تجزیه روابط ژنتیکی برخی از ارقام مرکبات با استفاده از نشانگر PCR-RFLP

فاطمه عبادت‌طلب (١)، بهروز گلعین (٢)، بابک باباخانی (٣)، عاطفه صبوری (٤)

١ و٣- دانشجوی کارشناسی ارشد و عضو هیأت علمی دانشگاه آزاد اسلامی تنکابن ٢- عضو هیأت علمی موسسه تحقیقات مرکبات کشور ٤- عضوهیأت علمی دانشگاه گیلان

در خانواده مرکبات تاریخچه طولانی کشت، پراکنش وسیع در دنیا، هم‌باروری بین گونه‌ها، دورگ‌گیری‌های جنسی و جهش‌های فراوان باعث شده که ارقام متنوعی از مرکبات در جهان وجود داشته باشد. شناخت روابط فیلوژنتیکی و تنوع ژنتیکی در مرکبات به منظور تعیین روابط ژنتیکی، شناسایی ژرم‌پلاسم، ثبت ارقام جدید و جلوگیری از فرسایش ژنتیکی دارای اهمیت قابل توجهی است. بسیاری از نمونه‌های مرکبات در کلکسیون‌های مرکبات ایران وجود دارند که بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی آنها شناسایی و طبقه‌بندی شده‌اند. نشانگرهای مولکولی به روابط بین آنها با ارقام شناخته شده کمک می کنند. در این مطالعه، ٨٩ نمونه که شامل ٧٤ تیپ ناشناخته و ١٥ رقم شناخته شده (شاهد) از مجموعه درختان مرکبات موجود کلکسیون ایستگاه تحقیقات مرکبات کترا (تنکابن) انتخاب شدند و به کمک نشانگر مولکولی PCR-RFLP که در مطالعات سایر محققین چندشکلی مناسبی نشان داده بودند، مورد بررسی قرار گرفتند. با استفاده از نشانگر PCR-RFLP الگوی مناسب و قابل امتیازدهی برای ٨٩ مورفوتیپ فراهم شد. بر اساس تجزیه خوشه‌ای به روش نزدیکترین همسایه و با ضریب تشابه جاکارد، مورفوتیپ‌های مورد بررسی به چهار گروه اصلی طبقه‌بندی شدند که از آنها می‌توان جهت تعیین روابط ژنتیکی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: مرکبات، تنوع ژنتیکی، ژرم پلاسم، PCR-RFLP

مقدمه:

مرکبات یکی از محصولات مهم باغبانی در دنیاست و گسترش وسیع جغرافیایی و میزان بالای تولید مرکبات باعث شده که این محصول از اهمیت اقتصادی فراوانی در جهان برخوردار باشد (سوست و روز ١٩٩٦).مرکبات از خانواده Rutaceae و زیرخانواده Aurantiodeae هستند (سوست و کامرون، ١٩٧٩).

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 اصلاحگر، توجه به ذخایر ژنتیکی و استفاده بهینه از این ذخایر و تنوع موجود در جهت بهبود کمی و کیفی محصولات است. در نتیجه 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 ازنظر تنوع ژنتیکی در گونه‌های مختلف گیاهی از جمله مرکبات می‌باشد. بدیهی است که مجموعه‌های گیاهی در کشور زمانی قادر به ایفای نقش ارزشمند خود خواهند بود که تمام اعضای آنها دارای شناسنامه‌ای کامل از خصوصیات مورفولوژیکی، سیتوژنتیکی و مولکولی بوده و بتوان در اسرع وقت به اطلاعات ثبت شده برای هر نمونه گیاهی دسترسی یافت. تهیه شناسنامه ملکولی و حفظ تنوع ژنتیکی به منظور بهنژادی مرکبات برای بالا بردن سطح تولید اقتصادی کشور حائز اهمیت است. استفاده از نشانگرهای مولکولی در تعیین ساختار ژنتیکی تیپ‌های طبیعی مرکبات و تعیین درجه قرابت آنها با گونه‌ها یا ارقام استاندارد، اطمینان بخش است. در حالی که تعدادی از این تیپ‌های طبیعی در کلکسیون مرکبات کشور بر اساس حدس و یا بر مبنای برخی صفات ظاهری نامگذاری شده‌اند و از وضعیت تعدادی دیگر نیز اطلاعات در دست نیست. هدف از این تحقیق، ارزیابی ملکولی تیپ‌های طبیعی مرکبات شمال ایران است تا در صورت امکان بتوان با ایجاد بستر مناسب برای مطالعات ژنتیکی با استفاده از پتانسیل موجود، در جهت اهداف اصلاحی مرکبات استفاده نمود.

موادوروشها:

در این مطالعه ٨٩ ژنوتیپ شامل ١٥ رقم استاندارد (نارنگی، پرتقال، لیموترش، لیموشیرین، شدوک، گریپ‌فروت، بالنگ و یوزو) و ٧٤ تیپ ناشناخته از درختان مرکبات موجود در کلکسیون کترا از توابع شهرستان تنکابن انتخاب شدند. جهت بررسی تنوع ژنتیکی از نشانگر مولکولی PCR-RFLP که در مطالعات قبلی چندشکلی قابل توجهی نشان داده بود، استفاده شد (اسدی آبکنار، ٢٠٠٤). پس از جمع‌آوری نمونه‌های برگی، استخراج DNA به روش موری وتامسون (١٩٨٠) انجام شد.

بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ صورت گرفت. پس از انجام PCR با چهار جفت آغازگر سیتوپلاسم (کلروپلاست) و برش آنزیمی محصولات PCR شده توسط آنزیم برش‌دهنده (محدودگر) با هفت آنزیم، نمونه‌های برش‌یافته بر روی ژل‌های آگارز ۲/۵٪ الکتروفورز شدند. پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید و عکس‌برداری از ژل‌های رانده شده، چند شکلی و مکان‌های جهش یافته تعیین و روابط مورفوتیپ‌ها بر اساس شباهت و تفاوت چندشکلی‌ها انجام پذیرفت. با استفاده از برنامه‌های NTSYS و POPGENE داده‌های بدست آمده از ٧٤ تیپ ناشناخته، با داده‌های ۱۵ رقم استاندارد مرکبات مورد مقایسه قرار گرفتند و روابط فیلوژنتیک آنها مشخص گردید.

نتایج و بحث:

چهار جفت آغازگر PCR-RFLP مورد استفاده در این تحقیق در مجموع ٥٤ آلل تولید کردند. مقدار PIC برای چهار جفت آغازگر بین ۰/۱۳۹ تا ۰/۲۹۱ بود. تجزیه خوشه‌ای به روش حداکثر همسایگی و با استفاده از ضریب تشابه جاکارد انجام گردید و با توجه به دندروگرام حاصل، تیپ‌های مورد مطالعه به چهار گروه اصلی تقسیم شدند. با توجه به دندروگرام حاصله، چهار جفت آغارگر و هفت نوع آنزیم برش‌دهنده مورد استفاده در این مطالعه توانستند تیپ‌های مختلف مرکبات را به خوبی دسته‌بندی کنند.

منابع:

1. Soost, R.K. and M.L. Roose.1996. *Citrus*. PP.257-323.In: Janik, Y., and J.N. Moore, (eds.) Fruit breeding, Volume I, Tree and tropical fruits .John Wiley & Sons, Inc.
2. Soost, R.K. & Cameron, J .W,(1975) *Citrus*. In: Advances in fruit breeding. Janick, J. & Moore, J.N. (eds.). Purdue university press,West Lafayette Indiana, PP. 507-540
3. . Asadi. Abkenar, A., S. Isshiki and Y. Tashiro. 2004. Phylogenetic relationships in the "true citrus fruit trees" revealed by PCR-RFLP analysis of cpDNA. Sci. Hort. 102:233-242.

Abstract

In *Citrus* family, the long history of cultivation, wide dispersion, widely sexual compatibility between *Citrus* and related genera and the high frequency of bud mutations have resulted in high genetic variability in the world. Understanding phylogenetic relationships and genetic diversity in *Citrus* are important in clarifying genetic relationships, characterizing germplasm and the registration of new cultivars. There are some *Citrus* accessions in Iranian citrus collections which have been classified merely based on their morphological traits. Molecular markers would help to infer their relations with known cultivars. In order to study genetic diversity of 89 morphotypes including 74 unknown accessions and 15 known (control) cultivars of citrus trees in the Kotra Research Station (Tonekabon) collection were selected and PCR-RFLP marker were used for determining polymorphism. The cluster analysis of data based Jaccard's similarity coefficient morphotypes obtained from PCR-RFLP marker suitable model were produced four main groups that they can determine the relationship Genetic.

Key words: *Citrus*, gentic diversity, germplasm, PCR-RFLP