بررسی مقایسه‌ای تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم ژنوتیپ‌های لایم اسیدی با کاربرد نشانگر AFLP

شاهین جهانگیرزاده خیاوی[1*]، یوسف حمیداوغلی[2]، بهروز گلعین[3]، عاطفه صبوری[4]

[1] پژوهشکده چای، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، لاهیجان، ایران،

[2] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان،

[3] پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه گرمسیری، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رامسر، ایران،

[4] گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه گیلان.

* نویسنده مسئول: shjahangirzadeh@gmail.com

چکیده:

کشت و کار لایم‌های اسیدی از دیرباز در مناطق جنوبی ایران متداول بوده و نقش مهمی در اقتصاد منطقه دارد. ازآنجاکه امروزه بسیاری از درختان لایم منطقه به دلایل مختلف در معرض از بین رفتن قرار دارند، بنابراین داشتن اطلاعات درباره ژنتیک آن درختان برای طراحی برنامه‌های اصلاحی جهت دست‌یابی به گیاهان مناسب و با اهداف خاص کمک شایانی است. از نشانگر AFLP با کاربرد چهار ترکیب پرایمری حاصل از آغازگرهای *Eco*RI و *Mse*I برای بررسی روابط ژنتیکی ۳۰ ژنوتیپ بومی از سه منطقه داراب، منوجان و میناب و شش رقم وارداتی استفاده شده است. در مجموع این ترکیب‌ها، تولید ۱۲۶ باند قابل نمره‌دهی کردند که ۷۰/۶۳٪ حالت چندشکلی داشتند. میزان PIC محاسبه شده برای تمام ترکیب‌ها از ۰/۴ تا ۰/۵ با متوسط ۰/۴۸ بود. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار POPGENE انجام شد و دندروگرام توسط نرم‌افزار NTSYS بر پایه UPGMA ترسیم گردید. تنوع ژنتیکی کل در جمعیت‌ها (Ht)، تنوع درون جمعیتی (Hs)، تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها (Gst)، شاخص شانون (I) و ضریب تنوع ژنتیکی نی(h) به ترتیب ۰/۳۰، ۰/۲۲، ۰/۲۷، ۰/۴۴ و ۰/۲۸ بدست آمدند. دندروگرام حاصل از بررسی جمعیت‌ها، ارقام مورد بررسی را در شباهت ژنتیکی ۰/۸۱ از ژنوتیپ‌های بومی سه منطقه دیگر (داراب، منوجان و میناب) تفکیک کرد. بیشترین شباهت نیز بین دو جمعیت منوجان، میناب (۰/۹۴) مشاهده شد.

کلمات کلیدی: **مرکبات، ترکیب پرایمری،جمعیت ، تجزیه خوشه‌ای، تنوع ژنتیکی**

مقدمه

در ایران مرکبات نقش تجاری مهمی در صنعت باغبانی، خصوصاً در نواحی جنوبی به علت شرایط مناسب برای تولید لایم‌های اسیدی (*C. aurantifolia* Swingle) ایفا می‌کنند.یکی از مهم‌ترین مشکلات رخداده برای لیموهای اسیدی به‌ویژه در کشورهای حاشیه خلیج‌فارس و دریای عمان، بیماری جاروی جادوگر یا جاروکاست.گسترش وسیع بیماری جاروک در جنوب ایران و کشورهای همسایه، سؤالاتی در رابطه با تنوع ژنتیکی لیموهای اسیدی این کشورها ایجاد کرده است. نشانگرهای گوناگونی ازجمله آیزوزایم‌ها، RFLP، ISSR، RAPD، SSR و AFLP برای محاسبه تنوع ژنتیکی جنس مرکبات و جنس‌های وابسته بکار رفته‌اند (Abedinpour *et al.*, 2014، Al-Sadi *et al.*, 2012، Campos *et al.*, 2005، Goleina *et al.*, 2012 و Nematollahi *et al.*, 2013). اگرچه روش AFLP تا سال ۱۳۸۵ شمسی (۲۰۰۷ میلادی) برای تجزیه و بررسی فیلوژنی در مرکبات استفاده نشده بود (*Pang et al.*, 2007)، اما این روش نشان داده است که می‌تواند به‌عنوان یک تکنیک قدرتمند برای شناسایی و تخمین تنوع ژنتیکی و روابط فیلوژنی در جمعیت‌های مرکبات باشد (Al-Sadi *et al.*, 2012، Nartvaranant and Nartvaranant, 2011، Pang *et al.*, 2007 و Robles-Gonzalez *et al.*, 2008). در این تحقیق سعی شده است نسبت به بررسی تنوع ژنتیکی برخی ژنوتیپ‌های بومی لیموهای اسیدی مربوط به مناطق کاشت عمده این محصول در جنوب ایران و مقایسه آن‌ها با شش رقم تجاری، اقدام گردد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و استخراج DNA:

برگ‌های جوان بالغ از ۳۰ ژنوتیپ لیموهای اسیدی مناطق میناب، منوجان و داراب و شش رقم مکزیکن لایم (*C. auranifolia*)، پرشین لایم (*Citrus × latifolia*)، لیمو شیرین(*C. limetta*)، بالنگ (*C. medica*)، لیمو لیسبون (*C. limon*) و راف لمون (*C. jambhiri*) از باغ تحقیقاتی موسسه مرکبات ایران در رامسر تهیه شده و تا زمان استفاده در فریز ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.جدول ۱ اطلاعات نمونه‌های مورد بررسی را نشان می‌دهد. استخراج DNA ژنومی بر اساس دستورالعمل معرفی‌شده توسط شرکت Diversity Arrays Technology Pty Ltd کشور استرالیا صورت گرفت (www.diversityarrays.com).

جدول۱. نمونه‌های لیمو اسیدی بکار رفته در بررسیAFLP

کد نمونه	محل جمع‌آوری	نام علمی	کد نمونه	محل جمع‌آوری	نام علمی
D1	داراب	*Citrus* sp.	M1-5	میناب	*Citrus* sp.
D2	داراب	*Citrus* sp.	M1-7	میناب	*Citrus* sp.
D3	داراب	*Citrus* sp.	M1-10	میناب	*Citrus* sp.
D4	داراب	*Citrus* sp.	MI1-13	میناب	*Citrus* sp.
D5	داراب	*Citrus* sp.	M1-14	میناب	*Citrus* sp.
D6	داراب	*Citrus* sp.	M2-2	میناب	*Citrus* sp.
D7	داراب	*Citrus* sp.	M2-8	میناب	*Citrus* sp.
D8	داراب	*Citrus* sp.	M2-10	میناب	*Citrus* sp.
D9	داراب	*Citrus* sp.	M4-2	میناب	*Citrus* sp.
A5	منوجان	*Citrus* sp.	M4-5	میناب	*Citrus* sp.
A6	منوجان	*Citrus* sp.	M5-2	میناب	*Citrus* sp.
A7	منوجان	*Citrus* sp.	M1-5	میناب	*Citrus* sp.
A8	منوجان	*Citrus* sp.	S37	رامسر	*Citrus aurantifolia*
A9	منوجان	*Citrus* sp.	S46	رامسر	*Citrus × limon*
A10	منوجان	*Citrus* sp.	S49	رامسر	*Citrus jambhiri*
M1-1	میناب	*Citrus* sp.	S51	رامسر	*Citrus × latifolia*
M1-3	میناب	*Citrus* sp.	S54	رامسر	*Citrus medica*
M1-4	میناب	*Citrus* sp.	S55	رامسر	*Citrus limetta*

آنالیز AFLP

روش AFLPبر اساس دستورالعمل وس و همکاران (۱۹۹۵) با کمی تغییرات صورت پذیرفت (Vos *et al.*, 1995). جدول ۲ اطلاعات ترکیب‌های پرایمری بکار رفته را بیان می‌دارد.

تجزیه آماری

فقط نوارهای تشکیل شده کاملاً مشخص و مطمئن امتیازدهی شدند. بعد از تشکیل ماتریس صفر و یک جهت آنالیز جمعیتی توسط نرم‌افزار POPGENE,Ver.32 انجام شد و دندروگرام جمعیتی توسط نرم‌افزار NTSYS-pc ver 2.02 رسم گردید. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) بر اساس رابطه PICi=2fi(1-fi) که برای نشانگرهای غالب توصیه شده است، محاسبه شد. در این رابطه fi فراوانی قطعه نشانگر iام هنگام وجود و (1-fi) فراوانی قطعه نشانگر iام در حالت عدم وجود نوار است (Roldain-Ruiz *et al.*, 2000).

جدول۲. ترکیب‌های پرایمریAFLP، بکار رفته در بررسی تنوع ژنتیکی ۳۶ نمونه مرکبات و اطلاعات آماری آن‌ها

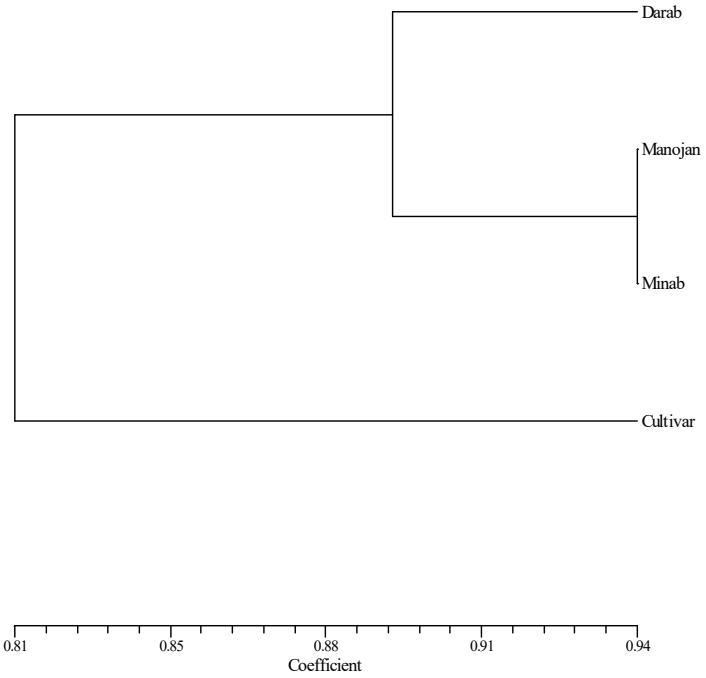
کد ترکیب	ترکیب پرایمر	تعداد کل قطعات	تعداد قطعات چندشکلی	درصد چندشکلی	PIC
C1	MAGA-ECGC	۳۲	۲۴	۷۵	۰/۴۸
C2	ECCA-MAGA	۲۶	۱۷	۶۵/۳۸	۰/۴۰
C3	ECCA-MAGT	۳۷	۲۷	۷۲/۹۷	۰/۴۸
C4	ECGC-MAAG	۳۱	۲۰	۶۴/۵۲	۰/۵۰
مجموع	-	۱۲۶	۸۸	۶۹/۸۴	۰/۴۸

نتایج و بحث

در این تحقیق در ابتدا تعداد نه ترکیب متفاوت پرایمری بر روی شش نمونه تصادفی انتخاب شده مورد بررسی قرار گرفتند که چهار ترکیب پرایمر E_{CGC}/M_{AGA}، E_{CCA}/M_{AGA}، E_{CCA}/M_{AGT} و E_{CGC}/M_{AAG} به علت داشتن درصد چندشکلی بالاتر برای بررسی ۳۶ نمونه لیموی اسیدی مورد استفاده قرار گرفتند اسامی ترکیب‌ها، تعداد کل باندها، تعداد باندهای چندشکل، درصد چند شکلی و محتوای اطلاعات چند شکلی برای هر ترکیب پرایمری در جدول ۲ ارائه شده است. در مجموع ۱۲۶ ناحیه ژنومی تکثیر شدند که ۸۸ نوار (۶۹٪/۸۴) چند شکلی داشتند. تعداد نوار برای هر ترکیب پرایمری از ۲۶ تا ۳۷ بود که متوسط نوار چند شکل تکثیر شده به ازای هر ترکیب پرایمر معادل ۲۲ بود. دقت در میزان محتوای چند شکلی حاصل شده در مطالعه حاضر، بیانگر این حقیقت است که کارایی قابل توجه ترکیب‌های پرایمری بکار رفته با توجه به میزان درصد چند شکلی و محتوای اطلاعات چند شکلی، می‌تواند برای بررسی تنوع ژنتیکی بین نمونه‌ها مناسب باشد. در بررسی جمعیتی نمونه‌ها، تنوع ژنتیکی کل در جمعیت‌ها (Ht)، تنوع درون جمعیتی (Hs)، تفاوت ژنتیکی بین جمعیت‌ها (Gst)، شاخص شانون (I) و ضریب تنوع ژنتیکی نی(h) به ترتیب ۰/۳۰، ۰/۲۲، ۰/۲۷، ۰/۴۴ و ۰/۲۸ محاسبه گردید.

جدول ۳. میزان تشابه (اعداد بالا چپ) و فاصله ژنتیکی (اعداد پایین راست) جمعیت‌ها با استفاده از فاصله ژنتیکی نی (۱۹۷۲) در جنس *Malus* ssp.

جمعیت	داراب	منوجان	میناب	ارقام
داراب	-	۰/۹۰۳	۰/۸۷۸	۰/۸۰۲
منوجان	۰/۱۰۱	-	۰/۹۴۰	۰/۸۳۷
میناب	۰/۱۲۹	۰/۰۶۱	-	۰/۸۰۳
ارقام	۰/۲۱۹	۰/۱۷۷	۰/۲۱۸	-



شکل ۲. دندروگرام بدست آمده بر اساس آنالیز جمعیتی (جمعیت‌ها شامل: Darab: داراب، Manojan: منوجان،Minab: میناب و Cultivar: ارقام)

در بررسی دندروگرام حاصل از بررسی جمعیتی (شکل-۱) بر اساس شباهت ژنتیکی نی (۱۹۷۳) (جدول ۳) مشخص شد که جمعیت ارقام مرکبات در حد تشابه ۸۱٪ از جمعیت‌های داراب، منوجان و میناب جدا گردید و حداکثر فاصله را از آن‌ها نشان داد. در سه جمعیت باقی‌مانده جمعیت منطقه داراب که نسبت به دو جمعیت دیگر (منوجان و میناب) در سطح تشابه حدود ۰/۸۹ از دو جمعیت مذکور جدا گردید. دو جمعیت منوجان و میناب حداکثر تشابه (۹۴٪) را با یکدیگر داشتند.

نتایج این بررسی بیان می‌دارد که تنوع ژنتیکی قابل‌توجهی در بین جمعیت‌های لیمو اسیدی ایران وجود دارد که دلیل عمده آن می‌تواند تکثیر از طریق بذر باشد، درحالی‌که السعدی و همکاران (۲۰۱۲) تنوع کمی را در لایم‌های کشور عمان گزارش نمودند (۳) دلیل آن می‌تواند تکثیر غیره بذری با روش‌های غیر جنسی از روی ارقام مختلف باشد.

منابع

Abedinpour, H., Ranjbar, G.A., Babaeian Jelodar, N. and Golein, B. 2014. Assessment of polymorphism in citrus genotypes using RAPD molecular markers. Plant. Prod. Res. J. 21 (4): 165-178. (In Persian)

Al-Sadi, A.M., Al-Moqbali, H.S., Al-Yahyai, R.A. and Al-Said, F.A. 2012. AFLP data suggest a potential role for the low genetic diversity of acid lime (*Citrus aurantifolia* Swingle) in Oman in the outbreak of witches' broom disease of lime. Euphytica. 188:285–297

Campos, E.T., Espinosa, M.A.G., Warburton, M.L., Varela, A. S. and Monter, A. V. 2005. Characterization of mandarin (*Citrus* spp.) using morphological and AFLP markers. Interciencia. 687-693.

Goleina, B., Bigonah, M., Azadvar, M. and Golmohammadid, M. 2012. Analysis of genetic relationship between 'Bakraee' (Citrus sp.) and some known Citrus genotypes through SSR and PCR-RFLP markers. Sci.Hort. 148: 147–153.

http://www.diversityarrays.com/sites/default/files/pub/DArT_DNA_isolation.pdf bfw.ac.at/200/1859.html

Nartvaranant, P. and Nartvaranan. K. 2011. Analysis based on AFLP markers of the genetic variations and their relationships for pummelo cultivars grown in the central region of Thailand. Songklanakarin J. Sci. Technol. 33 (5), 499-508.

Nematollahi, A.Kh., Golein, B. and Vahdati, K. 2013. Analysis of the genetic diversity in Citrus (*Citrus* spp.) species using SSR markers. J of Plant. Physio. Breed. 3, 41-49.

Pang, X.M., Hu, Ch.G. and Deng, X.X. 2007. Phylogenetic relationships within Citrus and its related genera as inferred from AFLP markers. Genet. Resour. Crop. Evol. 54:429–436.

Robles-Gonzalez, M.M., Medina-Urrutia, V.M., Velazquez-Monreal, J.J. and Simpson, J. 2008. Field performance and molecularprofiles of Mexican lime selection. Euphytica. 161:401–411

Roldain-Ruiz, I., Calsyn, E., Gilliand, T.J., Coll, R., Van Eijk, M.J.T. and De Loose, M. 2000. Estimating genetic conformity between related ryegrass (*Lolium*) varieties, 2. AFLP characterization. Mol. Breed. 6: 593-602.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., De Lee, T.V., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucl. Acids Res. 2: 4407-4414

Comparative Analysis of Genetic Diversity in Acid Lime Germplasm using AFLP Markers

Shahin Jahangirzadeh Khiavi[1*], Yousef Hamidoghli[2], Behroz Golein[3], Atefeh Sabouri[4]
[1] Tea Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Lahijan, Iran;
[2] Department of Horticultural Science, University of Guilan, Rasht, Iran;
[3] Citrus and Subtropical Fruits Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ramsar, Iran;
[4] Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Guilan, Rasht, Iran
**Corresponding author: Shjahangirzadeh@ gmail.com*

Abstract

Cultivation of limes are common in southern regions of Iran from many years ago and has an important role in the economy of this region. A large number of limes in these regions were affected and destroyed by many resons and knowledge about genetic of this plants for desining of breeding programs to find suitable plant is helpful. AFLP method was done by using four primer combinations of *Eco*RI and *Mse*I for studing of Genetic relationship between 30 local genotypes from three regions Darab, Manoojan, Minab and six foreign cultivars. All combinations produced 126 scorable bands that had %70.63 polymorphism. Polymorphic information content (PIC) was measured 0.4 to 0.5 for all combinations with an average of 0.48. Data were analyzed using POPGENE software and dendrogram was drawn based on UPGMA by NTSYS software. The total genetic diversity in populations (HT), and a major portion of it was within populations (HS), the genetic differentiation among populations (GST), Shannon's Information index (I) and Nei's gene diversity (h) was calculated 0.30, 0.22, 0.27, 0.44 and 0.28 (respectively).Resulted dendrogram from population study, discriminated cultivars from other three populations (Darab, Manoojan and Minab) by 0.81 genetic similarities (approximately). Maximum similarity were observed between Manoojan and Minab (0.94 approximately).

Keywords: **Citrus, Primer combination, population, Cluster Analysis, Genetic diversity**