

بررسی همراستایی گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مرکبات با استفاده از نشانگرهای مولکولی

ابوذر ابوذری^{۱*}، احمدرضا دادرسی^۲، زهره غفاری نیا^۳

^۱ استادیار پژوهشی، بخش زراعی و باغی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی مازندران، ایران

^۲ استادیار پژوهشی، بخش زراعی و باغی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی زنجان، ایران

^۳ کارشناس ارشد زراعت، واحد ترویج مدیریت جهاد کشاورزی شهرستان عباس‌آباد، مازندران، ایران

* نویسنده مسئول: A.Abouzari@areeo.ac.ir

چکیده

تعیین تنوع و روابط ژنتیکی بین ارقام و گونه‌ها، لازمه انتخاب صحیح مواد ژنتیکی جهت اهداف به‌نژادی می‌باشد. بدین منظور تنوع ژنتیکی بین ۷۶ بیوتیپ ناشناخته و ۳۴ رقم تجاری مرکبات با استفاده از ۲۸ جفت پرایمر SSR و ۲۵ ترکیب پرایمر AFLP مورد ارزیابی قرار گرفت. در مجموع ۳۲۶ و ۵۴۵ باند چند شکل به ترتیب برای نشانگر AFLP و SSR با میانگین درصد چندشکلی ۹۷/۵٪ و ۸۲/۶۸٪ مشاهده شد که بیانگر تنوع بالا در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بود. با توجه به داده‌های حاصل از SSR، ضریب تشابه Nei، الگوریتم ادغام برحسب متوسط گروه‌ها (UPGMA) و بیشترین ضریب همبستگی کوفنتیک ($r=0/94$)، ۱۱۰ نمونه در ۴ خوشه اصلی با ضریب تشابه مساوی و بیشتر از ۰/۳۶ گروه‌بندی شدند. در گروه‌بندی بر مبنای الگوی باندی حاصل از ترکیبات پرایمر AFLP، از ضریب تشابه جاکارد و روش الگوریتم اتصال همسایگی (NJ) استفاده شد. مقدار بالای ضریب همبستگی کوفنتیک محاسبه شده ($r=0/93$)، الگوریتم انتخاب شده را تأیید نمود. بر این اساس دندروگرام حاصل به ۵ گروه اصلی با تشابه درون گروهی مساوی و بزرگ‌تر از ۰/۶۵ تفکیک شد. نتایج این تحقیق نشان داد هر دو نشانگر در ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مرکبات کارآمد بوده‌اند ولی با در نظر گرفتن پرایمرها و ترکیبات پرایمری استفاده شده، نشانگر SSR در مقایسه با نشانگر AFLP کارایی بالاتری داشت. بر این اساس، به استناد وجه اشتراک نتایج تجزیه‌های انجام شده، هم‌گروهی و میزان شباهت ژنتیکی، اطلاعات مفیدی در خصوص ماهیت ژنتیکی ژرم‌پلاسم مورد مطالعه و ارتباط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های ناشناخته و ارقام تجاری به دست آمد.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، مرکبات، نشانگر مولکولی

مقدمه

سیتروس و ۲۸ جنس خویشاوند آن به خانواده Rutaceae و زیرخانواده Aurantioideae تعلق دارند (Barkley *et al.*, 2006). تعیین تنوع و روابط ژنتیکی بین ارقام و گونه‌ها، لازمه انتخاب صحیح مواد ژنتیکی جهت اهداف به‌نژادی می‌باشد. امروزه استفاده از نشانگرهای مولکولی به دلیل صرفه‌جویی در زمان، ثبات، پایداری، قابلیت اطمینان و انتخاب دقیق‌تر صفات پیچیده، از کارایی بیشتری نسبت به شاخص‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی برخوردار هستند (Abouzari *et al.*, 2020). استفاده از توالی‌های تکراری ساده (SSR) به دلیل ایجاد چندشکلی زیاد، سهولت به‌کارگیری، توزیع ژنومی مناسب و ماهیت هم‌باز، توسط محققین زیادی مورد توجه قرار گرفته است (Ollitrault *et al.*, 2015). نشانگر غالب چندشکلی طول قطعات حاصل از تکثیر AFLP^۲ بر اساس تکثیر دسته‌های خاصی از قطعات برش یافته ژنومی با استفاده از PCR طراحی شده و با وجود پیچیدگی نسبی، ویژگی‌هایی مانند قابلیت تکرارپذیری بالا، امکان بررسی هم‌زمان چندین مکان ژنی، عدم نیاز به اطلاعات اولیه ژنومی جهت طراحی پرایمر، غیرحساس بودن به غلظت DNA الگو و ظرفیت تولید تعداد زیاد باند تکرارپذیر در مدت‌زمان کوتاه، سبب شده برای اهداف مختلفی مانند بررسی تنوع ژنتیکی، در اولویت انتخاب برخی از محققین قرار گیرد (Paun and Schönswetter, 2012). داده‌های حاصل از نشانگرهای مولکولی با اعمال تجزیه‌های مختلفی در قالب گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه می‌توانند مورد بررسی

¹ Simple Sequence Repeat

² Amplified Fragment Length Polymorphism

قرار گیرند. پژوهش حاضر به منظور مقایسه کارایی و ارتباط دو نشانگر هم بارز (SSR) و غالب (AFLP) در تمایز و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها و تعیین روابط فیلوژنی بین ژنوتیپ‌های ناشناخته مرکبات و برخی از ارقام تجاری، طراحی و اجرا گردید.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش ۷۶ بیوتیپ طبیعی ناشناخته و ۳۴ رقم تجاری و محلی مرکبات، از پژوهش‌کننده تحقیقات مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری مورد ارزیابی قرار گرفت. استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های برگ‌ی به روش ادوارد و همکاران (Edwards *et al.*, 1991) انجام شد. تجزیه ۲۸ نشانگرهای ریز ماهواره بر اساس روش Barkley و همکاران (۲۰۰۶) و ۲۵ ترکیب پرایمری نشانگرهای AFLP بر اساس روش پیشنهادی Angiolillo و همکاران (۱۹۹۹) انجام شد (Angiolillo *et al.*, 1999). الگوهای بانندی چند شکل برای نشانگر SSR به دو روش برآورد وزن مولکولی ال‌ها و به صورت صفر (عدم وجود باند) و یک (وجود باند) امتیاز داده شدند. برای نشانگر AFLP نیز ماتریس صفر و یک حاصل از امتیازبندی باندها، بر مبنای عدم وجود باند (صفر) و وجود باند (یک) در دامنه ۷۰ تا ۵۰۰ جفت باز، تشکیل گردید. برای انتخاب بهترین ماتریس ضرایب تشابه و الگوریتم مناسب برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها، ضریب همبستگی کوفنتیک (r) برای هر دو نشانگر محاسبه شد. تشکیل ماتریس‌ها، گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها و سنجش میزان انطباق ماتریس‌ها و دندروگرام‌های حاصل انجام و تفکیک گروه‌ها بر اساس بیشترین فاصله محل ادغام شاخه‌ها در دندروگرام صورت گرفت.

جدول ۱- نام علمی و شماره ۱۱۰ ژنوتیپ مرکبات مورد استفاده در این پژوهش

شماره	نام علمی	نام عمومی	شماره	نام علمی	نام عمومی
G1-G75	Citrus spp	نامشخص	G93	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	تامسون ناول
G76	Osbeck <i>C. medica</i> (L.)	سیترون	G94	(L.) Osbeck <i>C. sinensis</i>	سیاورز ۲
G77	<i>C. limon</i> (L.) Burm. f.	لمون اروکا	G95	(L.) Osbeck <i>C. sinensis</i>	معلم کوه
G78	<i>C. grandis</i> (L.) Osbeck	پوملو	G96	<i>C. unshiu</i> Marcovitch	اونشو
G79	Citrus spp	نامشخص	G97	Minneola tangelo × <i>C. clementina</i>	پیچ
G80	<i>C. reshni</i> Tanaka	کلنوپاترا	G98	<i>C. reticulata</i> × <i>C. sinensis</i>	خرم
G81	<i>C. reticulata</i> Blanco	دنسی	G99	(L.) Osbeck. <i>C. sinensis</i>	والنسیا
G82	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	سیاورز ۱	G100	<i>C. reticulata</i> × <i>C. sinensis</i>	جهانگیر
G83	<i>C. myrtifolia</i> (L.) Rafinesque	نارنج خوشه‌ای	G101	<i>C. reticulata</i> × <i>C. sinensis</i>	نوشین
G84	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	سانگین	G102	<i>C. unshiu</i> Marcovitch	اکیتسو
G85	<i>C. reticulata</i> Blanco	شل محله	G103	<i>Poncirus trifoliata</i> (L.) Rafinesque	نارنج سه برگ
G86	<i>C. aurantium</i> L.	نارنج	G104	<i>C. reticulata</i> × <i>C. sinensis</i>	شاهین
G87	<i>C. limettoides</i> Tanaka	لیموشیرین	G105	<i>C. clementina</i> Tanaka	ماریسول
G88	<i>C. reticulata</i> Blanco	کلمانتین	G106	<i>trifoliata C. paradisi</i> × <i>P.</i>	سیتروملو
G89	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	سانگینا	G107	(<i>C. paradisi</i> × <i>C. reticulata</i>) × <i>C. changsha</i>	یاشار
G90	Macfadyen <i>C. paradise</i>	گریپ‌فروت	G108	<i>C. latifolia</i> (Yu. Tanaka) Tanaka	پرشین لایم
G91	<i>C. paradise</i> Macfadyen	گریپ‌فروت	G109	<i>C. aurantifolia</i> (Christm.) Swingle	مکزیکن لایم
G92	<i>C. sinensis</i> (L.) Osbeck	گروس سانگین	G110	<i>C. aurantium</i> L.	نارنج اف‌تایپ

نتایج و بحث

چندشکلی حاصل از نشانگرها

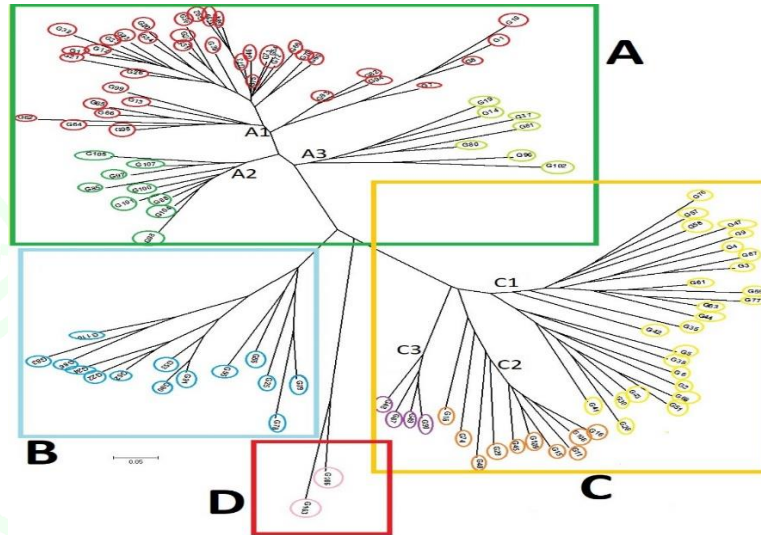
در این پژوهش هر ۲۸ جفت نشانگر SSR، الگوی بانندی مناسبی جهت ارزیابی ۱۱۰ ژنوتیپ مورد مطالعه تولید نمودند و در مجموع تعداد ۳۲۶ باند چند شکل با میانگین ۱۱/۶ ال‌ها به ازای هر جایگاه ژنی امتیازدهی شد. کمترین و بیشترین مقدار محتوای اطلاعات چند

شکلی (PIC) به عنوان یکی از معیارهای مهم برای مقایسه کارایی نشانگرهای مختلف در تمایز ژنوتیپ‌ها، به ترتیب ۰/۳۱ برای پرایمر AGG9 و ۰/۹۲ برای پرایمر TAA41، با میانگینی معادل ۰/۷۱ بود. در ارزیابی مجدد ژنوتیپ‌های انتخابی با استفاده از نشانگر AFLP، در مجموع ۶۴۹ باند قرائت شد که ۵۴۵ عدد از آن‌ها چند شکل بودند. با در نظر گرفتن ۰/۵ به عنوان بالاترین ارزش شاخص محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) برای نشانگرهای غالب، محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) برای تمامی ترکیبات پرایمر: آنزیمی بیشتر از ۰/۴ و میانگین محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) معادل ۰/۴۶ محاسبه شد. این میزان بالای PIC بیانگر انتخاب مناسب ترکیبات پرایمر: آنزیمی و قابلیت آن‌ها برای تمایز تفاوت‌های بین نمونه‌های مورد مطالعه است.

تعیین روابط ژنتیکی بر اساس داده‌های SSR

باتوجه به ضریب تشابه Nei و الگوریتم ادغام برحسب متوسط گروه‌ها (UPGMA) با بیشترین ضریب همبستگی کوفتیک ($r=0/94$) در مقایسه با دیگر الگوریتم‌ها، ۱۱۰ نمونه در ۴ خوشه اصلی (A, B, C و D) با ضریب تشابه مساوی و بیشتر از ۰/۳۶ گروه‌بندی شدند (شکل ۱). گروه A با بیشترین تعداد ژنوتیپ به سه زیرگروه A1, A2 و A3 تقسیم شد. همه ارقام شاهد پرتقال و نارنگی با هم در این گروه قرار گرفتند. پرتقال هیبریدی از دو گونه حقیقی ماندارین و پوملو بوده و در این تحقیق نیز همانند برخی از مطالعات فیلوژنی مرکبات (Curk et al., 2016) شباهت بیشتری به والد ماندارینی خود نشان داد. میانگین ضریب تشابه بالا بین ارقام شاهد پرتقال ($GS=0/826$) بیانگر منشأ ژنومی مشترک (مونوفیتیک) می‌باشد که در طی زمان با جهش سوماتیکی و گزینش ژنوتیپ‌های مطلوب همراه بوده است. ۳۱ بیوتیپ ناشناخته به همراه ارقام شاهد پرتقال در زیرگروه A1 دسته‌بندی شدند (شکل ۱). هم‌گروهی و بالابودن نسبی میانگین ضریب تشابه این بیو تیپ‌های ناشناخته با ارقام پرتقال ($GS=0/71$) بیانگر قرابت آن‌ها با پرتقال می‌باشد. در این زیرگروه برخی از بیو تیپ‌های ناشناخته مانند G12 با G73, G17 و G46، G27 با G31 دارای ضرایب تشابه بالایی بودند (به ترتیب ۰/۸۸، ۰/۹۳ و ۰/۹۱). این ژنوتیپ‌ها احتمالاً حاصل جهش‌های سوماتیکی و یا ژنوتیپ‌های با منشأ نوسلار مشترک می‌باشند. هیبریدهای ماندارین در زیرگروه A2 قرار گرفتند. در زیرگروه A3 سه ژنوتیپ ناشناخته G14, G19 و G37 بیشترین ضریب شباهت را با ژنوتیپ کلتوپاترا (G80) نشان دادند ($GS=0/64$) که بیانگر ارتباط ژنتیکی بین آن‌ها است. نارنگی اونسو (G96) با ضریب تشابه ۰/۵۱ نسبت به کلمانترین (G88) جداگانه در زیرگروه A3 قرار گرفت. پوملو (G78) به عنوان یکی از سه گونه حقیقی مرکبات و منطبق با الگوی گزارش شده در پژوهش‌های گذشته به همراه ارقام گریپ‌فروت (G90 و G91) و نارنج (G83 و G86، و G110) در گروه B قرار گرفت. بررسی‌ها نشان داده که نارنج هیبرید طبیعی ماندارین به عنوان والد پدری و پوملو به عنوان والد مادری است (Barkley et al., 2006). میانگین ضریب تشابه بین ژنوتیپ‌های نارنج ($GS=0/79$) می‌تواند دلیلی بر قرابت درون‌گونه‌ای بالا در بین ژنوتیپ‌های نارنج باشد. در مطالعه حاضر سیترون به همراه هیبریدهای آن در گروه C قرار گرفت. منشأ لایم‌ها و لمون‌ها هنوز یکی از دلایل اختلاف نظر در طبقه‌بندی مرکبات بشمار می‌آید (Curk et al., 2016). در گروه D صرفاً دو ژنوتیپ پونسیروس (G103) همراه با

سیتروملو (G106) با ضریب تشابه ۰/۷۴ قرار گرفت که این الگو با نتایج حاصل از پژوهش‌های انجام شده با نشانگرهای مولکولی ISSR و RAPD منطبق است (Barkley et al., 2006).

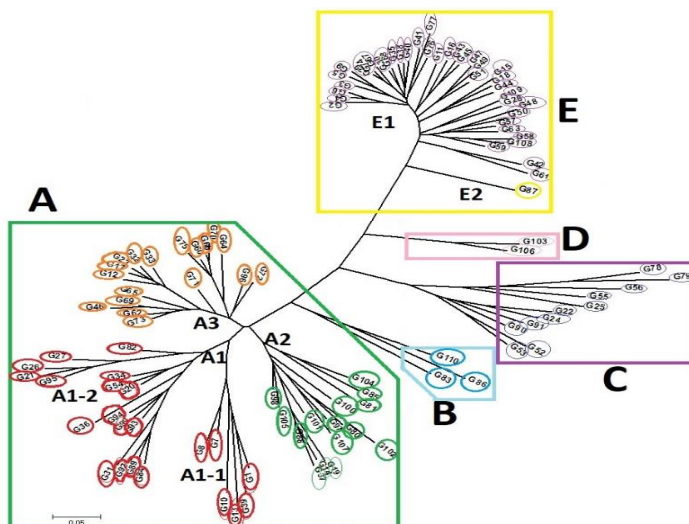


شکل ۱- گروه‌بندی ۱۱۰ ژنوتیپ مرکبات با استفاده از ۲۸ نشانگر SSR و به روش الگوریتم ادغام بر حسب متوسط گروه‌ها (UPGMA) (کدها بر اساس جدول ۱ می‌باشد)

تعیین روابط ژنتیکی بر اساس داده‌های AFLP

برای تعیین ارتباط ژنتیکی ۱۱۰ نمونه مورد مطالعه بر مبنای الگوی بانندی حاصل از ۲۵ ترکیب پرایمر: آنزیمی AFLP، از ضریب تشابه جاکارد و روش الگوریتم اتصال همسایگی (NJ) استفاده شد. مقدار بالای ضریب همبستگی کوفنتیک محاسبه شده ($r=0/93$) نسبت به سایر الگوریتم‌ها، انتخاب مناسب این الگوریتم را تأیید نمود. براین اساس دندروگرام حاصل به ۵ گروه اصلی A، B، C، D و E با تشابه درون گروهی مساوی و بزرگ‌تر از ۰/۶۵ تفکیک شد و بیوتیپ‌های ناشناخته به گروه‌های مختلف منتسب شدند (شکل ۲). بیشترین تعداد ژنوتیپ‌ها (۵۵ عدد) در گروه A قرار گرفت. این گروه خود دارای سه زیرگروه A1، A2 و A3 بود. مشابه گروه‌بندی همین نمونه‌ها بر اساس داده‌های SSR و منطبق با گزارش مطالعات گذشته (Barkley et al., 2006) در این سیستم نیز ارقام شاهد پرتقال و نارنگی با چیدمانی متفاوت در یک گروه دسته‌بندی شدند. زیرگروه A2 به جز رقم اونسو (G96)، همه ارقام شاهد نارنگی به همراه سه بیوتیپ ناشناخته G14، G19 و G37 را در بر می‌گیرد. وجود شباهت ژنتیکی با میانگینی در حدود ۰/۸ در بین ژنوتیپ‌های نارنگی، نتایج حاصل از این تحقیق با استفاده از نشانگر SSR و مطالعات دیگر را تأیید می‌نماید (Aka Kacar et al., 2009). ۱۷ بیوتیپ ناشناخته همراه با اونسو (G96)، در زیرگروه A3 گروه‌بندی شدند (شکل ۲). ژنوتیپ‌های G12، G17، G23، G32 و G33 با ضریب تشابه ۰/۸ از سایر ژنوتیپ‌های این زیرگروه تفکیک شده‌اند. باتوجه به میانگین ضریب تشابه بالا بین این ژنوتیپ‌ها ($GS=0/93$)، می‌توان گفت که نمونه‌های مذکور در حقیقت ژنوتیپ‌های مشابه نوسلار یکدیگر می‌باشند. دو ژنوتیپ پونسیروس (G103) و سیتروملو (G106) مشابه با نتایج SSR به طور مستقل گروه D را تشکیل دادند. گروه E خود به دو زیرگروه E1 و E2 تقسیم شد. زیرگروه E1 از ارقام سیترون (G76)، لمون اروکا (G77)، پرشین لایم (G108)، مکزیکن لایم (G109)، همراه با ۳۴ بیوتیپ ناشناخته تشکیل شده است (شکل ۲).

ضریب تشابه بین ژنوتیپ‌های این زیرگروه بسیار بالا بود (۰/۷۳ تا ۰/۹۶). در تحقیقات پیشین ضریب تشابه بین دو رقم پرشین لایم (G109) و مکزیکن لایم (G109) محاسبه شد (Shahsavari *et al.*, 2007) که با نتایج به دست آمده در این تحقیق مشابه است.



شکل ۲- گروه‌بندی ۱۱۰ ژنوتیپ مرکبات با استفاده از ۲۵ ترکیب پرایمری AFLP و به روش الگوریتم اتصال همسایگی (Neighbor Joining).

(کدها بر اساس جدول ۱ می‌باشد).

بررسی هم‌راستایی گروه‌بندی حاصل از نشانگرهای AFLP و SSR

پژوهش حاضر این فرصت را به وجود آورد که علاوه بر مقایسه توانایی دو نشانگر در کشف چندشکلی برای تشخیص تنوع بین نمونه‌های مورد آزمون، اعتبار نتایج حاصل در تشخیص تفاوت ماهیت ژنتیکی بیو تیپ‌های ناشناخته نیز تأیید شود. درک درست از اثربخشی هر نشانگر اولین شرط لازم برای انجام تجزیه‌های ژنتیکی و برنامه‌های اصلاحی است. آماره‌های محاسبه شده جهت تعیین پتانسیل نشانگرها در تشخیص تنوع ژنتیکی و حصول نتایج منطقی و قابل انتظار برای ژنوتیپ‌های شاهد، کارایی مناسب نشانگرهای AFLP و SSR را تأیید نمود. با وجود آنکه تعداد باندهای SSR نسبت به AFLP کمتر بود (به ترتیب ۳۳۱ و ۶۴۹) ولی بیشتر آن‌ها چند شکل بودند و بدین علت متوسط درصد چندشکلی برای SSR بیشتر از AFLP محاسبه شد (به ترتیب ۹۷/۵٪ و ۸۲/۶۸٪) که با نتایج پژوهش‌های دیگر نیز منطبق است (Belaj *et al.*, 2003). ثبت نسبت بالای چند شکلی در SSR را می‌توان به مکانیسم‌های متنوعی مانند سرخوردن پلیمرز در طی فرایند همانندسازی DNA که موجب تغییر در تعداد توالی‌های تکراری SSR و تنوع الی می‌شود مرتبط دانست. در این بررسی میانگین تعداد ال مؤثر برای هر جایگاه ژنی (Ne) در نشانگر SSR ۴/۹۳ و برای نشانگر AFLP ۱/۴۹ برآورد گردید که بیشتر بودن هتروزیگوسیتی مورد انتظار (He) یا تنوع الی نشانگر SSR نسبت به نشانگر AFLP را می‌رساند. آزمون مانل به منظور تعیین میزان تطابق گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در دو دندروگرام حاصل از نشانگر AFLP و SSR انجام شد و ضریب همبستگی کوفاکتیک معادل ۰/۴۰ به دست آمد ($r=0/40$). ثبت انطباق کمتر از ۰/۵ می‌تواند به دلیل ماهیت متفاوت دو نشانگر، تفاوت در مکانیسم شناسایی چندشکلی و حتی تعداد پرایمرهای استفاده شده برای هر نشانگر باشد. از سویی دیگر به واسطه احتمال وجود ردیف‌های SSR در قطعه‌های تکثیر شده AFLP، امکان داشتن مخلوطی از نشانگرهای غالب و هم بارز در روش AFLP وجود دارد که بخشی از انطباق نتایج دو نشانگر را می‌توان به این موضوع مرتبط دانست. در بررسی روابط فیلوژنی، هر دو سیستم نشانگری دامنه متنوعی از شباهت‌ها را بین نمونه‌ها نشان دادند و بر اساس موقعیت برخی ژنوتیپ‌ها در دندروگرام‌های به دست آمده تفاوت مشاهده شد. میزان دقت محاسبه ضریب تشابه ژنتیکی (GS)، بر اطلاعات منتج شده از هر نشانگر تأثیر می‌گذارد و این خود به تعداد نشانگرهایی که شناسایی شده‌اند و چگونگی توزیع آن‌ها در سطح ژنوم بستگی دارد. با استفاده از نشانگر SSR بیوتیپ ناشناخته G73 با دو بیوتیپ ناشناخته G11 و G75

به ترتیب کمترین (۰/۰۱۹) و بیشترین (۰/۹۶۲) تشابه را نشان داد. در بررسی ماتریس شباهت حاصل از داده‌های AFLP نیز کمترین ضریب تشابه (۰/۱۱۲) و بیشترین ضریب تشابه (۰/۹۷۲) به ترتیب بین بیوتیپ ناشناخته G66 با پونسیروس (G103) و بیوتیپ (G70) به دست آمد. این مقایسه نشان می‌دهد که میزان تنوع محاسبه شده (فاصله یا شباهت) بین دو ژنوتیپ با سیستم نشانگری SSR و AFLP، متفاوت می‌باشد. در برنامه‌های اصلاحی از طریق هیبریداسیون، ژنوتیپ‌هایی به‌عنوان والدین انتخاب می‌شوند که باثبات‌ترین فاصله ژنتیکی مطلوب را در نتایج به‌دست‌آمده از چند نشانگر داشته باشند. علاوه بر آن نتیجه‌گیری در خصوص جفت ژنوتیپ‌هایی که با استفاده از نشانگرهای مختلف شباهت ژنتیکی بالایی نشان داده‌اند از اعتبار بیشتری برخوردار خواهد بود. براین اساس در پژوهش حاضر ارقام سانگین (G84) و سانگین لا (G89)، تامسون ناول (G93) و والنسیا (G99)، سانگین لا (G89) و گروس سانگین (G92)، به همراه دو بیوتیپ ناشناخته G12 و G17 در هر دو سیستم نشانگری قرابت بالایی نشان دادند. این مطالعه نشان داد که تشابه ژنتیکی بالایی بین ارقام پرتقال وجود دارد. همچنین با دقت در دندروگرام حاصل از دو نشانگر (شکل‌های ۱ و ۲) ملاحظه می‌شود که بیو تیپ‌های ناشناخته G21، G26، G27، G20، G54، G34، G31، G36 همراه با ارقام شاهد پرتقال در یک گروه قرار گرفتند و این تشابه الگوی گروه‌بندی در حقیقت تأییدی بر قرابت بالای این بیو تیپ‌های ناشناخته با گونه پرتقال می‌باشد. دو رقم پونسیروس (G103) و سیتروملو (G106) بر اساس داده‌های AFLP نسبت به SSR، قرابت بیشتری به هم نشان دادند (GS=۰/۸۷). پونسیروس (G103) ژنوتیپ خزان‌کننده است و به علت دارا بودن خصوصیات مورفولوژیک متفاوت و عدم تقارن زمان گلدهی با سایر گونه‌های مرکبات، تمایز آن از سایر گروه‌ها دور از انتظار نیست.

تشکیل گروه‌های ژنوتیپی حاصل از اطلاعات دو نشانگر و مقایسه تجزیه‌های مختلف نشان داد که پوملو (*C. maxima*)، ماندارین (*C. reticulata*) و سیترون (*C. medica*) منطبق بر یافته‌های قبلی (Curk *et al.*, 2015) به‌عنوان سه گونه حقیقی مرکبات (گونه‌های اولیه) در گروه‌های مجزا قرار گرفته‌اند. نتایج این تحقیق نشان داد اگرچه هر دو نشانگر در ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مرکبات کارآمد بوده‌اند ولی با در نظر گرفتن پرایمرها و ترکیبات پرایمری استفاده شده، نشانگر SSR در مقایسه با نشانگر AFLP کارایی بالاتری داشت. براین اساس، به استناد وجه اشتراک نتایج تجزیه‌های انجام شده، هم‌گروهی و میزان شباهت ژنتیکی اطلاعات مفیدی در خصوص ماهیت ژنتیکی ژرم‌پلاسِم مورد مطالعه و ارتباط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های ناشناخته و ارقام تجاری به دست آمد.

منابع

- Abouzari, A., Solouki, M., Golein, B., Fakheri, B.A., Sabouri, A., Dadras, A.R., 2020. Unraveling the cryptic genetic variation and population structure of the citrus genotypes with unknown origin. *Genetika* 52, 291-309.
- Aka Kacar, Y., Uzun, A., Yesiloglu, T., Tuzcu, O., Gulsen, O., Seday, U., Canan, I., 2009. Genetic diversity and relationships of clementine mandarin accessions as assessed using SRAP markers, II International Symposium on Citrus Biotechnology 892, pp. 65-72.
- Angiolillo, A., Mencuccini, M., Baldoni, L., 1999. Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics* 98, 411-421.
- Barkley, N.A., Roose, M.L., Krueger, R.R., Federici, C.T., 2006. Assessing genetic diversity and population structure in a citrus germplasm collection utilizing simple sequence repeat markers (SSRs). *Theoretical and applied genetics* 112, 1519-1531.
- Belaj, A., Satovic, Z., Cipriani, G., Baldoni, L., Testolin, R., Rallo, L., Trujillo, I., 2003. Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. *Theoretical and Applied Genetics* 107, 736-744.
- Curk, F., Ancillo, G., Ollitrault, F., Perrier, X., Jacquemoud-Collet, J.-P., Garcia-Lor, A., Navarro, L., Ollitrault, P., 2015. Nuclear species-diagnostic SNP markers mined from 454 amplicon sequencing reveal admixture genomic structure of modern citrus varieties. *PloS one* 10, e0125628.
- Curk, F., Ollitrault, F., Garcia-Lor, A., Luro, F., Navarro, L., Ollitrault, P., 2016. Phylogenetic origin of limes and lemons revealed by cytoplasmic and nuclear markers. *Annals of botany* 117, 565-583.
- Edwards, K., Johnstone, C., Thompson, C., 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic acids research* 19, 1349.

Ollitrault, P., Terol, J., Chen, C., Federici, C.T., Lotfy, S., Hippolyte, I., Ollitrault, F., Berard, A., Chauveau, A., Cuenca, J., 2015. Comparative Genetic Mapping between Clementine, Pummelo and Sweet Orange and the Interspecific Structure of the Clementine Genome, Xii International Citrus Congress-International Society of Citriculture, pp. 561-573.

Paun, O., Schönswetter, P., 2012. Amplified fragment length polymorphism: an invaluable fingerprinting technique for genomic, transcriptomic, and epigenetic studies, *Plant DNA Fingerprinting and Barcoding*. Springer, pp. 75-87.

Shahsavari, A., Izadpanah, K., Tafazoli, E., Tabatabaei, B.S., 2007. Characterization of citrus germplasm including unknown variants by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Scientia Horticulturae* 112, 310-314.

Consistency of citrus genotypes grouping using molecular markers

Abouzar Abouzari^{1*}, Ahmad Reza Dadras², Zohreh Ghafarinia³

^{1*} Research Assistant Professor, Crop and Horticultural Science Department, Mazandaran Agricultural Resources Research and Education Center, (AREEO), Iran

² Research Assistant Professor, Crop and Horticultural Science Department, Zanjan Agricultural Resources Research and Education Center, (AREEO), Iran

³ Master of Agronomy, Extension Unit, Agricultural Jihad Management, Abbasabad, Mazandaran, Iran

*Corresponding Author: A.Abouzari@areeo.ac.ir

Abstract

Determining the diversity and genetic relationships between cultivars and species is necessary to select genetic material for breeding programs. For this purpose, genetic diversity between 76 unknown biotypes and 34 commercial citrus cultivars was evaluated using 28 SSR primers pairs and 25 AFLP primer combinations. A total of 326 and 545 polymorphic bands were observed for SSR and AFLP markers, with an average polymorphism percentage of 97.5% and 82.68%, respectively, indicating high diversity among the studied genotypes. According to SSR data, Nei similarity coefficient, unweighted-pair group method arithmetic average (UPGMA), and maximum cophenetic correlation coefficient ($r = 0.94$), 110 samples were clustered in four main groups with similarity coefficient equal and more than 0.36. Jaccard's similarity coefficient and the Neighbor-Joining (NJ) were used in the grouping based on the band pattern obtained from AFLP primer compounds, Jaccard's similarity coefficient, and the Neighbor-Joining (NJ) were used. The high value of the calculated cophenetic correlation coefficient ($r = 0.93$) confirmed the selected algorithm. The AFLP resulting dendrogram was divided into five main groups with intragroup similarity equal and more than 0.65. This study showed that although both markers effectively assessed the genetic diversity of citrus genotypes, considering the primers and primer compounds used, the SSR marker was more effective than the AFLP marker. Based on the commonality of the results and the degree of genetic similarity, helpful information about the genetic nature of the studied germplasm and the genetic relationship between unknown genotypes and commercial cultivars were obtained.

Keywords: Genetic diversity, Citrus, Molecular marker