بررسی چندشکلی نشانگر ISSR در بین ارقام ناشناخته و تجاری مرکبات

بهروز گلعین [1*]، مالک قاسمی [1]، سیروس نعمت‌الهی [1]، سمانه راهب [1]
1- اعضای هیئت علمی موسسه تحقیقات مرکبات کشور، رامسر.
* نویسنده مسئول

چکیده
اطلاع از روابط فیلوژنتیک و تنوع ژنتیک در مرکبات جهت تشخیص روابط ژنتیکی، شناسایی ژرم‌پلاسم و ثبت ارقام جدید، امری مهم و ضروری می‌باشد. در کلکسیون‌های مرکبات کشور، تعدادی بیوتیپ وجود دارد که شناسایی آنها عمدتاً بر اساس صفات مرفولوژی بوده و تحقیقات ژنتیکی چندانی بر روی آنها انجام نشده است. نشانگرهای ملکولی می‌توانند در این زمینه مفید باشند. در این پژوهش به منظور بررسی میزان تنوع و قرابت ژنتیکی 55 ژنوتیپ مرکبات شامل 43 ژنوتیپ ناشناخته بومی همراه با 12 رقم تجاری، از نشانگرهای ISSR استفاده شد. بررسی دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA با ضریب تشابه جاکارد، ژنوتیپ‌های مورد بررسی را به نه گروه (A, B, C, D, E, F, G, H & I) طبقه‌بندی کرد. ارقام پرتقال، نارنگی و 25 ژنوتیپ ناشناخته در گروه A، گریپ‌فروت و نه ژنوتیپ ناشناخته در گروه B، پوملو، دارابی و هفت ژنوتیپ ناشناخته در گروه C، نارنج و یک ژنوتیپ ناشناخته به ترتیب در گروه D و E با ضریب تشابه 0/54 نسبت به همدیگر، بالنگ در گروه F، لمون اروکا در گروه G، یک ژنوتیپ ناشناخته به طور مستقل در گروه H و لیموشیرین و مکزیکن لایم در گروه I قرار گرفتند. تجزیه تنوع ژنتیک و تعیین روابط خویشاوندی در مرکبات، اطلاعات مفیدی را برای برنامه‌های بهنژادی، انتخاب و حفظ ارقام فراهم می‌کند.
واژه‌های کلیدی: ارقام مرکبات، نشانگر ملکولی، روابط فیلوژنتیک

مقدمه
مشخص شدن رده‌بندی و تنوع ژنتیک در مرکبات جهت تعیین روابط ژنتیکی، شناسایی ژرم‌پلاسم، کنترل فرسایش ژنتیکی، ایجاد برنامه‌های بهنژادی و ثبت ارقام جدید، امری مهم و ضروری می‌باشد. درگذشته، مطالعات روابط فیلوژنتیک میان جنس‌ها وگونه‌های مرکبات تنها بر اساس خصوصیات مورفولوژی انجام می‌گرفت (نیکولاسی و همکاران، 2000)، اما استفاده از خصوصیات مورفولوژی به تنهایی، جهت تعیین و شناسایی میان ارقام مرکبات کاری دشوار است و علاوه بر آن، این صفات تحت تأثیر محیط قرار می‌گیرند. بنابراین استفاده از نشانگرهای مولکولی به طور گسترده‌ای در مطالعه روابط فیلوژنتیک و تنوع ژنتیکی در گیاهان مختلف استفاده گردیده است (فانگ و همکاران، 1998). از میان این نشانگرها، می‌توان به نشانگر ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) اشاره نمود. در ایران با تلاش محققین و باغداران پیشرو، بیوتیپ‌های مختلف پرتقال، لیمو، گریپ‌فروت و نارنگی که از طریق جهش، دورگ‌گیری‌های طبیعی و تغییرات ژنتیکی بوجود آمده‌اند، جمع‌آوری شده‌اند و در کلکسیون‌های شمال و جنوب کشور نگهداری می‌شوند. پایش‌های انجام شده در این کلکسیون‌ها عمدتاً بر اساس صفات مرفولوژی بوده و تحقیقات ژنتیکی چندانی بر روی آنها انجام نشده است و اطلاعات دقیقی از روابط ژنتیکی و خویشاوندی بین این ژنوتیپ‌ها و با ارقام تجاری وجود ندارد. با توجه به اینکه تعدادی از این ژنوتیپ‌ها بر اساس حدس و یا بر مبنای برخی صفات ظاهری نامگذاری شده‌اند و از وضعیت تعدادی دیگر نیز اطلاعاتی در دست نیست، هدف از این مطالعه بررسی و شناسایی برخی از این ژنوتیپ‌ها و ارتباط آنها با ارقام تجاری با استفاده از نشانگر ISSR است که در کلکسیون مرکبات کترا موجود می‌باشند.

مواد و روش‌ها

برای انجام این آزمایش، برگ 55 نمونه مرکبات از ایستگاه تحقیقات مرکبات کترا (تنکابن) جمع‌آوری شد (جدول 1). پس از استخراج DNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با 10 آغازگر ISSR انجام گرفت. به منظور بررسی و تفکیک محصولات حاصل از تکثیر، از ژل آگارز با غلظت 1/5 درصد استفاده شد. تجزیه تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار NTSYS pc ver 2,02 و POPGENE ver 1,31 انجام گرفت.

نتایج و بحث

تجزیه خوشه‌ای 55 ژنوتیپ مورد مطالعه بر اساس روش گروه‌های جفتی وزن‌نشده انجام شد. پس از برش دندروگرام در ضریب تشابه 0/54، ژنوتیپ‌ها در نه خوشه اصلی A، B، C، D، E، F، G، H و I دسته‌بندی شدند (شکل 1). گروه بزرگ A دارای دو زیرگروه A.1 و A.2 است. زیرگروه A.1 سپس به دو زیرگروه فرعی A.1,1 و A.1,2 تقسیم می‌شود. زیرگروه فرعی A.1,1 شامل ژنوتیپ‌های G1، G39، G33، G7، G12، پرتقال سیاورز (G48)، G8، G17، G20، G27، G23، G36، G13، G14، G10، پرتقال والنسیا (G45)، G4، G26، G21، G25، G24 و G38 است. با توجه به این‌که برخی از ژنوتیپ‌ها مانند G1 با G39، G12 و G48 با G7، G17 با G20 قرابت زیادی با همدیگر دارند، آنها احتمالاً موتانت‌هایی هستند که در اثر جهش سوماتیکی بوجود آمده‌اند یا ژنوتیپ‌های مشابه نوسلار همدیگر هستند. برخی مطالعات نشان داده‌اند که پرتقال‌ها به‌طور ژنتیکی یک بیوتیپ هستند. این نتایج می‌تواند دلیلی بر منشاء مونوفیلیتیک (متحدالاصل) پرتقال باشد که بوسیله جهش سوماتیکی و انتخاب کلون برتر دنبال شده است. از طرفی در این زیرگروه فرعی، برخی از ژنوتیپ‌ها قرابت بالایی با پرتقال‌های سیاورز و والنسیا ندارند که احتمالاً آنها دورگ‌هایی از پرتقال هستند. زیرگروه فرعی A.1,2 ژنوتیپ‌های G37 و نارنگی کلمانتین (G52) را در بر می‌گیرد که با ضریب تشابه ژنتیکی 0/60 از زیرگروه فرعی A.1,1 یعنی گروه پرتقال جدا شده است. الگوی باند ریزماهواره‌ای مشابه‌ای میان پرتقال و نارنگی مشاهده شده است که بیانگر روابط خویشاوندی نزدیک این دو گونه است (لورو و همکاران، 1995). نتایج حاصل از پژوهش بارت و رودز (1976) نشان می‌دهد که پرتقال از تلاقی پوملو و نارنگی بوجود آمده است. نتایج بدست آمده در این مطالعه نیز این فرضیه را تأیید می‌کند زیرا نارنگی قرابت ژنتیکی 0/60 با پرتقال دارد. ژنوتیپ‌های G19، G31، G34، G32 و نارنگی دنسی (G53) در زیرگروه A.2 قرار گرفتند. این گروه و نارنگی کلمانتین (G52) دارای ضریب تشابه 0/57 هستند. در میان نارنگی‌ها قرابت ژنتیکی بالایی وجود دارد و نتایج حاصل از نشانگرهای مولکولی این عقیده را تأیید می‌کند (بیسواس و همکاران، 2010).

خوشه B شامل ژنوتیپ‌های G2، G5، G40، G3، G35، G6، G29، G42، G43 و گریپ‌فروت دانکن (G44) است. قرابت درون‌گونه‌ای در گریپ‌فروت بسیار بالا است (بارت و رودز، 1976). با توجه به شکل 1، قرابت ژنتیکی بسیار بالایی بین ژنوتیپ‌های گروه B و گریپ‌فروت وجود ندارد، بنابراین احتمال می‌رود ژنوتیپ‌های مذکور دورگ‌هایی از گریپ‌فروت باشند.

ژنوتیپ‌های G9، G15، G30، G11، G16، پوملو (G47)، دارابی (G46)، G18 و G22 در گروه C دسته‌بندی شدند. به جز ژنوتیپ G16 که با 0/92 ضریب تشابه، شباهت بالایی به پوملو دارد، ژنوتیپ‌های دیگر قرابت بالایی را به پوملو نشان ندادند.

خوشه D شامل ژنوتیپ G41 است که قرابت بیشتری با نارنج (G51) در گروه E نشان داد. قرابت درون‌گونه‌ای بالایی در میان ارقام نارنج وجود دارد اگرچه هتروزیگوس هستند (بارت و رودز، 1976). ژنوتیپ بالنگ (G54) به صورت انفرادی در گروه F قرار گرفت. بالنگ یکی از سه گونه اصلی مرکبات است و به عنوان منشأ سایر مرکبات شناخته شده است (بارت و رودز، 1976).

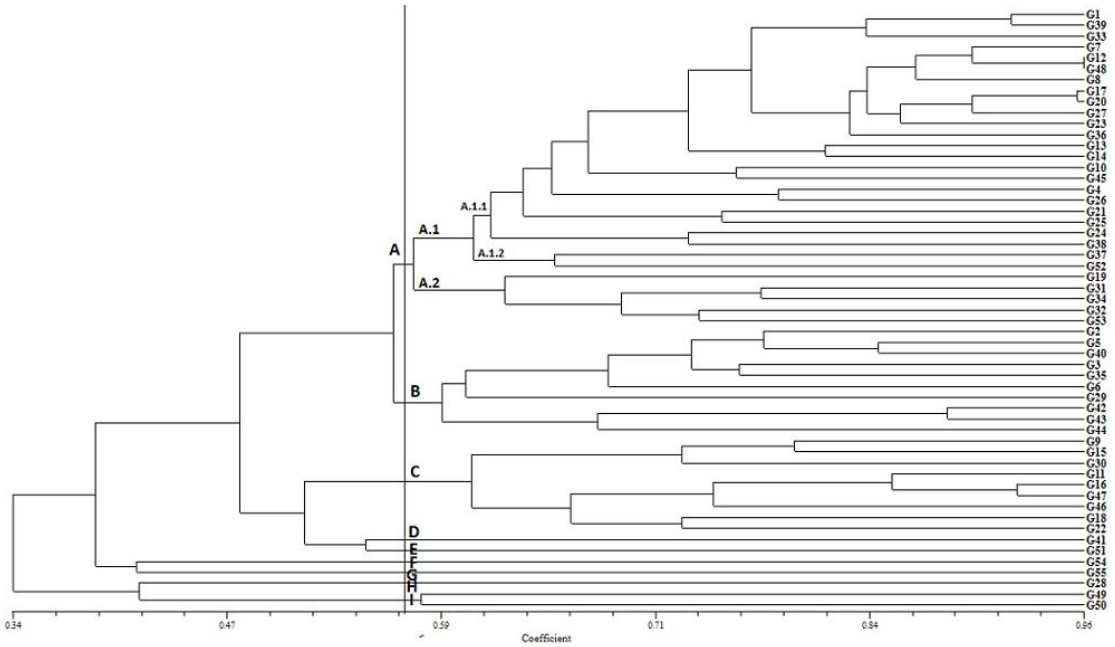
لمون اروکا (G55) به تنهایی در خوشه G قرار گرفت. گزارشات حاکی از این هستند که لمون‌ها دورگ حاصل از تلاقی میان لایم و بالنگ هستند، اما به لحاظ ژنتیکی قرابت بیشتری نسبت به بالنگ دارند و یا دورگ حاصل از بالنگ و نارنج می‌باشند (گولسن و روز، 2001). نتایج بدست آمده در این پژوهش نیز مؤید این موضوع است زیرا لمون اروکا در ضرایب تشابه 0/41 از بالنگ و

0/34 از لایم تفکیک شد. ژنوتیپ G28 به صورت مستقل در خوشه H قرار گرفت. این ژنوتیپ با هیچ‌یک از نمونه‌های شاهد مورد بررسی در این مطالعه قرابت نشان نداد. در گروه I لیمو شیرین (G49) و لیمو آب شیراز (G50) جای گرفتند.

نشانگرهای حاضر توانستند روابط ژنتیکی در گروه مورد مطالعه را تقریباً بطور واضحی مشخص کنند. نشانگرهای مولکولی دیگر مانند PCR-RFLP و SSR ممکن است بتوانند در تعیین والدین مادری و تکمیل دقیق‌تر قرابت این ژنوتیپ‌ها کمک نماید.

جدول 1: مواد گیاهی استفاده شده در آزمایش

نام عمومی	نام علمی گیاه	کد گیاه	ردیف
نامشخص (Unknown)	Citrus spp	G1~G43	1~43
گریپ‌فروت دانکن (Duncan grapefruit)	Citrus paradisi	G44	44
پرتقال والنسیا (Valencia orange)	Citrus sinensis	G45	45
دارابی (Darabi)	Citrus grandis	G46	46
پوملو (Pummelo)	Citrus grandis	G47	47
پرتقال سیاورز (Siavaraz orange)	Citrus sinensis	G48	48
لیموشیرین (Sweet lime)	Citrus limettioides	G49	49
لیمو آب شیراز (Mexican lime)	Citrus aurantifolia	G50	50
نارنج (Sour orange)	Citrus aurantium	G51	51
نارنگی کلمانتین (Clementine mandarin)	Citrus clementina	G52	52
نارنگی دنسی (Dancy mandarin)	Citrus reticulata	G53	53
بالنگ (Citron)	Citrus medica	G54	54
لمون اروکا (EureKa lemon)	Citrus limon	G55	55



شکل 2: تجزیه کلاستر 55 ژنوتیپ مرکبات با استفاده از نشانگر ISSR به روش UPGMA

منابع

1. 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.

2. Biswas, M.K., Q. Xu and X.X. Deng. 2010. Utility of RAPD, ISSR, IRAP and REMAP markers for the genetic analysis of Citrus spp. Scientia Horticulturae 124: 254-261.

3. Fang, D.Q., R.R. Krueger and M.L. Roose. 1998. Phylogenetic relationships among selected Citrus germplasm accession revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) markers. Journal of the American Society for Horticultural science 123: 612-617.

4. 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.

5. 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. Hort Science 30:1063-1067.

6. 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.

ISSR Polymorphism between unknown Citrus accessions and commercially important cultivars

B. Golein1*, M. Ghasemi1, S. Nematollahi1 and S. Raheb1

1- Iran Citrus Research Institute, Ramsar.

*Corresponding author

Abstract

Understanding phylogenic relationships and genetic diversity in citrus is considered to be important in clarifying their genetic relationships, germplasm characterization and the registration of new varieties. There are some Citrus accessions in the country citrus collections which have been classified merely based on their morphological traits. Molecular markers would help to infer their relations with known cultivars. In the present research work, phylogenic relationships among 55 citrus genotypes including 43 unknown local genotypes and 12 commercially important citrus varieties were investigated through ISSR markers. Genetic similarities among accessions were calculated according to Jaccard Similarity Index and used to construct a dendrogram based on the unweighted pair groups method arithmetic averages (UPGMA), which put the 55 samples into nine major groups. Orange, mandarin and 25 unknown genotypes into group A, grapefruit and 9 unknown genotypes into group B, Pummelo, Darabi and 7 unknown genotypes into group C, sour orange and an unknown genotype into groups D & E, citron into group F, Eureka lemon into group G, an unknown genotype into group H and sweet lime and Mexican lime into group I were clustered. Genetic diversity and phylogenetic analysis in citrus, provide useful information for further breeding programs, collection, preservation and utilization.

Keywords: Citrus cultivars, Molecular marker, Phylogenetic relationship