جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد
مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۵ شماره ٤ صفحه های ۱۷۷ تا ۱۸۸ (۱۳۸۳)

ارزیابی گوناگونی ژنتیکی انواع لیمو (لایم ولمون) در استان فارس با استفاده ازویژگی های مورفولوژیکی و نشانگرهای مولکولی ISSR[1]

EVALUATION OF GENETIC VARIABILITY OF LIMES AND LEMONS IN THE FARS PROVINCE BY MORPHOLOGICAL TRAITS AND INTER- SIMPLE SEQUENCE REPEAT (ISSR) MARKERS

علیرضا شهسوار، کرامت اله ایزد پناه، عنایت اله تفضلی و بدرالدین ابراهیم سید طباطبائی[2]

چکیده

برای شناسایی و تعیین روابط فیلوژنتیکی ۱۸ نمونه لیمو شامل لایم [*Citrus aurantifolia* (Chrism.) Swing.] و لمون [*Citrus limon* (L.) Burm. f.] در فارس از نشانگرهای مولکولی ISSR استفاده گردید. به این منظور DNA نمونه ها در واکنش PCR با استفاده از ٦ آغازگر افزایش یافت. در کل ۳۳۳ نوار به دست آمد که تعداد ۲۱۵ نوار آن چند شکل بود. رسم دندروگرام به روش UPGMA انجام شد. براساس این روش، ۱۸ نمونه مورد آزمایش در سه گروه اصلی دسته بندی شدند. گروه یک تنها شامل نژادگان[3] D3 بود که از داراب جمع آوری شده بود. این نژادگان با ضریب تشابه ۰/٥٦ از دو گروه دیگر جدا شد. با توجه به تفاوت های زیاد مولکولی و مورفولوژیکی، به نظرمی رسد که این نمونه, لایم یا لمون نیست. دو گروه دیگر یکی شامل لمون ها و دیگری لایم ها است. گروه لمون ها در بر گیرنده سه نژادگان G24 ('لیمو لیسبون')، D5 ('لیمو سنگی')، و G30 ('لیمو گلابی' یا 'لامپی') می باشد. لیمو 'لیسبون' یک لمون شناخته شده است و با قرار گرفتن دو نژادگان دیگر در کنار آن احتمال لمون بودن آن هازیاد است. گروه سوم شامل انواع مختلف لایم می باشد. این گروه دو زیرگروه اصلی دارد که یکی شامل سه نژادگان ناشناخته D1، D2 و D9 و دیگری شامل ۱۱ نژادگان است که از بین این ها D7 ('لیمو خیاری') با ضریب تشابه ۰/۷۹ از ۱۰ نژادگان دیگر متمایز است. شکل میوه این نژادگان نیز با سایر لیمو ها تفاوت اساسی دارد. لیموی 'تاهیتی' نیز با ضریب تشابه ۰/۸۲ از سایر لیموها جدا شد. ۹ نژادگان باقیمانده ارتباط نزدیکی هم از نظر مورفولوژیکی و هم مولکولی با ضریب تشابه ۰/۸٥ تا ۰/۹٦ با یکدیگر نشان می دهند. در بین آن ها نژادگان های شناخته شده لیموی آب داراب و جهرم وجود دارد. برخی از این نژادگان ها از جمله G31 و G14 ویژگی های ژنتیکی مطلوبی دارند که می توانند در برنامه های بهنژادی مورد توجه قرار گیرند.

واژهای کلیدی: گوناگونی ژنتیکی، لیمو، مرکبات, نشانگرهای ISSR.

مقدمه

مرکبات از مهمترین محصول های نیمه گرمسیری دنیا می باشند. در کشور ما نیز مرکبات از جایگاه ویژه و ارزش اقتصادی بالایی برخوردار هستند. آب و هوای ایران به ویژه در استان های جنوبی، شرایط مطلوبی را

۱- تاریخ دریافت: ۸۳/٤/۱۳ تاریخ پذیرش: ۸۳/۱۲/۱۲

۲- به ترتیب دانشجوی دکتری بخش علوم باغبانی و استادان بخش گیاهپزشکی وعلوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز, شیراز و دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان, اصفهان, جمهوری اسلامی ایران.

۳- Genotype

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

برای کاشت مرکبات فراهم کرده است که همین مورد باعث ایجاد گوناگونی زیادی در مرکبات ایران شده است. افزون بر این، سازگاری آمیزشی[۱] بین جنس *Citrus* و جنس های مرتبط با آن و همچنین سازگاری بین گونه ها، زیاد بودن جهش جوانه[۲]، وجود پدیده نامیزیدن[۳] در برخی گونه ها، دورگه های طبیعی و مصنوعی زیادی که در این گیاه ایجاد شده و تاریخچه طولانی کشت و پراکندگی وسیع آن، از دیگر عوامل ایجاد کننده گوناگونی در این گیاه می باشد. همه این عوامل باعث شده که آرایه بندی[٤] و تبارزایی[٥] مرکبات بسیار پیچیده و مشکل باشد (۱۵, ۳). مرکباتی که با بذر افزوده می شوند از جمله انواع لایم و لمون[٦]، بیشتر دچار دگرگونی می شوند. از این رو پدیدگان های زیادی وجود دارند که شباهت ها و اختلاف های ظاهری آن ها با گونه های شناخته شده مانع از طبقه‌بندی دقیق و تعیین رابطه تبارزایی آن ها را مشکل می سازد. در گذشته، بیشتر از نشانگرهای مورفولوژیکی[۷] برای تشخیص استفاده می شد اما این نشانگرها به دلیل تاثیر پذیری زیادی که از محیط دارند، چندان دقیق نیستند (۳, ۱۵). نشانگرهای بیو شیمیایی[۸] مثل ایزوزیم ها[۹] از دقت بیشتری برخوردار هستند (۸) اما این دسته از نشانگرها بیشتر برای تشخیص ارقامی که به روش جنسی افزوده شده اند مفید هستند و نمی توانند ارقامی را که از جهش های بدنی تولید شده اند، تشخیص دهند. تعداد این نشانگرها نیز بسیار محدود است. (٤ , ۸ , ۱۷).

در سال های اخیر با پیشرفت هایی که در زمینه زیست شناسی مولکولی ایجاد شده، از نشانگرهای مولکولی[۱۰] برای تشخیص انواع مرکبات استفاده شده است. نشانگرهای DNA از نظر پدیدگانی خنثی بوده، فراوانی زیادی دارند و کمتر تحت تاثیر عوامل محیطی می باشند (۳). گروهی از این نشانگرها مثل RAPD[۱۱]، SSR[۱۲]، AFLP[۱۳] که استوار بر واکنش زنجیره ای پلیمراز[۱٤] (PCR) هستند، بیشتر مورد قبول می باشند (۱۰). این نشانگرها هر کدام معایب و مزایای مربوط به خود را دارند. برای مثال، نشانگرRAPD اگر چه روشی است خیلی سریع و ساده اما تکرار پذیری آن کم است (۷, ۲۲). نشانگرAFLP تکرارپذیری خوبی دارد ولی انجام آن به نسبت مشکل و پر هزینه است (۹, ۲۳). نشانگرهای SSR که به ریزماهواره[۱۵] نیز معروف هستند، اختصاصی بوده و چند شکلی[۱٦] بالایی دارند، از تکرار پذیری خوبی برخوردار هستند اما برای طراحی آغازگر[۱۷] باید از ترادف ژنومی[۱۸] به میزان کافی آگاه بود. بنابراین انجام آن مشکل بوده و از آن برای گونه هایی که ارزش اقتصادی بالایی دارند، استفاده می شود، (۹, ۱۱). درگزینش یک نشانگر مولکولی موارد مهمی مثل تکرار پذیری، سادگی و کم هزینه بودن آن را باید در نظر داشت. از سال ۱۹۹٤ میلادی نشانگرهای مولکولی جدیدی به نام ISSR[۱۹] مطرح شدند که می توانستند هدف های یاد شده را به خوبی بر آورده سازند (۲٤) و بیشتر مزایای هر سه نشانگر را دارا می باشند (۱٦). این نشانگرها استوار بر PCR بوده و می توانند قطعه هایی از DNA که بین دو ریزماهواره یکسان قرار گرفته اند را افزایش دهند. نشانگرهای ISSR به عنوان آغازگر از یک ریزماهواره که خود از ۱٦ تا ۲۵ جفت باز[۲۰] تشکیل شده است استفاده می کنند. این آغازگر با ۲ تا ٤ نوکلئوتید به

۱- Cross-compatibility
۲- Bud mutation
۳- Apomixis
٤- Taxonomy
٥- Phylogeny
٦- Lime and lemon
۷- Morphological markers
۸- Biochemical markers
۹- Isozymes
۱۰- Molecular markers
۱۱- Random Amplified Polymorphic DNA
۱۲- Simple Sequence Repeat
۱۳- Amplified Fragment Length Polymorphism
۱٤- Polymerase Chain Reaction
۱۵- Microsatellites
۱٦- Polymorphism
۱۷- Primer
۱۸- Genomic sequences
۱۹- Inter Simple Sequence Repeat
۲۰- Base pair

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

انتهای ´۳ یا ´۵ مولکول DNA می چسبد و آن را می افزاید (۲، ۳، ٤، ٦). نشانگرهای ISSR می توانند افرادی که نسبت نزدیکی بالایی با هم دارند را به سرعت تشخیص دهند (٤، ٥، ٢٤). نشانگرهای ISSR در رابطه با شناسایی و تفکیک انواع مرکبات نیز مورد استفاده قرار گرفته اند. فنگ و همکاران[۱] (٥) در یک بررسی روی نارنج سه برگ[۲]، ایزوزیم ها، نشانگرهای RFLP و ISSR را باهم مقایسه کردند. همچنین فنگ و رز[۳] (٤) نشانگرهای ISSR را به طور وسیعی در تشخیص و جداسازی ارقام نزدیک به هم مرکبات به کار گرفتند. فنگ و همکاران (۳) در پژوهش دیگری ارتباط تبارزایی بین ٤٦ نمونه مرکبات را با استفاده از نشانگرهای ISSR مشخص کردند. در حال حاضر در مرکبات جنوب فارس نمونه هایی وجود دارند که طعم آن ها اسیدی است و شباهت هایی به لایم ها یا لمون ها دارند ولی تفاوت هایی نیز به ویژه از نظر مورفولوژیکی با نمونه های شناخته شده نشان می دهند.

در این بررسی سعی شده است با استفاده از نشانگرهای ISSR، این نمونه های ناشناخته از هم جداسازی و ارتباط آن هابا ارقام شناخته شده مثل لیموی آب و 'لیموی لیسبون' مشخص گردد.

مواد و روش ها

مواد گیاهی

برگ های جوان که پهنک رشد یافته داشتند از ۱۸ نمونه لیموی مناطق مختلف شهرستان های داراب و جهرم واقع در جنوب استان فارس در فصل بهار جمع آوری شدند. این نمونه ها همگی میوه هایی با طعم ترش داشتند و هر کدام شباهت هایی با لایم ها و لمون ها نشان می دادند. از بین این ۱۸ نمونه، لیموی آب داراب و لیموی آب جهرم[٤]، 'لیموی لیسبون'[٥] و 'تاهیتی لایم'[٦] شناخته شده بودند اما بقیه نا مشخص بوده و برخی از نظر مورفولوژی میوه، شکل هایی غیر معمول داشتند (شکل۱). این درختان بیشتر به صورت پراکنده به تعداد کم در باغ های مناطق یاد شده وجود داشتند و تنها برخی از آن ها مانند 'لیموی خیاری' مورد توجه باغداران قرار گرفته و افزایش یافت و محصول های آن ها مورد استفاده قرار می گیرد. جدول ۱ فهرستی از این گیاهان را با کدهایی که به آن‌ها اختصاص داده شده نشان می دهد. نمونه های برگی پس از انتقال به آزمایشگاه ابتدا شسته شده و سپس با استفاده از نیتروژن مایع به سرعت منجمد گردیده و در ۷۰- درجه سانتیگراد تا زمان استخراج DNA نگهداری شدند.

استخراج DNA و واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)

برای استخراج DNA از بافر CTAB[۷] و روش تغییر یافته موری و تامسون[۸] (١٤) استفاده گردید. شش آغازگرISSR (جدول ۲) برای انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) (۳، ٤، ٥) مورد استفاده قرار گرفت. بر اساس پژوهش های فنگ و همکاران (۳، ٤، ٥) این آغازگرها برای مرکبات مناسب تشخیص داده شده اند. این آغازگرها از آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه بریتیش کلمبیای کانادا خریداری شدند. هر ۲۰L μ واکنش شامل ۱۰X بافر PCR [10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 2 mM

۱- Fang and *et al.*
۲- *Poncirus trifoliata* (L.)
۳- Fang and Roose
٤- *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing.
٥- *Citrus limon* (L.) Burm.f.
٦- *Citrus latifolia* Tan.
۷- Hexadecyltrimethylamonium bromide
۸- Murray and Thompson

جدول ۱- مشخصات فنوتیپی نمونه های مرکبات مورد استفاده در این بررسی.

Table 1. Phenotypic characteristics of citrus samples used in this study.

نام علمی Scientific name	نام محلی Local name	ویژگی Feature	منطقه Location	کد گیاه Plant code
Citrus sp.	ندارد None	بدون تیغ, قسمت انتهای میوه مانند پستانک No thorns, distal e nd of the fruits nipple-like	داراب Darab	D1
Citrus sp.	ندارد None	میوه به صورت خوشه ای، پوست شیار شیار Fruits in clusters, skin with grooves and ridges	داراب Darab	D2
Citrus sp.	ندارد None	پوست میوه ناصاف, تیغ ها بلند, گوشواره ها خیلی کوچکند یا اصلاً وجود ندارند. Fruit skin rough, thorns long, petiole wings small or none	داراب Darab	D3
Citrus sp.	لیمو سنگی (Rock lemon)	میوه ها به نسبت کشیده, گلبرگ ها بنفش رنگ Fruits somewhat oblong, petals purple	داراب Darab	D5
Citrus sp.	لیمو خیاری (Cucumber lime)	میوه ها خیلی کشیده و دراز، غنچه ها بنفش رنگ Fruits oblong, blossoms purple	داراب Darab	D7
Citrus aurantifolia	لیموی آب داراب (Darab juice lime)	میوه ها گرد و کوچک, لیموی آب معمولی Fruits round and small, common juice lime	داراب Darab	D8
Citrus sp.	ندارد None	میوه ها شیاردار, حاشیه برگ ها دندانه دار، تیغ ها بلند Fruits with grooves, leaf margins serrated, thorns long	داراب Darab	D9
Citrus sp.	لیموی بی تیغ (Thornless lime)	میوه ها شبه D8 ، درخت بدون تیغ Fruits similar to D8, tree is thornless	داراب Darab	D12
Citrus latifolia	ندارد None	شکل درخت شبیه لیمو شیرین، گوشواره ها بزرگ و میوه ها درشت Tree similar to sweet lime, petiole wing large, fruit large	داراب Darab	D13
Citrus sp.	ندارد None	میوه کمی کشیده، درشت تر از لیموی آب معمولی Fruit slightly oblong, larger than common lime	جهرم Jahrom	G14
Citrus sp.	ندارد None	میوه شبیه لیمو شیرین اما طعم آن ترش ، میوه ها، برگ ها و گل ها درشت، غنچه ها ارغوانی Fruit similar to sweet lime but sour, fruit, leaf and flower large, blossoms purple	جهرم Jahrom	G15
Citrus sp.	ندارد None	میوه ها به نسبت کشیده، غنچه ها ارغوانی Fruit slightly oblong, blossom purple	جهرم Jahrom	G16
Citrus limon	ندارد None	میوه ها کشیده، تیغ ها کوچک، گوشواره ها کوچکند یا اصلاً وجود ندارند. Fruit oblong, thorns small, petiole wings small or absent	جهرم Jahrom	G24
Citrus aurantifolia	لیموی آب جهرم(Jahrom Juice lime)	میوه ها گرد و کوچک، لیموی آب معمولی Fruit smal and round, common juice lime	جهرم Jahrom	G25
Citrus sp.	ندارد None	میوه ها درشت ، گرد، پوست میوه نازک (شبیه لیموشیرین) Fruit large, round, fruit skin thin (like sweet lime)	جهرم Jahrom	G26
Citrus sp.	لیمو 'لامپی' (Pear-shaped lemon)	میوه ها درشت، گلابی شکل، غنچه ها بنفش رنگ Fruit large, pear shaped, blossoms purple	جهرم Jahrom	G30
Citrus sp.	لیموی دیررس(Late ripening lime)	میوه ها کشیده، دیررس Fruit oblong, late ripening	جهرم Jahrom	G31
Citrus sp.	شاه لیمو (King lime)	میوه به نسبت کشیده، پوست میوه ناصاف و ضخیم تر از لیموی آب Fruit slightly oblong, fruit skin rough, thicker than lime.	داراب Darab	D35

[$MgCl_2$، ۲۰۰M μ هر یک از چهار dNTP (شرکت Fermentas)، ۱M μ آغازگر، ۱ واحد آنزیم *Taq* پلیمراز (شرکت Roche)، ۲٪ فرمامید و ۱۰ng DNA بود. هر آمیخته واکنش با ۳۰L μ روغن معدنی پوشانده شد. برای افزایش DNA از دستگاه ترموسایکلر[۱] اپندورف (شرکت Eppendorf) با برنامه زیر استفاده گردید: یک چرخه به مدت ۵ دقیقه در ۹٤ درجه سانتیگراد، ٤۰ چرخه هر یک شامل ۹٤ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ٤۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه و در پایان یک چرخه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه. DNA افزایش داده شده در واکنش PCR تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردید. برای جدا سازی محصول PCR از دستگاه الکتروفورز ترادف یاب Sequi-Gen GT (شرکت BioRad) با صفحه ای به ابعاد ۰/٤* ۳۸۰ *۳۰۰ میلی متر و ژل آکریل آمید ٦ درصد که دارای اوره ۷ مولار بود استفاده گردید. جهت تشخیص نوار ها روش رنگ آمیزی با نیترات نقره و کربنات سدیم برابر با روش باسام و همکاران[۲] (۱) همراه با تغییرهایی مورد استفاده قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل داده ها

نوارهای مشاهده شده در ژل بر اساس بودن (کد ۱) و یا نبودن (کد ۰) قطعه های چند شکل در نمونه‌های مورد آزمایش برای هر آغازگر ارزیابی شدند. پس از آن ماتریس تشابه[۳] بر اساس ضریب تشابه ساده (SM)[٤] (۱۹) تشکیل شده و آزمون مانتل[۵] انجام گرفت و ضریب های کوفنوتیکی محاسبه گردید. دندروگرام[٦] براساس این ضریب به روش UPGMA و به کمک نرم افزار NTSYS (ویرایش ۲/۰۲) (۱۸) رسم شد. انتخاب ضریب تشابه ساده (SM) به این دلیل است که می تواند هم تغییرهای درون گروهی و هم بین گروهی را تخمین بزند (۱۲).

نتایج و بحث

میزان چند شکلی نوارهای ISSR

شش آغازگر به کار رفته با ۱۸ نمونه DNA مورد آزمایش، نواربندی مشخصی را با درجه‌های مختلف چند شکلی نشان دادند (جدول ۲). تعداد کل نوارها از ٤۱ نوار مربوط به آغازگر شماره ۱۱ تا ۷۰ نوار مربوط به آغازگر شماره ۳ متغیر بود. میانگین تعداد نوارها ۵۵ بود. بیشترین میزان چند شکلی با آغازگر های شماره ۱ و۳ ایجاد شد و کمترین آن با آغازگر شماره ۲ ایجاد گردید. در مجموع تعداد کل نوارهای به دست آمده از ٦ آغازگر ۳۳۳ و تعداد کل نوارهای چند شکل ۲۱۵ بود (جدول ۲). اندازه قطعه های افزوده شده بین ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز بود اما ناحیه قابل ارزیابی بین ۱۵۰ تا ۲۰۰۰ جفت باز تشخیص داده شد (شکل ۲). یکسان بودن نوارهای به دست آمده از تکرار ۱۸ نمونه لیمو با یک پرایمر، بیانگر تکرارپذیری بالایی نشانگرهای ISSR بود.

۱- Thermocycler ۲- Bassam *et al.* ۳- Similarity matrix ٤- Simple matching
۵- Mantel test ٦- Dendrogam

جدول ۲- آغازگرهای ISSR استفاده شده در این آزمایش و تعداد قطعه های چند شکل به دست آمده از آن ها.

Table 2. ISSR primers used and number of polymorphic fragments obtained.

آغازگر Primer		تعداد کل قطعه ها Total No. of fragments	تعداد قطعه های چند شکلی No. of polymorphic fragments
ISSR -1	HVH $(CA)_7T$	69	42
ISSR -2	BDB $(CA)_7C$	55	30
ISSR -3	DBDA $(CA)_7$	70	42
ISSR -6	$(GA)_8YG$	53	35
ISSR -10	$(AG)_8YT$	45	34
ISSR -11	$(AG)_8$ YC	41	32
Total		333	215

Y= Pyrimidine, B= non-A, D= non-C, H= non -G, V= non –T.

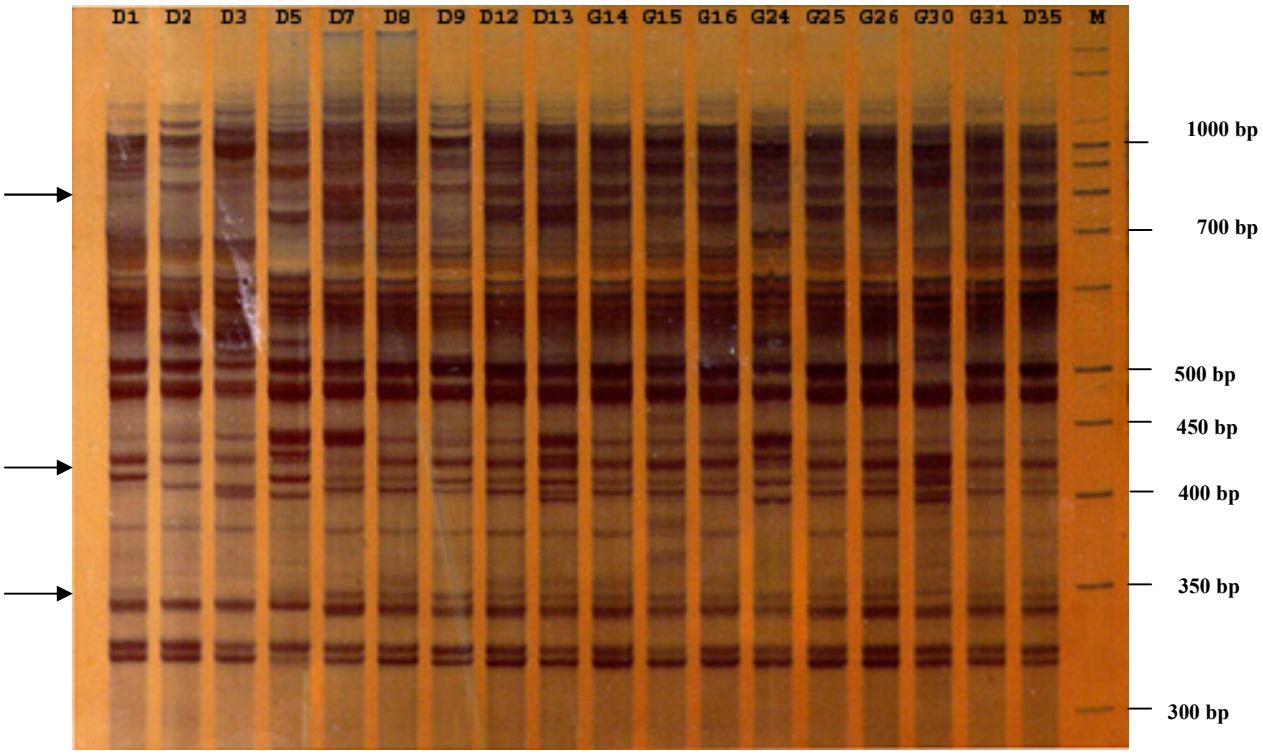

Fig. 2. ISSR profiles of 18 genotypes (see Table 1) of lime and lemon using primer 2 [BDB $(CA)_7C$]. M=50 bp Ladder. Arrows indicate differeces between genotypes.

شکل ۲- الگوی ISSR به دست آمده از آغازگر شماره ۲ [$BDB(CA)_7C$] در ۱۸ نژادگان لیمو (لایم و لمون). (جدول ۱ را نگاه کنید) نشانگر ۵۰ جفت بازی =M. پیکان ها تفاوت بین نژادگان ها را نشان می دهند.

ارتباط فیلوژنتیکی بین نمونه ها

بیشترین ضریب همبستگی با استفاده از ضریب تشابه ساده (SM) معادل r= ۰/۹۳۷٤۱ به دست آمد. بالا بودن این ضریب نشان دهنده مناسب بودن روش گروه‌بندی است. بر اساس ۲۱۵ نوار چند شکل به دست آمده با ٦ آغازگر ISSR، دندروگرام تشابه براساس این ضریب به روش UPGMA رسم شد (شکل ۳). براساس این

دندروگرام، ۱۸ نمونه لیموی مورد آزمایش می توانند به ۳ گروه اصلی با تشابه درون گروهی بزرگتر یا مساوی ۰/۶۱ طبقه بندی شوند.

گروه ۱ تنها شامل نمونه D3 از منطقه داراب می باشد که یک نمونه ناشناخته است. این نژادگان با ضریب تشابه ۰/۵۶ از سایر نمونه ها جدا می شود (شکل ۳). این میزان تشابه قابل توجه نیست و نشان می دهد که این نژادگان با سایر نژادگان ها تفاوت اساسی دارد. ممکن است که اگر این نمونه در کنار سایر انواع مرکبات قرار گیرد درصد تشابه بیشتری را با برخی از آن ها نشان دهد به ویژه که از نظر ویژگی های ظاهری شباهت هایی با نارنگی[۱] دارد. برگ های این نژادگان کشیده و نوک تیز بوده و بیشتر به نارنگی شبیه است و مانند نارنگی محلی گل های کوچکی دارد. تاج درخت نیز در مقایسه با لیموی آب خیلی کوچک بوده و به تقریب به اندازه تاج نارنگی است. میوه های این نوع از لیموی آب بزرگتر و پوست آن ناصاف است. محل اتصال میوه به شاخه مانند نارنگی برجسته است. طعم میوه زیاد ترش نیست. بررسی های مولکولی که توسط نیکولوسی و همکاران[۲] (۱۴) انجام گرفته نارنگی، لایم و لمون را در شاخه های جدا گانه دسته بندی کرده است. در این بررسی نیز لایم ها، لمون ها و نمونه D3 در سه گروه جدا گانه قرار گرفته اند.

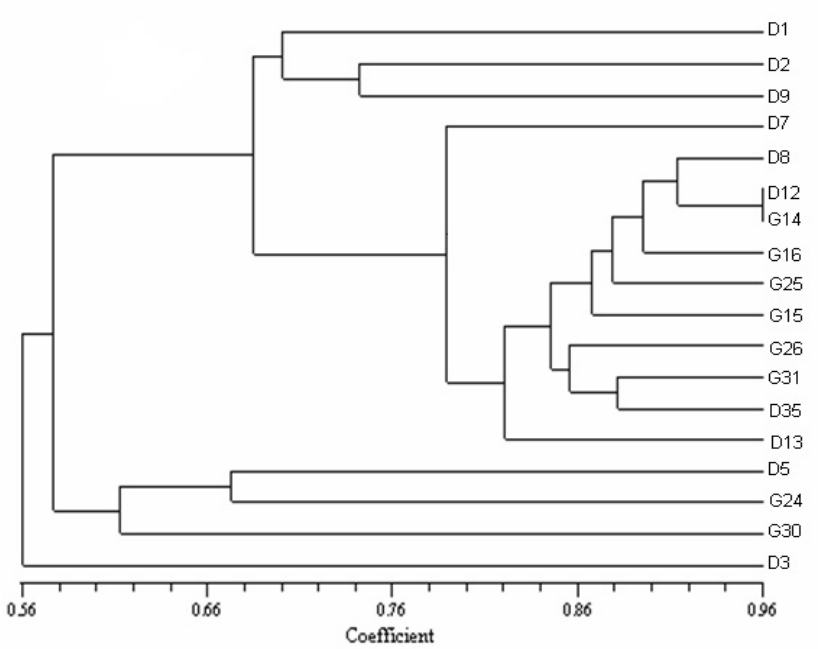

Fig. 3. Dendrogram of 18 genotypes of lime and lemon using ISSR markers based on UPGMA. characteristics of genotypes are presented in Table 1.

شکل۳- گروه بندی ۱۸ نژادگان لیمو(لایم و لمون) با استفاده از نشانگرهای ISSR به روش UPGMA. ویژگی نژادگان ها در جدول ۱ آورده شده است.

گروه دوم شامل سه نمونه D5 ، G24 و G30 است که خود به دو زیر گروه، یکی شامل D5 و G24 و دیگری شامل G30 تقسیم می شود. نمونه G24 (لیمو 'لیسبون') یک رقم شناخته شده مرکبات می باشد. اما D5 یک نمونه ناشناخته است که لیمو سنگی (شکل ۱) نامیده می شود. این نوع از نظر مورفولوژی و اندازه میوه و تاج درخت از لیمو 'لیسبون' بزرگتر است، اما غنچه ها و پشت گلبرگ های آن مانند لیمو 'لیسبون' بنفش رنگ است.

۱- *Citrus reticulata* Blanco ۱- Nicolosi *et al.*

میوه دراین رقم بدون بذر است و از نظر درشتی میوه، صافی پوست آن، شکل برگ ها و گوشواره بزرگ آن ها و همچنین طعم میوه به گریپ فروت[1] شباهت دارد. با توجه به این که گریپ فروت خود از تلاقی بطاوی[2] و پرتقال[3] تولید شده است (۱۵،٦)، بنابراین علاوه بر لیمو 'لیسبون'، احتمال دخالت بطاوی و گریپ فروت در ایجاد لیمو سنگی می تواند مطرح باشد. مقایسه این نمونه با سایر انواع مرکبات به ویژه بطاوی و گریپ فروت، می تواند نقش تعیین کننده‌ای در شناسایی دقیق تر این نژادگان داشته باشد. نمونه G30 که در اصطلاح محلی 'لیمو گلابی' یا 'لیمو لامپی' نامیده می شود (شکل ۱)، با ضریب تشابه ۰/٦۱ با لیمو 'لیسبون' در یک گروه قرار گرفته است (شکل ۳). درشتی میوه، صافی پوست و رنگ زرد آن و حتی عطر و طعم میوه مانند لمون ها است. غنچه ها و پشت گلبرگ هانیز مانند لمون ها بنفش می باشد. گوشواره های برگ نیز مانند لمون ها کوچک است. تفاوت اساسی G30 با لمون ها شکل غیر عادی میوه می باشد (شکل ۱). قسمتی از میوه که به شاخه متصل می شود خیلی کشیده و باریک است و طول قسمت باریک تا ۳ سانتیمتر نیز می رسد. اگر چه مطالعه های مولکولی بیانگر این است که لمون ها خود از تلاقی نارنج[4] و بالنگ[5] تولید شده اند (۱۵) اما هیچ تشابه مورفولوژیکی بین این دو گونه و 'لیموی گلابی' یا 'لامپی' مشاهده نمی شود و احتمال آن ضعیف است که نارنج و بالنگ در پیدایش این نژادگان نقش داشته باشند. از سوی دیگر با توجه به تشابه های مورفولوژیکی زیاد لمون ها با لیموگلابی یا لامپی و همچنین قرار گرفتن آن ها در یک گروه از نظر مولکولی، به نظر می رسد که لیموی 'گلابی' یا 'لامپی' یک لمون جهش یافته باشد.

بیشترین تعداد نمونه های بررسی شده شامل لیموی آب جهرم، لیموی آب داراب و 'تاهیتی لایم' به همراه چند نمونه ناشناخته در گروه سوم قرار دارند. این گروه خود شامل دو زیر گروه اصلی است که یکی از این دو شامل سه نژادگان D1، D2 و D9 از نمونه های ناشناخته منطقه داراب می باشد. این سه نژادگان با ضریب تشابه ۰/٦۸ از سایر لایم ها جدا شده اند (شکل۳). D1 با ضریب تشابه ۰/٦۹ از دو نمونه D2 وD9 جدا شده است. تاج درخت D1 در مقایسه با لیموی آب خیلی کوچکتر است. برگ های آن از لیموی آب بزرگترند و مانند آن گوشواره های خیلی کوچکی دارند. اما گل های آن نیز مانند لیموی آب کوچک است. D1 برخلاف لیموی آب تیغ ندارد. میوه های آن به تقریب به اندازه لیموی آب هستند ولی پوست ضخیم تر و آب کمتری دارند. طعم میوه به ترشی لیموی آب نیست ولی رنگ میوه مانند لیموی آب زرد است. دو نژادگان دیگر شامل نمونه های ناشناخته D2 و D9 افزون بر نزدیکی مولکولی (۰/۷٤)، از نظر مورفولوژی نیز شباهت های قابل توجهی با یکدیگر نشان می دهند. از جمله میوه ها خیلی شبیه هم هستند وشیارهای به نسبت عمیقی روی آن ها مشاهده می شود. برگ های هر دو بدون گوشواره اند وگل های آن ها کوچک است. تاج D9 از D2 خیلی بزرگتر است . در نمونه D9 تیغ ها زیاد و بزرگ هستند اما در D2 تیغ ها کوچکند. میوه های D9 نیز در مقایسه با D2 بزرگتر هستند. با توجه به تشابه ها و اختلاف های سه نژادگان D1 ، D2 و D9 با لیموی آب می توان نتیجه گرفت که به احتمال زیاد لیموی آب در پیدایش این نمونه ها نقش داشته است. حال یا این نمونه ها جهش یافته ای از لیموی آب هستند و یا از تلاقی نمونه هایی از مرکبات با لیموی آب تولید شده اند.

زیرگروه دیگر گروه سوم ۱۱ نژادگان را در بر می گیرد که از بین این ها نمونه D7 که 'لیموی خیاری' نامیده می شود با ضریب تشابه ۰/۷۹ از ۱۰ نمونه دیگر جدا شده است (شکل ۳). شکل میوه این نژادگان نیز بسیار متفاوت از سایر لیموها است (شکل ۱). میوه ها بسیار کشیده و دراز هستند. رنگ پوست میوه ها مانند

۱- *Citrus paradisi* Macf. ۲- *Citrus grandis* (L.) Dsb. ۳- *Citrus sinensis* L.

٤- *Citrus aurantium* L. ٥- *Citrus medica* L.

لمون‌ها زرد بوده و ضخامت پوست آن ها کمی از لیموی آب بیشتر است. طعم میوه بیشتر شبیه طعم لیموی 'لیسبون' است. همچنین جوانه های برگی اولیه، غنچه هاو پشت گلبرگ ها مانند لمون ها بنفش رنگ می باشند. برگ هامانند لیموی آب و لمون ها یا گوشواره ندارند و یا گوشواره آن ها خیلی کوچک است. بنابراین نژادگان D7 شباهت هایی با لیموی آب و لمون ها نشان می دهد. به نظر می رسد که در پیدایش آن هر دو دخالت داشته اند. از ۱۰ نژادگان باقی مانده نمونه D3 که 'تاهیتی لایم' می باشد با ضریب تشابه ۰/۸۲ از بقیه جدا شده است (شکل ۳). در طبقه بندی تاناکا[1] (۲۱) این نمونه به گونه *C. latifolia* Tan. اما در طبقه بندی سوینگل[2] (۲۰) به گونه *C. aurantifolia (*Christm.) Swing. تعلق دارد. این نمونه سه گان[3] بوده و بدون بذر می باشد (۱۳). برگ ها و میوه های آن از لیموی آب بزرگتر است اما مانند لیموی آب گوشواره های کوچکی داشته و دارای تیغ های کوچکی نیز می باشد. ۹ نمونه باقی مانده شامل نمونه های D8 (لیموی آب داراب)، D12 (لیموی بی تیغ)، G25 (لیموی آب جهرم) و نمونه های ناشناخته G31 (لیموی دیررس)، D35 (شاه لیمو)، G14، G15، G16 و G26 ارتباط نزدیکی با یکدیگر نشان می دهند. ضریب تشابه آن هابین ۰/۸۵ تا ۰/۹۶ می باشد. لیموی بی تیغ (D12) و لیموی آب داراب (D8) از نظر مولکولی دارای ضریب تشابه ۰/۹۲ می باشند. افزون بر تشابه مولکولی بالا از نظر مورفولوژی نیز تشابه زیادی بین آن ها دیده می شود. شکل و طعم میوه و شکل برگ ها، گوشواره ها و گل ها مثل هم است. تنها تفاوت اساسی بودن یا نبودن تیغ می باشد. به نظر می رسد که ایجاد یک جهش در لیموی آب منجر به پیدایش لیموی بی تیغ شده است. تشابه زیاد (۰/۹۶) لایم بی تیغ (D12) با نژادگان ناشناخته G14 با مورفولوژی این دو گیاه سازگاری ندارد. در نمونه G14 میوه ها درشت ترند و اندازه گل‌ها به تقریب دو برابر لیموی بی تیغ و لیموی آب می باشد، برگ ها خیلی بزرگتر بوده و برخلاف لیموی بی تیغ، تیغ‌های زیادی روی شاخه های آن وجود دارد. البته با توجه چگونگی کار نشانگرهای ISSR، نباید انتظار داشت که همیشه نمونه‌هایی که از نظر مولکولی به هم نزدیک هستند، شباهت مورفولوژیکی زیادی نیز با هم داشته باشند. این موضوع بستگی دارد به ناحیه ای از DNA که افزوده می شود. البته عکس این موضوع هم ممکن است رخ دهد. برای مثال, لیموی آب داراب و جهرم تشابه مورفولوژیکی خیلی زیادی با هم دارند اما از نظر مولکولی دارای ضریب تشابه ۰/۸۶ هستند. در رابطه با نژادگان های ناشناخته این گروه، علاوه بر تشابه مولکولی بالایی که با لیموی آب دارند، تشابه مورفولوژیکی بالایی نیز نشان می دهند. با توجه به اینکه لیموی آب به نسبت هتروزیگوس می باشد (۹, ۱۱) و همچنین به روش جنسی و افزوده می شود. احتمال دگرگرده افشانی و تولید نژادگان های دو رگه در آن زیاد است. نمونه های حاضر می توانند دور گه هایی باشند که والد مادری آن ها لیموی آب است. برای مثال نژادگان G15 در مقایسه با لیموی آب برگ ها، گل ها و میوه های درشت تری تولید می کند و میوه ها شباهت زیادی به لیمو شیرین[4] دارند. برگ ها و گل های آن نیز به لیمو شیرین شبیه است اما طعم میوه ترش است. بنابراین احتمال دارد که دانه های گرده لیمو شیرین بر روی گل های لیموی آب منجر به تولید این نمونه شده باشد. میوه های نژادگان ناشناخته G26 نیز نشانه هایی از لیمو شیرین را از خود نشان می دهند. نژادگان G31 نظر مورفولوژیکی شباهت های زیادی از با لیموی آب جهرم دارد و این دو از نظر مولکولی نیز با ضریب تشابه ۰/۸۷ با هم تشابه دارند. اما G31 از لیموی آب دیررس‌تر و میوه های آن کشیده تر است. برخلاف G31, نژادگان G14 خیلی زودرس است و نسبت به سرما از لیموی آب مقاوم‌تر می باشد.

نتایج این بررسی نشان می دهد که نشانگرهای مولکولی ISSR می توانند به خوبی رابطه های فیلوژنتیکی را بین نژادگان های مختلف مرکبات مشخص کنند. در بررسی های آینده با قرار دادن نژادگان های استفاده شد در

۱- Tanaka ۲- Swingle ۳- Triploid ٤- *Citrus limettioides* Tan.

این پژوهش در کنار گونه های دیگر مرکبات، می توان جایگاه آن هارا در طبقه بندی مرکبات مشخص تر نمود و ارتباط فیلوژنتیکی آن ها با گونه های شناخته شده را تعیین نمود.

سپاسگزاری

بدینوسیله از گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان به ویژه جناب آقای دکترمسعود بهار که امکانات لازم برای این پژوهش را در اختیار نویسنده اول قراردادند و همچنین از همکاری صمیمانه آقایان مهندس سیروس قبادی، مهندس مجید طالبی و مهندس احد یامچی سپاسگزاری می گردد. از مرکز تحقیقات ویروس شناسی گیاهی شیراز (قطب علمی ویروس شناسی) نیز برای فراهم آوردن محیط لازم برای انجام این پژوهش سپاسگزاری می شود.

REFERENCES منابع

1. Bassam, B.J., G. Caetano-Anolles and P.M. Gresshoff. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 196:80-83.
2. Bornet, B. and M. Branchard. 2001. Nonanchored inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. Plant Mol. Biol. Rep. 19:209-215.
3. Fang, D.Q., R.R. Krueger and M.L. Roose. 1998. Phylogenetic relationships among selected *Citrus* germplasm accessions revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 123:612-617.
4. Fang, D.Q. and M.L. Roose. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. Theor. Appl. Genet. 95:408-417.
5. 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. Theor. Appl. Genet. 95:211-219.
6. Gmitter, F.G. 1995. Origin, evolution and breeding of the grapefruit. Plant Breed. Rev. 13:345-363.
7. Hansen, M., C. Hallden and T. Sall. 1998. Error rates and polymorphism frequencies for three RAPD protocols. Plant Mol. Biol. Rep. 16:139-149.
8. Herrero, R., M.J. Asins, E.A. Carbonell and L. Navarro. 1990. Genetic diversity in the orange subfamily *Aurantioideae*. I. Intraspecies and intragenus genetic variability. Theor. Appl. Genet. 92:599-609.
9. Karp, A., S. Kresovich, K.V. Bhat, W.G. Ayada and T. Hodgkin. 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: A guide to the technologies. IPGRI Technical Bulletin No 2. Int. Plant Genetic Resour. Inst. Rome, Italy.
10. Kijas, J.M.H., J.C.S. Fowler and M.R. Thomas. 1995. An evaluation of sequence tagged microsatellite site markers for genetic anaylsis within *Citrus* and related species. Genome 38:349-355.
11. Kijas, J.M.H., M.R. Thomas, J.C.S. Fowler and M.L. Roose. 1997. Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of *Citrus*. Theor. Appl. Genet. 94:701-706.
12. Mohammadi, S.A. and B.M. Prsanna. 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants-salient statistical tools and considerations. Crop Sci. 43:1235-1248.
13. Moore, G.A. 2001. Oranges and lemons: clues to the taxonomy of *Citrus* from molecular markers. Trends in Genet.17:536-540.
14. Murray, M.G. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 8:4321-4325.
15. Nicolosi, E., Z.N. Dong, A. Gentile, S. La Malfa, G. Contimella and E. Tribulato. 2000. *Citrus* phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. Theor. Appl. Genet. 100:1155-1166.
16. Pradeep Reddy, M., N. Sarla and E.A. Siddiq. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application to plant breeding. Euphytica 128:9-17.

17. Rahman, M.M., N. Nito and S. Isshiki. 200l. Cultivar identification of 'Yuzu' (*Citrus jumos* Sieb, ex Tanaka) and related acid citrus by leaf isozymes. Sci. Hort. 87:191-198.
18. Rohlf, F.J. 1998. NTSYS-pc, numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version 2.02. Exeter Publicatios, Setauket, New York, U.S.A.
19. Sokal, R.R. and C.D. Michener.1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. Univ. Kansas Sci. Bull. 38:1409-1438.
20. Swingle, W.T. and P.C. Reece. 1967. The botany of *Citrus* and its wild relatives.In: W. Reuther, H.J. Webber and L.D. Batchelor (eds.), The Citrus Iindustry. 2nd ed., Vol. 1. Univ. Cal. Press, Berkeley, U.S.A. 190-430.
21. Tanaka, T. 1977. Fundamental discussion of *Citrus* classification. Studia Citrologica 14:1-6.
22. Virk, P.S., J. Zhu, H.J. Newbury, G.J. Bryan, M.T. Jackson and B.V. Ford-Lioyd. 2000. Effectiveness of different classes of molecular markers for classifying and revealing variations in rice (*Oryza sativa*) germplasm. Euphytica 112:275-284.
23. Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Rerjans, T. Van der Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res. 23:4407-4414.
24. Zietkiewicz, E., A. Rafalski and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20:176