

مطالعه روابط ژنتیکی برخی از گونه‌های مرکبات با استفاده از ریزماهواره‌های (شناسایی شده از توالی‌بایی تنسکریپتوم کلمانتین) EST-SSR

Study of genetic relationship in some Citrus species using EST-SSRs
developed by transcriptome sequencing of clementine

مائده شفیعی^۱، محسن مردی^{۲*}، محمد رضا فتاحی مقدم^۱، ذبیح‌اله زمانی^۱

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار و استاد پردازش کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران

۲- دانشیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج

Shafiee M¹, Mardi M^{*2}, Fattahi Moghaddam MR¹, Zamani Z¹

1. PhD Student, Associate Professor and Professor, College of Agricultural and Natural Resources,
University of Tehran, Karaj, Iran

2. Associate Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mardi@abrii.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۲/۴/۲ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۷/۳۰)

چکیده

شانگرهای ریزماهواره در بررسی تکامل نژادی و تهیه نقشه‌های ژنی و لیتکاژی نقش موثری دارند. در سال‌های اخیر مطالعات بسیاری برای شناسایی شانگرهای ریزماهواره (با مبدأ ژنوم یا تنسکریپتوم) در گونه‌های مختلف مرکبات با استفاده از روش‌های متداول انجام شده است. در این مطالعه برای اولين بار از داده‌های بدست آمده از توالی‌بایی عمیق تنسکریپتوم نارنگی کلمانتین (*Citrus clementina*) برای شناسایی مکان‌های ریزماهواره در مرکبات استفاده شد. به منظور ارزیابی کارآبی ریزماهواره‌های بدست آمده از این روش در مطالعات روابط فیلوجنی، برای تعدادی از این مکان‌ها آغازگر طراحی و الگوی باندی آن‌ها در ۳۴ ژنوتیپ مرکبات بررسی شد. در مجموع ۹۰۸۲ مکان ریزماهواره از ۷۵۶۹ یونی‌ژن بدست آمده از توالی‌بایی عمیق تنسکریپتوم نارنگی کلمانتین، شناسایی شد که بیشترین فراوانی به ترتیب مربوط به ریزماهواره‌های دو و سه نوکلئوتیدی بود. تعداد بالای EST-SSR های بدست آمده نشان‌دهنده بازده بالای روش نسل جدید توالی‌بایی در شناسایی شانگرهای مولکولی بود. ۲۵ مکان ریزماهواره دو و سه نوکلئوتیدی برای طراحی آغازگر انتخاب شدند. در مجموع ۶۵ آلل با میانگین ۴/۲۵ آلل در هر مکان و میانگین آلل موثر ۲/۵۳ از ۱۶ جفت آغازگر چندشکل و با کیفیت تفکیک بالا بدست آمد. میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی ۰/۴۸ بود که بیشترین مقدار آن در مکان‌های ABRII7 و ABRII9 مشاهده شد. مطالعه روابط ژنتیکی ۳۴ ژنوتیپ مرکبات به روش تجزیه خوش‌های بر اساس الگوریتم NJ و فاصله P Uncorrected انجام شد. بر این اساس همه ژنوتیپ‌ها در چهار گروه پولمو، سیترون، ماندرین و فارنچ سه برگ قرار گرفتند. شباهت بالای طبقه‌بندی بدست آمده با سایر مطالعات تنوع ژنتیکی مرکبات نشان‌دهنده کیفیت بالای شانگرهای بدست آمده از روش توالی‌بایی عمیق تنسکریپتوم است.

واژه‌های کلیدی

ترنسکریپتوم
تنوع ژنتیکی
توالی‌بایی نسل جدید
نارنگی کلمانتین
EST-SSR

مقدمه

توالی‌یابی عمیق ترنسکریپتوم^۴ با استفاده از فناوری‌هایی نظیر GS-FLX (Roche) و HiSeqTM2000 (Illumina) منابع فراوانی از EST را فراهم می‌کند که می‌تواند در برنامه‌های شناسایی مکان‌های جدید برای نشانگرهای ملکولی مورد استفاده قرار گیرد (Guo et al. 2010; Gahlan et al. 2012).

هدف از این تحقیق استفاده از مکان‌های جدید ریزماهواره (EST-SSR) شناسایی شده از یونیژن‌های حاصل از توالی‌یابی عمیق ترنسکریپتوم نارنگی کلمانتین در مطالعه روابط ژنتیکی برخی از گونه‌های مرکبات است.

مواد و روش‌ها

جستجوی مکان‌های ریزماهواره ۲-۶ نوکلئوتیدی با حداقل ۵ تکرار بر روی ۷۰۶۵۹ یونیژن^۵ بدست آمده از توالی‌یابی Msatfinder ترنسکریپتوم گیاه کلمانتین با استفاده از نرمافزار Thurston and Field Online (Thurston and Field 2005) انجام شد. توزیع فراوانی تکرارها و ترکیب مکان‌های ریزماهواره شناسایی شده، محاسبه شد. طراحی آغازگر برای تعدادی از مکان‌های ریزماهواره شناسایی شده با استفاده از نرمافزار اولیگو^۶ بر اساس شاخص‌های محصول PCR با طول ۱۰۰-۲۵۰ نوکلئوتید، طول آغازگر ۱۷-۲۲ نوکلئوتید (طول مطلوب ۲۰ نوکلئوتید)، دمای ذوب بهینه ۶۵ درجه سانتی‌گراد و درصد GC ۴۵-۵۵ درصد (بهینه ۵۰ درصد) انجام شد. ۳۴ ژنوتیپ مختلف مرکبات و گونه‌های نزدیک به آن از موسسه تحقیقات مرکبات ایران (ژرم پلاسم کترا، رامسر) جمع‌آوری و تا زمان آزمایشات بعدی در فریزر -۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (جدول ۱). بعد از پودر کردن نمونه‌ها با استفاده از نیتروژن مایع و هاون استریل شده، DNA برگی با استفاده از روش CTAB اصلاح شده برای مرکبات DNA (Askari et al. 2011) استخراج شد. کیفیت و کمیت DNA بدست آمده با استفاده از روش‌های اسپکتروفوتometری و ژل آگارز ۰/۸ درصد ارزیابی شد.

جنس مرکبات (Citrus) از خانواده Rutaceae، از مهمترین محصولات درختان میوه هستند که در بسیاری از مناطق نیمه گرمسیری کره زمین پرورش می‌یابند (Ollitrault et al. 2010). این جنس شامل گونه‌های متعددی است، در حالی که تنها ۴ گونه اصلی سیترون (C. medica)، پوملو (C. maxima) (Nicolosi et al. 2000) و سایر گونه‌ها اکثراً از دورگ‌گیری بین گونه‌های اصلی و جنس‌های نزدیک به مرکبات بوجود آمده و یا نتیجه موتاسیون Terol et al. 2008; Ollitrault et al. 2010). این امر منجر به پیچیدگی در تکامل نژادی این جنس شده است. به کارگیری نشانگرهای مولکولی می‌تواند در رده‌بندی دقیق گونه‌های مرکبات موثر باشد.

فراوانی نسبی، طبیعت چند آلی، شناسایی آسان، چندشکلی بالا و نیاز به مقدار انداز DNA، نشانگرهای ریزماهواره^۱ را به یکی از موثرترین نشانگرهای برای طبقه‌بندی سیستماتیک و تهیه نقشه‌های ژنتیکی تبدیل کرده است (Dong et al. 2006). در سال‌های اخیر تحقیقات موثری جهت شناسایی مکان‌های ریزماهواره و طبقه‌بندي ژرمپلاسم مرکبات انجام شده است (Dong et al. 2006; Luro et al. 2008). با این وجود اختلافاتی که بین گروه‌بندی‌های مختلف وجود دارد، سبب عدم قطعیت در رده‌بندی مرکبات شده است. نشانگرهای ریزماهواره که از روی قطعات^۲ EST بدست می‌آیند، مستقیماً بر روی نواحی کدکننده ژن قرار گرفته‌اند و قادر به ارزیابی تکامل مولکولی ژن‌های مربوطه هستند. از طرفی محفوظ‌تر بودن نواحی جانبی نشانگرهای^۳ EST-SSR در گونه‌های مرتبط، آن‌ها را نسبت به نشانگرهای ریزماهواره ژنومی در بررسی تنوع ژنتیکی بین گونه‌ها کارآمدتر می‌سازد (Luro et al. 2008). به حال یکی از مشکلات EST-SSR‌ها کمبود چندشکلی در آن‌هاست و محدود بودن منابع EST موجود در پایگاه داده‌ها مانع بزرگی برای شناسایی مکان‌های ریزماهواره بیشتر است.

⁴ Deep transcriptome sequencing

⁵ Unigene

⁶ Oligo5

¹ Microsatellite

² Expressed sequence tag

³ Simple sequence repeat (SSR)

جدول ۱- ژنوتیپ‌های مرکبات جمع آوری شده به منظور بررسی چندشکلی نشانگرهای ریزماهواره شناسایی شده از توالی یا بی تنسکرپتوم نارنگی کلمانتین

شماره	نام عمومی	نام علمی	شماره	نام علمی	نام عمومی	نام علمی
۱	سترون (Citron)	<i>Citrus medica</i>	۱۸	نارنج (Sour Orange)	<i>C. aurantium</i>	
۲	پوملو (Pummelo)	<i>C. maxima</i>	۱۹	تانجرین (Tangerine)	<i>C. reticulata</i>	
۳	کوسایی (Kusai)	<i>C. limonia</i>	۲۰	کلمانتین (Clementine)	<i>C. clementina</i>	
۴	آلمو (Alemow)	<i>C. macrophylla</i>	۲۱	کلثپاترا (Cleopatra)	<i>C. reshni</i>	
۵	لیموشیرین (Sweet Lemon)	<i>C. limetta</i>	۲۲	گریپ فروت (Grape fruit)	<i>C. paradisi</i>	
۶	پرشین لایم (Persian lime)	<i>C. latifolia</i>	۲۳	تایوانیکا (Taiwanica)	<i>C. taiwanica</i>	
۷	لیموترش مکزیکی (Mexican lime)	<i>C. aurantifolia</i>	۲۴	پرتقال والنسیا (Valensia Orange)	<i>C. sinensis</i> var. <i>Valensia</i>	
۸	لیمو لیسبون (Lisbon lemon)	<i>C. limon</i>	۲۵	پرتقال همین (Orange Hamlin)	<i>C. sinensis</i> var. <i>Hamlin</i>	
۹	راف لمون (Rough lemon)	<i>C. jambhiri</i>	۲۶	پرتقال ناول (Orange Navel)	<i>C. sinensis</i> var. <i>Navel</i>	
۱۰	لیمو آستارایی (Astaraii Lime)	<i>C. Limonia</i>	۲۷	پرتقال خونی (Orange Blood)	<i>C. sinensis</i> var. <i>Blood</i>	
۱۱	رانگپورلایم (Rangpour lime)	<i>C. lemon</i> Hybrid	۲۸	نارنگی پیچ (Page Mandarin)	Minneola × <i>C. clementina</i>	
۱۲	لیمو گلابی (Pear Lemon)	<i>Poncirus trifoliata</i>	۲۹	اورلاندو تانجلو (Orlando Tangelo)	<i>C. reticulata</i> × <i>C. paradisi</i>	
۱۳	نارنج سه برگ (Trifoliate Orange)	<i>C. sinensis</i> × <i>P. trifoliata</i>	۳۰	مینولا تانجلو (Minneola Tangelo)	<i>C. reticulata</i> × <i>C. paradisi</i>	
۱۴	سیترنج (Citrange)	<i>C. paradisi</i> × <i>P. trifoliata</i>	۳۱	Shell Mahaleh	<i>C. reticulata</i> Hybrid	
۱۵	سیتروملو (Citrumelo)	<i>Fortunella</i> <i>margarita</i>	۳۲	کلاموندین (Calamondin)	<i>C. reticulata</i> × <i>F. margarita</i>	
۱۶	کامکوات (Kumquat)	<i>C. aurantifolia</i> × <i>F. margarita</i>	۳۳	بکرائی (Bakraei)	<i>C. reticulata</i> × <i>C. limettoide</i>	
۱۷	لایم کوات (Limequat)		۳۴	یوزو (Yuzu)	<i>C. reticulata</i> × <i>C. ichangensis</i>	

استفاده شد. در نهایت ژل پلی اکریلامید توسط روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی شد. نمره‌دهی ژل پلی اکریلامید بر اساس اختصاص حروف و همچنین حضور (یک) یا عدم حضور (صفر) باند انجام شد. نرم‌افزار آنالیز ژنتیکی PowerMarker 3.25 (Liu 2005) برای تعیین تعداد آلل، آلل موثر، هتروزیگوستی مشاهده شده، هتروزیگوستی مورد انتظار و محتوای اطلاعات چندشکلی هر مکان (PIC²) مورد استفاده قرار گرفت.

نرم‌افزار SplitTree 4.11.3 (Huson and Bryant 2006) برای بررسی روابط ژنتیکی مرکبات به روش تجزیه خوش‌های بر اساس الگوریتم NJ³ و فاصله P (تعداد آلل‌های غیر مشابه بین دو فرد) مورد استفاده قرار گرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز^۱ در حجم ۱۵ µl، شامل بافر Tris-HCl [۱۰ میلی‌مولار pH ۸/۸؛ KCl ۵۰ میلی‌مولار؛ Nonidet P40 ۰/۸ درصد]، ۳۰ نانوگرم DNA ژنومی و مقادیر بهینه کلرید منزیم، آغازگرها و dNTPها، Taq DNA Polymerase انجام شد. چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه واسرشته‌سازی اولیه به مدت دو دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی-گراد، ۳۵ چرخه شامل مرحله واسرشته‌سازی به مدت دو دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله اتصال آغازگرها به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۶۵-۶۷ درجه سانتی‌گراد و مرحله بسط به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و یک چرخه بسط نهایی به مدت ۴ دقیقه در دمای ۷۲°C بود. پس از واسرشته‌سازی محصولات تکثیر شده به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۵°C، از دستگاه الکتروفورز عمودی و ژل پلی اکریلامید ۶ درصد برای جداسازی محصولات

² Polymorphic information content³ Neighbour joining¹ Polymerase chain reaction (PCR)

ترکیباتی نظیر GC/GC (۷/۰ درصد) در ریزماهواره‌های دو نوکلئوتیدی و ACT/AGT (۴/۱ درصد) در ریزماهواره‌های سه نوکلئوتیدی نادر بودند. نتایج مشابهی برای مکان‌های EST-SSR شناسایی شده از پایگاه داده HarvEST مرکبات گزارش شده است (Dong et al. 2006).

از بین مکان‌های ریزماهواره شناسایی شده، ۱۰ ریزماهواره دو نوکلئوتیدی و ۱۵ ریزماهواره سه نوکلئوتیدی برای بررسی کارآیی نشانگرهای شناسایی شده با استفاده از توالی‌بایی عمیق ترانسکرپتوم در مطالعات فیلوژنی مرکبات انتخاب و برای آن‌ها آغازگر طراحی شد (جدول ۳).

پس از تایید کیفیت DNA استخراج شده از ۳۴ ژنتوتیپ مرکبات با استفاده از ژل آکارز ۸/۰ درصد، رقیق سازی به منظور حصول غلظت DNA یکسان ۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر برای کلیه نمونه‌ها بر اساس غلظت‌های بدست آمده از روش اسپکتروفتومتری انجام شد.

مقادیر بهینه کلرید منیزیم، dNTP‌ها، آغازگرها، Taq DNA Polymerase و همچنین دمای ذوب مطلوب برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تعیین شدند (جدول ۴).

پنج جفت آغازگر ABRII3 ABRII21 ABRII23 ABRII30 و ABRII35 موفق به تکثیر هیچ قطعه‌ای در میان ژنتوتیپ‌های مورد آزمایش نشدنند که نشان می‌دهد به خوبی طراحی نشده‌اند و یا طول قطعه تکثیر شده بیشتر از آن است که توسط ژل قابل جداسازی باشد. از ۲۰ جفت آغازگر باقیمانده همه به استثنای ABRII19 در میان ژنتوتیپ‌های مورد آزمایش چندشکلی نشان دادند. در نهایت از اطلاعات بدست آمده از ۱۶ جفت آغازگر که کیفیت تفکیک باند بهتری داشتند در بررسی فیلوژنی ۳۴ ژنتوتیپ مرکبات استفاده شد.

تعداد آلل، آلل موثر، هتروزیگوستی پیش‌بینی شده، هتروزیگوستی مشاهده شده و محتوا اطلاعات چندشکلی (PIC) ۱۶ مکان ریزماهواره و آغازگرهای طراحی شده که در مطالعه فیلوژنی مورد استفاده قرار گرفتند، با استفاده از نرم‌افزار PowerMarker 3.25 محاسبه شد (جدول ۵).

نتایج و بحث

در این مطالعه برای اولین بار از یونیژن‌های بدست آمده از توالی‌بایی عمیق ترانسکرپتوم نارنگی کلمانتین در شناسایی مکان‌های ریزماهواره در مرکبات استفاده شده است. در مجموع ۹۰۸۲ مکان ریزماهواره ساده ۶-۲ نوکلئوتیدی با حداقل ۵ تکرار از ۷۵۲۵ یونیژن شناسایی شد. پیش از این بیشترین تعداد-EST SSR در مرکبات توسط Chen et al. (2006) برای کل منابع ترانسکرپتومی مرکبات موجود در NCBI (۳۲۷۸ ریزماهواره)، Luro et al. (2008) برای EST‌های شناسایی شده کلمانتین (۱۹۶۲ ریزماهواره) گزارش شده است.

از میان ۷۵۲۵ یونیژن حاوی ریزماهواره، ۶۲۶۷ یونیژن (۸۳/۲۸ درصد) دارای تنها یک ریزماهواره و ۱۲۵۸ یونیژن (۱۶/۷۲ درصد) دو یا تعداد بیشتری ریزماهواره داشتند. بیشترین فراوانی مربوط به ریزماهواره‌های دو نوکلئوتیدی (۵۸۳۷ ۶۴/۲۷ درصد) است و پس از آن به ترتیب ریزماهواره‌های سه نوکلئوتیدی (۲۹۸۰ ۳۲/۸۱ درصد)، چهار نوکلئوتیدی (۲۱۴ ۲/۳۶ درصد)، پنج نوکلئوتیدی (۲۷ ۰/۳۰ درصد) و شش نوکلئوتیدی (۲۴ ۰/۲۶ درصد) قرار گرفته‌اند. در بیشتر مطالعاتی که بر روی مکان‌های EST-SSR انجام شده، ریزماهواره‌های سه نوکلئوتیدی فراوانی بالاتری نسبت به ریزماهواره‌های دو نوکلئوتیدی داشته‌اند، زیرا تغییر در تعداد تکرار ریزماهواره‌های غیر سه نوکلئوتیدی منجر به تغییر مکانی چارچوب^۱ توالی کدکننده^۲ می‌شود و بنابراین احتمال حضور این ریزماهواره‌ها در ناحیه کدکننده کمتر است (Dong et al. 2006; Luro et al. 2008). مشاهده شده که تعداد ریزماهواره‌های دو نوکلئوتیدی بیشتر از سه نوکلئوتیدی بوده است (Shanker et al. 2007).

در میان ریزماهواره‌های دو نوکلئوتیدی ترکیب AG/CT (۵۶/۴۸ درصد) بیشترین فراوانی را نشان داد. ترکیب‌های AAG/CTT (۰/۱۰ درصد) و AAT/ATT (۹۹/۱۸ درصد) در ریزماهواره‌های سه نوکلئوتیدی و AAAT/ATTT (۳۰/۲۸ درصد) در ریزماهواره‌های چهار نوکلئوتیدی بالاترین فراوانی را داشتند (جدول ۲). در مقابل

^۱ Frame shift

^۲ Open reading frame

جدول ۲- توزیع نوع ترکیبات تکراری در ۹۰۸۲ مکان ریزماهواره بدست آمده از یونیژن‌های حاصل از توالی‌بایی ترانسکرپتوم نارنجی کلمانتین

SSR%	SSR	تعداد	Tetra-	SSR%	SSR	تعداد	Di-
۲۵/۲۷	۴۷		AAAT/ATT	۵۶/۷۵	۲۴۱۰		AG/CT
۱۹/۳۵	۳۶		AAAG/CTT	۲۲/۵۱	۹۵۶		AC/GT
۱۱/۲۹	۲۱		ATAC/GTAT	۱۹/۴۷	۸۴۸		AT/TA
۷/۵۳	۱۴		AAAC/GTT	۰/۷۸	۳۳		GC/CG
۶/۴۵	۱۲		AATT/TTAA				
۳۰/۱۱	۵۶		Others (≤ 10)				
SSR%	SSR	تعداد	Penta-	SSR%	SSR	تعداد	Tri-
۲۱/۶۲	۸		AAAAG/CTTT	۱۷/۹۶	۵۲۸		AAG/CTT
۱۰/۸۱	۴		AAGAG/CTCTT	۱۵/۸۷	۳۶۱		AAT/ATT
۱۰/۸۱	۴		AAAAT/ATTTT	۱۲/۰۰	۲۱۹		ATC/GAT
۸/۱۱	۳		AACTC/GAGTT	۷/۵۱	۲۴۱		AGC/GCT
۵/۴۰	۲		AAAAC/GTTTT	۶/۵۲	۱۵۱		AAC/GTT
۵/۴۰	۲		AAACC/GGTTT	۳/۴۳	۱۳۱		GGA/TCC
۵/۴۰	۲		AAGCC/GGCTT	۳/۲۳	۶۹		ACG/CGT
۳۲/۴۳	۱۲		Others (=1)	۰/۹۹	۶۵		CCG/CGG
					۰/۹۹	۲۰	ACT/AGT

استفاده شده می‌توانند فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌های مرکبات را مشخص کنند.

مطالعه روابط فیلورزني ۳۴ ژنوتیپ مرکبات با استفاده از الگوی باندی بدست آمده از نشانگرهای ریزماهواره به روش تجزیه خوشهای بر اساس الگوریتم Uncorrected P و فاصله NJ انجام شد. بر اساس نتایج بدست آمده همه نمونه‌ها در ۴ گروه اصلی قرار گرفتند (شکل ۱). پوملو به عنوان یکی از گونه‌های اصلی مرکبات به همراه پرشین لایم، لیمو گلابی شکل و لیموشیرین مدیترانه‌ای در گروه اول واقع شده‌اند. پوملو به عنوان یکی از والدین لیمو گلابی شکل شناخته شده که در گروه‌بندی نیز مجاور هم قرار می‌گیرند (Jannati et al. 2009). اگرچه پرشین لایم هیبرید سیترون بوده و گزارش شده که نزدیک به مکریکن لایم قرار می‌گیرد (Federici et al. 1998)، بهرحال این گونه سهمی نیز Federici et al. (1998) که خود هیبرید پوملو می‌باشد.

در مجموع از ۱۶ جفت آغازگر مورد استفاده ۶۵ آلل با میانگین ۴/۲۵ آلل برای هر مکان بدست آمد. حداقل و حداکثر تعداد آلل در هر مکان به ترتیب متعلق به ABRII24 (۲) و ABRII22 (۶) بود، در حالی که میانگین آلل موثر ۲/۵۳ و کمترین ABRII31 (۳/۷۴) مشاهده شد. حداکثر مقدار هتروزیگوستی برای ABRII7 (۰/۸۵) و حداقل مقدار آن برای ABRII22 (۰/۰۹) و ABRII24 (۰/۷۲) و حداقل مقدار آن برای ABRII22 (۰/۲۴) و بیشترین مقدار آن به ترتیب در ABRII32 (۰/۰۹) و ABRII28 (۰/۰۷۱) مشاهده شد. میانگین هتروزیگوستی مشاهده شده در ABRII1 (۰/۰۷۱) میانگین هتروزیگوستی مشاهده شده در ABRII2 (۰/۰۴۵) نسبت به میانگین هتروزیگوستی پیش‌بینی شده (۰/۰۵۴) کمتر بود. بیشترین مقدار محتوای اطلاعات چندشکلی نیز در ABRII7 (۰/۰۶۷) و ABRII9 (۰/۰۶۷) و کمترین مقدار آن در ABRII24 (۰/۰۳۳) مشاهده شد. بنابراین در مجموع دو جفت آغازگر ABRII7 و ABRII9 بهتر از سایر جفت آغازگرهای

جدول ۳- اطلاعات مکان‌های ریزماهواره انتخاب شده آغازگرهای طراحی شده برای مطالعات تکامل ژنتیکی مرکبات.

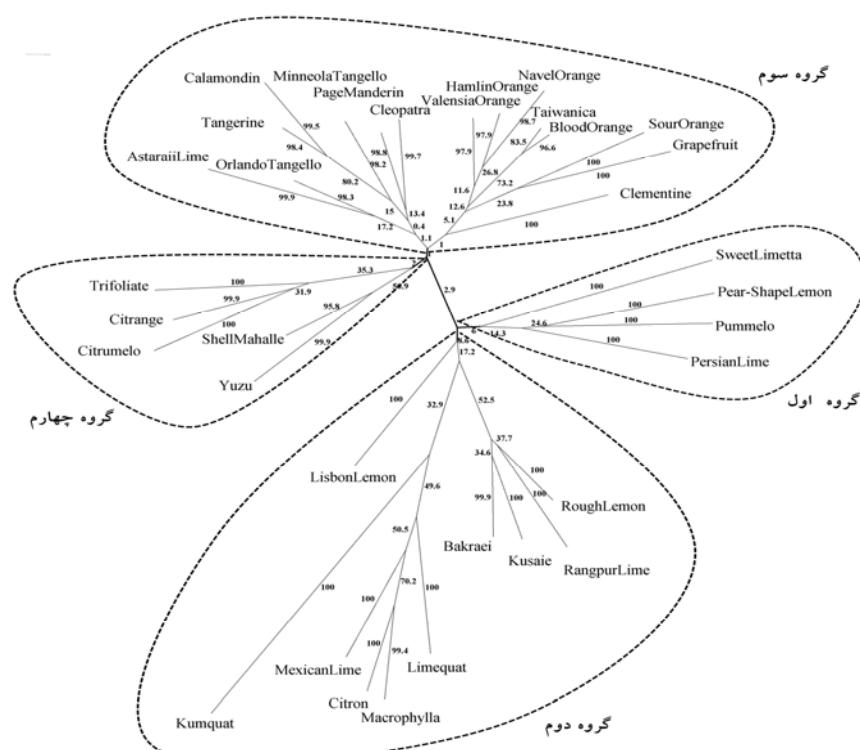
مکان	منبع	موتیف	PCR (bp)	سایز محصول	توالی آغازگر (۳'-۵')	طول آغازگر (bp)	محتوای GC (%)	دمای ذوب (°C)
ABRII-LC-1	Unigene 7002_HC	(aac)6	217	F-GGCGCTCA(C)AAAGGCTAAC R-GCTGTTGCTGAAGTTGCTGT	19 20	6.52 50	3.68	6.67
ABRII-LC-2	Unigene 34439_HC	(at)10	187	F-GGGGTTCTCACCTCTCTTA R-CGGC(T)GATGGTGATGTGTAT	19 19	4.47 6.52	4.65 6.67	
ABRII-LC-3	Unigene 56286_HC	(ac)6	211	F-GCATGAAGAGAG(T)AGATGG R-GAGGCCATTATCGTTG	18 17	50 1.47	5.64 1.61	
ABRII-LC-4	Unigene 7002_HC	(ggc)5	221	F-GTGGGAATCAGAATGGAGG(C)A R-CCCACCATTATCATACACCCA	20 20	50 50	3.68 3.68	
ABRII-LC-5	Unigene 46649_HC	(tga)6	127	R-GAGTGTGAGGTAAGTTGGT(G)G	19 20	6.52 50	6.67 3.68	
ABRII-LC-6	Unigene 64087_HC	(tc)5	179	F-GATAAGACCATCCCATCTCC R-GTTTGTGTCGTGTACGTG	20 19	50 4.47	3.68 4.65	
ABRII-LC-7	Unigene 26372_HC	(ta)6	144	F-GGTTTGTCTCTCGCTAGA R-GTGTGGCGGAGGATTGA	19 19	4.47 6.52	4.65 6.67	
ABRII-LC-9	Unigene 19674_HC	(cag)5	231	F-CTGAATGCTGTGTCTCT R-ATGGCTTCAGATTGGAG	17 17	1.47 1.47	1.61 1.61	
ABRII-LC-19	Unigene 7002_HC	(tgg)5	107	F-GCCCGTCCAGGTAAATATG R-GGTCTGATTGTTGCTCC	19 19	6.52 4.47	6.67 4.65	
ABRII-LC-21	Unigene 7554_HC	(tct)5	208	F-ATCTGAATGGCTGTGGCTG R-TCTCCGCATTGGTTCTGG	19 19	6.52 6.52	6.67 6.67	
ABRII-LC-22	Unigene 25999_HC	(cgc)5	217	F-GTCTCTAACATCAGCG(C)GCAT R-CGTGGGTTGGATTCCTTTG	20 20	50 50	3.68 3.68	
ABRII-LC-23	Unigene 67440_HC	(cac)5	143	F-ACACAACCATTCTCGTCGC R-CGATAGGATTCTTGAGAGCG	19 20	6.52 50	6.67 3.68	
ABRII-LC-24	Unigene 27221_HC	(ag)8	194	F-TGACGTTGATCGAGAGCC R-AATAACAGCTCCACCTGCC	19 19	6.52 6.52	6.67 6.67	
ABRII-LC-25	Unigene 61170_HC	(taa)6	152	F-GCAAAGCAACCAAGGGATT R-GCCT(C)TGTTTGAATCGTGGT	20 20	50 50	3.68 3.68	
ABRII-LC-26	Unigene 61586_HC	(acc)7	170	F-CCACGGCAGAGATCAACAT R-GTTGGAGGTGGAGGTTAAAG	19 19	6.52 6.52	6.67 6.67	
ABRII-LC-27	Unigene 69039_HC	(gaa)7	189	F-GTTGAGTTACTGGACCGCG R-CATGGTTGCGATCAGTGAT	19 19	6.52 4.47	6.67 4.65	
ABRII-LC-28	Unigene7324_HC	(ta)9	163	F-GAGGAAGATGCCAAAGAGC R-CTGCTTGCTCTTTTCCTC	19 19	6.52 4.47	6.67 4.65	
ABRII-LC-29	Unigene31949_HC	(tc)5	167	F-CAAATGGTGBAATGGGAAG R-CGCTGGAGTCATCATTGTT	20 20	50 50	3.68 3.68	
ABRII-LC-30	Unigene44614_HC	(tc)5	120	F-TTACGAGCAAAGTGAGAGC R-TGACGATTATGAGGAGAGG	19 19	4.47 4.47	4.65 4.65	

ادامه جدول ۳

مکان	منبع	موتیف	سایز محصول (bp)PCR	توالی آغازگر (۵'-۳')	طول آغازگر (bp)	دماهی محتوای ذوب (%)	دماهی GC (%)	دماهی ذوب (°C)
ABRII-LC-31	Unigene 38906_HC	(tga)6	170	F-CTGGGCAGTAGGATTGTGA R-AAATGGCAGATTCAAGGGAGC	19 20	6.52 50	3.68	6.67
ABRII-LC-32	Unigene 20361_HC	(tg)9	102	F-GTCTGAACCTCTAGTCTG R-GAGAACACAGCTCATAC	18 18	50 50	5.64 5.64	5.64
ABRII-LC-34	Unigene 23494_HC	(aga)5	167	F-CCCGAAATCTCCAAAGCTTG R-TGTTGAAGAACGGTCTGAGC	20 20	50 50	3.68 3.68	3.68
ABRII-LC-35	Unigene 72357_HC	(caa)5	131	F-CTGTCTCTTCGGTCAT(G)CAT R-CGGGACGAGAGAACTCAAA	20 19	50 6.52	3.68 6.67	6.67
ABRII-LC-36	Unigene 6289_HC	(cat)5	157	F-GTGCAAGCAACAAGAGAGG R-AAGAGAAAGGCAAGAGGC	19 18	6.52 50	6.67 5.64	6.67
ABRII-LC-37	Unigene 27245_HC	(ac)5	124	F-CCTGTCACGGTTGTCAATTG R-GGGTACTTGTGCTGTTAGTG	20 21	50 6.47	3.68 9.68	3.68

جدول ۴- مقادیر بهینه کلرید منزیزم، آغازگرها، dNTPs و دماهی مناسب ذوب

مکان	کلرید منزیزم (میلی مولار)	dNTP (میلی مولار)	آغازگرها (میلی مولار)	Taq DNA Polymerase (U)	دماهی ذوب انتخابی (°C)
ABRII-LC-1	۱/۷	۰/۸	۰/۷	۱/۰	۵۷
ABRII-LC-2	۲/۰	۱/۰	۰/۸	۱/۵	۶۱
ABRII-LC-3	—	—	—	۱/۰	۶۱
ABRII-LC-4	۱/۷	۰/۸	۰/۷	۱/۰	۶۱
ABRII-LC-5	۱/۷	۰/۸	۰/۷	۱/۰	۶۱
ABRII-LC-6	۲/۰	۰/۱	۰/۸	۱/۵	۶۱
ABRII-LC-7	۱/۷	۰/۸	۰/۷	۱/۰	۶۳
ABRII-LC-9	۱/۷	۰/۸	۰/۷	۱/۰	۵۵
ABRII-LC-19	۱/۷	۰/۸	۰/۷	۱/۰	۶۳
ABRII-LC-21	—	—	—	—	—
ABRII-LC-22	۱/۷	۰/۸	۰/۷	۱/۰	۶۱
ABRII-LC-23	—	—	—	—	—
ABRII-LC-24	۱/۷	۰/۸	۰/۷	۱/۰	۶۱
ABRII-LC-25	۱/۷	۰/۸	۰/۷	۱/۰	۵۹
ABRII-LC-26	۱/۷	۰/۸	۰/۷	۱/۰	۶۵
ABRII-LC-27	۱/۷	۰/۸	۰/۷	۱/۰	۶۳
ABRII-LC-28	۱/۷	۰/۸	۰/۷	۱/۰	۶۳
ABRII-LC-29	۱/۷	۰/۸	۰/۷	۱/۰	۶۵
ABRII-LC-30	—	—	—	—	—
ABRII-LC-31	۱/۷	۰/۸	۰/۷	۱/۰	۶۵
ABRII-LC-32	۱/۷	۰/۸	۰/۷	۱/۰	۵۹
ABRII-LC-34	۱/۷	۰/۸	۰/۷	۱/۰	۶۵
ABRII-LC-35	—	—	—	—	—
ABRII-LC-36	۱/۷	۰/۸	۰/۷	۱/۰	۶۵
ABRII-LC-37	۱/۷	۰/۸	۰/۷	۱/۰	۶۱



شکل ۱- بررسی روابط ژنتیکی ۳۴ ژنوتیپ مرکبات با استفاده از نتایج توالی یابی ترنسکریپتو نارنگی کلمانتین

باشد (Golein et al. 2012). در این مطالعه (شکل ۱) نیز بکرائی در مجاورت راف لمون و همچنین رانگپورلایم و کوسایی که خود هیبرید راف لمون و ماندرین بوده (Nicolosi et al. 2000)، قرار گرفته است که احتمال والد بودن راف لمون را افزایش می دهد. لایم کوات هیبرید کامکوات و لیموترش مکزیکی است و شbahت ژنتیکی آن به لیموترش سبب شده در این گروه قرار گیرد. کامکوات نیز احتمالاً به علت حضور لایم کوات در گروه سیترون، در این گروه قرار گرفته است. همه ژنوتیپ‌های نارنگی (تانجرین، کلئوپاترا)، هیبریدهای آن (کلمانتین، نارنگی پیچ، کلاموندین، اورلاندو و مینولا تانجلو)، ژنوتیپ‌های پرتقال (والنسیا، نارول، هملین و پرتقال خونی) و همچنین نارنج (تایوانیکا، گریپ فروت و لیمو آستارایی در گروه سوم قرار گرفته‌اند. کلاموندین هیبرید کامکوات و ماندرین است که در طبقه‌بندی ۳۷۰ ژنوتیپ مرکبات با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره در گروه کامکوات واقع شده است (Barkley et al. 2006)، در حالی که در این مطالعه در گروه ماندرین که والد دیگر آن است قرار گرفته است. کلمانتین به عنوان هیبرید نارنگی و

گروه دوم شامل سیترون به عنوان یکی دیگر از گونه‌های اصلی مرکبات و هیبریدهای آن (راف لمون (Barkley et al. 2006)، رانگپورلایم (Nicolosi et al. 2000)، آلمو (Shahsavar et al. 2000)، بکرایی (Nicolosi et al. 2000)، کوسایی (Barkley et al. 2007; Golien et al. 2012)، لیمو لیسبون (Nicolosi et al. 2000) (al. 2006)، لیمو لیسبون (Federici et al. 1998; Li et al. 2010; Ollitrault 2007) در سایر مطالعات طبقه‌بندی مرکبات با استفاده از نشانگرهای مختلف نیز راف لمون، آلمو، رانگپورلایم، لیموترش مکزیکی و لیمو لیسبون در گروه سیترون قرار گرفته‌اند (et al. 2010). استفاده از نشانگرهای ISSR در طبقه‌بندی برخی ژنوتیپ‌ها از جمله بکرایی نشان داد که این ژنوتیپ احتمالاً هیبرید بین ماندرین و لیموشیرین است (Shahsavar et al. 2007). مطالعات بعدی با استفاده از نشانگرهای SSR و RFLP با هدف تعیین روابط ژنتیکی میان بکرایی و بعضی ژنوتیپ‌های دیگر نشان داد که فاصله ژنتیکی بکرایی با راف لمون کمتر از لیموشیرین است و احتمالاً راف لمون یکی از والدین بکرایی می

جدول ۵- نام مکان، تعداد آلل، آلل موثر، هتروزیگوستی پیش‌بینی شده، هتروزیگوستی مشاهده شده و محتوای اطلاعات چندشکل ۱۶ مکان چندشکل EST-SSR در ۳۴ ژنوتیپ مرکبات

مکان	تعداد آلل	آلل موثر	هتروزیگوستی پیش‌بینی شده	هتروزیگوستی مشاهده شده	محتوای اطلاعات چندشکل
ABRII1	۴	۲/۵۶	۰/۵۷	۰/۷۱	۰/۵۲
ABRII4	۴	۲/۸۸	۰/۶۷	۰/۶۱	۰/۶۰
ABRII5	۵	۲/۴۴	۰/۵۵	۰/۳۱	۰/۴۶
ABRII6	۴	۲/۰۹	۰/۴۶	۰/۲۴	۰/۴۲
ABRII7	۴	۳/۷۲	۰/۷۲	۰/۳۴	۰/۶۷
ABRII9	۵	۳/۷۴	۰/۷۲	۰/۴۷	۰/۶۷
ABRII22	۶	۱/۹۷	۰/۳۹	۰/۳۱	۰/۳۷
ABRII24	۲	۱/۸۹	۰/۴۳	۰/۶۲	۰/۳۳
ABRII25	۵	۲/۲۳	۰/۵۴	۰/۳۸	۰/۴۵
ABRII26	۴	۲/۰۶	۰/۴۶	۰/۶۵	۰/۳۹
ABRII28	۴	۲/۰۵	۰/۴۲	۰/۲۴	۰/۳۹
ABRII29	۴	۲/۳۳	۰/۵۳	۰/۵۰	۰/۴۸
ABRII31	۶	۳/۲۹	۰/۶۲	۰/۴۷	۰/۵۸
ABRII32	۳	۱/۸۵	۰/۴۲	۰/۲۴	۰/۳۷
ABRII34	۳	۲/۰۱	۰/۴۴	۰/۵۹	۰/۳۷
ABRII37	۵	۳/۳۰	۰/۷۰	۰/۵۹	۰/۶۴
میلانگین	۴/۲۵	۲/۵۳	۰/۵۴	۰/۴۵	۰/۴۸

در گروه ماندرین قرار گرفته‌اند (Federici et al. 1998; Barkley et al. 2006; Luro et al. 2008; Ollitrault et al. 2010; Li et al. 2010). همچنین گزارش شده تایوانیکا که از هیریدهای نارنج است نیز در گروه ماندرین قرار می‌گیرد (Federici et al. 1998) در گروه چهارم شامل نارنج سه برگ، هیریدهای آن (سیترنج و سیتروملو) و یوزو به عنوان هیرید پاپدا × ماندرین (Uzun et al. 2009) می‌باشد. علاوه بر این شل محل که پیش از این به عنوان هیرید نوا (کلمانتین × اورلاندو) و پوملو یا سیترون گزارش شده اگرچه در مطالعات اولیه با استفاده از نشانگرهای RAPD و SCAR با والد ماندرینی خود هم‌گروه شده بود (Nicolosi et al. 2000)، در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های ایرانی مرکبات با استفاده از نشانگر SSR، در حالی که ژنوتیپی از والد پاپدا وجود نداشت، با نارنج سه برگ در یک گروه قرار گرفتند (Jannati et al. 2009). سیترنج و سیتروملو نیز در حضور نارنج سه برگ در یک گروه قرار می‌گیرند (Amar et al. 2011).

پرتفال (Federici et al. 1998) همواره در مطالعات تکامل ژنتیکی در گروه ماندرین قرار گرفته است (Federici et al. 1998; Nicolosi et al. 2000; Luro et al. 2008; Ollitrault et al. 2010; Biswas et al. 2011). اورلاندو و مینولا تانجلو هیرید ماندرین و گریپ فروت هستند و رابطه نزدیکی با گروه ماندرین دارند (Uzun and Yesiloglu 2012). نارنگی پیچ در هیچ یک از مطالعات تنوع ژنتیکی مرکبات یافت نشد، ولی از آنجایی که هیرید کلمانتین و مینولا تانجلو است (Reece et al. 1963) حضور آن در گروه ماندرین طبیعی است. ژنوتیپ‌های مختلف پرتفال که هیرید پوملو و ماندرین هستند (Federici et al. 1998) به والد ماندرینی خود نزدیکی بیشتری نشان داده‌اند و در تمام مطالعات فیلوزنی مرکبات با ماندرین هم‌گروه شده‌اند (Nicolosi et al. 2000; Luro et al. 2008; Ollitrault et al. 2010; Biswas et al. 2011; Amar et al. 2011). نارنج و گریپ فروت که به ترتیب هیرید ماندرین × پوملو (Barkley et al. 2006) و پرتفال × پوملو (Li et al. 2010) هستند وضعیت پیچیده‌ای دارند زیرا این دو گونه گاهی در گروه پوملو و گاهی

این مکان‌ها کارآیی بالایی در طبقه‌بندی مرکبات دارند. به این ترتیب می‌توان از چنین نشانگرهایی در سایر کارهای اصلاحی نظیر تکمیل نقشه ژنتیکی بهره برد.

منابع

- Amar MH, Biswas MK, Zhang Z, Guo WW (2011) Exploitation of SSR, SRAP and CAPS-SNP markers for genetic diversity of Citrus germplasm collection. *Scientia Horticulturae* 128:220-227.
- Askari N, Salehi Jouzani G, Mousivand M, Foroutan A, Hagh Nazari A, Abbasalizadeh S, Soheilivand S, Mardi M (2011) Evaluation of anti-phytoplasma properties of surfactin and tetracycline towards lime witches' broom disease using real-time PCR. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 21:81-88.
- Barkley NA, Roose ML, Krueger RR, Federici CT (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.
- Biswas MK, Chai L, Amar MH, Zhang X, Deng Xx (2011) Comparative analysis of genetic diversity in Citrus germplasm collection using AFLP, SSAP, SAMPL and SSR markers. *Scientia Horticulturae* 129:798-803.
- Chen C, Zhou P, Choi YA, Huang S, Gmitter Jr FG (2006) Mining and characterization microsatellites from citrus ESTs. *Theoretical and Applied Genetics* 112:1248-1257.
- Dong J, Guang-Yan Z, Qi-Bing H (2006) Analysis of microsatellites in citrus unigenes. *Acta Genetica Sinica* 33:345-353.
- Federici C, Fang D, Scora R, Roose M (1998) Phylogenetic relationships within the genus Citrus (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 96:812-822.
- Gahlan P, Singh H, Shankar R, Sharma N, Kumari A, Chawla V, Ahuja P, Kumar S (2012) De novo sequencing and characterization of *Picrorhiza kurrooa* transcriptome at two temperatures showed major transcriptome adjustments. *BMC Genomics* 13:126-146.
- Golein B, Bigonah M, Azadvar M, Golmohammadi M (2012) Analysis of genetic relationship between 'Bakraee' (*Citrus sp.*) and some known *Citrus* genotypes through SSR and PCR-RFLP markers. *Scientia Horticulturae* 148:147-153.
- Guo S, Zheng Y, Joung JG, Liu S, Zhang Z, Crasta O, Sobral B, Xu Y, Huang S, Fei Z (2010) Transcriptome sequencing and comparative analysis of cucumber flowers with different sex types. *BMC Genomics* 11:384-391.
- Huson DH, Bryant D (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution* 23:254-267

در مجموع نتایج بدست آمده نشان می‌دهد داده‌های بدست آمده از توالی‌یابی عمیق تنسکرپتوم می‌تواند منبع خوبی برای شناسایی مکان‌های ریزماهواره باشد و نشانگرهای بدست آمده از

Jannati M, Fotouhi R, Abad AP, Salehi Z (2009) Genetic diversity analysis of Iranian citrus varieties using micro satellite (SSR) based markers. *Journal of Horticulture and Forestry* 1:120-125.

Li X, Xie R, Lu Z, Zhou Z (2010) The origin of cultivated citrus as inferred from internal transcribed spacer and chloroplast DNA sequence and amplified fragment length polymorphism fingerprints. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 135:341-350.

Liu K, Muse SV (2005) PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics* 21:2128-2129.

Luro F, Costantino G, Terol J, Argout X, Allario T, Wincker P, Talon M, Ollitrault P, Morillon R (2008) Transferability of the EST-SSRs developed on Nules clementine (*Citrus clementina* Hort ex tan) to other citrus species and their effectiveness for genetic mapping. *BMC Genomics* 9:287-299.

Nicolosi E, Deng ZN, Gentile A, La Malfa S, Continella G, Tribulato E (2000) Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics* 100:1155-1166.

Ollitrault F, Terol J, Pina JA, Navarro L, Talon M, Ollitrault P (2010) Development of SSR markers from *Citrus clementina* (Rutaceae) BAC end sequences and interspecific transferability in Citrus. *American Journal of Botany* 97:124-129.

Reece PC, Gardner F, Hearn C (1963) Page orange_a promising variety. In: Proceedings of the Florida State Horticultural Society 76:53-54.

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

Shanker A, Bhargava A, Bajpai R, Singh S, Srivastava S, Sharma V (2007) Bioinformatically mined simple sequence repeats in UniGene of *Citrus sinensis*. *Scientia Horticulturae* 113:353-361.

Terol J, Naranjo MA, Ollitrault P, Talon M (2008) Development of genomic resources for *Citrus clementina*: characterization of three deep-coverage BAC libraries and analysis of 46000 BAC end sequences. *BMC Genomics* 9:423-434.

Uzun A, Yesiloglu T, Tuzcu O, Gulsen O (2009) Genetic diversity and relationships within *Citrus* and related genera based on sequence related amplified polymorphism markers (SRAPs). *Scientia Horticulturae* 121:306-312.

Uzun A, Yesiloglu T (2012) Genetic Diversity in Citrus. In: Caliskan M (Ed.) *Genetic Diversity in Plants*, InTech, Rijeka, Croatia 213-230.