

ارزیابی تنوع ژنتیکی منابع ژرم پلاسما مرکبات با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره (Microsatellite)

* سارویه کیانوش^۱، نادعلی بابائیان جلودار^۲ و اسد اسدی آبکنار^۳

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، آستاند گروه بیوتکنولوژی،

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، آستاندیار موسسه تحقیقات مرکبات کشور، رامسر

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۰/۱؛ تاریخ پذیرش: ۸۷/۷/۲۷

چکیده

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی تیپ‌های طبیعی ناشناخته موجود در کلکسیون شمال کشور، ۳۰ تیپ طبیعی ناشناخته به همراه ۱۶ رقم شناخته شده انتخاب و ۹ نشانگر ریزماهواره‌ای که در مطالعات سایر محققان چندشکلی مناسبی نشان داده بودند، مورد بررسی قرار گرفت. نه جفت آغازگر SSR الگوی مناسب و قابل امتیازدهی برای ۴۶ ژنوتیپ مورد مطالعه تولید کردند. تعداد ۵۴ آلل در مجموع ۹ جایگاه ریزماهواره در ارقام و تیپ‌های مورد بررسی ردیابی شد به طوری که جایگاه CAC33 با ۹ آلل بیشترین و TAA17 با ۴ آلل کمترین تعداد آلل را در بین نشانگرها نشان دادند. با بررسی سطح چندشکلی بیشترین ملاک IC مربوط به نشانگر TAA15 ($PIC=0/782$) و کمترین مقدار آن مربوط به TAA27 ($PIC=0/412$) بوده و میانگین ($PIC=0/632$) برآورده شده است. تجزیه خوشه‌ای به روش Complete و با ضریب تشابه دایس انجام و تیپ‌های مورد بررسی در سه گروه مجزا طبقه‌بندی گردید که تعدادی از تیپ‌های طبیعی ناشناخته با ارقام شناخته شده در یک گروه قرار گرفتند که از آنها می‌توان جهت تعیین روابط ژنتیکی استفاده نمود و همچنین تجزیه خوشه‌ای نشان داد که بیشترین شباهت ژنتیکی مربوط به دو تیپ طبیعی ناشناخته Kc_{33} ، Kc_{34} و کمترین شباهت با سایر ارقام مربوط به تیپ طبیعی ناشناخته Kc_{41} می‌باشد. با بررسی دندروگرام در این تحقیق تأیید می‌شود که شادوک (*Citrus maxima*)، بادرنگ (*Citrus medica*) و نارنگی (*Citrus reticulata*) به عنوان گونه‌های پایه‌ای مرکبات در سه خوشه مجزا قرار گرفته‌اند. هم‌چنین نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که نشان‌گرهای ریزماهواره که قدرت تمایز بالایی از خود نشان داده‌اند در تعیین میزان تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی از کارایی بالایی برخوردار بوده و از میان نشان‌گرهای مورد استفاده TAA41، CAC15، CAC19، TAA15، TAA33، CAC33 و TAA1 جهت شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی ارقام موجود در ژرم پلاسما مرکبات کشور و بهبود مدیریت کلکسیون معرفی و پیشنهاد می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: مرکبات، تنوع ژنتیکی، نشانگرهای SSR، ژرم پلاسما

مقدمه

مرکبات گیاهان درختی، درختچه‌ای و علفی از خانواده *Rutaceae* و زیرخانواده *Aurantioideae* می‌باشند. (سوست و رز، ۱۹۹۶). دیپلوتیدی ($x=2n=2$) قاعده کلی در جنس *Citrus* و جنس‌های وابسته به آن بوده و این ویژگی ژنتیکی طبیعی، تجزیه ژنتیکی را آسان‌تر می‌سازد (واردی و اسپیگل، ۱۹۷۸). کشت وسیع مرکبات، خاصیت آلوگامی، ازدیاد بذری، هم‌باروری بین گونه‌ها، دورگ‌گیری‌های جنسی و جهش‌های فراوان باعث ایجاد تنوع زیادی در میان ارقام مرکبات گردیده است (اسکارانو و همکاران، ۲۰۰۳). شناسایی، حفظ و آگاهی از تنوع ژنتیکی ذخایر توارثی مرکبات زیربنای هر گونه تحقیق کاربردی را فراهم می‌نماید. برای این منظور، تعیین تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای، اولین گام در قابل استفاده کردن منابع ژرم پلاسما می‌باشد (گراهام و همکاران، ۱۹۹۶؛ هررو و همکاران، ۱۹۹۶). نشانگرهای مورفولوژیکی به‌طور سنتی در علوم زیستی مورد استفاده قرار گرفته‌اند، این نشانگرها براساس صفات اندازه‌گیری شده در باغ و یا آزمایشگاه می‌باشند که از یک طرف معیارهای صحیح و بدون ابهام را کمتر ارائه می‌دهد و از طرفی چون مربوط به شرایط رشد گیاه می‌باشد بررسی آنها از نظر هزینه مقرون به‌صرفه نمی‌باشد (کاتو و یوکویاما، ۱۹۹۲).

در طول دهه ۱۹۷۰ و اوایل ۱۹۸۰ استفاده از نشانگرهای بیوشیمیایی رایج گردید. ایزوزایم‌ها، اولین نشانگرهای ژنتیکی بودند که در ژنتیک گیاهی و اصلاح نباتات برای شناسایی ارقام به‌کار گرفته شدند. سیستم شناسایی و استفاده از این نوع نشانگرها، ساده، ارزان و نسبت به نشانگرهای مورفولوژیکی از پایداری بیشتری برخوردار می‌باشند (ریبولد و همکاران، ۱۹۹۸). اما تعداد نشانگرهای بیوشیمیایی کم بوده و از طرفی این نشانگرها تحت‌تأثیر نوع بافت و فیزیولوژی گیاه در زمان‌های مختلف رشد قرار می‌گیرند. به‌دلیل مشکلات فوق در دهه ۱۹۸۰ توجه متخصصان به‌سمت نشانگرهای مولکولی

مبتنی بر DNA جلب گردید. این نشانگرها تفاوت‌های قابل توارث در توالی‌های هم‌ردیف DNA بین افراد را منعکس می‌نمایند (وین، ۲۰۰۳).

ریزماهورها واحدهای نوکلئوتیدی دو، سه، چهار تا ده‌تایی تکرار شونده‌ای هستند که در طول ژنوم موجودات یوکاریوت مانند گیاهان به وفور یافت می‌شوند و به‌علت جهش‌های فراوان از تنوع قابل ملاحظه‌ای در بین افراد یک جمعیت برخوردار می‌باشند. این واحدهای تکراری توسط دو ردیف منحصر به فرد حفاظت شده در دو طرف واحد تکراری محدود شده‌اند (داش و همکاران، ۱۹۹۶؛ داویرولا و همکاران، ۲۰۰۰). بنابراین براساس این توالی‌های حفاظت شده می‌توان آغازگرهای اختصاصی طراحی نمود و نشانگرهای انحصاری مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) برای هر جایگاه به‌دست آورد (نیکولوسی و همکاران، ۲۰۰۰).

تاکنون ریزماهورهای زیادی را در محصولات مختلف گیاهی مانند گندم (اسنیر و همکاران، ۱۹۹۳)، انگور (دانگل و همکاران، ۲۰۰۱)، سویا (رالف، ۱۹۹۰)، گوجه‌فرنگی (اسمولدرز و همکاران، ۱۹۹۷) و گلابی (یاماموتو و همکاران، ۲۰۰۱) شناسایی نموده‌اند. اسکورا و همکاران نشان داده‌اند که ریزماهورها ابزار قوی در شناسایی ژنوتیپ‌ها و نگهداری واریته‌ها به‌شمار می‌روند (اسکورا، ۱۹۸۸). کیجاس و همکاران با تلفیق موفقیت‌آمیز ریزماهورها به نقشه ژنتیکی مرکبات، سودمندی این نشانگر را جهت تجزیه و تحلیل میان دو رگ‌های مرکبات نشان دادند (کیجاس و همکاران، ۱۹۹۷).

کیجاس و همکاران نشانگر مولکولی SSR^۱ را به‌دلیل پلی‌مورفیسم بالا و هم‌بارز بودن به‌عنوان نشانگری مناسب جهت نقشه‌یابی ژنتیکی جنس *Citrus* معرفی نمودند و بیان کردند که این نشانگر می‌تواند سطوح بالای تنوع را آشکار سازد (کیجاس و همکاران، ۱۹۹۵).

آتونبو و همکاران در بررسی‌های خود به کمک نشانگر مولکولی SSR و ویژگی مورفولوژیکی شاخص

می‌تواند از پایه‌های ژنتیکی متنوع که در بانک ژن وجود دارد در برنامه‌های به‌نژادی مرکبات استفاده نماید. استفاده از نشانگرهای چند آلی هم بارز با سطح تنوع بالا و پخش یکنواخت در سراسر ژنوم مانند ریزماهورها برای گونه‌های هتروزیگوت آلوگام بسیار مفید بوده و اجازه تعیین ژنوتیپ هر گیاه را به‌صورت جداگانه می‌دهد (بارکلی و رز، ۲۰۰۰؛ نیکولوسی و همکاران، ۲۰۰۰). در این ارتباط در تحقیق حاضر نشانگرهای SSR که از قدرت تمایز بالایی برخوردار می‌باشند جهت مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی ارقام موجود در ژرم پلاسما مرکبات کشور و بهبود مدیریت کلکسیون معرفی و پیشنهاد می‌شوند.

مواد و روش‌ها

۳۰ تیپ طبیعی ناشناخته موجود در کلکسیون ایستگاه تحقیقات مرکبات کترا و ۱۶ رقم شناخته شده موجود در منطقه شمال کشور جهت بررسی‌های مولکولی جمع‌آوری گردید. ۵ تا ۶ برگ سالم جوان از هر گیاه به‌طور تصادفی جمع‌آوری و تا زمان استخراج DNA در فریزر در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. جهت استخراج DNA ژنومی، ۲ گرم از بافت برگ‌های جمع‌آوری شده در هاون چینی در حضور ازت مایع پودر شد و استخراج DNA به‌روش CTAB انجام گرفت (دویل و دویل، ۱۹۸۷). جهت کنترل خلوص DNA از دستگاه اسپکتروفتومتر با نسبت جذب ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر استفاده گردید. نمونه‌های با نسبت ۱/۸ و یا بیشتر به‌دلیل ناخالصی کمتر جهت انجام آزمایش‌ها انتخاب شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با ۹ جفت آغازگر SSR اختصاصی مرکبات (جدول ۱) که در مطالعات سایر محققان کیفیت آلی مناسب و میزان پلی‌مورفیسم بالایی را بین ارقام مرکبات نشان داده بودند، انجام شد. واکنش‌های PCR با استفاده از مواد تهیه شده از شرکت سیناژن و در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR ۱۰x، ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی‌مولار،

سطح برگ نشان دادند که تلفیق انتخاب براساس نشانگر مولکولی و مرفولوژیکی در بررسی‌های ژنتیکی مرکبات می‌تواند منجر به انتخاب بهتر، کاهش وقت مصرفی و کاهش هزینه در برنامه‌های اصلاح مرکبات گردند (آنتونیو، ۲۰۰۲). اسکارانو و همکاران در بررسی‌های خود جهت شناسایی نهال‌های جنسی با کمک نشانگرهای مولکولی RFLP^۱ و SSR، به ترتیب ۴ و ۵ ژنوتیپ جنسی را مشخص نمودند و همچنین پیشنهاد کردند که نشانگر مولکولی SSR در مقایسه با نشانگر مولکولی RFLP، در تشخیص نهال‌های جنسی از کارایی بالاتری برخوردار می‌باشد (روئیز و همکاران، ۲۰۰۰).

روئیز و همکاران جهت شناسایی نهال‌های جنسی از نوسلار از نشانگر مولکولی SSR و ایزوزایم استفاده نموده و نشان دادند که نشانگر مولکولی SSR در مقایسه با سیستم ایزوزایم از کارایی بالاتری برخوردار بوده و سطوح بالای پلی‌مورفیسم را نشان می‌دهد. همچنین سرعت و دقت روش SSR، استخراج سریع DNA و قابلیت آشکارسازی از طریق رنگ‌آمیزی نترات نقره را از شاخص‌های برتری این نشانگر عنوان کردند (رانگون و همکاران، ۱۹۹۵). فانگ و همکاران در بررسی تنوع ژنتیکی لیمو ترش چینی به کمک نشانگر مولکولی ISSR^۲، ۴۸ جنس لیمو ترش را به ۴ گروه مجزا تقسیم نمودند (فانگ و رز، ۱۹۹۷). فانگ و همکاران به‌منظور بررسی روابط خویشاوندی بین جنس *Citrus* و جنس‌های وابسته از نشانگر ریزماهوره استفاده نمودند. الگوی خویشاوندی ژنتیکی به‌دست آمده توسط آنها با طبقه‌بندی‌های کلاسیک جنس‌های مرکبات مطابقت دارد (فانگ و دنگ، ۲۰۰۳).

بررسی تنوع ژنتیکی و نزدیکی ژنتیکی مرکبات موجود در کلکسیون شمال کشور به‌عنوان گام اولیه و اساسی در شناسایی و ارزیابی ارقام از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد که محقق با صرف حداقل زمان ممکن

1- Restriction Fragment Length Polymorphism
2- Inter Simple Sequence Repeat

۰/۲ واحد آنزیم *Taq DNA Polymerase*، ۱/۲۵ میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت ۵ میلی مولار، مخلوط نوکلئوتیدی (dNTPs) ۱۰ میلی مولار و ۲۵ نانوگرم DNA ژنومی انجام شد. برنامه حرارتی واکنش PCR به شرح زیر می باشد: یک چرخه ۵ دقیقه ای در ۹۴ درجه سانتی گراد و ۳۵ چرخه حرارتی شامل ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و مرحله تکثیر نهایی با ۴ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد. محصول واکنش PCR با استفاده از ژل پلی اکریل آمید ۶ درصد و اسرشت با ۷ مولار اوره تفکیک شد.

سیستم الکتروفورز مورد استفاده در این مطالعه دستگاه Bio Rad و قطر ژل مورد استفاده ۰/۴ میلی متر و ابعاد ژل (۳۸×۳۰) سانتی متر بود. جهت واسرشته سازی محصولات PCR، نمونه ها در حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه قرار داده شد. مقدار ۸ میکرولیتر بافر بارگذاری حاوی فرم آلدئید به ۶ میکرولیتر

محصول PCR واسرشته شده اضافه و داخل چاهکها بارگذاری شد. الکتروفورز نمونه ها در توان ثابت ۱۰۰ وات و در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد انجام شد. زمان الکتروفورز با توجه به وزن باندهای حاصل از PCR برحسب جفت باز، ۹۰-۴۵ دقیقه تشخیص داده شد. رنگ آمیزی ژل با روش نیترا نقره صورت گرفت (باسم و همکاران، ۱۹۹۱). الگوهای نواری حاصل به صورت وجود و یا عدم وجود نوارها (Band) در محصول PCR با اعداد یک و صفر امتیازدهی شدند. تجزیه خوشه ای به روش Complete و با ضریب تشابه دایس انجام شد و ملاک PIC از فرمول $PIC = 1 - \sum P_i^2$ (Pi: فراوانی I امین آلل در یک جایگاه معین) و جهت محاسبه فاصله ژنتیکی از شاخص Nei استفاده گردید (نی، ۱۹۷۲). تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار NTSYS pc ver 2.02 انجام گرفت (رالف، ۱۹۹۰).

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده، توالی نوکلئوتیدی، تعداد آلل های ردیابی شده و دامنه اندازه آللی.

آغازگر	توالی نوکلئوتیدی	تعداد آللی	دامنه اندازه آللی
TAA1	F-GACAACATCAACAACAGCAAGAGC R-AAGAAGAAGAGCCCCATTAGC	۶	۱۴۷-۱۹۰
CAC19	F-ACAACCTTCCAACAAAACCTAGG R-AAGACTTGGTGCGACAGG	۵	۲۴۲-۳۲۰
CAC33	F-GGTGATGCTACTGATGC R-CAATTGTGAATTTGTGATTCCG	۹	۱۲۴-۱۴۷
TAA33	F-GGTACTGATAGTACTGCGGCG R-GCTAATCGCTACGTCTTCGC	۷	۱۱۰-۱۲۴
CAC15	F-TAAATCTCCACTCTGCAAAATG R-GATAGGAGGCGTCGTAGACCC	۵	۱۴۷-۱۹۰
TAA27	F-GGATGAAAAATGCTCAAAATG R-TAGTACCACAGGGAAGAGAGC	۴	۱۹۰-۲۴۲
TAA41	F-AGGTCTACATTGGCATTGTC R-ACATGCAGTGCTATAATGAATG	۵	۱۴۷-۱۹۰
TAA15	F-GAAAGGGTTACTTGACCAGGC R-CTTCCCAGCTGCACAAGC	۸	۱۲۴-۱۹۰
CAC23	F-ATCACAATTACTAGCAGCGCC R-TTGCCATTGTAGCATGTTGG	۵	۲۴۰-۳۲۰
میانگین		۶	-

نتایج و بحث

نتایج این بررسی نشان داد که هر نه جفت نشانگر SSR الگوی نواری مناسب و قابل امتیازدهی برای ۴۶ ژنوتیپ مورد مطالعه تولید نمودند. در (شکل ۱) الگوی نواری مربوط به نشانگر TAA15 دیده می‌شود. تعداد ۵۴ آلل در مجموع ۹ جایگاه ریزماهوره‌ای در ارقام و تیپ‌های تحت بررسی مشاهده می‌شود به طوری که جایگاه CAC33 با ۹ آلل بیشترین و TAA27 با ۴ آلل کمترین تعداد آلل را در بین نشانگرها از خود نشان داده‌اند. متوسط آلل ردیابی شده ۶ برآورد شده است. تعداد آلل و تعداد ژنوتیپ‌های هتروزیگوت در هر مکان دلالت بر وجود آلل چندگانه می‌باشد به عبارت دیگر هتروزیگوت بودن ارقام و تیپ‌های مورد بررسی محرز شده است. در این بررسی تعداد ارقام هتروزیگوت از ۲۱ رقم (۴۳ درصد) در جایگاه TAA27 تا ۴۳ رقم (۹۳ درصد) مربوط به TAA1 متغیر بوده و متوسط تعداد ارقام هتروزیگوت ۳۲ رقم (۶۹ درصد) برآورد شده است. با بررسی سطح چندشکلی ۹ جایگاه ریزماهوره، بیشترین ملاک PIC^۱ مربوط به نشانگر TAA15 (PIC=۰/۷۸۲) و TAA27 دارای کمترین مقدار (PIC=۰/۴۱۲) می‌باشد. متوسط ملاک PIC در این بررسی (PIC=۰/۶۳۲) برآورد شده است. این نتایج با یافته‌های پانگ و همکاران مبنی بر این که نشانگر TAA27 دارای حداقل (PIC=۰/۴۱۲) در بررسی روابط خویشاوندی مرکبات است، مطابقت دارد (پانگ و همکاران، ۲۰۰۳).

تجزیه خوشه‌ای براساس داده‌های مولکولی به روش Complete با ضریب تشابه دایس انجام گردید (شکل ۲). میزان شباهت ارقام و تیپ‌های مورد بررسی براساس ضریب تشابه دایس از ۰/۱۸ تا ۰/۹۷ متغیر بود که نشان‌دهنده تنوع بالا میان ژنوتیپ‌های مورد بررسی می‌باشد. در دندروگرام ترسیم شده (شکل ۲) ارقام و تیپ‌های مورد مطالعه در ضریب تشابه ۰/۳۲ در سه گروه مجزا (C, B و A) قرار گرفتند که هر گروه اصلی با دو زیرگروه مشخص می‌شوند. گروه A را می‌توان به دو

زیرگروه AI و AII تقسیم کرد. زیرگروه AI شامل تیپ‌های طبیعی^۲ Kc_{۴۱}، Kc_{۴۴}، Kc_{۴۵} و Kc_{۴۶} که با هیچ یک از ارقام شناخته شده هم‌گروه نیستند. در این زیرگروه تیپ طبیعی Kc_{۴۱} دارای حداکثر فاصله ژنتیکی می‌باشد (GS= ۰/۴۵). در زیرگروه AII، تیپ‌های طبیعی Kc_{۱۸}، Kc_{۲۰}، Kc_{۲۳}، Kc_{۲۴}، Kc_{۲۶}، Kc_{۲۷}، Kc_{۲۸}، Kc_{۲۹} و Kc_{۳۰} ارقام شناخته شده پرتقال خونی (جبرفتی)، دارابی، گریپ‌فروت، پرتقال خونی (سانگینلا)، پرتقال تامسون، نارنگی کلمانتین و پرتقال محلی (سیاورز) با ضریب تشابه ۰/۵۳ قرار دارند. در این زیرگروه تیپ‌های طبیعی Kc_{۴۳}، Kc_{۳۱} و Kc_{۳۳} رقم شناخته شده پرتقال محلی (سیاورز) و تیپ طبیعی Kc_{۳۳} به ترتیب (GS=۰/۹۶) و (GS=۰/۹۴) دو به دو دارای حداکثر قرابت ژنتیکی می‌باشند. گروه B نیز خود به دو زیرگروه BI و BII تقسیم می‌گردد. زیرگروه BI شامل تیپ‌های طبیعی ناشناخته Kc_{۱۹}، Kc_{۲۲}، Kc_{۲۵}، Kc_{۲۶}، Kc_{۲۷} و Kc_{۲۹} با ضریب تشابه ۰/۴۶ می‌باشد. ارقام شناخته شده ته بشقابی، دارابی و لیموترش با ضریب ۰/۵۷ در زیرگروه BII قرار گرفته‌اند. گروه C نیز شامل دو زیرگروه CI و CII می‌باشد که تیپ‌های طبیعی ناشناخته Kc_{۲۷}، Kc_{۲۳}، Kc_{۲۸} و ارقام شناخته شده لیمو شیرین، بادرنگ و لیمو عمانی با ضریب ۰/۵۵ در زیرگروه CI قرار دارند و در زیرگروه CII، تیپ‌های طبیعی ناشناخته Kc_{۲۶}، Kc_{۲۱}، Kc_{۲۸} و ارقام شناخته شده نارنج، انشو و شادوک با ضریب تشابه ۰/۴۶ قرار دارند. رقم شادوک دارای حداقل قرابت ژنتیکی در این زیرگروه می‌باشد (GS=۰/۵۳). در این زیرگروه بادرنگ و لیمو عمانی دارای حداکثر قرابت ژنتیکی (GS=۰/۸۱) می‌باشند. با بررسی دندروگرام در این تحقیق تأیید می‌شود که شادوک (*C. maxima*)، بادرنگ (*C. medica*) و نارنگی (*C. reticulata*) به عنوان گونه‌های پایه‌ای مرکبات در سه خوشه مجزا قرار داشته به طوری که شادوک در زیرگروه CI، بادرنگ در زیرگروه CII و نارنگی در زیرگروه AII قرار گرفته‌اند.

تعدادی از گونه‌های *Citrus* که احتمالاً دارای والد مادری یکسانی بوده‌اند در یک گروه طبقه‌بندی شده‌اند.

در این رابطه می‌توان به قرار گرفتن شادوک (*C. maxima*)، نارنج (*C. aurantium*)، انشو (*C. unshiu*)، لیمو شیرین (*C. limettioides*)، بادرنگ (*C. medica*) و لیمو عمانی (*C. limonia*) اشاره نمود که یافته‌های این تحقیق با مطالعاتی که توسط نیکولوسی و همکاران انجام شده است، مطابقت دارد (نیکولوسی و همکاران، ۲۰۰۰). قرار گرفتن شادوک (*C. maxima*) و نارنج (*C. aurantium*) در یک گروه با یافته‌های پانگ و همکاران که به کمک نشانگر مولکولی SSR نشان داده‌اند که شادوک (*C. maxima*)، نارنج (*C. aurantium*) و گریپ‌فروت (*C. paradisi*) در یک گروه قرار دارند، مطابقت می‌نماید (پانگ و همکاران، ۲۰۰۳). براساس نتایج تحقیقات پانگ و همکاران بادرنگ (*C. medica*) لیمو شیرین (*C. limettioides*)، لیمو (*C. limon*) در یک کلاستر قرار می‌گیرند که با نتایج این تحقیق که بادرنگ (*C. medica*)، لیمو شیرین (*C. limettioides*) و لیمو عمانی (*C. limonia*) در گروه C قرار گرفته‌اند، مطابقت دارد (پانگ و همکاران، ۲۰۰۳).

هم‌گروه بودن لیمو شیرین (*C. limettioides*)، بادرنگ (*C. medica*) و لیمو عمانی (*C. limonia*) در زیرگروه CII با یافته‌های نیکولوسی و همکاران مبنی بر این‌که بادرنگ (*C. medica*) والد مادری بسیاری از گونه‌های *Citrus* از قبیل لمون (*C. limon*) و لایم (*C. aurantifolia*) می‌باشد، مطابقت دارد. در این زیرگروه تیپ‌های طبیعی ناشناخته Kc_{38} ، Kc_{39} ، Kc_{33} و Kc_{27} قرار گرفته‌اند که قرابت ژنتیکی آنها با گونه‌های یاد شده قابل توجه می‌باشد (نیکولوسی و همکاران، ۲۰۰۰). براساس یافته‌های اسکورا و همکاران (۱۹۸۸)، یاماموتو و همکاران (۲۰۰۲) ارتباط فیلوژنتیکی تنگاتنگی میان گریپ‌فروت (*C. paradisi*) و والد پدری آن پرتقال (*C. sinensis*) گزارش شده است که در این تحقیق نیز

قرار گرفتن گریپ‌فروت (*C. paradisi*) و پرتقال (*C. sinensis*) در زیرگروه AII، با یافته‌های حاضر مطابقت دارد (اسکورا و همکاران، یاماموتو و همکاران، ۲۰۰۲).

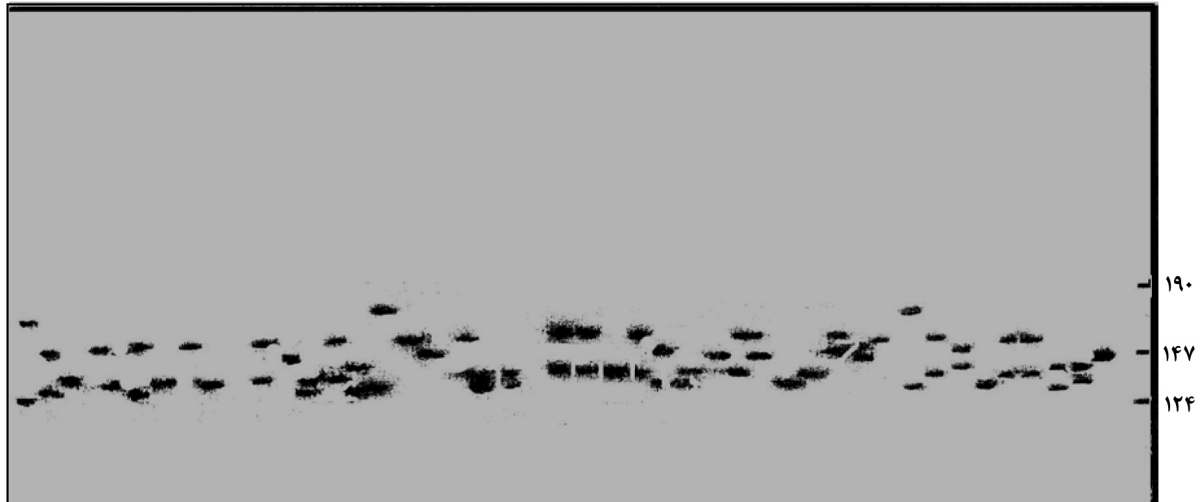
لورو و همکاران در بررسی روابط خویشاوندی در جنس *Citrus* با کمک نشانگر مولکولی STMs (*Sequence Tagged Microsatellite*) به‌طور واضح شناسایی سه گروه اصلی *Orange-mandarin*، *Pumello-grapefruit*، *Lime-citron-lemon* اشاره می‌نماید که با زیرگروه AII، CII، CI در این تحقیق مطابقت و یافته‌های این تحقیق را تایید می‌نماید (لورو و همکاران، ۱۹۹۵). در این تحقیق تایید می‌شود که کاربرد نشانگر مولکولی SSR، تکنیک ساده و سریع بوده و می‌تواند چندشکلی قابل قبولی جهت تمایز و درک بهتر تعیین قرابت ژنتیکی بین ارقام و ژنوتیپ‌ها ارائه نماید (جدول ۲).

از اطلاعات جمع‌آوری شده به کمک نشانگر مولکولی SSR می‌توان به‌عنوان شناسنامه معتبر جهت شناسایی ارقام مشابه ظاهری، ارقام و تیپ‌های جمع‌آوری شده با پیشینه نامشخص طی مدت کوتاه و در هر موقعیت زمانی استفاده کرد و از این نتایج در بهبود اعمال مدیریت کلکسیون ژرم پلاسما مرکبات سود جست. در مجموع با توجه به یافته‌های حاصل از به‌کارگیری نشانگرهای ریزماهوراه‌ای در این تحقیق تصویر جامع‌تری از ساختار ژنتیکی ارقام به‌دست آمده است که استفاده از آنها را برحسب مورد در برنامه به‌نژادی مرکبات ممکن می‌سازد. به‌عنوان مثال در برنامه *Cross breeding* (دورگ‌گیری) استفاده از ژنوتیپ‌ها با فاصله ژنتیکی زیاد توصیه می‌شود. از جمع‌بندی نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های SSR چنین استنباط می‌شود که از میان نشانگرهای ریزماهوراه‌ای مورد استفاده در این تحقیق TAA41، CAC15، CAC19، TAA15، TAA33، CAC33 و TAA1 با توجه به هتروزیگوتی بالا، تعداد آلل‌های ردیابی شده و تعیین ملاک PIC (با قدرت تمایز بالا) جهت مطالعه و بررسی ارقام موجود در کلکسیون مرکبات کشور پیشنهاد و معرفی می‌شوند.

جدول ۲- آغازگرهای مورد استفاده، تعداد و درصد ارقام هتروزیگوت و ملاک PIC در ژنوتیپ‌های مورد بررسی.

آغاز گر	تعداد ارقام هترو زیگوت	درصد هترو زیگوتی	PIC
	۴۳	۹۳	۰/۷۶۲
TAA1	۴۱	۸۹	۰/۷۵۷
CAC19	۲۸	۶۰	۰/۶۷۴
CAC33	۴۱	۸۹	۰/۶۸۵
TAA33	۳۳	۷۱	۰/۵۷۱
CAC15	۲۱	۴۵	۰/۴۱۲
TAA27	۲۶	۵۶	۰/۵۲۹
TAA41	۳۴	۷۳	۰/۷۸۲
TAA15	۲۲	۴۷	۰/۴۶
CAC23	-	-	۰/۶۳۲
میانگین			

۴۶ ۴۵ ۴۴ ۴۳ ۴۲ ۴۱ ۴۰ ۳۹ ۳۸ ۳۷ ۳۶ ۳۵ ۳۴ ۳۳ ۳۲ ۳۱ ۳۰ ۲۹ ۲۸ ۲۷ ۲۶ ۲۵ ۲۴ ۲۳ ۲۲ ۲۱ ۲۰ ۱۹ ۱۸ ۱۷ ۱۶ ۱۵ ۱۴ ۱۳ ۱۲ ۱۱ ۱۰ ۹ ۸ ۷ ۶ ۵ ۴ ۳ ۲ ۱



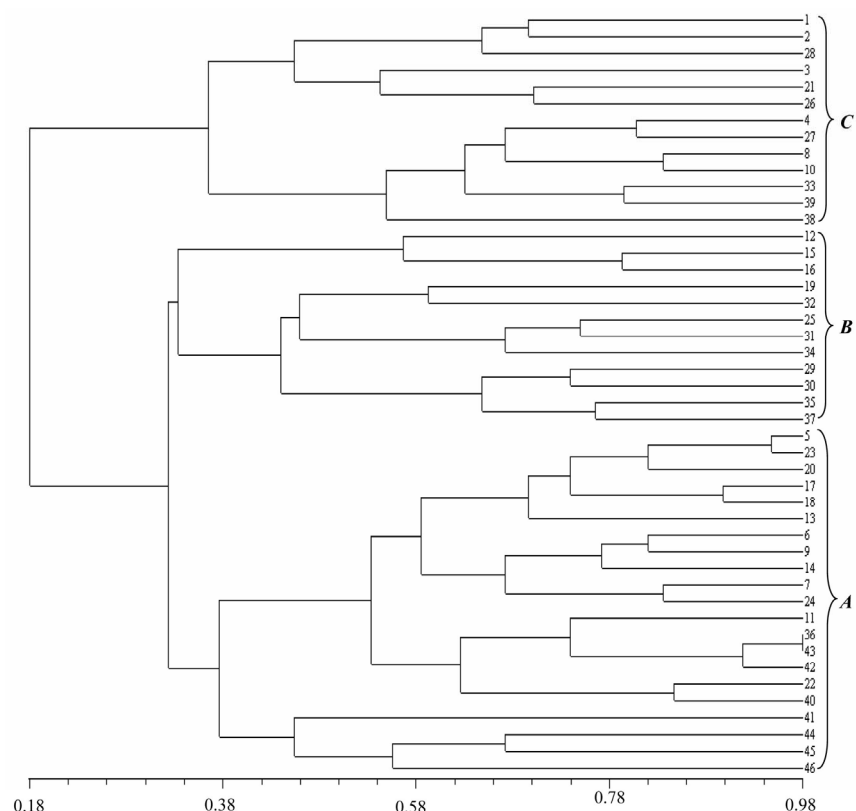
شکل ۱- محصولات تکثیری ۴۶ ژنوتیپ با جفت آغازگر TAA15 در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز VIII ladder 0.019-1.11 Kbp (اندازه

باندهای تکثیر شده در سمت راست آورده شده است) ۱- نارنج ۲- انشو ۳- شادوک

۴- لیمو شیرین ۵- پرتقال محلی ۶- پرتقال تامسون ۷- دارابی (۱) ۸- بادرننگ ۹- پرتقال خونی (سانگینلا)

۱۰- لیمو عمانی ۱۱- پرتقال خونی (جیرفتی) ۱۲- لیمو ترش ۱۳- کلمانتین ۱۴- گریپ فروت ۱۵- دارابی (۲)

۱۶- ته بشقابی و (Kc_{۱۷}-Kc_{۴۶}) - تیپ‌های طبیعی ناشناخته موجود در کلکسیون مرکبات کترا.



شکل ۲ - تجزیه کلاستر براساس روش Complete و ضریب تشابه دایس.

منابع

1. Antoni, R.J. 2002. Novel genetic mapping tools in plants: SNPs and LD-based approaches. *Plant Sci.* 162: 329-33.
2. Barkely, N.A., and Roose, M.L. 2000. A sssessing genetic diversity in *Citrus* by utilizing molecular markers. *Botany and Plant sciences*, 6: 126-127.
3. Bassam, B.J., Caetano-Anolles, G., and Gresshoff, P.M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamid gels. *Anal. Biochem.* 19: 680-683.
4. Dash, S.K., Sigh, J., Tripathy, M., and Mishra, D. 1996. Assosiation of quantitative traits and path analysis in medium landrice. *Environment and Ecology*, 14: 99-102.
5. Dangle, G.S., Mendum, M.L., and Prins, B.H. 2001. Simple Sequence repeat analysis of a clonally propagated species: A tool for managing a grape germplasm collection. *Genome*, 44: 432-438.
6. Davierwala, A.P., Chowdari, K.V., Reddy, A.P., Kumar, S., Ranjekar, P.K., and Gupta, P.K. 2000. Use of three different marker systems to estimate genetica, 108: 269-284.
7. Doyle, J.J., and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantines of fresh leaf tissue . *Phyto chemical Bullten*, 19: 11-15.
8. Fang, D.Q., and Roose, M.L. 1997. Identitication of closely related *Citrus* cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor. Appl. Genet.* 95: 408-417.
9. Graham, J., McNicol, R.J., and McNicol, J.W. 1996. Acomparision of methods for the estimation of genetic diversity in strawberry cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 93: 402-406.
10. Herrero, R., Asins, M.J., Carbonell, E.A., and Noyarro, I. 1996. Genetic diversity in the Orange subfamily Aurantioideae. I. Intra species and intragenus genetic variability. *Theor. Appl. Genet.* 92: 596-606.
11. Kato, K., and Yokoyama, H. 1992. Geographical variation in heading characters among wheat landraces, (*Triticum aestivum* L.) and its implication for their adaptability. *Theor. Appl. Genet.* 84: 259-265.

- 12.Kijas, J.M.H., Flower, J.C.S., and Thomas, M.R. 1995. An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic analysis within *Citrus* and related species. *Genome*, 38: 349-355.
- 13.Kijas, J.M.H., Thomas, M.R., Flower, J.C.S., and Roose, M.L. 1997. Integration of trinucleotide microsatellites in to a linkage map of *Citrus*. *Theor. Appl. Genet.* 94: 701-706.
- 14.Luro, F., Laigrent, F., Bove, J.M., and Ollitrault, P. 1995. DNA amplified fingerprinting a useful tool for determination of genetic origin and diversity analysis in *Citrus*. *Hort. Sci.* 30: 1063-1067.
- 15.Nei, M. 1972. Genetic distance between population. *Am Nat.* 106: 283-292.
- 16.Nicolosi, E., Deng, Z., Gentile, A., and La Malfa, S. 2000. Citrus phylogeny and genetic origin of important species as in vestigated by molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 100: 1155-1166.
- 17.Pang, X., and Deng, X. 2003. Phylogenetic relationships among *Citrus* and its relatives as revealed by SSR markers. *Acta Genetica Sinica.* 30: 81-87.
- 18.Raybould, A.F., Mogg, R.J., Aldam, C., Gildon, C.J., Thorpe, R.S., and Clarke, R.T. 1998. The genetic structure of sea beat (*Beta vulgaris* ssp . maritime) population, III. Detection of isolation by distance at micro satellite loci. *Heredity*, 80: 129-132 .
- 19.Rohlf, F.J. 1990. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariat Analysis system, version 2.02. Exeter Software, New York.
- 20.Rongwen, J., Akaya, M.S., Bhagwat, A.A., Lavi, U., and Cregan, P.B. 1995. The use of microsatellite DNA markers for doybean genotype identification. *Theor. Appl. Genet.* 90: 43-48.
- 21.Ruiz, C., Berto, M.P., and Asins, M.J. 2000. A quick methodology to identify sexual seedlings in *Citrus* breeding programs using SSR markers. *Euphytica*, 112: 89-94.
- 22.Scarano, M.T., Tusa, N., Abbate, L., Lucretti, S., Nardi, L., and Ferrante, S. 2003. Flow cytometry, SSR and modified AFLP for the identification of Zygotic plantlets in back crosses between Femminello lemon cybrids (2n and 4n) and a diploid clon of Femminello lemon (*Citrus limon* L . Burn , F.) tolerant to malsecoo disease. *Plant Science*, 164: 1009-1017.
- 23.Scora, R.W. 1988. Biochemistry, taxonomy and evolution of modern cultivated *Citrus*. In: Goren R. and K. Mendel (eds.). *Proc. VI. Int. Soc. Citricult*, 1: 277-289.
- 24.Smulders, M.J.M., Brede meijer, G., Rus-Kortekaas, W., Arens, P., and Vosman, B. 1997. Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphism among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species *Theor. Appl. Genet.* 97: 264-272.
- 25.Snior, M.L., and Henu, M. 1993. Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the repeats using a CT primer. *Genome*, 36: 884-889.
- 26.Soost, R.K., and Roose, M.L. 1996. *Citrus*. In: *Fruit breeding. vol.1: Tree and Tropical Fruits* Janick, J., and Moore, J.N. (eds.). Chapter, 6, Wiley and Sons, Inc, 632p.
- 27.Vardi, A., and Spiegel-Roy, P. 1978. *Citrus* breeding, taxonomy and the species problem. *Proc. III. Int. Soc. Citriculture*, 1: 51-57.
- 28.Vienne, D. 2003. Molecular markers in plant genetics and biotechnology. *Science Pub.* 235p.
- 29.Yamamoto, T., Kimur, T., Saw amura, Y., Kotobuki, K., Ban, Y., Hayashi, T., and Matsuta, N. 2001. SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. *Theor. Appl. Genet.* 102: 865-870.

Evaluation of genetic diversity in *citrus* germless using microsatellite (SSR) markers

***S. Kianoush¹, N. Babaeian Jelodar² and A. Asadi Abkenar³**

¹Former M.Sc. student, Dept. of Biotechnology, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran, ²Professor, Dept. of Biotechnology, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran,

³Assistant Prof., Citrus Research Center of Country, Ramsar, Iran

Abstract

Genetic characterization and classification of germless are very important in breeding programmers. In this study 46 *Citrus* genotypes of Iran were classified based on data obtained from microsatellite marker banding pattern, using the Complete Cluster analysis. In this research nine pair of SSR primers generated a total of 54 alleles. The CAC33 with 9 alleles had the highest and TAA17 with 4 alleles had the lowest number of alleles among the SSR markers employed. The number of heterozygote varieties varied from 21 in TAA27 and 43 in TAA17 loci. The highest PIC value was related to TAA15 (PIC=0.782) and the lowest was for TAA27 (PIC=0.412). Cluster analysis divided the genotypes into 3 clusters. The genotype Kc₃₆ was very similar to Kc₄₃ and both of them were grouped in the same cluster and the least similarity with other types was related to the genotype Kc₄₁. Also (*Citrus maxima*), (*Citrus medica*) and (*Citrus reticulata*) were placed in three groups. Based on results obtained from this experiment, it was inferred that among the studied SSR marker employed, TAA41, CAC15, CAC19, TAA15, TAA33, CAC33 and TAA1 revealed high distinct polymorphism. From the result of this study we suggest that these markers can be used for detecting genetic variability on *Citrus* germplasm.

Keywords: *Citrus*; Genetic diversity; SSR markers; Germplasm