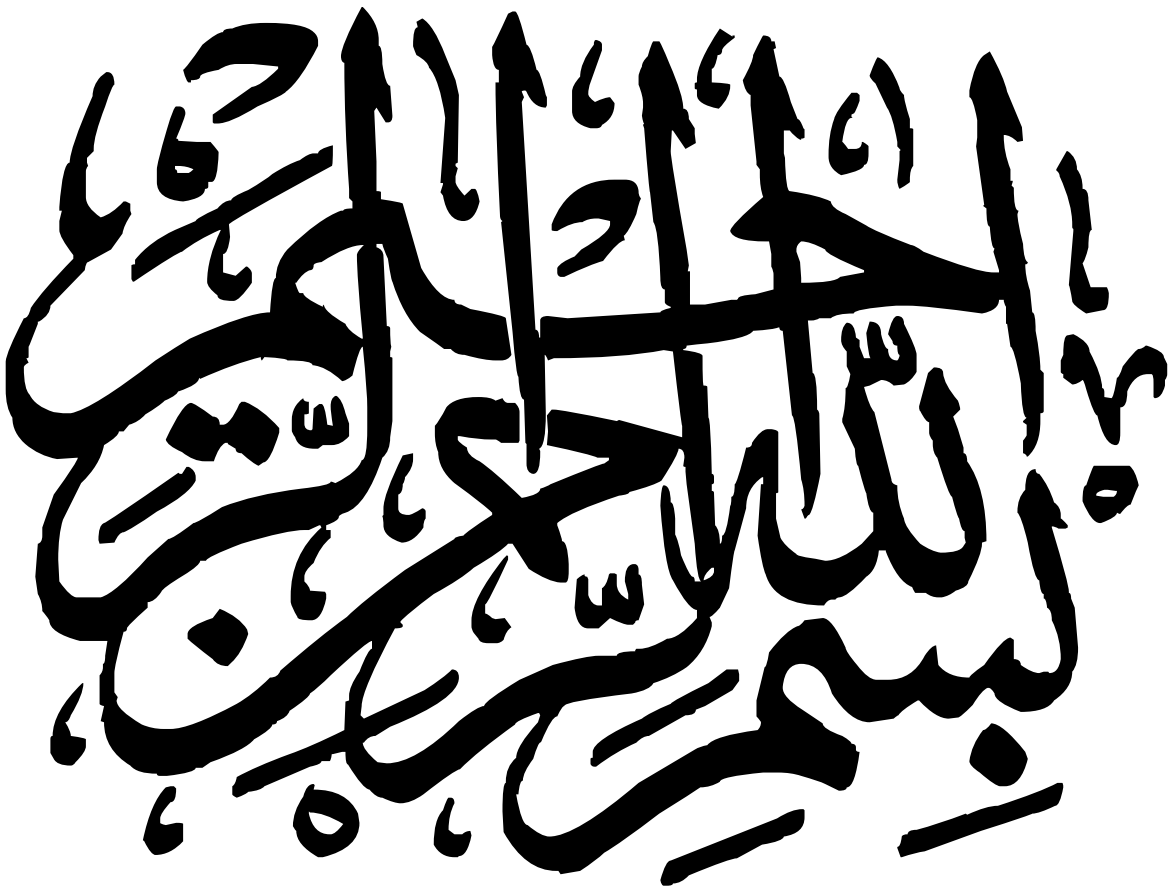
بسم الله الرحمن الرحيم

مدیریت تحصیلات تکمیلی

دانشکده کشاورزی

گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته اصلاح نباتات:

مطالعه تنوع ژنتیکی دربرخی ارقام پرتقال جیرفت با استفاده از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر رتروترانسپوزون

اساتید راهنما:

دکتربراتعلی فاخری

دکتر حسین کمال الدینی

اساتید مشاور:

دکتر لیلا فهمیده

دکتر محمود سلوکی

نگارش:

سکینه شهدادنژاد

تقدیم به پدر و مادرم عزیزم

تقدیم به کوه صبر و استقامت

پدر زحمتکش و مهربانم که در تمامی لحظات زندگی و تحصیل راهنما و مشوق من بوده و تمامی موفقیت هایی که تا به اکنون کسب کرده ام مدیون زحمات بی شائبه ایشان است.

تقدیم به **مادر** مهربانم

آن عاشق بی ریا که با مهر و لطف، پرستار وجودم گشت

بر نگاهم لبخند زد صحنه خالی روحم را با مهر و عشق آشنا نمود

مادر صبورم که شبی آسوده خاطر از فردای فرزندانش نخفت

تقدیم به این دو عزیز که بودنشان تاج افتخاری است بر سرم و نامشان دلیلی است بر بودنم

چرا که این دو وجود، پس از پروردگار، مایه هستی ام می باشند.

تقدیم به **برادران و خواهران بزرگوارم** به خاطر فداکاری ها، صبر و شکیبایی بی دریغ شان، عزیزانی که همیشه دلسوز و همراهم بودند.

تقدیم به **همسر مهربان و عزیزم** او که وجودش همواره شادی بخش زندگیم است، عزیزی که سایه مهربانیش سایه سار زندگیم می باشد، مهربانی که با صبرش در تمامی لحظات رفیق راه بود و مشکلات مسیر را برایم تسهیل نمود. همدلی که با واژه نجیب و مغرور تلاش آشنایی دارد و تلاش را تنها راستین را می شناسد و عطر رویایی آن را استشمام می کند و مرا در راه رسیدن به اهداف عالی یاری می سازد.

و تقدیم به کسانی که دوستشان دارم و یار و یاور من در این پایان نامه بودند.

تشکر و قدردانی

سپاس بی‌نهایت خدای را که دریای بی‌منتهای بخشش است و بال فضل، بر کائنات گشوده و سایه لطف بر بندگان گسترده و با منت خود، مرا به زینت ایمان آراسته و در خیمه لطف منزل داده است. چگونه شکر او را گویم که منت را بر من تمام کرده و از سر رحمت خود، مرا در زمره جویندگان علم و دانش قرار داده است. من چگونه نوای لک الحمد سر دهم که این نوای ارادت، خود از بیشمار نعمت‌های اوست و محتاج لک الحمدی دیگر. تمام مباهات من در طول تحصیل، نه دست یازیدن به درجه‌ای از دانش، بلکه فراسوی آن تلمذ در نزد استادانی بوده است که خود دریایی از معرفت بودند و سهم من پرتوی از تشعشع معرفت ایشان بر اندیشه بوده است. در این رهگذر، به رسم ادب خود را ملزم می‌دانم که با تواضع تام و از صمیم قلب تشکر و سپاس خالصانه خود را از استاد گرانقدرم آقای **دکتر مسیح فروتن** عرضه دارم،. همچنین از استاد راهنمایم جناب آقای **دکتر براتعلی فاخری** بسیار سپاسگذارم که بزرگترین حامی و پشتیبان من در سرانجام رساندن این پروژه بودند که بدون همراهی ایشان بیگاه این تحقیق به سرانجام نمی رسید و از استاد راهنمای دوم **آقای دکتر حسین کمال الدینی** و از اساتید مشاورم **سرکار خانم دکتر لیلا فهمیده** و **دکتر محمود سلوکی** طی انجام این پژوهش یاری ام دادند تشکرم. در آخر از دوستان عزیزم سرکار خانم **فاطمه خسروی**، **سمیه خون رز**، **سکینه حسینی اقبال** و تمامی دوستانی که طی این مدت با شکیبایی تام از ابراز محبت و همکاری دریغ ننموده اند و به عناوین مختلف یار و یاورم بودند سپاسگزارم. این پروژه در **پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه زابل** انجام گرفته و مجریان این تحقیق مراتب سپاسگزاری خود را **از** مسئولین پژوهشکده جناب آقای **دکتر صباغ و سرکار خانم خواجه** ابراز می دارند.

چکیده

مطالعه تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های گیاهی، پایه و اساس تحقیقات و برنامه‌های اصلاحی می‌باشد. پرتقال یکی از میوه‌های مهم دنیاست که در مناطقی با آب و هوای گرمسیری یا نیمه گرمسیری رشد می‌نماید. در ایران نیز بعضی از گونه‌های مرکبات به صورت سنتی کشت می‌شدند و در دهه‌های اخیر کشت آن‌ها افزایش یافته است تا آنجا که ایران را جز هشت کشور بزرگ تولید کننده این محصول قرار داده است. شهرستان جیرفت با دارا بودن آب و هوای گرمسیری و دارا بودن ۳۶۰۰۰ هکتار سطح زیرکشت مرکبات و تولید ۲۰ تا ۲۵ تن محصول در هکتار سومین رتبه کشوری را دارا می‌باشد. استفاده از نشانگرهای مولکولی برای شناسایی شباهت ژنتیکی و مطالعات ژنتیک جمعیت به عنوان یک ابزار مهم مطرح است و از این میان رتروترانسپوزون‌ها از نشانگرهای مهم محسوب می‌شوند. هدف این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی پرتقال‌های موجود در کلکسیون مرکبات جیرفت بوسیله مارکر-های مبتنی بر رتروترانسپوزون بود. استخراج DNA به روش Doyle and Doyle انجام شد. ۱۹ رقم پرتقال مورد مطالعه شامل ۲ رقم داخلی و ۱۷ رقم وارداتی بودند که ارقام وارداتی جزو مهم‌ترین ارقام تجاری کشور می‌باشند و رقم محلی جیرفت از مناسب‌ترین ارقام پرمحصول منطقه می‌باشد. ارقام مورد نظر با ۴ جفت آغازگر رتروترانسپوزونی آنالیز شده و محصولات PCR بر روی ژل آگارز بارگذاری شد. حضور و یا عدم حضور باند بصورت یک و صفر امتیازدهی شد. از تست مانتل به منظور تعیین میزان همبستگی بین ماتریس تشابه و کوفنتیک استفاده شد و ضریب کوفنتیک r=0.9 بدست آمد. تجزیه خوشه‌ای داده‌ها بر مبنای روش UPGMA و ضریب تشابه دایس انجام گرفت که ارقام به چهار گروه اصلی تفکیک شدند. در تجزیه به مولفه‌های اصلی نیز ۸ مولفه اول در مجموع ۸۸ درصد از کل تغییرات را توجیه کردند. سهم مولفه اول در میزان تنوع مشاهده شده ۳۱ درصد، مولفه دوم ۱۳ درصد و مولفه سوم ۱۲ درصد از کل تغییرات را توجیه کرد.

واژه‌های کلیدی: پرتقال، تنوع ژنتیکی، رتروترانسپوزون،IRAP

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

مقدمه ۲

فصل دوم: کلیات و مروری بر منابع

۱-۱ مقدمه ۲
۱-۲گیاهشناسی پرتقال ۸
۲-۲ اهداف اصلاحی مرکبات ۹
۲-۳ تاریخچه اصلاح مرکبات ۱۰
۲-۴ ذخایر ژنتیکی مرکبات ۱۱
۲-۵ سیتوژنتیک مرکبات ۱۱
۲-۶ تنوع ژنتیکی ۱۲
۲-۶-۱ روش‌های ارزیابی تنوع ژنتیکی ۱۴
۲-۶-۲ فرسایش ژنتیکی ۱۴
۲-۷ اصلاح با کمک نشانگرها ۱۵
۲-۸ نشانگرهای ژنتیکی ۱۵
۲-۸-۱ نشانگرهای مولکولی ۱۶
۲-۸-۲ نشانگرهای مورفولوژیکی ۱۷
۲-۹ خصوصیات مناسب یک نشانگر مولکولی ۱۸
۲-۱۰ عناصر جابجا شونده ۱۹
۲-۱۱ رتروترانسپوزون‌ها ۱۹
۲-۱۲چگونگی همانندسازی رتروتراسپوزون ها ۲۱
۲-۱۳ مزایا و معایب رتروترانسپوزون ۲۳
۲-۱۴ مروری بر تحقیقات انجام شده با استفاده از مارکرهای مولکولی مبتنی بر رتروترانسپوزون ۲۴
۲-۱۵ مروری بر تحقیقات انجام شده بر روی بر روی مرکبات ۲۴

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل سوم: مواد و روش ها

۳-مواد گیاهی ۲۷
۳-۱ نمونه برداری ۲۷
۳-۲ بررسی مولکولی ۲۸
۳-۲-۱ استخراج DNA ۲۸
۳-۳ تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراجی ۳۰
۳-۳-۱ بررسی کیفیت DNA استخراجی با استفاده ار ژل آگارز یک درصد ۳۰
۳-۳-۲ ارزیابی کمیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ۳۲
۳-۳-۳ یکسان سازی غلظت DNA ۳۲
۳-۳-۴رقیق کردن آغازگرها ۳۳
۳-۴ انجام واکنش PCR ۳۳
۳-۴-۱طرز تهیه ژل آگارز یک درصد ۳۵
۳-۴-۲طرز تهیه اتیدیوم بروماید ۳۶
۳-۵ تجزیه و تحلیل داده ها و نرم افزارهای مورد استفاده در تجزیه آماری ۳۶
۳-۵-۱ ضریب کوفنتیک ۳۷
۳-۵-۲ تجزیه خوشه ای ۳۷
۳-۵-۳ تجزیه به مولفه های اصلی ۳۷

فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱نتایج استخراج DNA ژنومی ۳۹
۴-۲ نتایج حاصل از PCR ۴۰
۴-۳ تجزیه و تحلیل آماری ۴۲
۴-۳-۱ تجزیه خوشه ای ۴۳
۴-۳-۲تجزیه به مولفه های اصلی ۴۶
۴-۳-۳ضریب همبستگی کوفنتیک ۴۹
۴-۳-۴ بررسی تنوع ژنی ۵۰
نتیجه گیری کلی ۵۱
پیشنهادات ۵۳
منابع ۵۵
پیوست ۶۲

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول (۱-۳) مواد گیاهی ۲۷
جدول (۲-۳) Loading ۳۱
جدول(۳-۳) بافر TAE(1X) برای ۱۰۰۰ میلی لیتر ۳۱
جدول(۴-۳) آغازگرهای مورد استفاده در تحقیق ۳۴
جدول (۵-۳) انواع مواد و مقادیر مورد نیاز آنها در PCR ۳۴
جدول (۶-۳) برنامه حرارتی PCR ۳۵
جدول(۱-۴) تجزیه به مولفه‌های اصلی ۴۷

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۱- ۲مراحل مختلف همانندسازی رتروترانسپوزون‌ها ۲۳
شکل ۱-۴ ژل الکتروفورز استخراج DNA تعدادی از ژنوتیپ‌های پرتقال ۳۹
شکل ۲-۴ نتایج PCRژنوتیپ‌های پرتقال مورد مطالعه با استفاده از پرایمر IRAP-5 ..... ۴۰
شکل ۳-۴ نتایج PCRژنوتیپ‌های پرتقال مورد مطالعه با استفاده از پرایمر RTd2 ..... ۴۱
شکل ۴-۴ نتایج PCRژنوتیپ‌های پرتقال مورد مطالعه با استفاده از پرایمر LTRr ۴۱
شکل ۵-۴ دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر مبنای روش UPGMA بر اساس ضریب تشابه دایس ۴۵
شکل ۶-۴ نمایش ارقام مورد مطالعه بر اساس تجزیه به مولفه‌های اصلی ۴۵
شکل۷-۴ نمایش سه بعدی ارقام مورد مطالعه بر اساس تجزیه به مولفه‌های اصلی ۴۸
شکل ۸-۴ نمایش دو بعدی ارقام مورد مطالعه بر اساس تجزیه به مولفه‌های اصلی ۴۹

فصل اول:

مقدمه

۱-۱ مقدمه

کلیه میوه‌هایی که مرکبات نامیده می‌شوند گیاهان درختی، درختچه ای از خانواده روتاسه[1] و زیر خانواده آورانتوییده[2] هستند. این زیر خانواده بیش از ۳۳ جنس مختلف دارد که تنها ۳ جنس آن پونسیروس[3]، فورچونلا[4] و سیتروس[5] جنبه اقتصادی دارند و در کشورهای تولید کننده مرکبات از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند (Soost and. Roose, 1996). دیپلوئیدی (۲n=۲x=۱۸) قاعده کلی در جنس سیتروس و جنس‌های وابسته به آن بوده و این ویژگی ژنتیکی طبیعی، تجزیه ژنتیکی را آسان‌تر می‌کند. کشت وسیع مرکبات، خاصیت آلوگامی، ازدیاد بذری، هم باروری بین گونه‌ها، دورگ گیری های جنسی و جهش‌های فراوان باعث ایجاد تنوع زیادی در میان ارقام مرکبات گردیده است (Scarno *et al*.,2003). شناسایی، حفظ و آگاهی از تنوع ژنتیکی ذخایر توارثی مرکبات زیربنای هرگونه تحقیق کاربردی را فراهم می‌نماید. برای این منظور، تعیین تنوع درون گونه ای، اولین گام در قابل استفاده کردن منابع ژرم پلاسم می‌باشد. مرکبات یکی از مهم‌ترین میوه‌های نیمه گرمسیری است که گونه‌های متعددی از آن در کشورهای مختلف دنیا مورد کشت قرار می‌گیرند (Davis and Albrigo, 1994). روابط خویشاوندی پیچیده ای بین این گونه‌ها وجود دارد که اساسا به دلیل دگرگرده افشانی مکرر و سازگاری بین گونه‌های مختلف جنس سیتروس و نیز دگرگرده افشانی با سایر جنس‌های این خانواده، ایجاد جهش‌های جوانه‌ای و سابقه طولانی کشت و کار مرکبات و پراکنش گسترده آن در دنیا می‌باشد. در بین ژنوتیپ‌های جنس سیتروس و جنس‌های نزدیک به آن تنوع زیادی از لحاظ صفات مختلف دیده می‌شود که می‌تواند مورد

[1] -Rotaceae
[2] -Aurantioideae
[3] -Poncirus
[4] -Fortchunella
[5] -Citrus

استفاده اصلاح گران قرار گرفته و زمینه مساعدی را برای انتخاب گسترده‌تر از بین افراد دارای صفات مختلف فراهم می‌نماید. مشکلات و معضلاتی نیز بر سر راه استفاده و بهره‌گیری کامل از این گوناگونی ژنتیکی در اصلاح مرکبات وجود دارد. اصلاح کنندگان سنتی گیاهان، ارقام را بر اساس نشانگرهای مورفولوژیکی انتخاب و اصلاح کرده‌اند، اما متاسفانه خصوصیات عمومی نشانگرهای مورفولوژیکی چندان ایده‌آل نیست. در سال‌های اخیر زیست شناسی مولکولی، ابزارهای مناسبی را جهت تجزیه‌های جامع‌تر فراهم آورده است (گلعین، ۱۳۸۴). امروزه روابط خویشاوندی مرکبات به کمک علوم جدید و مخصوصاً مطالعات ژنتیکی به نحو مطلوبی در حال انجام است.

یکی از پایه‌های اساسی اصلاح نباتات، دسترسی و آگاهی از میزان تنوع در مجموعه‌های ژنتیکی و مراحل مختلف پروژه‌های اصلاحی است. تخمین ترکیب ژنتیکی مرکبات و قرابت بین آن ها از گذشته دور معمول بوده است (Barceli *et al*., 2006). مشخص شدن رده بندی، روابط فیلوژنتیک و تنوع ژنتیکی در مرکبات جهت تعیین روابط ژنتیکی، شناسایی ژرم پلاسم، کنترل فرسایش ژنتیکی، ایجاد برنامه‌های اصلاحی و ثبت ارقام جدید، امری مهم و حیاتی می‌باشد (Herrero, 1996). یکی از پیامدهای اجتناب ناپذیر کشاورزی مدرن که مبتنی بر استفاده از واریته‌های اصلاح شده با حداکثر عملکرد و کیفیت قابل قبول می‌باشد، کاهش تنوع ذخایر ژنتیکی است. بنابراین امروزه آگاهی از تنوع ژنتیکی و مدیریت منابع ژنتیکی به‌عنوان اجزای مهم اصلاح نباتات تلقی می‌شود. در گذشته، مطالعات روابط فیلوژنتیک میان جنس‌ها و گونه‌های مرکبات تنها بر اساس خصوصیات مورفولوژیک انجام می‌گرفت (Nicolaci *et al*., 2000). اما استفاده از خصوصیات مورفولوژیک به‌تنهایی، جهت تعیین و شناسایی روابط میان ارقام مرکبات کار دشواری است و علاوه بر آن، این صفات تحت تاثیر محیط قرار می‌گیرند (Bang *et al*., 1998). بنابر این استفاده از نشانگرهای مولکولی به طور گسترده‌ای در مطالعه روابط فیلوژنتیک و تنوع ژنتیکی در گیاهان مختلف استفاده گردید. در ایران ژنوتیپ‌های بسیار زیادی از مرکبات در طی دهه‌های

گذشته با تلاش پژوهشگران مرکبات کشور جمع آوری و در کلکسیون‌های شمال و جنوب کشور نگهداری می‌شوند. ارزیابی انجام شده در این کلکسیون‌ها عمدتا" معطوف به جنبه‌های باغبانی بوده و مطالعات ژنتیکی چندانی بین این ژنوتیپ ها انجام نشده و اطلاعات دقیقی از تنوع ژنتیکی، روابط ژنتیکی و خویشاوندی بین این ژنوتیپ‌ها وجود ندارد. با توجه به اینکه شناخت و حفظ تنوع ژنتیکی به منظور به‌نژادی مرکبات برای بالا بردن سطح تولید اقتصادی حائز اهمیت است. امروزه به کارگیری نشانگرهای DNA (که تفاوت افراد را در سطح ماده ژنتیکی نشان داده و تحت تاثیر عوامل محیطی قرار نمی‌گیرند) به همراه داده‌های مورفولوژیک، امکان شناسایی دقیق ارقام و متمایز کردن ارقام بسیار نزدیک به هم را میسر کرده است. یک اصلاح‌گر در صورتی شانس موفقیت در برنامه‌های اصلاحی را دارد که امکان انتخاب مواد مناسب را داشته باشد و این مواد نیز دارای تنوع کافی باشند (صالحی، ۱۳۷۸). تنوع مبنای همه گزینش‌ها در اصلاح نباتات است. انتخاب بر مبنای ژنوتیپ نیازمند تنوع است، با افزایش تنوع ژنتیکی در یک جامعه، دامنه انتخاب وسیع‌تر می‌شود (عبدمیشانی و شاه نجات بوشهری، ۱۳۷۷). تنوع فنوتیپی موجود در ژنوتیپ‌های مختلف تحت تاثیر دو عامل ژنتیک و محیط قرار داشته و بدیهی است آن دسته از تنوع‌هایی که منشا ژنتیکی داشته باشنداز نظر اصلاح نباتات حائز اهمیت بیشتری بوده و در صورت بهره گیری از آن‌ها امکان انتخاب ژنوتیپ‌های مورد نظر برای اهداف خاص اصلاحی فراهم می‌گردد و از این طریق به‌نژادگر می‌تواند از خزانه ژنی یا ژرم پلاسم قابل دسترس حداکثر استفاده بنماید (رحیمیان و بنایان، ۱۳۷۵؛فرشادمهر، ۱۳۷۶؛ رمضانی مقدم و همکاران، ۱۳۸۵). با بالا رفتن تنوع ژنتیکی در یک جامعه، حدود انتخاب هم، در طبیعت و هم بطور مصنوعی وسیع می‌شود (عبدمیشانی و شاه نجات بوشهری، ۱۳۷۷). با توجه به رابطه مثبت بین میزان تنوع ژنتیکی و مقدار وقوع تغییرات تکاملی در آن رابطه مشابهی نیز بین کارایی بهبود ژنتیکی اصلاح یک جامعه و تنوع ژنتیکی برای صفات مورد نظر موجود است. تمایل به حذف تنوع ژنتیکی در توده‌های بومی اولیه، واریته‌های

سازگار به نیازهای غیر قابل پیش بینی آینده را به خطر می‌اندازد. بنابراین حفظ و نگهداری ذخایر توارثی ضروری می‌باشد. بطور کلی یکی از اولین قدم‌ها در یک برنامه به‌نژادی موفق، تشخیص صحیح ژنوتیپ‌های مطلوب است، که برای صحیح عمل نمودن در این راستا باید به نکاتی توجه کرد. اثرات متقابل ژنوتیپ و محیط، اتخاذ روش صحیح گزینش و استفاده از نشانگرهای مولکولی مناسب برای تشخیص ژنوتیپ‌ها توصیه می‌گردد (فارسی و همکاران، ۱۳۸۳). در حالیکه سرانه تولید میوه و مرکبات در دنیا ۸۵ کیلوگرم است، این رقم در ایران به ۲۰۰ کیلوگرم رسیده و قابلیت باغبانی ایران در دنیا بی نظیر است. با توجه به اینکه سطح کشت مرکبات در دنیا بر اساس آمار فائو ۷/۶ میلیون هکتار است، از این رقم، ۲۹۰هزار هکتار باغ مرکبات در ایران وجود دارد و رتبه جهانی ایران در تولید مرکبات، هشتم است (فتوحی قزوینی و فتاحی مقدم، ۱۳۸۵). بنابراین با توجه به استعداد کشور ما از دیدگاه پرورش و تولید ارقام مرکبات و وجود دشت‌های وسیع برای توسعه این محصول اقتصادی ارزشمند، مطالعه و تحقیق جهت تعیین میزان تنوع ژنتیکی ارقام مختلف مرکبات ایران و استفاده از این پتانسیل جهت پیش‌برد اهداف مطلوب اصلاحی لازم و ضروری به نظر می‌رسد. تولید مرکبات در جهان از اهمیت بسزایی برخوردار است و یکی از منابع بسیار مهم تولید ثروت، مبادلات تجاری و اشتغال به کار ساکنین حدود ۱۲۵ کشور مرکبات خیز جهان شده است. مرکبات امروزه در جهان جنبه صنعتی بسیار مهمی را حائز گردیده و منبع بسیار پردرآمدی برای کشورهای تولید کننده آن می‌باشد. درخت پرتقال به احتمال زیاد در قرن ۱۶ میلادی توسط پرتغالی‌ها از اروپا به ایران آورده شده است و به‌همین دلیل آن را پرتقال نامیده‌اند. کشت اقتصادی مرکبات در ایران از ۳۰۰ سال پیش از شمال کشور آغاز شده و به جنوب کشور رفته است. از تمام قسمت‌های مرکبات شامل گل، پوست میوه و درون میوه استفاده می‌شود. از گل مرکبات عطر و مربا (بهار نارنج) تهیه می‌شود. از پوست پرتقال هم مربا تهیه می‌شود و هم از آن اسانس به دست می‌آید. از پوست هر تن مرکبات ۴ تا ۵ لیتر اسانس به دست می‌آید (بسته به نوع

میوه مقدار آن فرق می‌کند). از بذر مرکبات روغن صنعتی استخراج می‌شود که در صنایع هواپیمایی از آن استفاده می‌شود. میوه مرکبات به صورت تازه مصرف می‌شود، آب میوه، کنسانتره و نکتار نیز از آن تهیه می‌شود.

هدف از این مطالعه، بررسی تنوع ژنتیکی میان ارقام پرتقال موجود در کلکسیون مرکبات جیرفت با استفاده از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر رتروترانسپوزون می‌باشد که به این منظور ۱۹ رقم از پرتقال‌های جیرفت با استفاده از ۴ جفت مارکر رتروترانسپوزونی مورد بررسی قرار گرفت.

فصل دوم:
کلیات و مروری
بر مطالعات

۲-۱ گیاهشناسی پرتقال

پرتقال یا مالته میوه‌ای با نام علمی *Citrus sinensis* از خانواده مرکبات، رده دو لپه‌ای‌ها می‌باشد. درخت آن همیشه سبز است و ارتفاع آن تا ۱۰ متر هم می‌رسد. ریشه پرتقال از جنوب شرقی آسیا (چین و هند) می‌باشد و یک میوه پیوندی است که در دوران باستان احتمالاً با پیوند نارنگی و پومیلو پرورش داده شد. نوع ایرانی *Persian Orange* که ایتالیایی‌ها از قرن ۱۱ میلادی کشت آن را در جنوب اروپا رایج کردند تلخ بود و جای خود را از قرن ۱۵ میلادی به نوع شیرین‌تر داد که تاجران کشور پرتغال از هندوستان وارد و کشت کردند. برای همین هم در بسیاری از زبان-های دنیا (یونانی، ترکی، ایرانی، عربی، بلغاری، گرجی و زبان جنوب ایتالیا) امروزه هنوز لغت میوه پرتقال با کشور پرتغال تشابه اسمی دارد (فتوحی قزوینی و فتاحی مقدم، ۱۳۸۵). پرتقال یکی از قدیمی‌ترین میوه‌هایی است که بشر از آن استفاده می‌کرده است و در حدود ۵۰۰ سال قبل از میلاد مسیح، کنفوسیوس از آن نام برده است . در حال حاضر بیشتر از ۲۰۰ نوع پرتقال در آمریکا کشت می‌شود. پرتقال اولیه، کوچک، تلخ و پر از هسته بوده است که در اثر مهندسی ژنتیک و همچنین انتخاب نوع بهتر و کود کافی درشت تر و شیرین‌تر شده است. پرتقال ابتدا از چین به هندوستان برده شده و سپس آنجا به نقاط دیگر دنیا راه یافت (سید اکبر ساداتی، ۱۳۹۱). معروف-ترین گونه اصلاح شده پرتقال در دنیا تامسون ناول می‌باشد. بیروت، پایتخت لبنان نیز یکی از معروف‌ترین مکان‌های پرورش آن درجهان می‌باشد که پرتقال بیروتی آن نیز معروف است. طبق آمار جهانی بر مبنای آمار سایت فائو در سال ۲۰۰۸ سطح زیرکشت مرکبات در ایران ۲۴۸۵۸۱ هکتار و میزان تولید مرکبات ۴۲۹۹۲۴۷ تن در هکتار و متوسط عملکرد مرکبات ۱۷۲۹۵ کیلوگرم در هکتار می باشد. از سال ۱۳۰۹ تاکنون بالغ بر۱۵۰ رقم پرتقال، نارنگی، لیمو شیرین، گریپ فروت، بادرنگ، لیموترش و دورگه‌های آن‌ها به کشور وارد شده که پس ازانجام آزمایش‌های مقدماتی و مقایسه ارقام در ایستگاه‌های پژوهشی، رقم‌های مناسب برای نقاط گوناگون انتخاب و

معرفی می‌شوند. رقم‌های انتخاب شده در سه منطقه مرکبات کاری کشور شامل نوار ساحلی دریای خزر (گیلان ، مازندران وگلستان)، نواحی مرکزی (فارس، کرمان، کرمانشاه، ایلام، کهکیلویه و بویراحمد و یزد) و سواحل خلیج فارس و دریای عمان (خوزستان، بوشهر، هرمزگان و سیستان و بلوچستان) کاشته شده است و انجام آزمایش‌های مقدماتی و مقایسه ارقام درحال حاضر بر روی تعدادی از ارقام که از سال ۱۳۷۹ به بعد وارد گردیده ادامه دارد. پرتقال سرشار از ویتامین ث است. پرتقال درخت کوچکی است دارای برگ‌های سبز و گل‌های سفید، پوست پرتقال نارنجی رنگ، کمی ناصاف و میوه آن بسته به انواع مختلف شیرین و ترش، زرد رنگ و یا قرمز می‌باشد. پرتقال یکی از غنی‌ترین منابع ویتامین C می‌باشد. البته باید دقت کرد که ویتامین C در اثر سرما و گرمای زیاد از بین می‌رود . اسانسی که از گل‌های پرتقال گرفته می‌شود بنام روغن نرولی معروف است که دارای بویی بسیار مطبوع بوده و خیلی گران است و در عطر سازی از آن استفاده می‌شود.

۲-۲ اهداف اصلاحی مرکبات

متاسفانه اصلاح مرکبات وقت‌گیر است، زیرا اغلب گونه‌ها و ژنوتیپ‌های مرکبات، هتروزیگوت هستند بنابراین هیبریدهای نسل اول تمایل به تغییرپذیری دارند. از طرف دیگر وجود پدیده چندجنینی و عدم وجود نشانگرهای مورفولوژیکی، در اغلب موارد شناسایی جنین‌های زایشی از رویشی را مشکل ساخته است اما استفاده از نشانگرهای مولکولی، این مشکل را برطرف کرده است. به‌علاوه دوره نونهالی طولانی در نهال‌های بذری مرکبات (۵ تا ۱۵ سال) اصلاح مرکبات را بلند-مدت و پرهزینه کرده است (Soost and Roose, 1996).

علاوه بر مشکلات موجود در امر اصلاح این محصول، برنامه‌های متعددی جهت حل موانع محدودکننده اصلاح مرکبات در سطح جهانی در حال اجراست. اغلب این پروژه‌ها به دو بخش اصلاح پایه و اصلاح رقم مربوط می‌شوند.

۲-۳ تاریخچه اصلاح مرکبات

کار اصلاح مرکبات صدها سال پیش با سلکسیون و گزینش از توده‌های وحشی در چین، آغاز شد. اما برنامه‌های اصلاحی منظم برای نخستین بار توسط وزارت کشاورزی آمریکا در فلوریدای آمریکا توسط سوئینگل و وبر در سال ۱۸۹۳ آغاز شد، چنانچه مطالعاتی قبل از انجام آن انجام شده باشد پراکنده بوده و نتایج آن منتشر نشده است (Soost and Cameron., 1975). اصلاح مرکبات در ایران با از بین رفتن مرکبات بذری در سال ۱۲۹۷ هجری به وسیله پیوند آغاز شد. ورود ارقام اصلاح شده خارجی در رامسر در سال ۱۳۰۹ نقطه عطفی در گسترش و شناخت ارقام خارجی تلقی می‌شود. بذر پونسیروس که گیاه آن مقاوم به سرما و بیماری‌های فیتوفتیرا و تریستیزا می-باشد به عنوان یک گیاه زینتی در سال ۱۳۲۹ وارد ایران گردید و در سال ۱۳۳۰ در ایستگاه مرکبات رامسر کشت شد. در سال ۱۳۴۲ که اکثر درختان مرکبات شمال به علت سرمازدگی از بین رفت ۲۱۰ رقم مختلف تجاری جدید در شمال و جنوب کشور مورد آزمایش قرار گرفت. در سال‌های بعد نیز ارقامی دیگر وارد کشور شد و در ایستگاه‌های پژوهشی شمال و جیرفت به مجموعه ارقام اضافه شد. در اوایل پاییز ۱۳۵۰، تعداد ۴۸ رقم مختلف مرکبات از یک شرکت آمریکایی واقع در کالیفرنیا به تعداد ۱۰۰ جوانه از هر رقم خریداری و در اختیار سازمان عمران جیرفت قرار گرفت و در سال ۱۳۵۱ تعداد ۲۸ رقم از مراکش وارد ایران شد و به کلکسیون پژوهشی مرکبات جیرفت اضافه گردید. به طور کلی از سال ۱۳۰۹ تا کنون تعداد ۱۸ رقم تجاری وارد ایران شده است و با روش پیوند، به منظور اصلاح باغ‌های ایران مورد بررسی قرار گرفته است. روش‌های دیگر اصلاح از قبیل دورگ گیری، انتخاب و نگهداری جهش‌های مطلوب و تهیه نهال-های نوسلار نیز در دو دهه اخیر در کشور ما رایج بوده است.

۲-۴ ذخایر ژنتیکی مرکبات

موسسه بین المللی تنوع زیستی، یک سازمان علمی و بین المللی مستقل است که توسط گروه مشورتی تحقیقات بین المللی کشاورزی حمایت می‌شود. فعالیت این سازمان شامل برنامه منابع ژنتیک گیاهی، برنامه حمایت منابع ژنتیکی و شبکه جهانی گسترده موزوپلانتن است. چندین کلکسیون بین المللی مرکبات در سراسر دنیا وجود دارد که در تمامی این کلکسیون‌ها دو هدف عمده دنبال می‌شود: حفظ تنوع ژرم پلاسم مرکبات و جنس‌های وابسته به آن و دوم تولید واریته-های مطلوب. کلکسیون اکیتسوبرانچ (مرکز تحقیقات درختان میوه) در ژاپن، از مهم‌ترین مراکز جمع‌آوری مواد گیاهی از مبدا اصلی آن‌ها می‌باشد اما برای اهداف محافظتی، دانشگاه مالزی یکی از مهم‌ترین مراکز جمع آوری و محافظت از گیاهان خانواده Aurantioideae در جنوب شرق آسیاست. کلکسیون‌های وزارت کشاورزی ایالات متحده آمریکا، موسسه تحقیقات کشاورزی والنسیا در اسپانیا و همچنین کلکسیون دانشگاه آدانا در جنوب ترکیه مهم‌ترین مراکز جمع آوری گیاهان خانواده مرکبات می‌باشند و ارقام جدید برای سراسر دنیا تولید می‌کنند. مراکز INRA و CIRAD در فرانسه به دلیل وجود شرایط فتوسنتزی مطلوب، یک مجموعه بی‌نظیر را به وجود آورده است. تمامی این کلکسیون‌ها مراکز نگهداری مواد سالم گیاهی می‌باشند و امکان معرفی به کشاورزان را دارند (Ollitrault *et el*., 2003).

۲-۵ سیتوژنیک مرکبات

تمامی گونه‌های جنس سیتروس دارای تعداد کروموزوم پایه x=9 و دیپلوئید 2n=2x=18 می-باشند که یک قاعده کلی در جنس سیتروس و جنس‌های وابسته به آن‌ها است. هرچند که تیپ-هایی با شماره کروموزومی بیشتر نیز در آن‌ها تشخیص داده شده و یا معرفی شده اند (Davies