ژنتیک نوین
دوره نهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۳
صفحه ۲۹۸- ۲۸۹

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

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

مائده شفیعی[۱]، محسن مردی*[۲]، محمدرضا فتاحی‌مقدم[۱]، ذبیح‌اله زمانی[۱]

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار و استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران
۲- دانشیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج

Shafiee M[1], Mardi M[*2], Fattahi Moghaddam MR[1], Zamani Z[1]

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

نشانگرهای ریزماهواره در بررسی تکامل نژادی و تهیه نقشه‌های ژنی و لینکاژی نقش موثری دارند. در سال‌های اخیر مطالعات بسیاری برای شناسایی نشانگرهای ریزماهواره (با مبدا ژنوم یا ترنسکریپتوم) در گونه‌های مختلف مرکبات با استفاده از روش‌های متداول انجام شده است. در این مطالعه برای اولین بار از داده‌های بدست آمده از توالی‌یابی عمیق ترنسکریپتوم نارنگی کلمانتین (*Citrus clementina*) برای شناسایی مکان‌های ریزماهواره در مرکبات استفاده شد. به منظور ارزیابی کارآیی ریزماهواره‌های بدست آمده از این روش در مطالعات روابط فیلوژنی، برای تعدادی از این مکان‌ها آغازگر طراحی و الگوی باندی آن‌ها در ۳۴ ژنوتیپ مرکبات بررسی شد. در مجموع ۹۰۸۲ مکان ریزماهواره از ۷۵۶۵۹ یونی‌ژن بدست آمده از توالی‌یابی عمیق ترنسکریپتوم نارنگی کلمانتین، شناسایی شد که بیشترین فراوانی به ترتیب مربوط به ریزماهواره‌های دو و سه نوکلئوتیدی بود. تعداد بالای EST-SSRهای بدست آمده نشان‌دهنده بازده بالای روش نسل جدید توالی‌یابی در شناسایی نشانگرهای 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 Uncorrected P انجام شد. بر این اساس همه ژنوتیپ‌ها در چهار گروه پوملو، سیترون، ماندرین و نارنج سه برگ قرار گرفتند. شباهت بالای طبقه‌بندی بدست آمده با سایر مطالعات تنوع ژنتیکی مرکبات نشان‌دهنده کیفیت بالای نشانگرهای بدست آمده از روش توالی‌یابی عمیق ترنسکریپتوم است.

واژه‌های کلیدی

ترنسکریپتوم
تنوع ژنتیکی
توالی‌یابی نسل جدید
نارنگی کلمانتین
EST-SSR

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-26]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.5.8]

مقدمه

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، درحالی‌که تنها ۴ گونه اصلی سیترون (*C. medica*)، پوملو (*C.maxima*)، ماندرین (*C. reticulata*) و پاپدا برای آن شناخته شده است (Nicolosi et al. 2000) و سایر گونه‌ها اکثرا از دورگ‌گیری بین گونه‌های اصلی و جنس‌های نزدیک به مرکبات بوجود آمده و یا نتیجه موتاسیون های سوماتیکی هستند (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 آللی، شناسایی آسان، چندشکلی بالا و نیاز به مقدار اندک DNA، نشانگرهای ریزماهواره[1] را به یکی از موثرترین نشانگرها برای طبقه‌بندی سیستماتیک و تهیه نقشه‌های ژنتیکی تبدیل کرده است (Dong et al. 2006). در سال‌های اخیر تحقیقات موثری جهت شناسایی مکان‌های ریزماهواره و طبقه-بندی 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 EST[2] بدست می‌آیند، مستقیما بر روی نواحی کدکننده ژن قرار گرفته‌اند و قادر به ارزیابی تکامل مولکولی ژن‌های مربوطه هستند. از طرفی محفوظ‌تر بودن نواحی جانبی نشانگرهای EST-SSR[3] در گونه-های مرتبط، آن‌ها را نسبت به نشانگرهای ریزماهواره ژنومی در بررسی تنوع ژنتیکی بین گونه‌ها کارآمدتر می‌سازد (Luro et al. 2008). بهرحال 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.

توالی‌یابی عمیق ترنسکریپتوم[4] با استفاده از فناوری‌هایی نظیر GS-FLX (Roche) و HiSeq^{TM}2000 (Illumina) منابع فراوانی از EST را فراهم می‌کند که می‌تواند در برنامه‌های شناسایی مکان های 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 ۶-۲ نوکلئوتیدی با حداقل ۵ تکرار بر روی ۷۵۶۵۹ یونی‌ژن[5] بدست آمده از توالی‌یابی ترنسکریپتوم گیاه کلمانتین با استفاده از نرم‌افزار Msatfinder 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 ۵[6] بر اساس شاخص‌های محصول PCR با طول۲۵۰-۱۰۰ نوکلئوتید، طول آغازگر ۲۲-۱۷ نوکلئوتید (طول مطلوب ۲۰ نوکلئوتید)، دمای ذوب بهینه ۶۵ درجه سانتی‌گراد و درصد GC ۵۵-۴۵ درصد (بهینه ۵۰ درصد) انجام شد. ۳۴ ژنوتیپ مختلف مرکبات و جنس‌های 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 (جدول۱). 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 (Askari et al. 2011) استخراج شد. کیفیت و کمیت DNA بدست آمده با استفاده از روش‌های اسپکتروفتومتری و ژل آگارز ۰/۸ درصد ارزیابی شد.

[1] Microsatellite
[2] Expressed sequence tag
[3] Simple sequence repeat (SSR)
[4] Deep transcriptome sequencing
[5] Unigene
[6] Oligo5

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-26]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.5.8]

جدول۱- ژنوتیپ‌های مرکبات جمع‌آوری شده به منظور بررسی چندشکلی نشانگرهای ریزماهواره شناسایی شده از توالی‌یابی ترنسکریپتوم نارنگی کلمانتین

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

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[1] در حجم µl ۱۵، شامل بافر PCR [Tris-HCl ۱۰ میلی‌مولار (pH ۸/۸)؛ KCl ۵۰ میلی‌مولار؛ Nonidet P40 ۰/۸ درصد]، ۳۰ نانوگرم DNA ژنومی و مقادیر بهینه کلرید منیزیم، dNTPها، آغازگرها و Taq DNA Polymerase انجام شد. چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه واسرشته‌سازی اولیه به مدت دو دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ چرخه شامل مرحله واسرشته‌سازی به مدت دو دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله اتصال آغازگرها به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۶۵ –۵۷ 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 پلی‌اکریلامید ۶ درصد برای جداسازی محصولات PCR استفاده شد. در نهایت ژل پلی‌اکریلامید توسط روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی شد. نمره‌دهی ژل پلی‌اکریلامید بر اساس اختصاص حروف و همچنین حضور (یک) یا عدم حضور (صفر) باند انجام شد. نرم‌افزار آنالیز ژنتیکی PowerMarker 3.25 (Liu and Muse 2005) برای تعیین تعداد آلل، آلل موثر، هتروزیگوسیتی مشاهده شده، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و محتوای اطلاعات چندشکلی هر مکان (PIC[2]) 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 NJ[3] و فاصله Uncorrected P (تعداد آلل های غیر مشابه بین دو فرد) مورد استفاده قرار گرفت.

[1] Polymerase chain reaction (PCR)

[2] Polymorphic information content
[3] Neighbour joining

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-26]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.5.8]

نتایج و بحث

در این مطالعه برای اولین بار از یونی‌ژن‌های بدست آمده از توالی‌یابی عمیق ترنسکریپتوم 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 ترنسکریپتومی مرکبات موجود در NCBI (۳۲۷۸ ریزماهواره)، و 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[1] توالی کدکننده[2] می‌شود و بنابراین احتمال حضور این ریزماهواره‌ها در ناحیه کدکننده کمتر است (Dong et al. 2006; Luro et al. 2008). به هرحال در مواردی نیز 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 (۲۵/۱۰ درصد) و AAT/ATT (۱۸/۹۹ درصد) در ریزماهواره‌های سه نوکلئوتیدی و AAAT/ATTT (۲۸/۳۰ درصد) و AAAG/CTTT (۲۰/۲۸ درصد) در ریزماهواره‌های چهار نوکلئوتیدی بالاترین فراوانی را داشتند (جدول ۲). در مقابل ترکیباتی نظیر GC/CG (۰/۷ درصد) در ریزماهواره‌های دو نوکلئوتیدی و ACT/AGT (۱/۷۴ 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 توالی‌یابی عمیق ترنسکریپتوم در مطالعات فیلوژنی مرکبات انتخاب و برای آن‌ها آغازگر طراحی شد (جدول۳).

پس از تایید کیفیت DNA استخراج شده از ۳۴ ژنوتیپ مرکبات با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد، رقیق سازی به منظور حصول غلظت DNA یکسان ۱۰ نانوگرم بر میکرولیتر برای کلیه نمونه ها بر اساس غلظت های 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 (جدول۴).

پنج جفت آغازگر ABRII3، ABRII21، ABRII23، ABRII30 و ABRII35 موفق به تکثیر هیچ قطعه‌ای در میان ژنوتیپ‌های مورد آزمایش نشدند 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 ژنوتیپ‌های 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 ژنوتیپ مرکبات استفاده شد.

تعداد آلل، آلل موثر، هتروزیگوسیتی پیش‌بینی شده، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و محتوای 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).

[1] Frame shift
[2] Open reading frame

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-26]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.5.8]

جدول ۲- توزیع نوع ترکیبات تکراری در ۹۰۸۲ مکان ریزماهواره بدست آمده از یونیژن‌های حاصل از توالی‌یابی ترنسکریپتوم نارنگی کلمانتین

Di-	تعداد SSR	SSR%
AG/CT	۲۴۱۰	۵۶/۷۵
AC/GT	۹۵۶	۲۲/۵۱
AT/TA	۸۴۸	۱۹/۹۷
GC/CG	۳۳	۰/۷۸

Tri-	تعداد SSR	SSR%
AAG/CTT	۵۲۸	۴۱/۰۴
AAT/ATT	۳۶۱	۱۷/۹۶
ATC/GAT	۳۱۹	۱۵/۸۷
AGC/GCT	۲۴۱	۱۲/۰۰
AAC/GTT	۱۵۱	۷/۵۱
GGA/TCC	۱۳۱	۶/۵۲
ACC/GGT	۱۲۵	۶/۲۲
ACG/CGT	۶۹	۳/۴۳
CCG/CGG	۶۵	۳/۲۳
ACT/AGT	۲۰	۰/۹۹

Tetra-	تعداد SSR	SSR%
AAAT/ATTT	۴۷	۲۵/۲۷
AAAG/CTTT	۳۶	۱۹/۳۵
ATAC/GTAT	۲۱	۱۱/۲۹
AAAC/GTTT	۱۴	۷/۵۳
AATT/TTAA	۱۲	۶/۴۵
Others (≤۱۰)	۵۶	۳۰/۱۱

Penta-	تعداد SSR	SSR%
AAAAG/CTTTT	۸	۲۱/۶۲
AAGAG/CTCTT	۴	۱۰/۸۱
AAAAT/ATTTT	۴	۱۰/۸۱
AACTC/GAGTT	۳	۸/۱۱
AAAAC/GTTTT	۲	۵/۴۰
AAACC/GGTTT	۲	۵/۴۰
AAGCC/GGCTT	۲	۵/۴۰
Others (=۱)	۱۲	۳۲/۴۳

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 و ABRII31 (۶) بود، درحالی‌که میانگین آلل موثر ۲/۵۳ و کمترین و بیشترین مقدار آن به ترتیب در ABRII32 (۱/۸۵) و ABRII9 (۳/۷۴) مشاهده شد. حداکثر مقدار هتروزیگوسیتی برای ABRII7 و ABRII9 (۰/۷۲) و حداقل مقدار آن برای ABRII22 (۰/۳۹) پیش‌بینی شده بود، درحالی‌که کمترین مقدار هتروزیگوسیتی در ABRII6، ABRII28 و ABRII32 (۰/۲۴) و بیشترین مقدار آن در ABRII1 (۰/۷۱) مشاهده شد. میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده (۰/۴۵) نسبت به میانگین هتروزیگوسیتی پیش‌بینی شده (۰/۵۴) کمتر بود. بیشترین مقدار محتوای اطلاعات چندشکلی نیز در ABRII7 و ABRII9 (۰/۶۷) و کمترین مقدار آن در ABRII24 (۰/۳۳) مشاهده شد. بنابراین در مجموع دو جفت آغازگر ABRII7 و ABRII9 بهتر از سایر جفت آغازگرهای استفاده شده می‌توانند فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌های مرکبات را مشخص کنند.

مطالعه روابط فیلوژنی ۳۴ ژنوتیپ مرکبات با استفاده از الگوی باندی بدست آمده از نشانگرهای ریزماهواره به روش تجزیه خوشه‌ای بر اساس الگوریتم NJ و فاصله Uncorrected P انجام شد. بر اساس نتایج بدست آمده همه نمونه‌ها در ۴ گروه اصلی قرار گرفتند (شکل۱). 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 مکزیکن لایم قرار می‌گیرد (Federici et al. 1998)، بهرحال این گونه سهمی نیز از پوملو دارد زیرا یکی از والدین آن نارنج است (Federici et al. 1998) که خود هیبرید پوملو می‌باشد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-26]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.5.8]

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

مکان	منبع	موتیف	سایز محصول PCR (bp)	توالی آغازگر (′۳-′۵)	طول آغازگر (bp)	محتوای GC (٪)	دمای ذوب (ºC)
ABRII-LC-1	Unigene 7002_HC	(aac)6	217	F-GGCGCTCA(C)AAAGGCTAACA	19	6.52	6.67
				R-GCTGTTGCTGAAGTTGCTGT	20	50	3.68
ABRII-LC-2	Unigene 34439_HC	(at)10	187	F-GGGGTTCTCACTTCTCTTA	19	4.47	4.65
				R-CGGC(T)GATGGTGATGTGTAT	19	6.52	6.67
ABRII-LC-3	Unigene 56286_HC	(ac)6	211	F-GCATGAAGAGAG(T)AGATGG	18	50	5.64
				R-GAGGCCATTATCGTTTG	17	1.47	1.61
ABRII-LC-4	Unigene 7002_HC	(ggc)5	221	F-GTGGGAATCAGAATGGAGG(C)A	20	50	3.68
				R-CCCACCATTCATATCACCCA	20	50	3.68
ABRII-LC-5	Unigene 46649_HC	(tga)6	127	F-CCATCCCAGCACAGTTTCA	19	6.52	6.67
				R-GAGTGTGAGGTAAGTTGGT(G)G	20	50	3.68
ABRII-LC-6	Unigene 64087_HC	(tc)5	179	F-GATAAGACCATCCCATCTCC	20	50	3.68
				R-GTTTGTGTCTGTGTACGTG	19	4.47	4.65
ABRII-LC-7	Unigene 26372_HC	(ta)6	144	F-GGTTTTGTCTCTCGCTAGA	19	4.47	4.65
				R-GTGTTGGCGGAGGATTTGA	19	6.52	6.67
ABRII-LC-9	Unigene 19674_HC	(cag)5	231	F-CTGAATGCTGTGTCTCT	17	1.47	1.61
				R-ATGGCTTCAGATTGGAG	17	1.47	1.61
ABRII-LC-19	Unigene 7002_HC	(tgg)5	107	F-GCCCGTCCAGGTAAATATG	19	6.52	6.67
				R-GGTTCTGATTGTTTGCTCC	19	4.47	4.65
ABRII-LC-21	Unigene 7554_HC	(tct)5	208	F-ATCTGAATGGCTGTGGCTG	19	6.52	6.67
				R-TCTCCGCATTGGTTTCTGG	19	6.52	6.67
ABRII-LC-22	Unigene 25999_HC	(cgc)5	217	F-GTCTCTAATCTCAGCG(C)GCAT	20	50	3.68
				R-CGTGGGTTGGATTTCCTTTG	20	50	3.68
ABRII-LC-23	Unigene 67440_HC	(cac)5	143	F-ACACAACCATTCTCGTCGC	19	6.52	6.67
				R-CGATAGGATTCTTGAGAGCG	20	50	3.68
ABRII-LC-24	Unigene 27221_HC	(ag)8	194	F-TGACGTTTGATCGAGAGCC	19	6.52	6.67
				R-AATAACAGCTCCACCTGCC	19	6.52	6.67
ABRII-LC-25	Unigene 61170_HC	(taa)6	152	F-GCAAAGCAACCAAGGGATTC	20	50	3.68
				R-GCCT(C)TGTTTGGAATCGTGGT	20	50	3.68
ABRII-LC-26	Unigene 61586_HC	(acc)7	170	F-CCACGGCAGAGATCAACAT	19	6.52	6.67
				R-GTTGGAGGTGGAGGTAAAG	19	6.52	6.67
ABRII-LC-27	Unigene 69039_HC	(gaa)7	189	F-GTTGAGTTACTTGGACGCG	19	6.52	6.67
				R-CATGGTTGCGATCAGTGAT	19	4.47	4.65
ABRII-LC-28	Unigene7324_HC	(ta)9	163	F-GAGGAAGATGCCAAAGAGC	19	6.52	6.67
				R-CTGCTTGCTCTTTTTCCTC	19	4.47	4.65
ABRII-LC-29	Unigene31949_HC	(tc)5	167	F-CAAATGGTGGAATGGGGAAG	20	50	3.68
				R-CGCTGGAGTCATCATTGTTC	20	50	3.68
ABRII-LC-30	Unigene44614_HC	(tc)5	120	F-TTAGCAGCAAAGTGAGAGC	19	4.47	4.65
				R-TGACGATTATGAGGAGAGG	19	4.47	4.65

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-26]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.5.8]

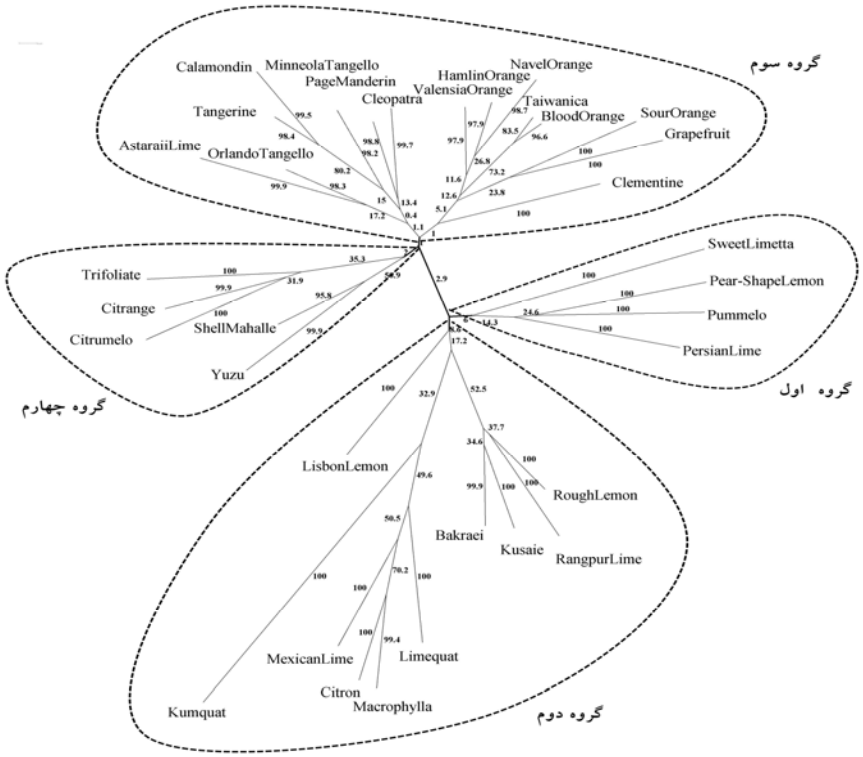
ادامه جدول ۳

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

جدول ۴- مقادیر بهینه کلرید منیزیم، dNTPs، آغازگرها، Taq DNA Polymerase و دمای مناسب ذوب

مکان	کلرید منیزیم (میلی مولار)	dNTP (میلی مولار)	آغازگرها (میلی مولار)	Taq DNA Polymerase (U)	دمای 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	–	–	–	–	–
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

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-26]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.5.8]



شکل ۱- بررسی روابط ژنتیکی ۳۴ ژنوتیپ مرکبات با استفاده از ۱۶ نشانگر چندشکل EST-SSR شناسایی شده از نتایج توالی یابی ترنسکریپتوم نارنگی کلمانتین

گروه دوم شامل سیترون به عنوان یکی دیگر از گونه‌های اصلی مرکبات و هیبریدهای آن (راف لمون (Barkley et al. 2006)، آلمو (Nicolosi et al. 2000)، رانگپورلایم (Nicolosi et al. 2000)، کوسایی (Nicolosi et al. 2000)، بکرایی (Shahsavar et al. 2007; Golien et al. 2012)، لیموترش مکزیکی (Barkley et al. 2006)، لیمو لیسبون (Nicolosi et al. 2000)) و همچنین لایم کوات و کامکوات هستند. 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 (Federici et al. 1998; Li et al. 2010; Ollitrault et al. 2010). استفاده از نشانگرهای ISSR در طبقه‌بندی برخی ژنوتیپ‌ها از جمله بکرایی نشان داد که این ژنوتیپ احتمالا 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 ژنوتیپ های دیگر نشان داد که فاصله ژنتیکی بکرایی با راف لمون کمتر از لیموشیرین است و احتمالا راف لمون یکی از والدین بکرایی می باشد (Golein et al. 2012). در این مطالعه (شکل۱) 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 شباهت ژنتیکی آن به لیموترش سبب شده در این گروه قرار گیرد. کامکوات نیز احتمالا به علت حضور لایم کوات در گروه سیترون، در این گروه قرار گرفته است. همه ژنوتیپ‌های نارنگی (تانجرین، کلئوپاترا)، هیبریدهای آن (کلمانتین، نارنگی پیج، کالاموندین، اورلاندو و مینولا تانجلو)، ژنوتیپ‌های پرتقال (والنسیا، ناول، هملین و پرتقال خونی) و همچنین نارنج، تایوانیکا، گریپ فروت و لیمو آستارایی در گروه سوم قرار گرفته‌اند. کالاموندین 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 حالی‌که در این مطالعه در گروه ماندرین که والد دیگر آن است قرار گرفته است. کلمانتین به عنوان هیبرید نارنگی و

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-26]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.5.8]

جدول۵- نام مکان، تعداد آلل، آلل موثر، هتروزیگوسیتی پیش‌بینی شده، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و محتوای اطلاعات چندشکلی ۱۶ مکان چندشکل EST-SSR در ۳۴ ژنوتیپ مرکبات

مکان	تعداد آلل	آلل موثر	هتروزیگوسیتی پیش‌بینی شده	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	محتوای اطلاعات چندشکلی
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
میانگین	۴/۲۵	۲/۵۳	۰/۵۴	۰/۴۵	۰/۴۸

پرتقال (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 هیبرید ماندرین و گریپ فروت هستند و رابطه نزدیکی با گروه ماندرین دارند (Uzun and Yesiloglu 2012). نارنگی پیج در هیچ یک از مطالعات تنوع ژنتیکی مرکبات یافت نشد، ولی از آنجایی‌که هیبرید کلمانتین و مینولا تانجلو است (Reece et al. 1963) حضور آن در گروه ماندرین طبیعی است. ژنوتیپ‌های مختلف پرتقال که هیبرید پوملو و ماندرین هستند (Federici et al. 1998) به والد ماندرینی خود نزدیکی بیشتری نشان داده‌اند و در تمام مطالعات فیلوژنی 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 هیبرید ماندرین × پوملو (Federici et al. 1998; Barkley et al. 2006) و پرتقال × پوملو (Li et al. 2010) هستند وضعیت پیچیده‌ای دارند زیرا این دو گونه گاهی در گروه پوملو و گاهی 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 هیبریدهای نارنج است نیز در گروه ماندرین قرار می‌گیرد (Federici et al. 1998).

گروه چهارم شامل نارنج سه برگ، هیبریدهای آن (سیترنج و سیترومیلو) و یوزو به عنوان هیبرید پاپدا × ماندرین (Uzun et al. 2009) می‌باشد. علاوه بر این شل محل که پیش از این به عنوان هیبرید نوا (کلمانتین × اورلاندو) و پوملو یا سیترون گزارش شده (Jannati et al. 2009) نیز در این گروه قرار گرفته است. یوزو 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 حالی‌که ژنوتیپی از والد پاپدا وجود نداشت، با نارنج سه برگ در یک گروه قرار گرفتند (Jannati et al. 2009). سیترنج و سیترومیلو نیز در حضور نارنج سه برگ در یک گروه قرار می‌گیرند (Amar et al. 2011).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-26]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.5.8]

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

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.

Shahsavar 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.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-26]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.3.5.8]