بررسی تنوع ژنتیکی و تجزیه ساختار ژنوتیپ‌های مختلف مرکبات با استفاده از آغازگرهای ISSR

ابوذر ابوذری[۱،*]، احمدرضا دادرس[۲]، بهروز گلعین[۳] و یحیی تاجور[٤]

۱- استادیار، بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان مازندران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری

۲- استادیار، ایستگاه تحقیقات زیتون طارم، بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، زنجان

۳- دانشیار، پژوهشکده تحقیقات مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری رامسر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رامسر

٤- استادیار، پژوهشکده تحقیقات مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری رامسر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رامسر

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰٦/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۲۵)

چکیده

در برنامه‌های اصلاحی به آگاهی از قرابت و تنوع ژنتیکی موجود در ذخایر ژرم‌پلاسمی نیاز است. گستردگی کشت و میزان بالای تولید مرکبات بیانگر اهمیت آن در اقتصاد جهانی است. در این تحقیق ۱۱۰ ژنوتیپ مرکبات با استفاده از ۱۲ آغازگر ISSR مورد ارزیابی قرار گرفتند. در مجموع ۱٥٤ نوار چندشکل با میانگین ۱۲/۸ آلل امتیازدهی شد. درصد چندشکلی از ۵۷ درصد برای آغازگر ISSR1 تا ۸۲ درصد برای آغازگر ISSR9 متغیر بود. متوسط محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)، میزان متوسط شاخص نشانگر (MI)، شاخص تنوع ژنی (Nei)، شاخص شانون (I) و تعداد آلل مؤثر (Ne) به‌ترتیب ۰/۰۰۲ ± ۰/٤۸، ۱/۱۷ ± ٦/۱٤، ۰/۱۱ ± ۰/٤۲، ۰/۱۲ ± ۰/٦۱ و ۰/۲۷ ± ۱/۷۸ برآورد شد. بر اساس آماره‌های تنوع ژنتیکی، جمعیت مورد مطالعه تنوع ژنتیکی بالایی داشت و چهار آغازگر ISSR11، ISSR9، ISSR4 و ISSR5 از پتانسیل بیشتری جهت تمایز ژنوتیپ‌ها برخوردار بودند. تجزیه خوشه‌ای و تجزیه ساختار به‌ترتیب بر اساس روش اتصال همسایگی (NJ) و روش بیزی ژنوتیپ‌ها را به پنج گروه و چهار زیرجمعیت تقسیم کرد. بر مبنای هر دو تجزیه، قرار گرفتن ژنوتیپ‌های ناشناخته با ارقام شاهد در یک گروه، فرض زمینه ژنتیکی مشترک بین این ژنوتیپ‌ها را تقویت نمود. در گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها، سه گونه حقیقی پوملو (*C. maxima*)، ماندارین (*C. reticulate*) و سیترون (*C. medica*) در گروه‌های مجزا قرار گرفتند. بر اساس نتایج، علاوه‌بر سه گونه حقیقی، حداقل یک گونه یا جنس دیگر از خویشاوندان مرکبات در ریخته ارثی جمعیت مورد مطالعه سهم داشت. در این تحقیق اگرچه هر دو تجزیه مورد استفاده در تکمیل اطلاعات هم کارآمد بودند، امّا با لحاظ نمودن میزان اختلاط ژنتیکی و اطلاعات منشأ ژنوتیپ‌ها، شاید بتوان بر اثربخشی بیشتر تجزیه ساختار مبتنی بر مدل در ارزیابی روابط ژنتیکی دست یافت.

واژگان کلیدی: آغازگر ISSR، تجزیه ساختار جمعیت، مرکبات، روابط فیلوژنی

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: **a.abouzari@areeo.ac.ir**

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1399.7.2.4.3]

[DOI: 10.52547/pgr.7.2.2]

مقدمه

سیتروس و ۲۸ جنس خویشاوند آن به خانواده Rutaceae و زیرخانواده Aurantioideae تعلق دارند (Barkley *et al.*, 2006). فراوانی تلاقی‌های سازگار بین و درون‌گونه‌ای (Krueger and Navarro, 2007)، جهش جوانه، آپومیکسی، قدمت سابقه کشت و تفاوت مناطق پرورش مرکبات از عوامل اصلی ایجاد تنوع در جنس سیتروس به‌شمار می‌آیند (Mabberley, 2004). از آنجا که تعیین قرابت بر مبنای شاخص‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی به‌وسیله عواملی از جمله دوره رشد گیاه، شرایط محیطی و اپیستازی تحت تأثیر قرار می‌گیرند، لذا تعیین روابط ژنتیکی با کمک نشانگرهای مولکولی از دقت و اطمینان بیشتری برخوردار است (Barkley *et al.*, 2006). نشانگر ISSR، نشانگری غالب و مبتنی بر PCR است. در این تکنیک، قطعه‌ای از DNA ژنومی در حضور یک توالی مکمل با توالی یک ریزماهواره تکثیر می‌شود (Bornet and Branchard, 2001; Aziznia *et al.*, 2020). هرچند دامنه معرفی و استفاده از نشانگرهای جدید گسترش یافته است، ولی ویژگی‌هایی از قبیل عدم نیاز به اطلاع از توالی ژنومی، در اختیار بودن چندشکلی نسبتاً بالا در مدتی کوتاه، تکرارپذیری، سادگی و ارزان بودن سبب شده این نشانگر برای اهداف مختلفی در اولویت انتخاب برخی از محققین قرار گیرد (Mirmohammadi Maibody and Golkar, 2019). در بررسی روابط فیلوژنتیکی ٦٨ گونه از جنس سیتروس با استفاده از آغازگر ISSR، این آغازگر توانست ژنوتیپ پرتقال، گریپ‌فروت و لمون را از هم متمایز نماید (Fang and Roose, 1997). استفاده از نشانگر ISSR در تعیین ارتباط فیلوژنی ارقام مرکبات نشان داد که این نشانگر در متمایز نمودن گونه‌های با رابطه خویشاوندی نزدیک از پتانسیل بالایی برخوردار می‌باشد (Shahsavar *et al.*, 2007). مطالعه تنوع ژنتیکی ارقام لیموترش با استفاده از نشانگر ISSR نشان داد که ارقام رایج کشت شده در شرق نپال به پنج گروه متمایز تعلق دارد (Munankarmi *et al.*, 2018). همچنین استفاده از این نشانگر در شناسایی پایه‌های بذری (Awad *et al.*, 2019) و تهیه نقشه پیوستگی ژنی (Zhang *et al.*, 2016) نیز گزارش شده است. با استفاده از داده‌های مولکولی، تجزیه‌های متعددی برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. علاوه‌بر دسته‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس ماتریس فاصله یا شباهت که نیازی به ساختار از پیش تعریف شده ندارد (Evanno *et al.*, 2005)، می‌توان بر مبنای ساختار ژنتیکی ژنوتیپ‌ها و تفاوت فراوانی آللی، جمعیت را به زیرجمعیت‌های متمایزی تفکیک نمود. روش‌های متعارف تعیین ساختار جمعیت اغلب از رویکردهای مختلفی از جمله الگوریتم‌های مبتنی بر مدل مانند STRUCTURE با استفاده از روش Bayesian استفاده می‌کنند (Falush *et al.*, 2003). در این روش علاوه‌بر محاسبه میزان اختلاط، هر یک از ژنوتیپ‌ها با یک احتمال و تحت شرایطی به زیرجمعیت‌های فرضی منتسب می‌شوند که در هر زیرجمعیت میزان عدم تعادل پیوستگی حداقل و تعادل مرحله گامتی حداکثر باشد.

از آنجا که اشراف بر میزان تنوع و روابط ژنتیکی از اصول اولیه برنامه‌های اصلاحی مرکبات می‌باشد (Moore, 2001)، پژوهش حاضر در جهت تعیین پتانسیل ژنومی این مجموعه، با تأکید بر کارایی نشانگر ISSR در تعیین قرابت، ترکیب ساختار ژنتیکی نمونه‌های موجود در ژرم‌پلاسم مورد مطالعه و سهم مشارکت ژنومی گونه‌های حقیقی مرکبات در بین ارقام ناشناخته، طراحی و اجرا شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و استخراج DNA: در این پژوهش تعداد ۱۱۰ ژنوتیپ مختلف شامل ٧٦ ژنوتیپ طبیعی ناشناخته و ٣٤ رقم تجاری و محلی مرکبات از پژوهشکده تحقیقات مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری رامسر انتخاب و مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱). استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های برگی به روش ادوارد و همکاران (Edwards *et al.*, 1991) انجام و نمونه‌های با کمیت و کیفیت برتر پس از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد انتخاب شدند.

تجزیه نشانگر: واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با ۱۲ آغازگر ISSR اختصاصی مرکبات که در سایر پژوهش‌ها کیفیت آللی مناسب و چندشکلی بالایی برای آن‌ها گزارش شده بود (Shahsavar *et al.*, 2004; Golein *et al.*, 2014) انجام شد (جدول ۲).

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1399.7.2.4.3]
[DOI: 10.52547/pgr.7.2.2]

جدول ۱- مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق

Table 1. Plant materials used in the present study

کد گیاه Genotype code	نام علمی Scientific name	نام عمومی	Common name
G1-G75	*Citrus* spp	نامشخص	Unknown
G76	*C. medica* (L.) Osbeck	سیترون	Citron
G77	*C. limon* (L.) Burm. f.	لمون اروکا	Eureka lemon
G78	*C. grandis* (L.) Osbeck	پوملو	Pummelo
G79	*Citrus* spp	نامشخص	Unknown
G80	*C. reshni* Tanaka	کلئوپاترا	Cleopatra
G81	*C. reticulata* Blanco	دنسی	Dancy mandarin
G82	*C. sinensis* (L.) Osbeck	سیاورز ۱	Siavaraz 1 Bud mutation
G83	*C. myrtifolia* (L.) Rafinesque	نارنج خوشه‌ای	Chinotto
G84	*C. sinensis* (L.) Osbeck	سانگین	Sanguine
G85	*C. reticulate* Blanco	شل‌محله	Shelmahaleh Natural hybrid
G86	*C. aurantium* L.	نارنج	Sour orange
G87	*C. limettioides* Tanaka	لیموشیرین	Sweet lime
G88	*C. reticulata* Blanco	کلمانتین	Clementine
G89	*C. sinensis* (L.) Osbeck	سانگینلا	Sanguinella
G90	*C. paradise* Macfadyen	گریپ‌فروت	Duncan grapefruit
G91	*C. paradise* Macfadyen	گریپ‌فروت	Marsh grapefruit
G92	*C. sinensis* (L.) Osbeck	گروس‌سانگین	Gross sanguine
G93	*C. sinensis* (L.) Osbeck	تامسون ناول	Thomson navel orange
G94	*C. sinensis* (L.) Osbeck	سیاورز ۲	Siavaraz 2 Bud mutation
G95	*C. sinensis* (L.) Osbeck	معلم‌کوه	Moallemkoh Bud mutation
G96	*C. unshiu* Marcovitch	اونشو	Satsuma mandarin
G97	*Minneola tangelo* × *C. clementina*	پیج	Page mandarin
G98	*C. reticulata* × *C. sinensis*	خرم	Khorram
G99	*C. sinensis* (L.) Osbeck.	والنسیا	Valencia orange
G100	*C. reticulata* × *C. sinensis*	جهانگیر	Jahangir
G101	*C. reticulata* × *C. sinensis*	نوشین	Noshin
G102	*C. unshiu* Marcovitch	اکیتسو	Okitsu
G103	*Poncirus trifoliate* (L.) Rafinesque	نارنج سه برگ	Trifoliate orange
G104	*C. reticulata* × *C. sinensis*	شاهین	Shahin
G105	*C. clementina* Tanaka	ماریسول	Marisol clementine
G106	*C. paradisi* × *P. trifoliata*	سیتروملو	Citrumelo
G107	(*C. paradisi* × *C. reticulata*) × *C. changsha*	یاشار	Yashar
G108	*C. latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka	پرشین‌لایم	Persian lime
G109	*C. aurantifolia* (Christm.) Swingle	مکزیکن‌لایم	Mexican lime
G110	*C. aurantium* L.	نارنج اف‌تایپ	Off type sour orange

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1399.7.2.4.3]

[DOI: 10.52547/pgr.7.2.2]

جدول ۲- آغازگرهای ISSR و خلاصه‌ای از آماره‌های تنوع مورد استفاده در این پژوهش

Table 2. List of the ISSR primers and summary of diversity statistics used in the present study

کد آغازگر Primer code	توالی آغازگر Primer Sequence	تعداد کل نوار Total bands (N)	تعداد نوارهای چندشکل Number of polymorphic bands (Na)	درصد چندشکلی Polymorphism Percentage	میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی Polymorphic Information Content (PIC)	شاخص نشانگر Marker Index (MI)	تعداد آلل مؤثر Number of effective alleles (Ne)	شاخص شانون Shannon Index (I)	شاخص تنوع ژنی Gene diversity (Nei)
ISSR1	HVH (GA)7T	21	12	57	0.47	5.64	1.81	0.62	0.43
ISSR2	BDB (CA)7C	14	8	57	0.48	3.87	1.91	0.67	0.47
ISSR3	DBDA (CA)7	16	11	68	0.48	5.21	1.72	0.58	0.40
ISSR4	(GA)8YG	21	15	71	0.48	7.21	1.73	0.58	0.40
ISSR5	(AG)8YT	18	14	77	0.49	6.75	1.74	0.58	0.40
ISSR6	(AG)8YC	13	10	76	0.49	4.80	1.66	0.56	0.38
ISSR7	(AC)8YG	20	13	65	0.49	6.31	1.76	0.60	0.41
ISSR8	(AC)8YA	19	12	63	0.48	5.75	1.83	0.62	0.44
ISSR9	(AC)8YT	17	14	82	0.48	6.68	1.82	0.62	0.44
ISSR10	(CA)8RG	19	13	68	0.49	6.27	1.86	0.65	0.46
ISSR11	(AG)8 G	23	18	78	0.48	8.64	1.86	0.65	0.46
ISSR12	BDB(TCC)5	22	14	63	0.48	6.67	1.71	0.57	0.39
کل Total		223	154	825	5.79	73.8	21.41	7.3	5.08
میانگین Mean		18.58	12.83	68.75	0.48	6.15	1.78	0.61	0.42

واکنش‌های PCR در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر شامل ۳ میکرولیتر از DNA الگو، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر (۶۰ نانوگرم در میکرولیتر)، ۱ میکرولیتر از بافر PCR (10X)، ۰/۳ میکرولیتر کلرید منیزیم (۵۰ میلی‌مولار)، ۰/۲ میکرولیتر برای هر یک از چهار نوع dNTP (۲ میلی‌مولار)، ۰/۲ میکرولیتر از *Taq* DNA Polymerase (۵ واحد در میکرولیتر) و ٤ میکرولیتر آب مقطر استریل دو بار تقطیر انجام شد. چرخه‌های حرارتی شامل یک مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹٤°C به‌مدت ۳ دقیقه، ٤۰ چرخه حرارتی ۹٤°C برای یک دقیقه، دمای اتصال ۵۵°C به‌مدت ۳۰ ثانیه، توسعه در دمای ۷۲°C به‌مدت یک دقیقه و در نهایت یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲°C به‌مدت ٤ دقیقه بود. محصولات واکنش PCR در الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد به‌مدت ۲ ساعت و با ولتاژ ۱۰۰ ولت تفکیک شد و از رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید و عکس‌برداری زیر نور UV جهت رؤیت و ثبت نوارها استفاده شد.

تجزیه‌های آماری داده‌ها: ماتریس صفر و یک حاصل از امتیازبندی نوارها، بر مبنای عدم وجود نوار (صفر) و وجود نوار (یک) تشکیل شد. علاوه‌بر آن تعداد کل نوار برای هر جایگاه ژنی تعیین و فراوانی نسبی نوارهای چندشکل نیز به‌دست آمد. برای تعیین قدرت تمایز آغازگرها، شاخص میزان محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) با استفاده از نرم‌افزار Excel و سایر آماره‌های تنوع ژنتیکی مانند درصد چندشکلی، شاخص شانون (I)، تعداد آلل مؤثر (Ne)، شاخص نشانگر (MI) و شاخص تنوع ژنی (Nei) با استفاده از نرم‌افزارهای GenAlEx v.6.5 و PopGene v.1.32 محاسبه شدند. تشکیل ماتریس‌ها، گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها و سنجش میزان انطباق ماتریس‌ها و دندروگرام‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزارهای مختلف

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1399.7.2.4.3]
[DOI: 10.52547/pgr.7.2.2]

از جمله GGT v.2.0 و NTSYS v.2.02 انجام شد. همچنین به‌منظور تأیید گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای، شناسایی زیرجمعیت‌های با ساختار ژنتیکی متمایز (K) و تشخیص ژنوتیپ‌های مختلط، تجزیه ساختار جمعیت بر مبنای روش Bayesian با استفاده از نرم‌افزار STRUCTURE v.2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) انجام شد. با در نظر گرفتن ۲ تا ۸ زیرجمعیت فرضی اولیه و ۵ تکرار برای هرکدام از زیرجمعیت‌ها، از مدل ترکیبی (Admixture model) با ۵۰۰۰۰۰ تکرار آزمایش (Burn-in) و ۵۰۰۰۰۰ تکرار MCMC (Markov Chain Monte Carlo)، استفاده شد تا منحنی حداکثر درست‌نمایی حاصل شود. عدد K بهینه (تعداد زیرجمعیت‌های احتمالی) بر اساس دلتا K (Evanno *et al.*, 2005) و با استفاده از نرم‌افزار STRUCTURE HARVESTER تعیین شد.

نتایج و بحث

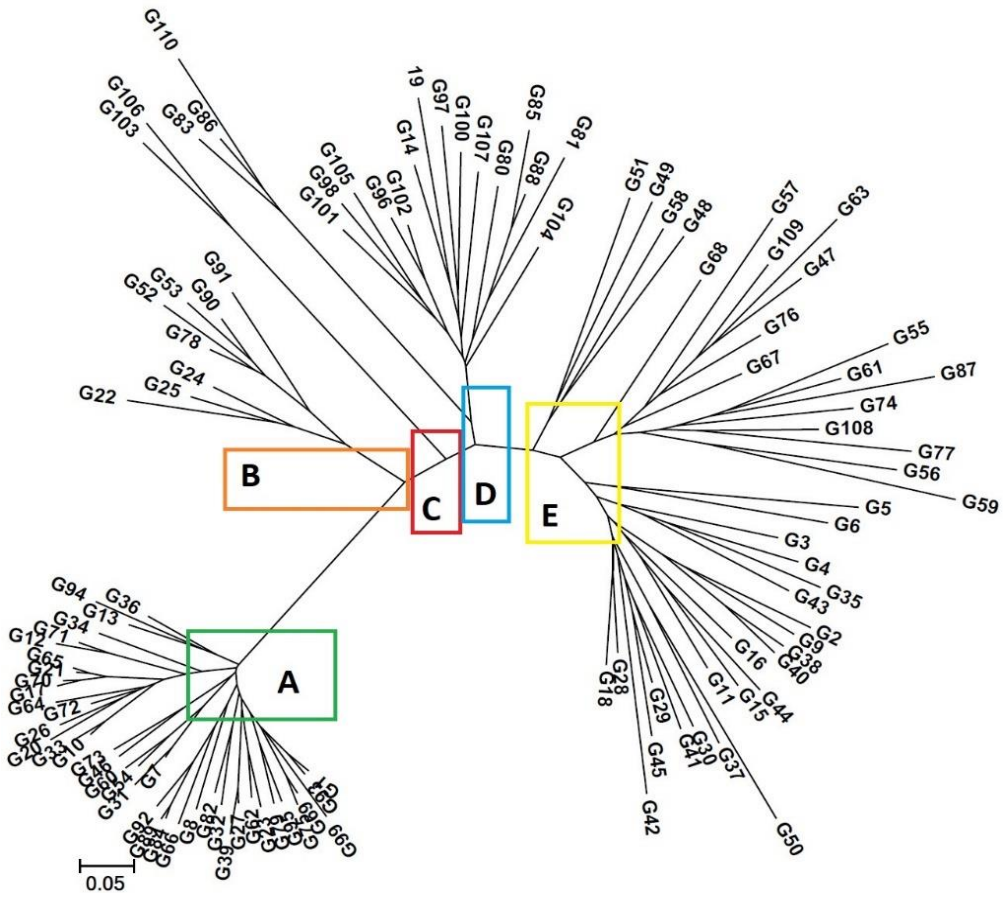
چندشکلی حاصل از آغازگر ISSR: در این پژوهش هر ۱۲ آغازگر ISSR الگوی نواری DNA مناسب در بین ۱۱۰ ژنوتیپ مرکبات مورد مطالعه تولید نمودند. در مجموع تعداد ۱۵٤ نوار چندشکل با میانگین ۱۲/۸ آلل به‌ازای هر جایگاه ژنی امتیازدهی شد. تعداد نوارهای چندشکل برای هر آغازگر از ۸ (ISSR2) تا ۱۸ (ISSR11) عدد متغیر بود (جدول ۲). کمترین و بیشترین مقدار درصد چندشکلی به‌ترتیب ۵۷ درصد برای آغازگر ISSR1 و ۸۲ درصد برای آغازگر ISSR9 محاسبه شد (جدول ۲). میانگین درصد چندشکلی مشاهده شده در این پژوهش ۷۰ درصد را برآورد شد که می‌تواند بیانگر کارایی مناسب آغازگرها، تنوع ژنتیکی بالا و وجود ژنوتیپ‌های با منشأ هیبرید نسبت داد. میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) معادل ۰/۰۰۲ ± ۰/٤۸ محاسبه شد. این میزان بالای PIC بیانگر انتخاب تقریباً مناسب آغازگرها برای تمایز بین نمونه‌های مورد مطالعه است. میزان متوسط شاخص نشانگر (MI)، شاخص تنوع ژنی (Nei)، شاخص شانون (I) و تعداد آلل مؤثر (Ne) به‌ترتیب ۱/۱۷ ± ٦/۱۵، ۰/۱۱ ± ۰/٤۲، ۰/۱۲ ± ۰/٦۱ و ۰/۲۷ ± ۱/۷۸ برآورد شد که بالا بودن این مقادیر می‌تواند بیانگر وجود تنوع ژنتیکی قابل‌ملاحظه در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه باشد. در مجموع با در نظر گرفتن آماره‌های تنوع ژنتیکی، چهار آغازگر ISSR11، ISSR9، ISSR4 و ISSR5 از پتانسیل مناسب‌تری جهت تمایز ژنوتیپ‌ها برخوردار بودند.

تعیین روابط ژنتیکی بر اساس داده‌های ISSR: در این پژوهش برای تعیین ارتباط ژنتیکی ۱۱۰ نمونه مورد مطالعه از ضریب تشابه جاکارد و روش الگوریتم اتصال همسایگی (NJ) استفاده شد. بر این اساس، دندروگرام حاصل به ۵ گروه اصلی A، B، C، D و E تفکیک شد (شکل ۱).

تعداد ۳۲ ژنوتیپ ناشناخته به‌همراه ارقام شاهد پرتقال در گروه A دسته‌بندی شدند. میانگین ضریب تشابه (GS) بالا بین ارقام شاهد پرتقال (GS ≥ ۰/۷٦) بیانگر منشأ ژنومی مشترک (مونوفیتیک) می‌باشد که در طی زمان با جهش سوماتیکی و گزینش ژنوتیپ‌های مطلوب همراه بوده است (Xu *et al.*, 2013). هم‌گروهی و بالا بودن نسبی میانگین ضریب تشابه ژنوتیپ‌های ناشناخته موجود در این گروه با ارقام پرتقال (GS ≥ ۰/۷۸) بیانگر قرابت آن‌ها با پرتقال می‌باشد (شکل ۱). در این گروه برخی از ژنوتیپ‌های ناشناخته مانند G7 با G31، G10 با G33 و G27 با G39 احتمالاً به‌دلیل جهش‌های سوماتیکی و یا منشأ مشترک از بافت خورش، دارای ضرایب تشابه بالایی بودند (به‌ترتیب ۰/۹۵، ۰/۹۵ و ۰/۹٤). این مطالعه نشان داد که تشابه ژنتیکی بالایی بین ارقام پرتقال وجود دارد و بررسی‌های انجام شده پیشین نیز این نتایج را تأیید می‌کند (Ahmed *et al.*, 2017).

پوملو (G78) به‌عنوان یکی از سه گونه حقیقی مرکبات و منطبق با الگوهای گزارش شده پیشین (Bayer *et al.*, 2009) به‌همراه ارقام گریپ‌فروت (G90 و G91) در گروه B قرار گرفت. در این گروه دو ژنوتیپ ناشناخته G52 و G53 به‌دلیل شباهت ژنتیکی بالا با گریپ‌فروت (G90) (GS = ۰/۸۵)، احتمالاً حاصل جهش سوماتیکی یا هیبرید درون‌گونه‌ای گریپ‌فروت و ژنوتیپی نزدیک به آن می‌باشند.

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1399.7.2.4.3]
[DOI: 10.52547/pgr.7.2.2]



شکل ۱- گروه‌بندی ۱۱۰ ژنوتیپ مرکبات با استفاده از ۱۲ آغازگر ISSR و به‌روش اتصال همسایگی (NJ)

Figure 1. The Neighbor-joining tree of 110 accessions of citrus genotypes using 12 ISSR markers

کدها بر اساس جدول ۱ می‌باشند.

The codes are based on table 1.

در گروه C فقط دو ژنوتیپ پونسیروس (G103) همراه با سیتروملو (G106) با ضریب تشابه ۰/۷۶ قرار گرفت. پونسیروس (G103) ژنوتیپ خزان‌کننده است و به‌علت دارا بودن خصوصیات مورفولوژیک متفاوت و عدم تقارن زمان گلدهی آن با سایر گونه‌های مرکبات، تمایز آن از سایر گروه‌ها دور از انتظار نیست (Wu *et al.*, 2018). رقم سیتروملو (G106) هیبرید گریپ‌فروت و پونسیروس است و این الگوی گروه‌بندی با نتایج حاصل از سایر پژوهش‌ها (Abouzari *et al.*, 2020) منطبق است.

در این پژوهش همه ارقام شاهد ماندارین و نارنج و دو ژنوتیپ ناشناخته G14 و G19 در گروه D قرار گرفتند. مشابه با نتایج به‌دست آمده در این تحقیق، در بررسی تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم مرکبات با استفاده از آغازگرهای RAPD و SCAR تمامی ژنوتیپ‌های ماندارین در یک گروه واقع شدند (Nicolosi *et al.*, 2000). پیش از این کلئوپاترا (G80) در گروه ماندارین گزارش شده است (Barkley *et al.*, 2006) و نتایج حاصل با این الگوی گروه‌بندی منطبق است. قرابت ژنتیکی (GS = ۰/٦٦) بین نارنگی دنسی (G81) و کلئوپاترا (G80) با توجه به تعلق دو ژنوتیپ به گروه تانجرین‌ها، مورد انتظار بوده و در مطالعات دیگر نیز اشاره شده است (Luro *et al.*, 1995).

گزارش شده که نارنج هیبرید طبیعی ماندارین به‌عنوان والد پدری و پوملو به‌عنوان والد مادری است (Velasco and Licciardello, 2014). در این مطالعه نارنج (G86) تشابه بیشتری به ماندارین نشان داده و با ضریب تشابه ۰/۲۹ از پوملو و ۰/۳۲ از گروه ماندارین تفکیک شده است.

ارقام شاهد لایم، لمون و سیترون به‌همراه تمام ژنوتیپ‌های ناشناخته با مورفولوژی مشابه با آن‌ها، در گروه E قرار گرفتند.

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1399.7.2.4.3]
[DOI: 10.52547/pgr.7.2.2]

دامنه تغییرات ضریب تشابه بین ژنوتیپ‌های ناشناخته این گروه بسیار زیاد بود (۰/۲ تا ۰/۸۷). بالا بودن تنوع ژنتیکی در این گروه می‌تواند به‌دلیل تلاقی‌های بین و درون‌گونه‌ای باشد. در این مطالعه شباهت ژنتیکی بین لمون اروکا (G77) با گروه لایم و نارنج به‌ترتیب ۰/٦۰ و ۰/٢٤ برآورد شد که بر احتمال سهم والد لایم در تشکیل ژنوم لمون می‌افزاید. با توجه به اینکه لایم‌ها عمدتاً دارای تکثیر جنسی می‌باشند لذا با افزایش احتمال دگرگرده‌افشانی، تولید ژنوتیپ‌های هیبرید و هتروزیگوتی نسبتاً بالا در بین آن‌ها دور از انتظار نخواهد بود (Kijas *et al.*, 1997). در این الگوی گروه‌بندی همانند مطالعاتی که پیش از این انجام شده است (Nicolosi *et al.*, 2000; Khiavi *et al.*, 2015)، رقم لیموشیرین (G87) در کنار سیترون (G76) در یک گروه قرار گرفت و این خود می‌تواند بیانگر وجود رابطه ژنتیکی با دیگر ژنوتیپ‌های ناشناخته گروه باشد.

تجزیه ساختار جمعیت بر اساس داده‌های ISSR: با توجه به بالاترین مقدار عددی ΔK در تعیین تعداد بهینه زیرجمعیت‌ها (K)، مجموعه ژرم‌پلاسم مورد مطالعه از لحاظ ساختار ژنتیکی به چهار گروه منتسب شد (شکل ۲). بر این اساس، ۱۵ژنوتیپ به گروه اول (با منشأ ژنومی نامشخص)، ۱۳ژنوتیپ به گروه دوم (سیترون)، ۱۹ ژنوتیپ به گروه سوم (ماندارین) و ٤۰ ژنوتیپ به گروه چهارم (پوملو) تعلق گرفت (جدول ۳). همچنین ۲۳ ژنوتیپ نیز با درصد عضویت کمتر از ۰/۷ به‌عنوان ژنوتیپ‌های مخلوط در نظر گرفته شدند.

جدول ۳- درصد عضویت ژنوتیپ‌های مختلف به چهارگروه حاصل از تجزیه ساختار مبتنی بر مدل

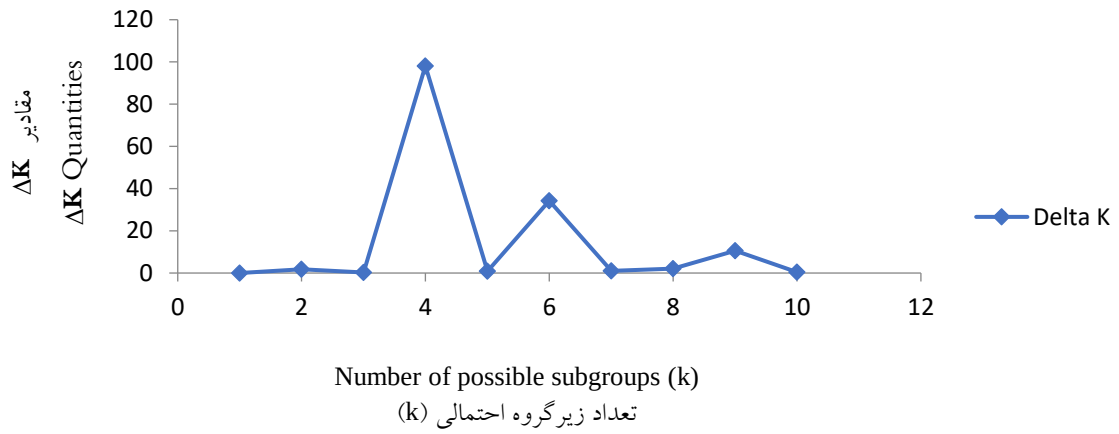
Table 3. Percentage of membership of genotypes into four groups resulted from model-based structure analysis

گروه پوملو Pummelo group		گروه ماندارین Mandarin group		گروه سیترون Citron group		ژنوم با منشأ نامشخص Genome with unknown origin	
شماره ژنوتیپ Genotype code	درصد عضویت Percentage of membership	شماره ژنوتیپ Genotype code	درصد عضویت Percentage of membership	شماره ژنوتیپ Genotype code	درصد عضویت Percentage of membership	شماره ژنوتیپ Genotype code	درصد عضویت Percentage of membership
G90	0.994	G88	0.986	G76	0.987	G38	0.989
G78	0.990	G100	0.985	G47	0.984	G29	0.978
G65	0.982	G81	0.916	G61	0.948	G18	0.940
G69	0.968	G24	0.907	G108	0.916	G45	0.925
G72	0.968	G19	0.886	G77	0.902	G28	0.904
G91	0.964	G25	0.876	G63	0.900	G40	0.903
G21	0.959	G22	0.860	G109	0.884	G41	0.872
G10	0.957	G85	0.850	G55	0.875	G30	0.868
G20	0.956	G105	0.844	G67	0.860	G42	0.813
G26	0.956	G97	0.837	G87	0.859	G2	0.799
G75	0.953	G102	0.832	G74	0.841	G3	0.758
G70	0.945	G98	0.805	G57	0.813	G9	0.747
G82	0.941	G104	0.803	G59	0.744	G43	0.728
G64	0.939	G101	0.800			G44	0.725
G23	0.935	G14	0.777			G37	0.722
G27	0.930	G79	0.731				
G99	0.926	G53	0.729				
G33	0.920	G1	0.711				
G54	0.920	G96	0.701				
G7	0.919						
G92	0.918						
G46	0.913						
G17	0.909						
G71	0.907						
G36	0.905						
G66	0.901						
G60	0.898						
G95	0.897						
G94	0.885						
G62	0.884						
G32	0.881						
G8	0.880						
G31	0.878						
G39	0.878						
G73	0.873						
G13	0.865						
G12	0.864						
G34	0.849						
G84	0.831						
G89	0.819						

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1399.7.2.4.3]

[DOI: 10.52547/pgr.7.2.2]

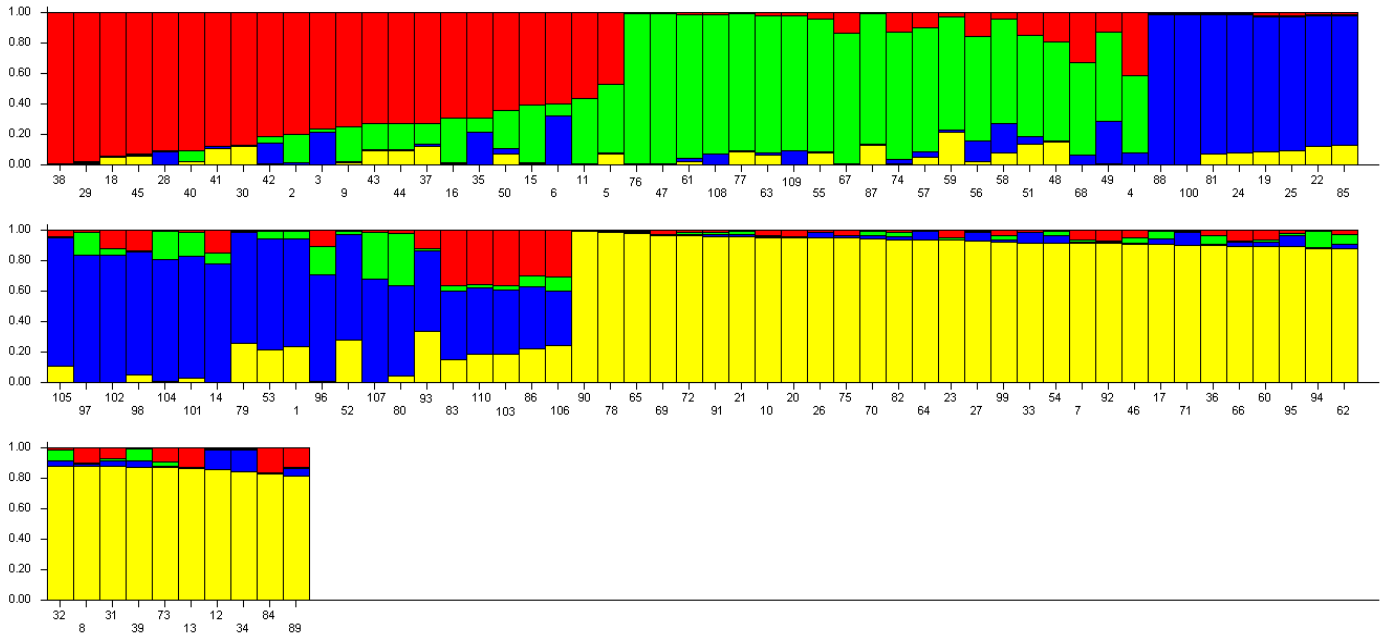


شکل ۲- نمودار دو طرفه تغییر مقادیر ΔK برحسب مقادیر K برای تعیین تعداد زیر گروه‌های احتمالی در ۱۱۰ ژنوم مرکبات مورد مطالعه

Figure 2. Bilateral charts of changes in ΔK values based on K amounts for determination of the number of sub-populations in studied 110 Citrus genomes.

با توجه به نمودار، تعداد زیرگروه احتمالی ٤ برآورد شد (K = ٤).

According to the charts, number of possible subgroups estimated to be 4 (K = 4)



شکل ۳- تجزیه ساختار مبتنی بر مدل بیزی برای ۱۱۰ ژنوتیپ مرکبات با استفاده از اطلاعات ۱۲آغازگر ISSR

Figure 3. Genetic relatedness of 110 citrus genotypes using 12 ISSR

کدها بر اساس جدول ۱ می‌باشند. اعداد روی محور افقی و عمودی به‌ترتیب بیانگر شماره و درصد عضویت افراد به هر زیرجمعیت می‌باشند. هر رنگ نشان دهنده یک زیرجمعیت است (قرمز: ژنوم با منشأ نامشخص، سبز: گروه سیترون، آبی: گروه ماندارین، زرد: گروه پوملو).

The codes are described in table 1. Numbers on the y-axis indicate the percentage of membership of individuals in each sub-population and numbers on the x-axis indicate the accessions code. Each color represents a sub-population (red: genome with unknown origin, green: Citron group, blue: Mandarin group, yellow: Pummelo group).

گروه اول دارای ترکیب ژنومی نامشخصی از سایر گونه‌ها یا جنس‌های خویشاوند مرکبات بود که احتمالاً ژنوتیپ شاهدی از آن‌ها در بین ۱۱۰ ژنوتیپ مورد بررسی در این مطالعه وجود نداشت. این ترکیب ژنومی با نسبت مختلف در ریخته

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1399.7.2.4.3]
[DOI: 10.52547/pgr.7.2.2]

ارثی ارقام شاهد گونه‌های مختلفی از جمله نارنج معمولی (G86)، پونسیروس (G103)، سیتروملو (G106)، تامسون ناول (G93)، اکیتسو (G102)، اونشو (G96) و نارنگی خرم (G98) سهم دارد (شکل۳). برخی از ژنوتیپ‌هایی که در یک گروه قرار گرفته‌اند به نسبت‌های مختلف، ساختاری از دیگر گونه‌ها را در ریخته ارثی خود دارند. به‌عنوان مثال ژنوتیپ‌های ناشناخته G16، G35، G43، G44، G52، G37 و G50 با داشتن مقادیر بیشتری از ژنوم ناشناخته، دارای سهم متفاوتی از ساختار ژنتیکی سایر گروه‌ها می‌باشند (شکل۳). اختلاط زیاد مشاهده شده در ژرم‌پلاسم نمونه‌ها این فرض را که تبار ژنوتیپ‌های مذکور از نوع مخلوط می‌باشد اثبات می‌کند.

دو ژنوتیپ پونسیروس (G103) و سیتروملو (G106) که در تجزیه خوشه‌ای در گروهی مستقل واقع شدند، در گروه‌بندی بر مبنای مدل، با توجه به تفاوت ماهیت محاسبات، الگویی مخلوط نشان دادند. این در حالی است که میانگین سهم ژنوم ماندارین در ریخته ارثی آن‌ها به‌ترتیب ۰/۴۲ و ۰/۳۵ و سهم ژنوم با منشأ نامشخص به‌ترتیب ۰/۳۶ و ۰/۳۰ برآورد شد. هرچند پونسیروس به جنس سیتروس (*Citrus spp*) تعلق ندارد ولی همسانی ساختاری و عملکردی بالایی بین این دو جنس گزارش شده است (Novelli *et al.*, 2000) که الگوی گروه‌بندی حاصل از این پژوهش را تأیید می‌نماید. مشابه با نتایج تجزیه خوشه‌ای، یکی شدن گروه ژنوتیپ‌های ناشناخته G22، G24، G53، G25 و G52 با گریپ‌فروت (G90 و G91) و پوملو (G78) فرض وجود زمینه ژنتیکی مشترک بین این ژنوتیپ‌ها و جریان ژنی به‌سوی ژنوتیپ‌های ناشناخته در طی تلاقی‌های طبیعی را تأیید می‌کند. در تجزیه بر اساس مدل، ژنوم ماندارین در ریخته ارثی بسیاری از نمونه‌های مورد مطالعه به نسبت‌های مختلف مشاهده شد (شکل ۳). پیش از این گزارش شد که دو گونه ثانویه پرتقال و نارنج که گونه حقیقی ماندارین در پیدایش آن‌ها نقش داشته، خود به‌عنوان والد مستقیم در شکل‌گیری برخی از هیبریدهای مرکبات سهم دارند (Li *et al.*, 2010). از سویی دیگر، از آنجا که سهم ماندارین در پیدایش لایم‌ها نیز گزارش شده است (Novelli *et al.*, 2000)؛ لذا مشاهده توزیع گسترده ژنوم ماندارین در دیگر ارقام مرکبات دور از انتظار نخواهد بود.

تعیین ارتباط ژنتیکی نارنج با دیگر گونه‌های حقیقی مرکبات همواره بحث‌برانگیز بوده و در مطالعات فیلوژنی یا در گروه ماندارین و یا در گروه پوملو گروه‌بندی شده است (Li *et al.*, 2010; Ollitrault *et al.*, 2010). ارقام نارنج (G86 و G110) که در تجزیه خوشه‌ای در گروه ماندارین قرار گرفته بودند (شکل ۱) در گروه‌بندی بر مبنای مدل، الگویی مخلوط با سهم ژنتیکی از چهار ژنوم متفاوت نشان دادند (شکل ۳). از آنجا که میانگین سهم ریخته ارثی ماندارین به‌عنوان یکی از والدین اصلی نارنج بیشتر از پوملو به‌عنوان والد دیگر محاسبه شد (به‌ترتیب ۰/۴۳ و ۰/۲۱) لذا این برآورد می‌تواند فرض اختصاص نارنج به گروه ماندارین‌ها را تأیید نماید (Novelli *et al.*, 2000). می‌توان این‌گونه برداشت نمود که در تطبیق با نتایج سایر پژوهش‌ها، بسته به نوع آغازگر و تعداد آغازگرهای به‌کار رفته، ممکن است سهم متفاوتی از ریخته ارثی گروه‌های اصلی (گونه‌های حقیقی) در نمونه‌های مورد مطالعه گزارش شود. به‌عنوان مثال با وجود آنکه پژوهش‌های متعددی وجود ژنوم دو گونه حقیقی ماندارین و پوملو در ریخته ارثی پرتقال را تأیید نموده‌اند (Barkley *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2018) ولی در خصوص سهم هر یک از آن‌ها نتایج مختلفی گزارش شده است. در برخی از مطالعات پرتقال محصول تلاقی برگشتی ساده بین ماندارین و پوملو (Xu *et al.*, 2013) و در مطالعاتی دیگر حاصل اینتروگرسیون‌های متوالی پوملو با هیبرید پوملو و ماندارین معرفی شده است (Curk *et al.*, 2015; Velasco and Licciardello, 2014).

مقایسه گروه‌های ژنوتیپی حاصل از دو تجزیه نشان داد که پوملو (*C. maxima*)، ماندارین (*C. reticulate*) و سیترون (*C. medica*) به‌عنوان سه گونه حقیقی مرکبات (گونه‌های اولیه) در گروه‌های مجزا قرار گرفته و مشابه با نتایجی که پیش از این گزارش شده (Omura and Shimada, 2016)، هر

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1399.7.2.4.3]
[DOI: 10.52547/pgr.7.2.2]

یک از آن‌ها با به اشتراک گذاشتن قطعات متفاوت ژنومی در ریخته ارثی سایر گونه‌ها (گونه‌های ثانویه) مانند پرتقال، گریپ‌فروت، نارنج، لمون و لایم، به نسبت‌های مختلف سهم دارند. در تجزیه خوشه‌ای پس از تشکیل ماتریس شباهت، از الگوریتم‌های خاصی برای گروه‌بندی استفاده می‌شود. این درحالی است که در تجزیه مبتنی بر مدل گروه‌هایی از نمونه‌ها با روش بیزی تشکیل می‌گردد. از آنجا که روش بیزی برخلاف تجزیه خوشه‌ای اطلاعات منشأ ژنوتیپ‌ها را هم مدنظر قرار می‌دهد؛ لذا در پژوهش حاضر، استفاده از این روش یک امتیاز برای تجزیه مبتنی بر مدل و تکمیل‌کننده اطلاعات تجزیه خوشه‌ای بشمار می‌آید. به‌طور کلی هرچند روابط ژنتیکی تعیین شده در این مطالعه به نتایج پژوهش‌هایی که در گذشته انجام شده بسیار نزدیک بود (Pang *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2018)، لیکن جهت حصول نتایج دقیق‌تر، استفاده از سایر نشانگرها با قدرت تفکیک بیشتر نظیر SNK و EST-SSR، همچنین ترکیب اطلاعات حاصل از نشانگرهای مختلف پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از حمایت پژوهشکده تحقیقات مرکبات و میوه‌های نیمه‌گرمسیری کشور که زمینه اجرای این پروژه را فراهم نمودند، قدردانی می‌شود.

References

Abouzari, A., Solouki, M., Golein, B., Fakheri, B.A., Sabouri, A. and Dadras, A.R. (2020). Unraveling the cryptic genetic variation and population structure of the citrus genotypes with unknown origin. *Genetika*, **52:** 291-309.

Ahmed, S., Rattanpal, H., Kumari, P. and Singh, J. (2017) Study of genetic variability in *Citrus* fruit crop by molecular markers a review. *Indian Journal of Pure & Applied Biosciences*, **5:** 111-128.

Aziznia, R., Badakhshan, H., Javadi, T. and Zamani, S. (2020). Assessment of diversity in barley genotypes (*Hordeum vulgare* L.) based on beta-glucan content and issr markers. *Plant Genetic Researches*, **6(2):** 97-110 (In Persian).

Awad, M.A., El-Alakmy, H.A., Abdalla, M.M. and ElDeep, M.D. (2019). Distinguishing of zygotic and nucellar seedlings in citrus rootstocks using issr technique. *Sinai Journal of Applied Sciences*, **8:** 1-8.

Barkley, N.A., Roose, M.L., Krueger, R.R. and 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.

Bayer, R.J., Mabberley, D.J., Morton, C., Miller, C.H., Sharma, I.K., Pfeil, B.E., Rich, S., Hitchcock, R. and Sykes, S. (2009). A molecular phylogeny of the orange subfamily (*Rutaceae: Aurantioideae*) using nine cpDNA sequences. *American Journal of Botany*, **96:** 668-685.

Bornet, B. and Branchard, M. (2001). Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter*, **19:** 209-215.

Curk, F., Ancillo, G., Ollitrault, F., Perrier, X., Jacquemoud-Collet, J.P., Garcia-Lor, A., Navarro, L. and 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.

Edwards, K., Johnstone, C. and Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, **19:** 1349.

Evanno, G., Regnaut, S. and Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, **14:** 2611-2620.

Falush, D., Stephens, M. and Pritchard, J.K. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, **164:** 1567-1587.

Fang, D. and Roose, M. (1997). Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics*, **95:** 408-417.

Golein, A., Ghasemi, M., Fattahi Moghadam, J. and Gholamian, E. (2014). Genetic analysis between unknown Citrus accessions and commercially important cultivars using ISSR marker. *Agricultural Biotechnology Journal*, **5(4):** 111-124 (In Persian).

Khiavi, S.J., Hamidoghli, Y., Golein, B. and Sabouri, A. (2015) Evaluation of genetic diversity in acid lime (*Citrus aurantifolia* swingle) genotypes using AFLP markers. *Australian Journal of Crop Science*, **9:** 996-1002.

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-24]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1399.7.2.4.3]
[DOI: 10.52547/pgr.7.2.2]

Kijas, J., Thomas, M., Fowler, J. and Roose, M. (1997). Integration of trinucleotide microsatellites into a linkage map of Citrus. *Theoretical and Applied Genetics*, **94:** 701-706.

Krueger, R.R. and Navarro, L. (2007). Citrus Gerplasm Resources. In: Khan, I.A., Ed., *Citrus Genetics, Breeding and Biotechnology*. pp. 45-140. CABI, London, UK.

Li, X., Xie, R., Lu, Z. and 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.

Luro, F., Laigret, F., Bové, J.M. and Ollitrault, P. (1995). DNA amplified fingerprinting, a useful tool for determination of genetic origin and diversity analysis in Citrus. *HortScience*, **30:** 1063-1067.

Mabberley, D. (2004). Citrus (Rutaceae): a review of recent advances in etymology, systematics and medical applications. *Blumea-Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants*, **49:** 481-498.

Moore, G.A. (2001). Oranges and lemons: clues to the taxonomy of Citrus from molecular markers. *Trends in Genetics*, **17:** 536-540.

Mirmohammadi Maibody, S.A.M. and Golkar, P. (2019). Application of DNA molecular markers in plant breeding. *Plant Genetic Researches*, **6(1):** 1-30 (In Persian).

Munankarmi, N.N., Rana, N., Bhattarai, T., Shrestha, R.L., Joshi, B.K., Baral, B. and Shrestha, S. (2018). Characterization of the genetic diversity of acid lime (*Citrus aurantifolia* (christm.) swingle) cultivars of eastern Nepal using inter-simple sequence repeat markers. *Plants*, **7(2):** 46-60.

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

Novelli, V.M., Machado, M.A. and Lopes, C.R. (2000). Isoenzymatic polymorphism in *Citrus* spp. and *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.(Rutaceae). *Genetics and Molecular Biology*, **23:** 163-168.

Ollitrault, F., Terol, J., Pina, J.A., Navarro, L., Talon, M. and Ollitrault, P. (2010). Development of SSR markers from *Citrus clementina* (Rutaceae) BAC end sequences and interspecific transferability in Citrus. *American Journal of Botany*, **97:** e124-e129.

Omura, M. and Shimada, T. (2016). Citrus breeding, genetics and genomics in Japan. *Breeding Science*, **66:** 3-17.

Pang, X.M., Hu, C.G. and Deng, X.X. (2007). Phylogenetic relationships within Citrus and its related genera as inferred from AFLP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **54:** 429-436.

Pritchard, J.K., Stephens, M. and Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155:** 945-959.

Shahsavar, A.R., Ezadpanah, K.A., Tafazoli, A.A. and Seyed Tababaie, B.A. (2004). Evaluation of genetic variability of limes and lemons in the Fars province by morphological traits and inter-simple sequence repeat (ISSR). *Journal of Horticultural Science and Technology*, **5(4):** 177-188 (In Persian).

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

Velasco, R. and Licciardello, C. (2014). A genealogy of the citrus family. *Nature Biotechnology*, **32:** 640-642.

Wu, G.A., Terol, J., Ibanez, V., López-García, A., Pérez-Román, E., Borredá, C., Domingo, C., Tadeo, F.R., Carbonell-Caballero, J. and Alonso, R. (2018). Genomics of the origin and evolution of Citrus. *Nature*, **554:** 311-316.

Xu, Q., Chen, L.L., Ruan, X., Chen, D., Zhu, A., Chen, C., Bertrand, D., Jiao, W.B., Hao, B.H. and Lyon, M.P. (2013). The draft genome of sweet orange (*Citrus sinensis*). *Nature Genetics*, **45:** 59-66.

Zhang, Y., Yan, H., Jiang, X., Wang, X., Huang, L., Xu, B., Zhang, X. and Zhang, L. (2016). Genetic variation, population structure and linkage disequilibrium in Switchgrass with ISSR, SCoT and EST-SSR markers. *Hereditas*, **153:** 4-16.

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1399.7.2.4.3]

[DOI: 10.52547/pgr.7.2.2]

Investigation of Genetic Diversity and Structure Analysis of Different Citrus Genotypes Using ISSR Markers

Abouzar Abouzari[1,*], Ahmad Reza Dadras[2], Behrouz Golein[3] and Yahya Tajvar[4]

1- Assistant Professor, Crop and Horticultural Science Research Department, Mazandaran Agricultural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Sari, Iran
2- Assistant Professor, Olive Research Station of Tarom, Crop and Horticultural Science Research Department, Zanjan Agricultural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Zanjan, Iran
3- Associate Professor, Ramsar Citrus and Subtropical Fruits Research Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ramsar, Iran
4- Assistant Professor, Ramsar Citrus and Subtropical Fruits Research Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ramsar, Iran

(Received: September 12, 2020 – Accepted: March 15, 2021)

Abstract

In breeding programs, it is necessary having knowledge of the relatedness and genetic diversity in germplasm pools. The spread of cultivated regions and the high levels of production indicates citrus importance in the global economy. Therefore, 110 citrus genotypes were evaluated using 12 ISSR markers. Overall, 154 polymorphic bands were scored with an average of 12.8 alleles per primer. The polymorphism percentage ranged from 57 for the ISSR1 to 82 for the ISSR9. Averages of polymorphic information content (PIC), marker index (MI), gene diversity index (Nei), Shannon index (I) and number of effective alleles (Ne) were 0.48 ± 0.002, 6.14 ± 1.17, 0.42 ± 0.11, 0.61 ± 0.12 and 1.78 ± 0.27, respectively. Based on genetic diversity statistics, the studied population had high genetic diversity, and four markers (ISSR11, ISSR9, ISSR4, and ISSR5) had more potential for differentiation of genotypes. Cluster analysis and model-based structure analysis, divided the genotypes into five groups and four subpopulations based on the Neighbor-Joining method (NJ) and Bayesian approach, respectively. Based on both analyses, grouping of unknown genotypes and control cultivars in the same group probably confirms the assumption of a common genetic background between these genotypes. Results from the two analyses showed that Pummelo (*C. maxima*), Mandarin (*C. reticulate*), and Citron (*C. medica*), as three true citrus species, separated in different groups. In addition to the three true species, at least one species or another genus of citrus relatives is involved in the genetic makeup of the studied population. In this study, although both used analyses were effective in completing each other's information, by considering the degree of genetic mixing and the information of the origin of the genotypes, the effectiveness of model-based structure analysis in evaluating genetic relationships could be achieved.

Keywords: ISSR markers, Population structure analysis, Citrus, Phylogenetic relationships

* **Corresponding Author, E-mail: a.abouzari@areeo.ac.ir**

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-04-24]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1399.7.2.4.3]

[DOI: 10.52547/pgr.7.2.2]