تعیین روابط فیلوژنتیک تعدادی از ژنوتیپ‌های مرکبات شمال ایران با استفاده از نشانگرهای ISSR

Determination of Phylogenetic Relationships in some *Citrus* Genotypes of Northern Iran Using ISSR Markers

هاجر بخشی‌پور میانده[۱*]، بهروز گلعین[۲]، ایرج مهرگان[۳] و سارا سعادتمند[۴]

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۶/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۰۶

چکیده

اطلاع از روابط فیلوژنتیک و تنوع ژنتیکی 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 براساس صفات مورفولوژی بوده و تحقیقات ژنتیکی چندانی بر روی آنها انجام نشده است به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی بین ۴۵ ژنوتیپ از ارقام ناشناخته و تجاری مرکبات موجود در ایستگاه تحقیقات کترا، از نشانگرهای ISSR استفاده گردید. 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 و I) مجزا طبقه‌بندی کرد. ارقام پرتقال، نارنگی و ۱۹ ژنوتیپ ناشناخته در گروه A، یک ژنوتیپ ناشناخته در گروه B، دو ژنوتیپ ناشناخته در گروه C، یک ژنوتیپ ناشناخته در گروه D، گریپ‌فروت و پوملو و نارنج و شش ژنوتیپ ناشناخته در گروه E، دو ژنوتیپ ناشناخته در گروه F، یوزو در گروه G، دو ژنوتیپ ناشناخته در گروه H و در نهایت ارقام لیمو و بالنگ در گروه I قرار گرفتند. تجزیه تنوع ژنتیکی و تعیین روابط خویشاوندی در مرکبات، اطلاعات مفیدی را برای برنامه‌های به‌نژادی، انتخاب و حفظ ارقام فراهم می‌کند.

واژه‌های کلیدی: ارقام مرکبات، روابط خویشاوندی، ژرم‌پلاسم، نشانگر مولکولی

۱. مربی باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران

۲. دانشیار، مؤسسه تحقیقات مرکبات کشور، رامسر

۳ و ۴. استادیاران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران

*: نویسنده مسوول Email: hajar.bakhshipour@yahoo.com

مقدمه

مرکبات عموماً به گونه‌های مختلفی از جنس *Citrus* L. (خانواده Rutaceae) اطلاق می‌شود. مرکبات در ایران شامل گروه بزرگی از میوه‌ها ازجمله پرتقال *Citrus sinensis*، نارنگی *C. reticulata*، لایم *C. aurantifolia*، گریپ‌فروت *C. paradisi*، دارابی *C. grandis* می‌باشد. گسترش وسیع جغرافیایی و میزان بالای تولید مرکبات موجب شده است که این محصول از اهمیت اقتصادی زیادی در جهان برخوردار باشد. در دنیای جدید، مرکبات دومین صنعت بزرگ میوه در تجارت جهانی بوده و می‌تواند در اقلیم‌های گرمسیری و نیمه‌گرمسیری که خاک مناسب، گرمای متوسط و رطوبت دائمی داشته باشند گسترش یابد (*گلعین و عدولی* Golein and Adouli, 2011). یکی از پایه‌های اساسی به‌نژادی گیاهان، دسترسی و آگاهی از میزان تنوع در مجموعه‌های ژنتیکی و مراحل مختلف پروژه‌های به‌نژادی است. تخمین ترکیب ژنتیکی مرکبات و مجموعه‌های ژنتیکی و قرابت بین آنها از گذشته دور معمول بوده است (*بارکلی* و همکاران Barkley *et al*., 2006). مشخص شدن رده‌بندی و تنوع ژنتیکی در مرکبات جهت تعیین روابط ژنتیکی، شناسایی ژرم‌پلاسم، کنترل فرسایش ژنتیکی، ایجاد برنامه‌های به‌نژادی و ثبت ارقام جدید، امری مهم و ضروری می‌باشد (*هررو* و همکاران Herrero *et al*., 1996). یکی از پیامدهای اجتناب‌ناپذیر کشاورزی مدرن که مبتنی بر استفاده از واریته‌های اصلاح شده با حداکثر عملکرد و کیفیت قابل قبول می‌باشد، کاهش تنوع ذخایر ژنتیکی بوده است. بنابراین امروزه آگاهی از تنوع ژنتیکی و مدیریت منابع ژنتیکی بومی و وارداتی به‌عنوان اجزاء مهم پروژه‌های به‌نژادی نبات تلقی می‌گردند (*کروجر و روز* Krueger and Roose, 2003). درگذشته، مطالعات روابط فیلوژنتیک میان جنس‌ها و گونه‌های مرکبات تنها بر اساس خصوصیات مرفولوژی انجام می‌گرفت (*نیکولاسی* و همکاران Nicolosi *et al*., 2000)، اما استفاده از خصوصیات مورفولوژی به تنهایی، جهت تعیین و شناسایی میان ارقام مرکبات کاری دشوار است و علاوه‌بر آن، این صفات تحت تأثیر محیط قرار می‌گیرند. بنابراین استفاده از نشانگرهای مولکولی به‌طور گسترده‌ای در مطالعه روابط فیلوژنتیک و تنوع ژنتیکی در گیاهان مختلف استفاده گردیده است (*فانگ* و همکاران Fang *et al*., 1998). امروزه تعیین تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای مولکولی آسان‌تر، کم هزینه‌تر، تکرارپذیرتر و قابل اعتمادتر از نشانگرهای مورفولوژی است. از میان این نشانگرها، می‌توان به نشانگر ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) اشاره نمود. نشانگر ISSR خصوصیات ریزماهواره‌ها را نشان می‌دهد، اما نیازی به یک توالی برای سنتز آغازگر ندارد و هم‌چنین از مزایای نشانگرهای تصادفی نیز برخوردار است (*ملونی* و همکاران Meloni *et al*., 2006). این نشانگر معمولاً چندشکلی بالایی را نشان می‌دهد (*بورنت و برانچارد* Bornet and Branchard, 2001).

این تکنیک در زمینه‌های تنوع ژنتیکی، مطالعات فیلوژنتیک، تعیین نقشه ژنی، شناسایی گونه‌ها یا واریته‌ها و تکامل بیولوژی در دامنه وسیعی از گونه‌ها و جنس‌های مرکبات کاربرد دارد. برای مثال می‌توان به پژوهش‌های انجام شده زیر اشاره نمود: *شهسوار* و همکاران (Shahsavar *et al*., 2007) تنوع ژنتیکی و ارتباط فیلوژنتیک میان ۳۳ ژنوتیپ تجاری و ناشناخته مرکبات استان فارس را با استفاده از نشانگرهای ISSR بررسی کردند. نشانگر ISSR به خوبی توانست روابط بین ژنوتیپ‌های مذکور را آشکار سازد. *ریما* و همکاران (Rima *et al*., 2011) طی شناسایی و تخمین تنوع ژنتیکی در مرکبات تأیید کردند که نشانگرهای RAPD و ISSR قادرند چندشکلی قابل قبولی را آشکار سازند و بر پایه آن می‌توان ژنوتیپ‌ها و گونه‌های مرکبات را به درستی از هم متمایز ساخت. *گلسن و روز* (Gulsen and Roose, 2001) از آیزوزایم‌ها و نشانگرهای مولکولی SSR و ISSR جهت بررسی تنوع ژنتیک و ارتباط فیلوژنتیک میان ۲۴ رقم لیموشیرین (*C. limon*) استفاده نمودند و تنوع ژنتیکی کمی میان آنها مشاهده نمودند. در پژوهشی تنوع ژنتیکی میان ۴۸ نارنج سه‌برگ (*Poncirus trifoliata*) که به‌صورت رویشی تکثیر شده بودند با استفاده از هفت مکان ژنی آیزوزایم، ۳۸ ترکیب RFLP و ۱۱ نشانگر ISSR تعیین شد. در میان نشانگرها، ISSR چندشکلی بالایی را نشان داد و در نهایت ۴۸ ژنوتیپ نارنج سه‌برگ به چهار گروه اصلی دسته‌بندی شدند (فانگ و همکاران، 1998). *اوزون* و همکاران (Uzun *et al*., 2010) جهت شناسایی و تمایز ارقام گریپ‌فروت و پوملو از نشانگرهای ISSR استفاده کردند. بدین‌منظور، آنها ۲۹ رقم گریپ‌فروت و پنج رقم پوملو و یک *C. hassaku* را مورد استفاده قرار دادند. پس از تجزیه داده‌ها آنها کل ارقام را به دو خوشه تقسیم نمودند. *زیکسیانگ* و همکاران (Zhixiang *et al*., 2009) با استفاده از نشانگر ISSR، ۱۴ واریته مرکبات Nanfeng را از نظر تنوع و ارتباط ژنتیکی مورد مطالعه قرار دادند و آنها را در سه گروه هفت، سه و چهار واریته‌ای تقسیم نمودند.

در ایران با تلاش محققین و باغداران پیشرو، بیوتیپ‌های مختلف پرتقال، لیمو، گریپ‌فروت و نارنگی که از طریق جهش، دورگ‌گیری‌های طبیعی و تغییرات ژنتیکی به‌وجود آمده‌اند،

جمع‌آوری شده‌اند و در مجموعه‌های شمال و جنوب کشور نگهداری می‌شوند. پایش‌های انجام شده در این مجموعه‌ها عمدتاً براساس صفات مورفولوژی 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

الف. مواد گیاهی و استخراج DNA ژنومیک

برای انجام این آزمایش، برگ ۴۵ نمونه مرکبات از ایستگاه تحقیقات مرکبات کترا (تنکابن) جمع‌آوری شد (جدول ۱). در میان نمونه‌های شاهد، سه گونه از جنس *Citrus* شامل گونه‌های *C. reticulata*، *C. medica* و *C. grandis* به‌عنوان گونه‌های اصلی پیشنهاد شدند و سایر گونه‌ها، دورگ‌های حاصل از این گونه‌های اصلی هستند *فدرسی* و همکاران؛ *نیکولاسی* و همکاران (Federici *et al*., 1998; Nicolosi *et al*., 2000). برگ‌ها از سرشاخه‌های جوان بدون نشانه‌های ظاهری ناشی از اثر عوامل بیماری‌زا و فیزیولوژیک بودند. پنج الی شش برگ سالم جوان از هر گیاه جمع‌آوری و تا زمان استخراج DNA در فریزر در دمای منهای ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. استخراج DNA به روش موری و *تامپسون* (Murry and Thompson, 1980) انجام گرفت. پس از استخراج DNA و قبل از انجام هر گونه واکنش‌های PCR، جهت بررسی کمیت اسیدهای‌نوکلئیک، DNA به‌دست آمده با اسپکتروفتومتر (نانو دراپ ND1000) در طول‌موج جذب ۲۶۰ نانومتر بررسی شد. همچنین برای تأیید کیفیت DNA استخراج شده، نمونه‌ها با روش الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸ درصد مورد مطالعه قرار گرفتند.

جدول ۱: ارقام مرکبات استفاده شده در این مطالعه

Table 1: Citrus cultivars used in this study.

ردیف Number	کد گیاه Plant code	نام علمی گیاه Science name	نام عمومی Common name
1- 33	G1- G33	*Citrus* spp.	نامشخص (Unknown)
34	G34	*Citrus limon* (L.) Burm.	لمون اروکا (EureKa lemon)
35	G35	*Citrus reticulata* Blanco.	نارنگی دنسی (Dancy mandarin)
36	G36	*Citrus clementina*	نارنگی کلمانتین (Clementine mandarin)
37	G37	*Citrus limettioides* Tan.	لیموشیرین (Sweet lime)
38	G38	*Citrus medica* L.	بالنگ (Citron)
39	G39	*Citrus aurantifolia* (Chrism.) Swingle	لیمو آب شیراز (Mexican lime)
40	G40	*Citrus junos* Sieb ex Yan.	یوزو (Yuzu)
41	G41	*Citrus aurantium* L.	نارنج (Sour orange)
42	G42	*Citrus grandis* (L.) Osbeck.	پوملو (Pummelo)
43	G43	*Citrus sinensis* (L.) Osbeck	پرتقال خونی (Moro orange)
44	G44	*Citrus paradisi* Macf.	گریپ‌فروت دانکن (Duncan grapefruit)
45	G45	*Citrus sinensis* (L.) Osbeck	پرتقال تامسون (Thomson navel orange)

ب. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با آغازگر ISSR

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (MJ Research, PTC200) با ۱۰ آغازگر ISSR اختصاصی مرکبات (جدول ۲) که در مطالعات سایر محققین کیفیت آللی مناسب و میزان چندشکلی بالایی را بین ارقام نشان داده بودند، انجام گرفت. واکنش‌های PCR با استفاده از مواد تهیه شده از شرکت سیناژن و در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل یک میکرولیتر بافر ۱۰X، ۱/۵ میلی‌مولار کلریدمنیزیم، ۰/۲ واحد آنزیم *Taq* DNA Polymerase، ۰/۵ میکرومولار از هر آغازگر، ۰/۲ میلی‌مولار مخلوط نوکلئوتیدی (dNTPs) و ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی، انجام شد. شرایط تکثیر DNA در ابتدا برای هر آغازگر به‌صورت واسرشته‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت پنج دقیقه، ۴۰ چرخه شامل واسرشته‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، دمای اتصال برای هر آغازگر ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و توسعه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت دو دقیقه و در نهایت هفت دقیقه توسعه نهایی انجام شد. به‌منظور بررسی و تفکیک محصولات حاصل از تکثیر، از ژل آگارز با غلظت ۱/۵ درصد استفاده شد. پس از الکتروفورز و رنگ‌آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید، نوارها در زیر نور ماوراءبنفش با استفاده از دستگاه ژل‌داک مشاهده و عکس‌برداری شدند. (شکل ۲).

جدول ۲: توالی آغازگرها، تعداد نوارهای چندشکل و درصد چندشکلی محاسبه شده برای آغازگرها

Table 2: Sequences of primers, number of polymorphic bands and polymorphism percent

کد آغازگر Primer code	توالی Sequences (5′–3′)	تعداد نوار چند شکل Number of polymorphic bands	درصد چندشکلی PIC value
N1	HVH (GA)7T	17	0.25
N4	(GA)8YG	17	0.28
N5	(AG)8YT	14	0.27
N6	(AG)8YC	15	0.31
N7	(AC)8YG	11	0.27
N8	(AC)8YA	11	0.26
N9	(AC)8YT	15	0.37
N10	(CA)8RG	17	0.32
ISSR 1	$BDB(TCC)_5$	12	0.29
ISSR 809	$(AG)_8$ G	16	0.38

Y: پیریمیدین، B: فاقد آدنین، D: فاقد سیتوزین، H: فاقد گوانین، V: فاقد تیمین، R: پورین

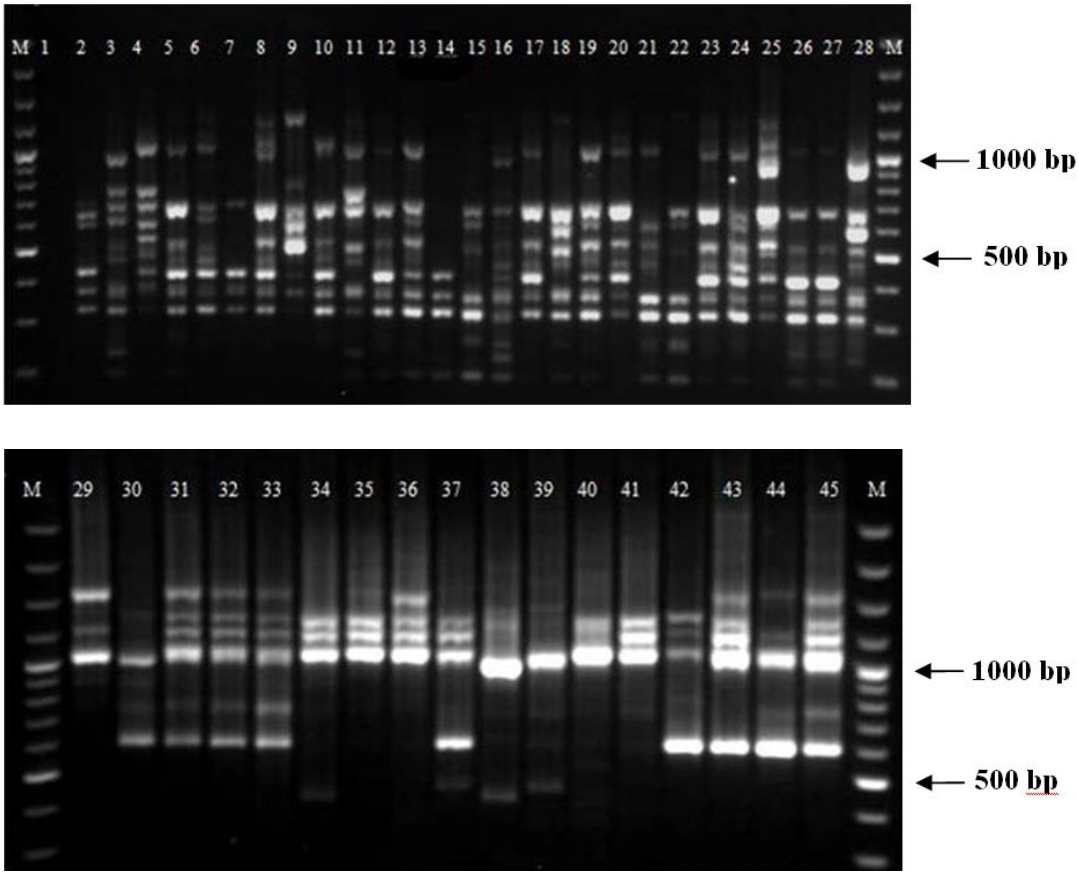
Y: Pyrimidine, B: Non-A, D: Non-C, H: Non-G, V: Non-T, R: Purin

ج. آنالیز داده‌ها

جهت امتیازدهی باندها از نرم‌افزار Adobe photoshop استفاده گردید. الگوی نواری حاصل به‌صورت وجود یا عدم وجود نوارها در محصول PCR با اعداد صفر و یک امتیازدهی شدند. تجزیه خوشه‌ای به روش گروه‌های وزنی جفت نشده (UPGMA) و با ضریب تشابه جاکارد انجام شد. تجزیه تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار NTSYS pc ver 2.02 و POPGENE ver 1.31 انجام گرفت.

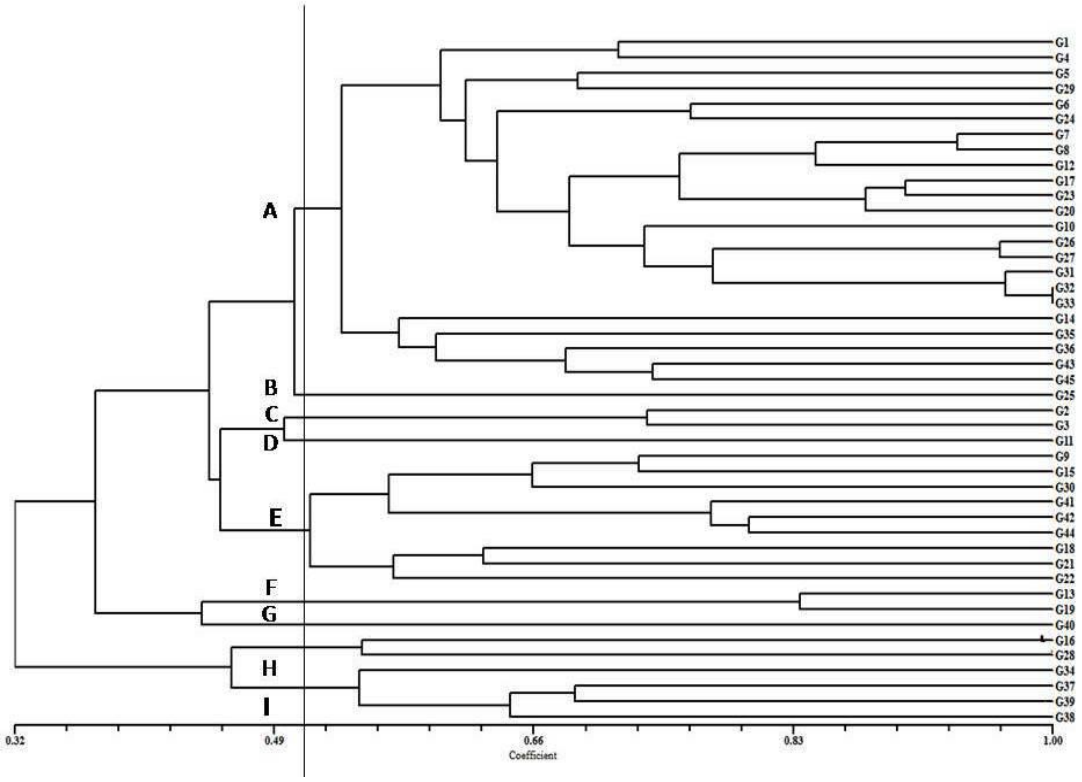
نتایج و بحث

در این پژوهش، با استفاده از ۱۰ آغازگر ISSR، روابط فیلوژنتیک ۴۵ ژنوتیپ مرکبات مورد بررسی قرار گرفت. شکل ۱ نتایج حاصل از تکثیر PCR نمونه‌ها را با استفاده از آغازگر ISSR809 نشان می‌دهد. آغازگرهای مورد نظر توانستند در مجموع ۱۴۵ نوار چندشکل را تکثیر کنند. تعداد نوارهای تکثیر شده توسط هر آغازگر بین ۱۷-۱۱ عدد بود که بیشترین آن با ۱۷ نوار مربوط به آغازگرهای N1، N4، N10 و کمترین آن مربوط به آغازگرهای N7، N8 بود. میانگین محتوی اطلاعات چندشکلی (PIC) ۰/۲۹ بود که بالاترین PIC مربوط به آغازگر ISSR 809 معادل ۰/۳۸ و کمترین آن مربوط به آغازگر N1 و معادل ۰/۲۵ بود (جدول ۲).



شکل ۱: الگوی نواری حاصل از تکثیر DNA ژنومی مرکبات توسط آغازگر ISSR809 در آزمون ISSR. M: نشانگر اندازه. شماره‌های ۴۵-۱ مربوط به ژنوتیپ‌های مورد مطالعه است

Fig. 1: ISSR amplified with the primer ISSR809. M: DNA ladder100bp plus; Lanes 1- 45 are ISSR products of the *Citrus* accessions



شکل ۲: دندروگرام ۴۵ ژنوتیپ مرکبات با استفاده از نشانگر ISSR به روش گروه‌های جفتی وزن نشده

Fig. 2: Dendrogram of 45 genotypes of *Citrus* using ISSR markers based on UPGMA

تجزیه خوشه‌ای ۴۵ ژنوتیپ مورد مطالعه براساس روش گروه‌های‌جفتی وزن نشده (UPGMA) انجام شد. پس از برش دندروگرام در ضریب تشابه ۰/۵۱، ژنوتیپ‌ها در نه خوشه اصلی A، B، C، D، E، F، G، H و I دسته‌بندی شدند (شکل ۲). ارقام پرتقال، نارنگی و ۱۹ ژنوتیپ ناشناخته در گروه A قرار گرفتند. با توجه به این‌که برخی از ژنوتیپ‌ها مانند G7 با G8، G26 با G27، G31 با G32 و G33 قرابت زیادی با همدیگر دارند، آنها احتمالاً موتانت‌هایی هستند که در اثر جهش سوماتیکی به‌وجود آمده‌اند یا ژنوتیپ‌های مشابه نوسلار همدیگر هستند. برخی مطالعات نشان داده‌اند که پرتقال‌ها به‌طور ژنتیکی یک بیوتیپ هستند. با مطالعه ۱۰ رقم پرتقال مشخص شد که الگوی باند کروموزومی در ۱۰ کلون هتروزیگوس است، ولی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره تفاوتی در این ۱۰ رقم مشاهده نشد. این نتایج می‌تواند دلیلی بر منشاء مونوفیلیتیک (متحدالاصل) پرتقال باشد که به‌وسیله جهش سوماتیکی و انتخاب کلون برتر دنبال شده است *لورو* و همکاران (Luro *et al*., 1995). 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* (Barret and Rhodes, 1976) نشان می‌دهد که پرتقال از تلاقی پوملو و نارنگی به‌وجود آمده است. نتایج به‌دست آمده در این مطالعه نیز این فرضیه را تأیید می‌کند زیرا نارنگی قرابت ژنتیکی ۰/۶۷ با پرتقال دارد. در گروه B، ژنوتیپ ناشناخته G25 و در گروه C دو ژنوتیپ ناشناخته G2، G3 و در گروه D نیز یک ژنوتیپ ناشناخته G11 جای گرفتند. این ژنوتیپ‌ها با هیچ‌یک از نمونه‌های شاهد مورد بررسی دراین مطالعه قرابت نشان ندادند. *بارکلی* و همکاران (2006) پیشنهاد کردند ارقام حاصل از تلاقی جنسی، تنوع ژنتیکی بسیار بالایی نسبت به ارقام آپومیکسی دارند، بنابراین روابط اجدادی آنها کمتر شناخته شده است. خوشه E شامل گریپ‌فروت (G44) و پوملو (G42) و نارنج (G41) می‌باشد که با ژنوتیپ‌های G9، G15، G30، G18، G22 و G21 ضریب تشابه ۰/۵۳ دارند و نشان می‌دهد که قرابت ژنتیکی نسبتاً خوبی بین آنها وجود دارد. *فانگ و روز* (Fang and Roose, 1997) از نشانگر مولکولی ISSR جهت بررسی هفت رقم گریپ‌فروت استفاده نمودند و گزارش کردند که تنها یک رقم با سایر ارقام اختلاف نشان داده که تحت تأثیر جهش قرار گرفته بود. نتایج مطالعه با نشانگرهای RAPD و SCAR نشان داد که گریپ‌فروت از تلاقی میان پرتقال و پوملو ایجاد شده است (*نیکولاسی* و همکاران، 2000). نتایج به‌دست آمده در این مطالعه نیز این فرضیه را تأیید می‌کند و گریپ‌فروت در ضریب تشابه ۰/۸۱ از پوملو جدا شده است. پوملو یکی دیگر از سه گونه اصلی مرکبات است و قرابت درون‌گونه‌ای بالایی در میان آنها وجود دارد (*بارت و رودز*، 1976). این با تمایل به خودبارور بودن در پوملوها که به‌دلیل هموزیگوس بودن آنها فرض می‌شود همخوانی دارد. نتایج به‌دست آمده از آیزوزایم‌ها تأییدکننده این فرضیه است و پوملو در ۱۰ مکان ژنی مورد بررسی هموزیگوس بود *تورس* و همکاران (Torres *et al*., 1978). از طرفی دیگر نارنج (G41) با ضریب تشابه ۰/۷۰ از پوملو و گریپ فروت جدا می‌گردد. مطالعات حاکی از آن است که نارنج‌ها هیبریدهای طبیعی نارنگی و پوملو هستند (*فدرسی* و همکاران، 1998). اطلاعات به‌دست آمده از نشانگر مولکولی PCR-RFLP این موضوع را تأیید می‌کند *اسدی آبکنار* (Asadi Abkenar, 2007). دو ژنوتیپ ناشناخته G13، G19 در گروه F جای گرفتند. این ژنوتیپ‌ها با هیچ‌یک از نمونه‌های شاهد مورد بررسی در این مطالعه قرابت نشان نداد. آنها احتمالاً دورگ‌هایی هستند که به‌طور طبیعی به‌وجود آمده‌اند. مرکبات به انجام دورگ‌گیری میان گونه‌ها شناخته شده هستند *ایواماسا* و همکاران (Iwamasa *et al*., 1988). همچنین ممکن است که این ژنوتیپ‌ها موتانتی باشند که در اثر جهش سوماتیکی ایجاد شده و با نشانگرهای استفاده شده در این مطالعه قابل تمیز نیستند. یوزو به تنهایی در گروه G قرار گرفت. در گروه H ژنوتیپ‌های G16 و G28 و در خوشه I ارقام لیمو و بالنگ (G38) قرار گرفتند که با ضریب تشابه ۰/۴۲ از گروه H جدا شدند. بالنگ یکی از سه گونه اصلی مرکبات است و به‌عنوان منشأ سایر مرکبات شناخته شده است (*بارت و رودز*، 1976). گزارشات حاکی از این هستند که لمون‌ها دورگ حاصل از تلاقی میان لایم (G39) و بالنگ هستند، اما به لحاظ ژنتیکی قرابت بیشتری نسبت به لایم دارند و یا دورگ حاصل از بالنگ و نارنج می‌باشند (*گلسن و روز*، 2001). نتایج به‌دست آمده در این پژوهش نیز مؤید این موضوع است زیرا لمون اروکا در ضرایب تشابه ۰/۵۴ از بالنگ و ۰/۶۴ از لایم تفکیک شد. دورگ‌گیری‌های طبیعی بین گونه‌ها و جهش‌های جوانه‌ای زیادی در اعضاء جنس *Citrus* وجود دارد که این جهش‌ها باعث ایجاد تنوع در ارقام می‌شوند *مور* (Moore, 2001).

در مجموع نشانگرهای ISSR استفاده شده در این مطالعه قادر به تکثیر توالی هدف در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بودند. نشانگرهای حاضر توانستند روابط ژنتیکی در گروه مورد مطالعه را تقریباً به‌طور واضحی مشخص کنند. این با نتایج گزارشات *فانگ و روز*، 1997؛ *شهسوار* و همکاران؛ *بیسواس* و همکاران

(Shahsavar *et al*., 2007; Biswas *et al*., 2010) که اعلام کردند، نشانگر مولکولی ISSR ابزاری قدرتمند در تجزیه ژنتیکی مرکبات است، مطابقت دارد. از آنجایی که مناطق شمالی کشور عمدتاً زیر کشت ارقام پرتقال و نارنگی می‌باشد، بنابراین جهش یا دورگ‌گیری‌های طبیعی نیز در این دو گونه زیاد بوده و به این دلیل، اکثر ژنوتیپ‌های ناشناخته مورد بررسی در گروه پرتقال و نارنگی قرار گرفتند. نشانگرهای مولکولی دیگر مانند PCR-RFLP و SSR ممکن است بتوانند در تعیین والدین مادری و تکمیل دقیق‌تر قرابت این ژنوتیپ‌ها کمک نماید.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از همکاری اساتید محترم که در مراحل مختلف تحقیق همکاری داشته‌اند قدردانی و تشکر می‌کنم. از داوران محترم مجله فنآوری زیستی در کشاورزی که با دقت فراوان مقاله را مطالعه نمودند و نکات بسیار ارزشمندی را یادآوری کردند، نهایت تشکر و سپاس را دارم.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه ۱۵-۱۴ متن انگلیسی مراجعه شود.