بررسی چندشکلی نشانگر SSR در بین ارقام بی‌بذر، کم‌بذر و بذردار گونه‌های مختلف جنس *Citrus*

بهروز گلعین *، بابک عدولی، فرهاد رفعت و مرتضی گل‌محمدی[1]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۲/۱۶ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۱۸)

چکیده

در این پژوهش، تنوع ژنتیک ۲۸ ژنوتیپ از گونه‌های مختلف جنس *Citrus* شامل ارقام نرعقیم (بی‌بذر)، عقیم (بی‌بذر)، کم‌بذر و بذردار با استفاده از نشانگرهای SSR (توالی‌های ساده تکراری) بررسی شدند. ۵۴ آلل با میانگین ۴/۲ آلل به ازاء هر آغازگر با استفاده از هشت جفت ترکیب آغازگری به‌دست آمد. تعداد آلل شناسایی شده در هر مکان ژنی بین ۸-۳ آلل بود که بیشترین آن مربوط به مکان ژنی TAA15 و کمترین آن مربوط به مکان‌های ژنی TAA27، CTT01، CCSM18 و ATC09 بود. میانگین محتوی اطلاعات چندشکلی (PIC) ۰/۵۹ بود که بالاترین PIC مربوط به مکان ژنی CCSM18 معادل ۰/۹۰ و کمترین آن مربوط به مکان ژنی AG14 و معادل ۰/۳۴ بود. بررسی دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA با ضریب تشابه جاکارد، ژنوتیپ‌های مورد بررسی را به چهار گروه مجزا طبقه‌بندی کرد. ارقام نرعقیم نارنگی انشو (ساتسوما) در گروه اول، ارقام پرتقال، گریپ‌فروت و نارنگی پیج (هیبرید کمپلکس) در گروه دوم، ارقام نارنگی (گروه معمولی و تانجرین) در گروه سوم و لمون لیسبون در گروه چهارم قرار گرفتند.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، مرکبات، نشانگر ملکولی، نرعقیم

۱. گروه اصلاح نباتات، موسسه تحقیقات مرکبات کشور، رامسر

*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: bgoleincitrus@yahoo.com

مقدمه

مرکبات گروه بزرگی از میوه‌ها و شامل انواع پرتقال، نارنگی، لیمو، گریپ‌فروت و پوملو است. تولید مرکبات در مناطق مختلف جهان و میزان بالای تولید آن موجب شده که این محصول در جهان از اهمیت اقتصادی زیادی برخوردار باشد. امروزه در تجارت جهانی، مرکبات دومین صنعت بزرگ میوه است (۱۱).

در مرکبات تاریخچه طولانی کشت، پراکنش وسیع جغرافیایی، جهش‌های فراوان و میزان دگرباروری بالا باعث شده که تنوع ژنتیکی فراوانی بین و درون جنس‌های آن وجود داشته باشد که می‌توان به ویژگی‌هایی مانند اندازه و رنگ گل، اندازه، شکل و رنگ میوه، اندازه و شکل درخت و مقاومت در برابر انواع تنش‌های محیطی و آفات اشاره کرد. این تنوع منتج به تولید گونه‌های مختلف با ظاهر فنوتیپی گوناگون و داشتن خصوصیات مطلوب شده است (۱۰).

امروزه دو عامل فرسایش ژنتیکی و آسیب‌پذیری ژنتیکی به شدت محصولات زراعی و باغی را تحت تأثیر قرار داده است، لذا از مهم‌ترین وظایف یک به‌نژادگر، توجه به ذخایر ژنتیکی و استفاده بهینه از این ذخایر و تنوع موجود در جهت بهبود کمی و کیفی محصولات است. برای این منظور، تعیین تنوع ژنتیکی ارقام، اولین گام در استفاده کردن منابع گیاهی می‌باشد (۱۲ و ۱۴). مشخص شدن رده‌بندی، روابط فیلوژنتیک و تنوع ژنتیک در مرکبات جهت تعیین روابط ژنتیکی، شناسایی ژرم‌پلاسم، کنترل فرسایش ژنتیکی، ایجاد برنامه‌های به‌نژادی و ثبت ارقام جدید، امری مهم و حیاتی می‌باشد (۱۶).

امروزه تعیین تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای ملکولی آسان‌تر، کم هزینه‌تر، تکرارپذیرتر و قابل اعتمادتر از نشانگرهای مرفولوژی است. نشانگرهای ملکولی به عنوان ابزاری مهم در مرکبات در دامنه وسیعی از مطالعات شامل تجزیه پیوستگی و تهیه نقشه‌های ژنتیکی، تجزیه آرایه‌بندی و تعیین خویشاوندی ژنتیکی و شناسایی ارقام به‌کار گرفته شده‌اند. برای مثال می‌توان به پژوهش‌های انجام شده زیر اشاره نمود: گولسن و روز (۱۳) از آیزوزایم‌ها و نشانگرهای مولکولی SSR و ISSR جهت بررسی تنوع ژنتیک و ارتباط فیلوژنتیک میان ۲۴ رقم لمون (*C. limon*) استفاده نمودند و تنوع ژنتیکی کمی میان آنها مشاهده نمودند. فانگ و همکاران (۷) تنوع ژنتیک میان ۴۸ نارنج سه‌برگ که به صورت رویشی تکثیر شده بودند را با استفاده از هفت مکان ژنی آیزوزایم، ۳۸ ترکیب RFLP و ۱۱ نشانگر ISSR تعیین کردند. آیزوزایم‌ها و RFLP میزان چندشکلی کمی نشان دادند. نشانگر ISSR باندهای چندشکلی را با متوسط ۵۸ قطعه به ازاء هر آغازگر ایجاد کردند و سرانجام ۴۸ ژنوتیپ نارنج سه‌برگ به چهار گروه اصلی دسته‌بندی شدند. فدرسی و همکاران (۸) از نشانگر ملکولی RAPD و RFLP جهت بررسی ارتباط فیلوژنتیک ۴۵ گونه از جنس *Citrus* و شش جنس وابسته استفاده نمودند. شهسوار و همکاران (۲۶) جهت شناسایی ژرم‌پلاسم مرکبات و ژنوتیپ‌های ناشناخته، از نشانگرهای ISSR استفاده نمودند و تنوع‌ژنتیکی و ارتباط فیلوژنتیک میان ۳۳ ژنوتیپ مرکبات شامل ارقام تجاری و ژنوتیپ‌های ناشناخته مرکبات را با این نشانگر بررسی نمودند. بیگنه (۵) از نشانگر ISSR جهت تعیین قرابت بکرایی و ارقام تجاری مرکبات استفاده کرد و نشان داد که بکرایی قرابت نزدیکی با راف‌لمون (*C. jambhiri*) (تشابه۸۱٪) و لیموشیرین (*C. limettioides*) (تشابه ۷۲٪) دارد. ریما و همکاران (۲۴)، طی شناسایی و تخمین تنوع ژنتیکی در مرکبات تأیید کردند که نشانگرهای RAPD و SSR قادرند چندشکلی قابل قبولی را آشکار سازند و بر پایه آن می‌توان ژنوتیپ‌ها و گونه‌های مرکبات را به درستی از هم متمایز ساخت.

در میان نشانگرهای ملکولی قابل دسترس مانند RAPD، ISSR، SSR، AFLP و ....، از نشانگرهای SSR در به‌نژادی ژنتیکی گیاهان استفاده زیادی شده است. نشانگر SSR به دلیل چندشکلی بالا، وراثت هم‌بارز، پایداری و تکرارپذیری زیاد از نشانگرهای قابل اعتماد در بررسی تنوع ژنتیکی، مطالعه فیلوژنی، شناسایی ژرم‌پلاسم و تهیه نقشه‌های ژنتیکی مرکبات به‌کار رفته‌اند (۱۸).

ذخیره ژرم‌پلاسم گیاهی یکی از گران‌بهاترین سرمایه‌های طبیعی هر کشور محسوب می‌شود و کشور ایران از این لحاظ کشوری غنی و دارای موقعیت منحصر به فرد از نظر تنوع ژنتیکی در گونه‌های مختلف گیاهی از جمله مرکبات است. در حال حاضر علاوه بر ارقام بومی شناسایی و جمع‌آوری شده در کشور، بیش از ۵۰ رقم تجاری/ژنوتیپ که از طریق انتخاب (گزینش)، دورگ‌گیری و جهش در کشورهای دیگر به‌وجود آمده‌اند، وارد کشور شده است. برخی از این ارقام بی‌بذر بوده (عقیم هستند) و با ارقام بومی و وارداتی دیگر اختلاط یافته‌اند و منتج به تولید تنوع زیادی از مرکبات عقیم، کم‌بذر و بذردار شده است (۱۱). با توجه به اهمیت تنوع ژنتیکی در ارقام نرعقیم، عقیم و کم‌بذر در برنامه‌های به‌نژادی مرکبات و برنامه‌ریزی صحیح در استفاده مؤثر از کلکسیون‌های مواد ژنتیکی و با عنایت به عدم وجود اطلاعات در این زمینه، در این تحقیق به بررسی تنوع موجود بین ارقام مذکور بر اساس نشانگرهای SSR پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

الف) مواد گیاهی و استخراج DNA

برای انجام این آزمایش، برگ ۲۸ نمونه از مرکبات نرعقیم (بی‌بذر)، عقیم (بی‌بذر)، کم‌بذر و بذردار از ایستگاه تحقیقات مرکبات کترا (تنکابن) و شرکت باغداری فجر ساری جمع‌آوری شد (جدول ۱). این برگ‌ها از سرشاخه‌های جوان بدون نشانه‌های ظاهری ناشی از اثر عوامل بیماری‌زا و فیزیولوژیک بودند. ۶-۵ برگ سالم جوان از هر گیاه جمع‌آوری و تا زمان استخراج DNA در فریزر در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. استخراج DNA به روش موری و تامسون (۲۰) انجام گرفت. پس از استخراج DNA و قبل از انجام واکنش‌های PCR، جهت بررسی کمیت و کیفیت اسیدهای نوکلئیک، DNA به‌دست آمده با اسپکتروفتومتر (نانو دراپ ND1000) در طول موج جذب ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. هم‌چنین برای تصدیق و تأیید نتایج به‌دست آمده مجدداً با روش الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

ب) واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (MJ RESEARCH, PTC-200) با ۱۰ جفت آغازگر SSR اختصاصی مرکبات (جدول ۲) که در مطالعات سایر محققین کیفیت آللی مناسب و میزان چندشکلی بالایی را بین ارقام مرکبات نشان داده بودند، استفاده شد. واکنش‌های PCR با استفاده از مواد تهیه شده از شرکت سیناژن و در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل یک میکرولیتر بافر ۱۰x، ۱/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۰/۲ واحد آنزیم *Taq* DNA Polymerase، ۰/۵ میکرومولار از هر جفت آغازگر، ۰/۲ میلی‌مولار مخلوط نوکلئوتیدی (dNTPs) و ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی انجام شد. شرایط تکثیر DNA در ابتدا برای هر جفت آغازگر به‌صورت واسرشته‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه، ۳۸ چرخه شامل واسرشته‌سازی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، دمای اتصال برای هر جفت آغازگر ۵۵-۴۵ درجه سانتی‌گراد (متفاوت برای هر جفت آغازگر) به مدت ۳۰ ثانیه و توسعه ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در نهایت هفت دقیقه توسعه نهایی انجام شد. محصول واکنش PCR با استفاده از ژل پلی‌اکریل آمید ۶٪ حاوی اوره هفت مولار تفکیک شد.

سیستم الکتروفورز مورد استفاده در این مطالعه دستگاه Bio Rad و قطر ژل مورد استفاده ۰/۴ میلی‌متر و ابعاد ژل ۳۰×۳۸ سانتی‌گراد بود. پس از اضافه کردن بافر بارگذاری حاوی فرم‌آلدئید به نمونه‌ها، جهت واسرشته‌سازی محصولات PCR، نمونه‌ها در حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه قرار داده شد. الکتروفورز نمونه‌ها در توان ثابت ۸۵ وات و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. زمان الکتروفورز با توجه به وزن باندهای حاصل از PCR بر حسب جفت باز، ۱۲۰-۹۰ دقیقه تشخیص داده شده است. رنگ‌آمیزی

جدول۱. ارقام گیاهی استفاده شده در آزمایش

جمعیت	نام عمومی	نام علمی گیاه	کد گیاه
نر عقیم	نارنگی کلوزلینا	*Citrus unshiu*	G1
نر عقیم	نارنگی هاشیموتو	*Citrus unshiu*	G2
نر عقیم	نارنگی اواری	*Citrus unshiu*	G3
نر عقیم	نارنگی وازه	*Citrus unshiu*	G4
نر عقیم	نارنگی سوجی یاما	*Citrus unshiu*	G5
نر عقیم	نارنگی اکیتزو	*Citrus unshiu*	G6
نر عقیم	نارنگی میاگاوا	*Citrus unshiu*	G7
عقیم	پرتقال فوکوموتو ناول	*Citrus sinensis*	G8
عقیم	پرتقال ناولیت	*Citrus sinensis*	G9
عقیم	پرتقال ناول فویوس	*Citrus sinensis*	G10
عقیم	پرتقال ناولینا	*Citrus sinensis*	G11
عقیم	پرتقال اسپرینگ ناول	*Citrus sinensis*	G12
عقیم	پرتقال نیوهال ناول	*Citrus sinensis*	G13
عقیم	پرتقال فراست ناول	*Citrus sinensis*	G14
کم‌بذر	گریپ‌فروت مارش سیدلس	*Citrus paradisi*	G15
کم‌بذر	گریپ‌فروت تامسون	*Citrus paradisi*	G16
کم‌بذر	پرتقال هاملین	*Citrus sinensis*	G17
کم‌بذر	پرتقال والنسیا	*Citrus sinensis*	G18
کم‌بذر	پرتقال گروس سانگین	*Citrus sinensis*	G19
کم‌بذر	لمون لیسبون	*Citrus limon*	G20
کم‌بذر	کلمانتین کلمینولس	*Citrus clementina*	G21
بذردار	نارنگی یونسی	*Citrus reticulata*	G22
بذردار	نارنگی اتابکی	*Citrus reticulata*	G23
بذردار	نارنگی محلی	*Citrus reticulata*	G24
بذردار	نارنگی بمی	*Citrus reticulata*	G25
بذردار	نارنگی پیچ	*Citrus* sp.	G26
بذردار	پرتقال محلی سیاورز	*Citrus sinensis*	G27
بذردار	نارنگی دانسی	*Citrus reticulata*	G28

جدول۲. آغازگرهای مورد استفاده و توالی نوکلئوتیدی آنها

آغازگر	توالی آغازگر رو به جلو	توالی آغازگر معکوس	واحد تکراری
AG14	AAAGGGAAAGCCCTAATCTCA	CTTCCTCTTGGAGTGTTG	GA
ATC09	TTCCTTATGTAATTGCTCTTTG	TGTGAGTGTTTGTGCGTGTG	TCA
CCSM18	GTGATTGCTGGTGTCGTT	AACAGTTGATGAAGAGGAAG	AG
CTT01	TCAGAACATTGAGTTGCTTGCTCG	TAACCACTTAGGCTTCGGCA	CTT
GT03	GCCTTCTTGATTTACCGGAC	TGCTCCGAATTCATCATTG	GT
TAA1	GACAACATCAACAACAGCAAGAGC	AAGAAGAAGAGCCCCCATTAGC	TAA
TAA15	GAAAGGGTTACTTGACCAGGC	CTTCCCAGCTGCACAAGC	TAA
TAA27	GGATGAAAAATGCTCAAAATG	TAGTACCCACAGGGAAGAGAGC	TAA

ژل با روش نیترات نقره صورت گرفت (۴).

ج) تجزیه داده‌ها

جهت امتیازدهی باندها از نرم افزار Adobe photoshop استفاده شد. الگوی نواری حاصل به صورت وجود یا عدم وجود نوارها در محصول PCR با اعداد یک و صفر امتیازدهی شدند. تجزیه خوشه‌ای به روش گروه‌های وزنی جفت‌نشده (UPGMA) و با ضریب تشابه جاکارد انجام شد. تجزیه تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار NTSYS pc ver 2.02 و POPGENE انجام گرفت (۲۵).

نتایج و بحث

الف) تکثیر SSR

با استفاده از ۱۰ جفت آغازگر SSR، تنوع ژنتیکی ۲۸ ژنوتیپ از جنس *Citrus* مورد بررسی قرار گرفت. از ۱۰ جفت آغازگر مورد مطالعه، هشت جفت آغازگر الگوی نواری مناسب و قابل امتیازدهی تولید نمودند. شکل ۱ نتایج حاصل از تکثیر PCR در مکان ژنی TAA15 را نشان می‌دهد. آغازگرهای مورد نظر توانستند در مجموع ۵۴ آلل را با میانگین ۴/۲ آلل به ازای هر آغازگر شناسایی کنند. تعداد آلل شناسایی شده در هر مکان ژنی بین ۸-۳ آلل بود که بیشترین آن با هشت آلل مربوط به مکان TAA15 و کمترین آن مربوط به مکان‌های TAA27، CTT01، CCSM18 و ATC09 بود. پارامتر دیگری که مورد محاسبه قرار گرفت محتوای اطلاعاتی چندشکلی بود (PIC) که با استفاده از تعداد فراوانی آلل‌ها در هر مکان ژنی، قدرت تفکیک آن را مشخص می‌کند (۱). به استثنای مکان‌های ژنی AG14 و TAA1 که به ترتیب با ۰/۳۴ و ۰/۴۶ چندشکلی پایینی نشان دادند، تمام مکان‌ها چندشکلی نسبتاً خوبی با میانگین ۰/۵۹ نشان دادند که بیشترین میزان چندشکلی مربوط به مکان CCSM18 معادل ۰/۹۰ بود (جدول ۳). با توجه به جدول ۳، مکان TAA27 ۱۰۰٪ هتروزیگوسیتی نشان داد و کمترین مقدار هتروزیگوسیتی مربوط به مکان AG14 و معادل با ۰/۲۱۴ بود. میانگین مقدار هتروزیگوسیتی دیده شده برابر با ۰/۶۸۴ بود. بارکلی و همکاران (۲) با استفاده از ۲۴ جفت آغازگر SSR روی ۳۷۰ ژنوتیپ مرکبات دانشگاه کالیفرنیا، دامنه تعداد آلل به‌دست آمده را بین ۳ تا ۳۰ عدد با میانگین ۱۱/۵ آلل به ازاء هر آغازگر گزارش کردند. هم‌چنین دامنه ارزش PIC محاسبه شده بین ۰/۲ تا ۰/۹ بود. در تحقیق آنها، میانگین هتروزیگوسیتی در کل جمعیت مورد مطالعه، ۰/۴۲ بود که بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی دیده شده مربوط به مکان ژنی TAA41 و کمترین آن مربوط به مکان ژنی ACO1 و معادل با ۰/۱۳ بود.

ب) تجزیه روابط ژنتیکی

تجزیه خوشه‌ای ۲۸ ژنوتیپ مورد مطالعه بر اساس روش گروه‌های جفتی وزن‌نشده انجام و دندروگرام در ضریب تشابه ۰/۵۶ برش داده شد که ژنوتیپ‌ها در چهار گروه اصلی،

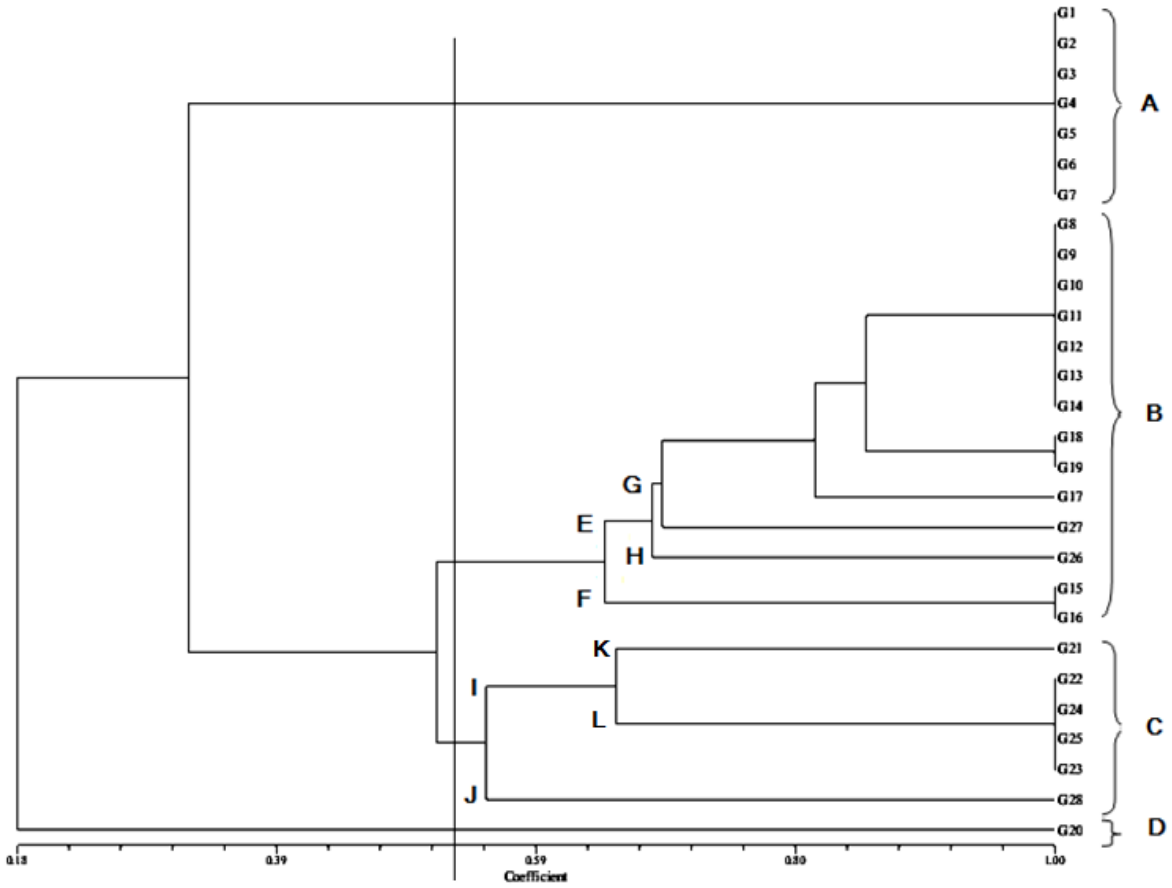
شکل ۱. آلل‌های SSR روی ژل پلی آکریل آمید ۶ درصد (آغازگر TAA15). شماره‌های ۲۸-۱ مربوط به ژنوتیپ‌های مورد مطالعه است. M بیانگر نشانگر استاندارد است (GeneRuler, 100bp).

جدول ۳. آغازگرها، اندازه آلل، آلل‌های دیده شده، محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H_{obs})

آغازگر	اندازه آلل (جفت باز)	آلل‌های دیده شده	PIC	H_{obs}
AG14	۱۱۹-۱۶۳	۵	۰/۳۴	۰/۲۱۴
ATC09	۱۶۹-۲۰۲	۳	۰/۵۵	۰/۷۵
CCSM18	۳۸۰-۱۵۰	۳	۰/۹	۰/۳۷۵
CTT01	۱۳۴-۱۶۴	۳	۰/۴۷	۰/۹۲
GT03	۱۴۹-۱۹۷	۴	۰/۵۹	۰/۹۶۳
TAA1	۱۴۷-۱۹۰	۵	۰/۴۶	۰/۲۸۵
TAA15	۱۴۱-۲۰۴	۸	۰/۸۸	۰/۹۶۴
TAA27	۱۹۷-۲۴۲	۳	۰/۵۹	۱
میانگین	-	۴/۲	۰/۵۹	۰/۶۸۴

دسته‌بندی شدند (شکل ۲).

گروه اول (A) شامل ژنوتیپ‌های نرعقیم (بی‌بذر) است که نارنگی‌های انشو (G1، G2، G3، G4، G5، G6 و G7) را تشکیل می‌دهد. این گروه با ضریب تشابه ۰/۳۱ از سایر گروه‌ها جدا شده است. ارقام مختلف نارنگی انشو از لحاظ اکثر صفات باغبانی با همدیگر مشابه هستند، اما مخصوصاً از نظر زمان برداشت و اندازه میوه با یکدیگر تفاوت دارند. در این مطالعه نشانگرهای SSR قادر به تمایز بین ارقام مختلف نارنگی انشو نشدند که تصور می‌رود که اعضای این گونه از جهش‌های رویشی نقطه‌ای از یک بیوتیپ اولیه ایجاد شده‌اند و از لحاظ ژنتیکی تقریباً مشابه هستند که این جهش‌ها منتج به تنوع در اندازه، رنگ و زمان رسیدن میوه می‌شود.



شکل ۲. تجزیه کلاستر به روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد

گروه دوم (B) بـه دو زیرگـروه E وF بـا ضـریب تـشابه ۰/۶۴ تقسیم شد. اعضای زیرگروه E بـه دو زیرگـروه فرعـی G و H دسته‌بندی می‌شوند. زیرگروه فرعی G نیز دربرگیرنده دو دسـته فرعی اول و دوم با ضریب تشابه ۰/۶۹ است. دسـته فرعـی اول شامل پرتقـال‌هـای نـاول (G8، G9، G10، G11، G12، G13 و G14) می‌باشد که با ضریب تشابه ۱ قرابت بالایی نسبت به هـم دارند و در دسته عقیم (بی‌بـذر) هـستند. بـا توجـه بـه ایـن‌کـه پرتقال‌های ناول دارای قرابت بسیار زیادی نـسبت بـه یکـدیگر هستند می‌توان نتیجه گرفت کـه احتمـالاً ژنوتیـپ‌هـای مـشابه نوسلار همدیگر هستند و یـا موتانـت‌هـایی هـستند کـه در اثـر جهش سوماتیکی به‌وجود آمده‌اند (۱۹ و ۲۳) که با نـشانگرهای SSR استفاده شده در این مطالعه قابـل تمـایز نیـستند. نـاولی و همکاران (۲۲) چندشکلی پایینی در بررسی میان ۳۱ رقم پرتقال با استفاده از نشانگرهای SSR گزارش کردند. پرتقال‌های نـاول در ضریب تشابه ۰/۸۵ از پرتقال‌های والنسیا و گروس سـانگین (G18 و G19) که کم‌بذر هـستند و در ضـریب تـشابه ۰/۸۱ از پرتقال هاملین کم‌بذر (G17) جدا شده‌اند. پرتقال محلی سیاورز (بذردار) در زیرگروه فرعی G – دسته فرعی دوم قـرار گرفـت. برخی مطالعات نشان داده‌اند که پرتقال‌ها به‌طـور ژنتیکـی یـک بیوتیپ هستند. با مطالعه ۱۰ رقم پرتقال مشخص شد که الگوی بانـد کرومـوزومی در ۱۰ کلـون هتروزیگـوس اسـت، ولـی بـا استفاده از نشانگرهای SSR تفاوتی در این ۱۰ رقم دیـده نـشد (۲۲). ایـن نتـایج مـی‌توانـد دلیلـی بـر منـشاء مونوفیلیتیـک (متحدالاصل) پرتقال باشد کـه بـه‌وسـیله جهـش سـوماتیکی و انتخاب کلون برتر دنبال شده است. زیرگروه فرعـی H نـارنگی پیچ را شامل می‌شود. نارنگی پیچ در اصل یـک دورگ ترکیبـی

(کمپلکس) بذردار می‌باشد که از تلاقی (*C. clementina*) × (*C. paradisi* cv. Duncan × *C. reticulata* cv. Dancy) به‌وجود آمده و بر این اساس از گروه نارنگی و پرتقال جدا شده است.

زیرگروه F شامل گریپ‌فروت مارش و تامسون (کم‌بذر) است که ضریب تشابه آنها ۱ می‌باشد. قرابت درون‌گونه‌ای در گریپ‌فروت بسیار بالاست (۳). زمانی که از آیزوزایم‌ها جهت بررسی ۱۳ رقم گریپ‌فروت استفاده شد، هیچ اختلافی میان ارقام دیده نشد (۲۸). فانگ و روز (۶) از نشانگر مولکولی ISSR جهت بررسی هفت رقم گریپ‌فروت استفاده نمودند و گزارش کردند که تنها یک رقم با سایر ارقام اختلاف نشان داده که تحت تأثیر جهش قرار گرفته بود. نتایج مطالعات RAPD و SCAR نشان داد که گریپ‌فروت از تلاقی میان پرتقال و پوملو ایجاد شده است (۱۰ و ۲۱). نتایج به‌دست آمده در این مطالعه نیز این فرضیه را تایید می‌کند و زیرگروه گریپ‌فروت در ضریب تشابه ۰/۶۴ از زیرگروه پرتقال‌ها جدا شده است.

گروه سوم (C)، شامل دو زیرگروه I و J با ضریب تشابه ۰/۵۵ می‌باشد. زیرگروه I خود نیز به دو زیرگروه فرعی K و L تقسیم می‌شود. نارنگی کلمینولس کم‌بذر (از گروه نارنگی معمولی) در زیرگروه فرعی K قرار دارد و با زیرگروه فرعی L که شامل نارنگی‌های بذردار پونکن، اتابکی، محلی و بمی است در ضریب تشابه ۰/۶۵ جدا شده است. نارنگی دانسی (بذردار) در زیرگروه J دسته‌بندی شد.

در میان نارنگی‌ها قرابت ژنتیکی بالایی وجود دارد و نتایج حاصل از نشانگرهای مولکولی این عقیده را تأیید می‌کند (۹ و ۱۷). نارنگی یکی از سه گونه اصلی مرکبات است (۳) و نتایج به‌دست آمده از نشانگرهای مولکولی RAPD و SCAR نتوانست منشأ و والد آن را مشخص نماید (۱۹). به نظر محققین نارنگی‌ها متعلق به یک گونه می‌باشند که شامل ارقام مختلف و تعداد زیادی از دورگ‌ها با تفاوت ژنتیکی نسبت به یکدیگر هستند (۹). در این بررسی نارنگی انشو و نارنگی‌های دیگر در دو دسته متفاوت از یکدیگر قرار گرفته‌اند و در ضریب تشابه ۰/۳۱ این دو دسته از هم جدا شده‌اند.

لمون لیسبون یکی از گونه‌های جنس *Citrus* به تنهایی در گروه چهارم (D) قرار گرفت. در این تحقیق قرابت ژنتیکی کمی (۱۸٪) بین لمون لیسبون (رقمی کم‌بذر) و ارقام کم‌بذر نارنگی و پرتقال به‌دست آمد.

در مجموع، نشانگرهای SSR استفاده شده در این مطالعه قادر به تکثیر توالی هدف در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بودند که احتمالاً به دلیل سطح بالای حفظ توالی آغازگر در ژنوم مرکبات است. طبق گزارش کیجاس و همکاران (۱۵) حفظ توالی آغازگر SSR در بین جنس *Citrus* و جنس‌های وابسته به مقدار زیادی وجود دارد. نشانگرهای هم‌بارز SSR نتوانستند روابط ژنتیکی در گروه نارنگی انشو و گروه پرتقال ناول را بطور واضحی مشخص کنند. از آنجایی که میزان جهش‌های جوانه در مرکبات بالا بوده (۱۹)، و از طرفی نشانگرهای SSR در مسیر تولید مثل جنسی و نوترکیبی ایجاد می‌شوند، بنابراین در درختانی مانند مرکبات که از طریق غیرجنسی تکثیر می‌شوند، این نشانگر قادر به تشخیص جهش نمی‌باشد. به نظر می‌رسد نشانگرهای بارز مانند ISSR و PCR-RFLP که در آنها قدرت تشخیص جهش به فرآیند میوز بستگی ندارد، توانایی بیشتری در تفکیک ارقام داشته باشند. با این وجود، نتایج این تحقیق نشان داد که نشانگرهای SSR در تعیین تنوع ژنتیک بین ارقام نرعقیم، عقیم، کم‌بذر و بذردار گونه‌های مختلف جنس *Citrus* مفید هستند. تجزیه خوشه‌ای منابع ژنتیکی ارقام عقیم و کم‌بذر آنها را به سه گروه تقسیم کرد که بیان‌کننده فراوانی منابع ارقام عقیم در خانواده مرکبات است.

ارقام عقیم، نرعقیم و کم‌بذر در احداث باغ مرکبات جایگاه ارزنده‌ای دارند چرا که ارقام مذکور بی‌بذر یا دارای تعداد اندکی بذر در میوه هستند و بنابراین برای مصرف‌کننده جذابیت دارند. اگرچه نمی‌توان از ارقام نرعقیم جمع‌آوری شده در این آزمایش به‌طور مستقیم و موثری در برنامه‌های انتقال ژن نرعقیمی استفاده نمود، اما به احتمال زیاد در فرایند انتخاب طبیعی قابل استفاده هستند و بنابراین جمع‌آوری و حفظ آنها ضروری به نظر می‌رسد. علاوه بر موارد ذکر شده، در تولید ارقام جدید،

دورگ‌گیری کلاسیک هنوز به عنوان روشی مهم به حساب می‌آید. برای مثال دورگ‌گیری‌های زیادی بین نارنگی انشو به عنوان والد مادر و برخی ارقام مرکبات انجام شده و در حال اجرا می‌باشد و ارقامی مانند Honey 1 و Night honey به‌دست آمده‌اند. هم‌چنین در تکنولوژی امتزاج پروتوپلاست، از ارقام نرعقیم برای تولید ارقام جدید عقیم استفاده می‌شود (۲۹).

تجزیه تنوع ژنتیک ارقام نرعقیم و کم‌بذر در جنس *Citrus*، اطلاعات مفیدی را برای برنامه‌های به‌نژادی، انتخاب و حفظ ارقام فراهم می‌کند. مشخص شده است که تنوع ژنتیکی کافی در برنامه به‌نژادی توسعه ارقام پرمحصول و با کیفیت، ضروری است. بنابراین با شناسایی و جمع‌آوری ژنوتیپ‌های عقیم و کم‌بذر، محقق می‌تواند از منابع ژنتیکی متنوع در برنامه‌های به‌نژادی خود به نحو مؤثرتری بهره‌مند شود.

بررسی با تعداد بیشتری از نشانگرهای SSR و یا استفاده از نشانگرهای مولکولی دیگر مانند AFLP و ISSR ممکن است بتواند در تعیین دقیق‌تر قرابت این ژنوتیپ‌ها کمک نماید.

منابع مورد استفاده

1. Anderson, B. and G. McDonald. 1993. Construction of DNA libraries of A-T rich organisms using EcoRI star activity. *Annual Review of Biochemistry* 211: 325-327.
2. 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 utility simple sequence repeat markers (SSRs). *Theoretical and Applied Genetics* 112: 1519-1531.
3. Barret, H. C. and A. M. Rhodes. 1976. A numerical taxonomic study affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives. *Systematic Botany* 1:105-136.
4. Bassam, B. J., G. Caetano-Anolles and P. M. Greesshoff. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Annual Review of Biochemistry* 19: 680-683.
5. Bigonah, M. 1390. Analysis of genetic relationships between two *Citrus* natural hybrids (Bakraei and Jirofti lime like) with some commercial citrus cultivars using molecular markers. MSc. Thesis, Jiroft Islamic Azad University, Jiroft, Iran
6. Fang, D. Q. and M. L. Roose. 1997. Identification of closely related Citrus cultivars with inter simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics* 95:408-417.
7. Fang, D. Q., M. L. Roose, R. R. Krueger and C. T. Federici. 1997. Fingerprinting trifoliate orange germplasm accessions with isozymes, RFLPs, and inter-simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics* 95:211–219
8. Federici, C. T., D. Q. Fang, R. W. Scora and M. L. Roose. 1998. Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 94:812–822.
9. Filho, H. D. C., M. A. Machado, M. L. P. N. Targon, M. C. P. Q. D. G. Moreira and J. Pompeu. 1998. Analysis of the genetic diversity among mandarins (*Citrus spp.*) using RAPD markers. *Euphytica* 102: 133-139.
10. Gmitter, F. G., J. W. Grosser and A. G. Moore. 1992. Citrus. PP. 335-369. *In*: F. A. Hammerschlag and R. E. Litz (Eds.), Biotechnology of Perennial Fruit Crops. CAB Intl. Pub., Wallingford, Oxon.
11. Golein, B. and B. Adouli. 2011. Citrus 1. Novin Poya Press, Tehran, Iran (In Farsi).
12. Graham, J., R. J. Mc Nicole and J. W. Mc Nicole. 1996. A comparison of methods for the estimation of genetic diversity in strawberry cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 402-406.
13. Gulsen, O. and M. L. Roose. 2001. Chloroplast and nuclear genome analysis of the parentage of lemons. *Journal of the American Society for Horticultural science* 126: 210–215.
14. Herrero, R., M. J. Asins, E. A. Carbonell and I. Noyarro. 1996. Genetic diversity in the Orange subfamily Aurantioideae. I. Intra species and intragenus genetic variability. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 596-606.
15. Kijas, J. M. H., J. C. S. Fowler and M. R. Thomas. 1995. An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within *Citrus* and related species. *Genome* 38: 349-355.
16. Krueger, R. R. and M. L. Roose. 2003. Use of Molecular markers in the management of Citrus germplasm resource. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 128: 827-837.
17. Luro, F., F. Laigrent, J. M. Bove and P. Ollitrault. 1995. DNA amplified fingerprinting, a useful tool for determination of genetic origin and diversity analysis in citrus. *Horticultural Science* 30: 1063-1067.
18. Matsuyama, T., M. Omura and T. Akihama. 2001. Distribution of Rutaceae specific repeated sequences isolated from *Citrus* genomes. *Annals of Botany* 87: 845-849.

19. Moore, G. A. 2001. Oranges and lemons: clues to the taxonomy of Citrus from molecular markers. *Trends in Genetic* 17: 536-540.
20. Murry, M. G. and W. F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 4321-4325.
21. Nicolosi, E., Z. N. Deng, A. Gentile, S. La Malfa, G. Continella and E. Tribulato. 2000. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 1155–1166.
22. Novelli, V. M., M. Cristofani and M. A. Machado. 2000. Evaluation of microsatellite markers in cultivars of sweet orange (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck). *Acta Hort* 535: 47-49
23. Nunes, M. J. C., M. A. Machado, W. M. C. Nunes, M. Cristofani and M. L. P. N. Targon. 2002. Assessment of genetic variability in grapefruits (*Citrus paradisi* Macf.) and pummelos (*C. maxima* (Burn.) Merr.) using RAPD and SSR markers. *Euphytica* 126: 169-176
24. Rima E. M., C. Waffa and D. Fassal. 2011. Characterization and Estimation of Genetic Diversity in Citrus Rootstocks. *Agriculture and Biology* 36: 571–575.
25. Rohlf, F. J. 1990. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.02. Extera Software, New York.
26. Shahsavar, A. R., K. Izadpanah, E. Tafazoli and B. E. Sayed Tabatabaei. 2007. Characterization of citrus germplasm including unknown variants by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Scientia Horticulturae* 112: 310-314.
27. Soost, R. K. and M. L. Roose. 1996. Citrus. PP. 257-323. *In*: J. Janick and J. N. Moor (Eds.), Fruit Breeding, Vol. 1: Tree and Tropical Fruits. John Wiley and Sons Pub., USA.
28. Torres, A. M., R. Soost and U. Diedenhofen. 1978. Leaf isozymes as genetic markers in *Citrus*. *American Journal of Botany* 65: 869-881.
29. Yamamoto, M. and S. Kobayashi. 1995. A cybrid plant produced by electrofusion between *Citrus unshiu* (satsuma mandarin) and (sweet orange). *Journal of Plant Tissue Culture Letters* 12(2): 131-137.