتیب مربوط به آغازگرهای UBC811 (۱/۹) و TOS-2 (۱/۱۴) می‌باشد (جدول ۳). ابوذری و همکاران تنوع ژنتیکی و تجزیه ساختار ژنوتیپ‌های مختلف مرکبات را با استفاده از آغازگرهای ISSR بررسی کردند که میانگین محتوای اطلاعات چندشکل، شاخص نشانگری، تعداد آلل مؤثر، شاخص شانون و شاخص تنوع ژنی نی به ترتیب برابر ۰/۴۸، ۰/۱۵، ۱/۷۸، ۰/۶۱ و ۰/۴۲ بود (۲۱). باباخانی و همکاران تنوع ژنتیکی ارقام مختلف مرکبات را به کمک نشانگرهای ریزماهواره بررسی کردند. نتایج نشان داد که 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 بررسی نمود (۲۲). شرفی و همکاران در پژوهشی تنوع ژنتیکی مولکولی ۱۹ گونه مرکبات رشد یافته در ایران را با استفاده از نشانگرهای SSR، ISSR و CAPS ارزیابی کردند. نتایج این پژوهش نشان داد که نشانگرهای SSR و ISSR در تشخیص تنوع ژنتیکی و روابط ترکیبات مرکبات بسیار مفید و کارآمد بودند

۱۵ مؤلفه اول توانستند در مجموع ۷۳/۱۳ درصد از واریانس کل را توجیه کنند. مطابق انتظار مؤلفه اول بیش‌ترین سهم (۱۵/۳۵ درصد) را در توجیه تغییرات داشت. سه مؤلفه اول مجموعاً توانستند ۲۹/۰۸ درصد از واریانس کل را توجیه کنند. در این پژوهش با توجه به این‌که تعداد زیاد مؤلفه، درصد کمی از واریانس مؤلفه‌ها را توجیه کرد نشان می‌دهد انتخاب آغازگرها به خوبی انجام شده است و نشانگرهای مورد مطالعه در این پژوهش در قسمت‌های مختلف ژنوم پرتقال پراکنده هستند و این می‌تواند بهترین حالت در بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از داده‌های مولکولی باشد (۳۰). باباخانی و همکاران با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR تنوع ژنتیکی ۲۹ رقم مرکبات شمال ایران را بررسی کردند که نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی نشان داد که سه مؤلفه اصلی در مجموع توانستند ۸۳/۱۸ درصد از واریانس کل را توجیه کنند (۲۲).

همکاران، تنوع ژنتیکی ۳۳ نژادگان مختلف لایم به همراه ۱۰ رقم تجاری مرکبات به عنوان شاهد با ۱۷ جفت آغازگر SSR و ۱۱ آغازگر ISSR بررسی کردند. نتایج نشان داد بین لایم‌ها و دیگر انواع مرکبات از لحاظ نشانگرهای مورد بررسی تفاوت‌هایی وجود دارد. از سوی دیگر همه نژادگان‌های لایم بر پایه هر دو نشانگر قرابت بالایی با رقم‌های مکزیکن لایم و پرشین لایم نشان دادند و در یک خوشه قرار گرفتند (۲۸). تجزیه به مختصات اصلی در بیان تنوع ژنتیکی بر اساس صفات کیفی کاربرد زیادی دارد و با استفاده از آن می‌توان الگوهای تنوع را به صورت چندبعدی نشان داد و اجازه تفسیر بیش‌تری در مورد ارتباط بین افراد را فراهم کرد (۲۹). نتایج تجزیه به مختصات اصلی شامل مقادیر ویژه، واریانس نسبی و واریانس تجمعی مؤلفه‌ها در جدول ۴ نشان داده شده است. میزان واریانس نسبی هر مؤلفه نشان‌دهنده اهمیت آن در واریانس کل است و به صورت درصد بیان می‌شود. در این تجزیه

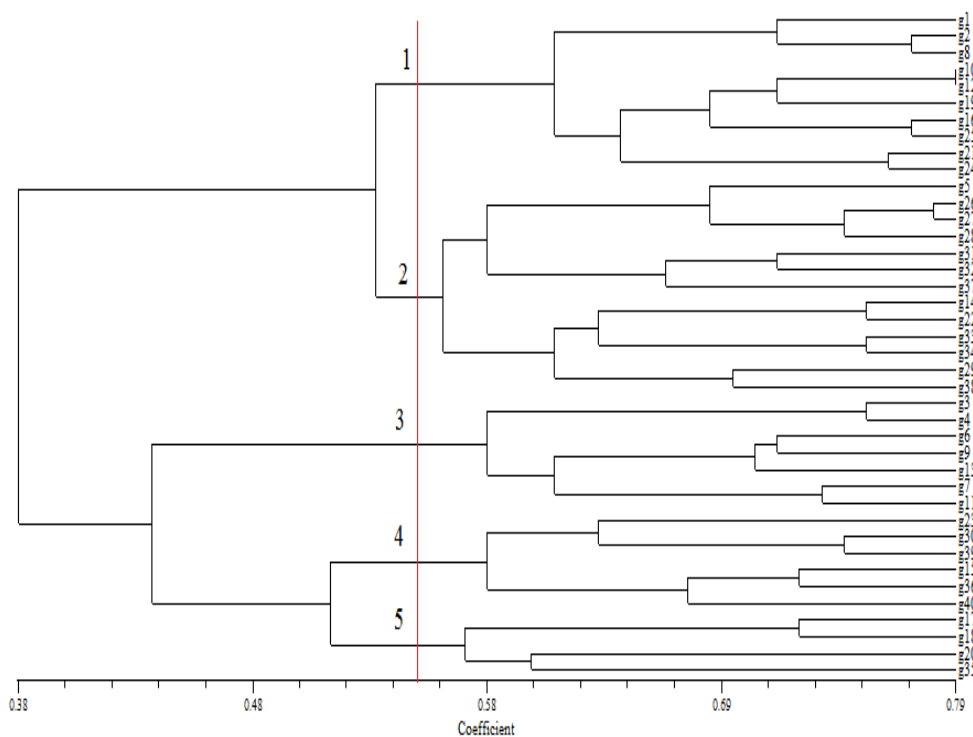
جدول ۴- مقادیر ویژه، واریانس نسبی و درصد تجمعی برای ۱۵ مؤلفه اول در ژنوتیپ‌های پرتقال مورد مطالعه.

Table 4. Eigenvalues, relative variance and cumulative percentage for the first 15 components in the studied orange genotypes.

مؤلفه Component	مقادیر ویژه Eigenvalues	درصد واریانس Relative variance	درصد تجمعی Cumulative percentage
1	2.45	15.35	15.35
2	1.26	7.89	23.24
3	0.93	5.84	29.08
4	0.89	5.56	34.64
5	0.79	4.98	39.62
6	0.70	4.43	44.05
7	0.67	4.20	48.25
8	0.60	3.79	52.04
9	0.57	3.62	55.66
10	0.55	3.47	59.13
11	0.50	3.16	62.29
12	0.48	3.04	65.33
13	0.44	2.75	68.08
14	0.41	2.62	70.70
15	0.38	2.43	73.13

۰/۵۵، ۴۰ ژنوتیپ پرتقال را در پنج کلاستر قرار داد. گروه‌های یک تا پنج به ترتیب شامل ۱۰، ۱۳، ۷، ۶ و ۴ ژنوتیپ بودند. صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای توسط تابع تشخیص کانونی به روش خطی فیشر ۱۰۰ درصد برآورد شد. با این ترتیب می‌توان نتیجه‌گیری نمود که تابع تشخیص تقسیم ژنوتیپ‌های پرتقال را به پنج گروه به‌وسیله تجزیه خوشه‌ای را تأیید می‌نماید.

به منظور تشخیص بهترین روش محاسبه ضریب شباهت و خوشه‌بندی نمونه‌ها، ضریب کوفنتیک برای هر روش محاسبه شد. تجزیه خوشه‌ای به روش‌های مختلف انجام شد و اندازه‌گیری سه ضریب تشابه تطابق ساده^۱، جاکارد^۲ و دایس^۳ نشان داد که گروه‌بندی به روش دورترین همسایه^۴ و ضریب تشابه تطابق ساده با ضریب کوفنتیک ۰/۷۶ بهترین روش از بین روش‌های مورد بررسی است. گروه‌بندی بر اساس ضریب تشابه با ترسیم خط برش در فاصله



شکل ۲- دندروگرام ترسیم شده بر اساس روش دورترین همسایه و ماتریس تشابه تطابق ساده برای ۴۰ ژنوتیپ پرتقال مورد مطالعه.

Fig. 2. Dendrogram drawn based on COMPELET method and simple similarity matrix for 40 orange genotypes studied.

- 1- Simple Maching
- 2- Jacar
- 3- Dice
- 4- COMPELET

G13 که در گروه چهارم قرار دارند و از لحاظ ریخت‌شناسی هم تاحدی مشابه بودند به ترتیب از باغ‌های بخش رحیم‌آباد و کلاچای نمونه‌برداری شدند. ژنوتیپ‌های G35 و G36 که هر دو از باغات منطقه سموش جمع‌آوری شده بودند و از لحاظ برخی صفات ریخت‌شناسی به یکدیگر شباهت داشتند اما یکی در گروه چهارم و دیگری در گروه پنجم قرار دارد. بیش‌ترین پراکندگی ژنوتیپ‌ها در گروه دوم است که شامل همه ژنوتیپ‌های مناطق نمونه‌برداری است. بنابراین افراد مشابه در یک گروه و افراد متفاوت از هم در گروه‌های مختلف قرار گرفتند. به این ترتیب آغازگرها توانستند ژنوتیپ‌ها را به خوبی جداسازی و در گروه‌های مختلف قرار دهند طوری که قرار گرفتن هر یک از ژنوتیپ‌ها در این گروه‌ها بر اساس منطقه جغرافیایی، تشابه ژنتیکی، ریخت‌شناسی و غیره با سایر ژنوتیپ‌ها است.

نسبت نمونه‌ها در هر گروه به ترتیب برای گروه اول ۲۵ درصد، گروه دوم ۳۲/۵ درصد، گروه سوم ۱۷/۵ درصد، گروه چهارم ۱۵ درصد و گروه پنجم ۱۰ درصد بود. در این گروه‌بندی گروه یک شامل ژنوتیپ‌های G1، G2، G8، G10، G12، G16، G19، G21، G24 و G25 گروه دوم شامل ژنوتیپ‌های G5، G14، G22، G26، G27، G28، G29، G31، G32، G33، G34، G37 و G38 گروه سه شامل ژنوتیپ‌های G3، G4، G6، G7، G9، G11 و G13 گروه چهارم شامل ژنوتیپ‌های G15، G23، G30، G36، G39 و G40 و گروه پنجم شامل ژنوتیپ‌های G17، G18، G20 و G35 بودند. این ژنوتیپ‌ها از بخش‌های مختلف شهرستان شامل بخش رحیم‌آباد، کلاچای، طول‌لات و سموش جمع‌آوری شدند. به عنوان مثال ژنوتیپ G14 که از باغ بخش کلاچای نمونه‌برداری شد با ژنوتیپ G38 از منطقه سموش در یک گروه قرار گرفتند. ژنوتیپ‌های G6 و

جدول ۵- آمار توصیفی برای صفات ریختی اندازه‌گیری شده در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه پرتقال.

Table 5. Descriptive statistics for morphological traits measured in the studied genotypes of orange.

صفات Traits	حداقل Minimum	میانگین Mean	حداکثر Maximum
ارتفاع درخت Tree height (meters)	2.4	4.1	5.5
تعداد شاخه Number of branches	6	9.8	13
اندازه میوه Fruit size	کوچک Small	متوسط Medium	بزرگ Big
تعداد بذر Number of seeds	3	8.5	14
شکل میوه Fruit shape	دایره‌ای circular	گلابی شکل Pear-shaped	
پوست میوه Fruit skin	زبر Rough	صاف Smooth	
شکل برگ Leaf shape	کنگره‌ای jagged	صاف Smooth	

در مناطق مختلف بودند اما توانستند در یک گروه قرار بگیرند. در واقع تطابق واضحی بین تنوع ژنتیکی و تنوع جغرافیایی مشاهده نشد. این امر می‌تواند ناشی از آن باشد که جداسازی جغرافیایی تنها عامل به وجود آورنده تنوع ژنتیکی نیست. در گروه چهارم که ژنوتیپ‌ها همگی دارای تعداد شاخه کم و میوه آن‌ها گلابی شکل بود توانستند در این گروه قرار بگیرند هر چند برخی از ژنوتیپ‌ها در بعضی از صفات دیگر با یکدیگر مشترک بودند. ژنوتیپ‌های گروه پنج درختانی با ارتفاع کم و میوه آن‌ها گلابی شکل بودند. هم‌چنین بررسی ریخت‌شناسی ژنوتیپ‌های تحت بررسی و انطباق آن با نتایج حاصل از نشانگرها مفید واقع شد. بنابراین با توجه به قرار گرفتن ژنوتیپ‌ها در گروه‌های مختلف می‌توان در گزینش ژنوتیپ‌های برتر، برنامه‌های اصلاحی، مدیریت و حفظ ژرم‌پلاسما این ژنوتیپ‌ها و غیره استفاده نمود.

در جدول ۵ صفات ریختی اندازه‌گیری شده برای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه پرتقال دیده می‌شود. بر این اساس ژنوتیپ‌های گروه اول از نظر صفات مورفولوژی دارای درختان بلند با تعداد شاخه‌های زیاد بودند که در این گروه قرار گرفتند (جدول ۶). هم‌چنین مطابق انتظار ژنوتیپ‌های G10 و G12 در این گروه بیش‌ترین شباهت را داشتند. در گروه دوم که بیش‌ترین تعداد ژنوتیپ‌ها قرار داشتند از نظر اندازه، شکل و پوست تا حدی مشابه هم هستند که دارای میوه‌هایی با اندازه متوسط، دایره‌ای شکل و پوست زبر بودند (جدول ۶) اما با این‌که ژنوتیپ‌های G29، G33 و G38 از این نظر متفاوت بودند اما در این گروه قرار گرفتند. هر چند که ممکن است برخی ژنوتیپ‌ها از لحاظ ریخت‌شناسی با هم متفاوت باشند اما از نظر ژنتیکی با یکدیگر شباهت دارند. ژنوتیپ‌های گروه سوم با این‌که از لحاظ جغرافیایی

جدول ۶- صفات ریختی اندازه‌گیری شده در گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه پرتقال.

Table 6. Morphological traits measured in groups resulting from cluster analysis the studied genotypes of orange.

صفات Traits	گروه اول First group	گروه دوم The second group	گروه سوم The third group	گروه چهارم The fourth group	گروه پنجم The fifth group
ارتفاع درخت Tree height (meters)	5.3	4.7	3.4	4	2.6
تعداد شاخه Number of branches	12	9	7	10	6
تعداد بذر Number of seeds	4	بدون بذر No seeds	8	12	10
اندازه میوه Fruit size	بزرگ Big	متوسط Medium	کوچک Small	کوچک و متوسط Small and Medium	متوسط Medium
شکل میوه Fruit shape	دایره‌ای circular	دایره‌ای circular	گلابی شکل Pear-shaped	گلابی شکل و دایره‌ای Pear-shaped and circular	گلابی شکل Pear-shaped
پوست میوه Fruit skin	صاف و زبر Smooth and Rough	زبر Rough	صاف Smooth	صاف و زبر Smooth and Rough	زبر Rough
شکل برگ Leaf shape	کنگره‌ای Jagged	کنگره‌ای و صاف Jagged and Smooth	کنگره‌ای Jagged	صاف smooth	صاف Smooth

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که تنوع ژنتیکی بالایی در بین ژنوتیپ‌های پرتقال وجود دارد. با توجه به این که نشانگرهای به‌کار رفته در این پژوهش چندشکلی قابل‌قبولی را نشان دادند می‌توان در پژوهش‌های آینده روی این گیاه و سایر گیاهان تیره مرکبات از آن‌ها استفاده کرد. آغازگرهای TOS-1، UBC813، UBC823 و TOS-2 با داشتن بالاترین مقدار PIC، بهترین شاخص‌های نشانگری و مقادیر بالای تعداد آلل مؤثر، شاخص شانون، تنوع ژنی نی به عنوان آغازگرهای برتر جهت بررسی تنوع ژنتیکی در این پژوهش معرفی شدند. به طور کلی با توجه به نتایج این پژوهش به نظر می‌رسد آغازگرهای ISSR و رتروترانسپوزون می‌توانند به عنوان یک روش مولکولی ساده مبتنی بر PCR و نسبتاً مطمئن و قابل‌اعتماد در تعیین سطح تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنتیک در مرکبات به کار روند.

خیای و همکاران تنوع ژنتیکی ۲۹ رقم لیمو ترش در سه منطقه ایران را با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی و ISSR ارزیابی کردند. نتایج پژوهش نشان داد که تجزیه و تحلیل صفات مورفولوژی و ISSR در میان ژنوتیپ‌ها و ارقام از سه منطقه ایران برای محاسبه تنوع ژنتیکی و ارتباط میان آن‌ها مفید واقع شد. همچنین تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA ارقام مورد مطالعه را در گروه‌های مختلف قرار داد (۳۱). تریپولیتسوتیس و همکاران ۳۶ 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 (۳۲). بیسواز و همکاران بیان کردند که نشانگر مولکولی ISSR ابزاری قدرتمند در تجزیه و تنوع ژنتیکی مرکبات است (۳۳). گلشن و رز از نشانگرهای مولکولی SSR و ISSR برای بررسی تنوع ژنتیکی و ارتباط فیلوژنتیک میان ۲۴ رقم لیمو (*C. limon*) استفاده کردند و تنوع کمی میان آن‌ها مشاهده نمودند (۳۴).

منابع

1. Talon, M. and Gmitter, F.G. 2008. Citrus genomics. Int. J. Plant Genomics 2008.
2. Liu, Y., Heying, E. and Tanumihardjo, S. A. 2012. History, global distribution, and nutritional importance of citrus fruits. Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 11: 6. 530-545.
3. Golein, B. and Adoli, B. 2012. Citrus (planting). Pouya Novin Publ. 162p. (In Farsi)
4. Atiyah, A. 2016. Molecular Characterization and Genetic Diversity Analysis of Sweet Orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) Cultivars in Iraq Using RAPD Markers. Eur. J. Mol. Biotechnol. 1: 4-12.
5. Krueger, R.R. and Roose, M.L. 2003. Use of molecular markers in the management of citrus germplasm resources. J. Am. Soc. Hort. Sci. 128: 6. 827-837.
6. Verma, S., Karihaloo, J. L., Tiwari, S. K., Magotra, R. and Koul, A.K. 2007. Genetic diversity in *Eremostachys superba* Royle ex Benth. (Lamiaceae), an endangered Himalayan species, as assessed by RAPD. Genet. Resour. Crop Evol. 54: 2. 221-229.
7. Yang, S., Guo, N. and Ge, H. 2016. Morphological and AFLP-based genetic diversity in *Rosa platyacantha* population in eastern Tianshan mountains of northwestern China. Hort. Plant J. 2: 1. 55-60.
8. 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). Theor. Appl. Genet. 112: 8. 1519-1531.

9. Haidari, P., Mehrabi, A.A. and Nasrollah, N.G.A.A. 2017. Genetic diversity of Balm (*Melissa officinalis* L.) landraces and genetic relationship within and between them using ITS markers. J. Med. Plants and By-prod. 1: 97-104.
10. Basha, A.I., Padulosi, S., Chabane, K., Hadj-Hassan, A., Dulloo, E., Pagnotta, M.A. and Porceddu, E. 2007. Genetic diversity of Syrian pistachio (*Pistacia vera* L.) varieties evaluated by AFLP markers. Genet. Resour. Crop Evol. 54: 8. 1807-1816.
11. Zane, L., Bargelloni, L. and Patarnello, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. Mol. Ecol. 11: 1. 1-16.
12. Reddy, M.P., Sarla, N. and Siddiq, E. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euphytica, 128: 1. 9-17.
13. Shahsavari, A., Izadpanah, K., Tafazoli, E. and Tabatabaei, B.S. 2007. Characterization of *Citrus* germplasm including unknown variants by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Sci. Hort. 112: 3. 310-314.
14. El-Mouei, R., Choumane, W. and Dway, F. 2011. Characterization and estimation of genetic diversity in *Citrus* rootstocks. Int. J. Agric. Biol. 13: 4.
15. Abedinpour, H., Ranjbar, G.A., Jelodar, N. and Golein, B. 2014. Evaluation of genetic diversity in Citrus genotypes by IRAP molecular marker. Intl. J. Farm & Alli Sci. 3: 230-234.1. (In Farsi)
16. Wicker, T., Sabot, F., Hua-Van, A., Bennetzen, J.L., Capi, P., Chalhou, B. and Panaud, O. 2007. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. Nat. Rev. Genet. 8: 12. 973-982.
17. Biswas, M.K., Baig, M., Cheng, Y.J. and Deng, X.X. 2010a. Retro-transposon based genetic similarity within the genus Citrus and its relatives. Genet. Resour. Crop Evol. 57: 963-972
18. Edwards, K., Johnstone, C. and Thompson, C. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. Nucleic Acids Res. 19: 6. 1349.
19. Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalski, A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Mol. Breed. 2: 3. 225-238.
20. Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. Am. Nat. 106: 949. 283-292.
21. Abouzari, A., Dadras, A.R., Golein, B. and Tajvar, Y. 2021. Investigation of genetic diversity and structure analysis of different *Citrus* genotypes using ISSR markers. Plant Genet Researches. 7: 2. 13-24. (In Farsi)
22. Babakhani, B., Naghashi, Y., Hosseini, B.S. and Hoshi, M. 2020. The genetic diversity of some *Citrus* varieties using microsatellite molecular markers. J. Plant Ecophysiol. 49: 271-280. (In Farsi)
23. Sharafi, A.A., Sharafi, A. and Abkenar, A.A. 2017. Molecular genetic diversity assessment of *Citrus* species grown in Iran revealed by SSR, ISSR and CAPS molecular markers. Int. J. Sci. Res. 8: 22-27.
24. Sülü, G., Kacar, Y.I.L.D.I.Z., Polat, İ., KİTAPCI, A., Turgutoğlu, E., Şimşek, Ö.Z.H.A.N. and Satar, G. 2020. Identification of genetic diversity among mutant lemon and mandarin varieties using different molecular markers. Turk. J. Agric. For. 44: 5. 465-478.
25. Yu, H., Yang, X., Guo, F., Jiang, X., Deng, X. and Xu, Q. 2017. Genetic diversity and population structure of pummelo (*Citrus maxima*) germplasm in China. Tree Genet. Genomes. 13: 3. 58.
26. Pal, D., Malik, S.K., Kumar, S., Choudhary, R., Sharma, K.C. and Chaudhury, R. 2013. Genetic variability and relationship studies of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) using morphological and molecular markers. Agric. Res. 2: 3. 236-245.
27. Lombardo, G., Schicchi, R., Marino, P. and Palla, F. 2012. Genetic analysis of Citrus aurantium L. (*Rutaceae*) cultivars by ISSR molecular markers. Plant Biosyst., Symp. Int. Organ. Plant Biosyst. 146 (sup1), 19-26.

28. Raheb, S., Ghasemnezhad, M., Golain, B., Golmohammadi, M. and Sabori, A. 2019. Investigation of polymorphism in different acid lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) genotypes with free witches broom disease by molecular markers of SSR and ISSR. Iran. J. Hort. Sci. 50: 1. 1-11. (In Farsi)
29. Khayam Nekouei, M., Jahantighi, R., Solouki, M., Mohammadi, R. and Emamjomeh, A. 2009. Study on genetic diversity of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) genotypes using AFLP marker. J. Agric. Sci. Nat. Resour. 16p.
30. Mohsenzadeh Golfzaei, M., Samizadeh Lahiji, H., Aalami, A., Shoaie Deilami, M. and Talesh Sasani, S. 2012. Investigation of genetic diversity of different greenhouse tobacco genotypes using ISSR and retrotransposon markers. Iran. J. Field Crop Sci. 43: 2. 371-380. (In Farsi)
31. Khiavi, S.J., Hamidoghli, Y., Golein, B. and Sabouri, A. 2016. Assessment of lime genetic diversity in three regions of Iran using morphological and ISSR markers. Agric. Sci. Commun. 4: 18-29.
32. Tripolitsiotis, C., Nikoloudakis, N., Linos, A. and Hagidimitriou, M. 2013. Molecular characterization and analysis of the greek *citrus* germplasm. Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj-Napoca. 41: 2. 463-471.
33. Biswas, M.K., Xu, Q. and Deng, X.X. 2010b. Utility of RAPD, ISSR, IRAP and REMAP markers for the genetic analysis of *Citrus* spp. Sci. Hort. 124: 2. 254-261.
34. Gulsen, O. and Roose, M. 2001. Chloroplast and nuclear genome analysis of the parentage of lemons. J. Am. Soc. Hort. Sci. 126: 2. 210-215.