تعیین خودناسازگاری و خودسازگاری ژنوتیپ بادام با استفاده از روش PCR

دیبا طبا [۱*]، علی ایمانی [۲] مهرشاد زین العابدینی [۳]

۱- دانشجوی گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج. ۲- دانشیار موسسه تحقیقات باغبانی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی ،تهران،ایران. ۳- استادیار پژوهشکده کشاورزی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی ،تهران،ایران.

*نویسنده مسئول: Imani_a45@yahoo.com

چکیده

۳۸ ژنوتیپ امیدبخش بادام با استفاده از روش PCR در سال ۱۳۹۳ مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی‌های مولکولی استخراج DNA به روش دلاپورتا (تغییریافته) انجام شد. سپس کلیه‌ی ژنوتیپ‌ها با آغازگرهای عمومی ($AS_1II/AmyC5R$) و آغازگرهای اختصاصی ($CEBAS_f/AmyC5R$) که مشخص کننده‌ی ژنوتیپ های سازگار و یا الل S_f به‌صورت اختصاصی بود، تکثیر شدند. در نهایت عکس‌برداری از ژل آگارز بعد از اتمام الکتروفورز با نور ماوراء بنفش انجام گردید. نتایج بررسی‌های مولکولی مشخص کرد که از میان ژنوتیپ‌های دیرگل، ژنوتیپ K26 علاوه بر دیر گل بودن دارای صفت خودگشنی نیز بود که این مورد در آنالیز مولکولی با تشکیل باندی به‌اندازه ۴۹۹ bp مشخص شد. همچنین بررسی‌های مولکولی نیز نشان داد که فراوانی الل‌های S_f و S_1 در ۳۸ ژنوتیپ مورد بررسی به ترتیب ۳۴/۲۱ و ۸۱/۵۸ درصد بود.

کلمات کلیدی: ژنوتیپ- خوداسازگاری- خودگشنی- نشانگرهای مولکولی

مقدمه

بادام با نام علمی *Prunus amygdalus* Batch syn. *Prunus dulicis* Mill/D.A.Webb، یکی از مهمترین میوه های خشک مناطق معتدله در دنیا به شمار می رود که به دلیل سهولت در برداشت، نگهداری و حمل نقل، سازگار بودن با خاک های آهکی و مناطق نیمه خشک از ارزش اقتصادی بالایی برخوردار می باشد. یکی از مشکلات تولید بادام خود ناسازگاری است که موجب کاهش شدید تشکیل میوه و درنهایت ایجاد مشکل در مدیریت باغ می گردد. بنابراین اصلاح بادام به منظور ایجاد ارقام خود سازگار اهمیت بالایی دارد(.مومن پور و همکاران، ۱۳۹۰) به عبارت دیگر گرده افشانی و باروری گل های اکثر ارقام بادام به دلیل سیستم ناسازگاری گامتوفتیک(SI) نیازمند گرده ارقام سازگار است که در سطح کلاله پذیرا قرار گیرد. گرده افشانی ناقص یکی از مهمترین دلایل کاهش عملکرد و عدم دستیابی به پتانسیل تولید در بادام است(Lopez *et al.*,2006). از آنجا که تعیین ارقام خودسازگار بادام و کشت آنها در زمان احداث باغ، کارایی کشت بادام و عملکرد را به طور چشمگیری افزایش می دهد (Socias I Company and Alonso, 2004). بنابراین اهمیت دارد که ارقام خود گشن و روش اصلاح سریع آنها در برنامه های اصلاحی مورد توجه قرار گیرد(زین العابدینی و همکاران، ۱۳۹۱.). به همین دلیل، تحقیقات وسیعی در جهان در جهت شناسایی و دستیابی به ارقام مناسب خود گشن بادام در حال اجرا می‌باشد (Socias I company and Felipe, 1992). برای این کار استفاده از روش‌های جدید مبتنی بر PCR در بررسی خوداسازگاری و خودسازگاری درختان بادام از موفقیت زیادی برخوردار بوده است. از روش PCR برای شناسایی الل‌های خوداسازگاری و خودسازگاری در بادام استفاده شده است(Channuntapipat *et al.*, 2003 ; Martinez- Gome *et al.*, 2005). آغازگرهای اختصاصی و عمومی مختلف بر اساس توالی مکان ژنی ناسازگاری در بادام و دیگر گونه‌های جنس *Prunus* طراحی‌شده است که به‌طور موفقیت آمیزی باعث تکثیر الل‌های خوداسازگار در رقم‌های بادام می‌شود(; Martinez- Gome *et al.*, 2005 Channuntapipat *et al.*, 2003).این روش با توجه به دقت زیاد و سهولت کاربرد، یک روش

آسان، کم هزینه، دقیق و قابل اطمینان بوده و از آنجایی که گلدهی لازم نمی باشد در سن نونهالی نیز قابل اجرا بوده و در مقایسه با روش آنالیز ریبونولکئازهای خامه دست یابی به ژنوتیپ های خود سازگار،زودترامکان پذیر است (Martinez-Gomez, *et al.*, 2005). از طرفی کارآمد بودن این روش در اصلاح درختان میوه از جمله بادام به علت هزینه بالا و وقت گیر بودن فرآیند اصلاح دارای اهمیت زیادی است. در این پژوهش خودناسازگار و خودسازگاربودن ژنوتیپ بادام با استفاده از روش PCR تعیین شده است

مواد و روش‌ها

برگ‌ها مواد گیاهی این تحقیق شامل حداقل ۳۸ ژنوتیپ حاصل گرده افشانی آزاد بادام رقم تونو بود. در ابتدا از هر ژنوتیپ نمونه های برگی تهیه و تا زمان استخراج DNA در دمای ۸۰- نگهداری شدند. در این پژوهش از روش لوپز و همکاران(Lopez *et al.*,2006) جهت استخراج DNA استفاده شد. لازم به ذکر است که استخراج DNA در گیاه بادام به دلیل دارا بودن متابولیت‌های ثانویه مانند پلی فنل‌ها و ترکیبات پلی ساکاریدی فراوان، اندکی مشکل است، ترکیبات بافری مورد استفاده در این روش در جدول ۱ آمده است.

جدول۱ ترکیبات اجزا بافر مورد استفاده برای استخراج DNA

ماده شیمیایی	برای ۱۰۰ میلی لیتر	غلظت استوک	غلظت نهایی	اتو کلاو
Tris-HCI PH 8	۵ میلی لیتر	۲ مولار	۱۰۰ میلی مولار	بله
Sodium EDTA	۴ میلی لیتر	۰/۵ مولار	۲۰ میلی مولار	بله
NaCI	۲۸ میلی لیتر	۵ مولار	۱/۴مولار	بله
CTAB	۲ گرم	-	۲ درصد	بله
2-mercaptoethanol	۲ میلی لیتر	-	۲ درصد	بله
P.V.P	۲ گرم	-	۲ درصد	بله

پس از استخراج DNA، تعیین کمیت و کیفیت DNA با استفاده از روش اسپکتو فتو متری انجام شد. این روش بر مبنای طیف جذب DNA می باشد. پس از این که دستگاه کالیبره شد، ۹۸۰ میکرولیتر از آب مقطر و ۲۰ میکرولیتر از DNA نمونه را در کووت ریخته و اعداد مربوط به طول موج های ۲۶۰ نانومتر (طول موج جذب نور توسط اسیدهای نوکلئیک) و ۲۸۰ نانومتر (طول موج جذب نور توسط پروتئین ها) خوانده شد و نسبت جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ و غلظت نمونه DNA یادداشت شد. نسبت جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ به منظور تعیین کیفیت DNA به کار می‌رود که باید بین ۱/۷ تا ۲ باشد. پس از تعیین غلظت نمونه های DNA، برای واکنش زنجیره ای پلی مراز، غلظت نمونه به مقدار ۱۰ نانو گرم در میکرو لیتر رقیق شد. برای انجام PCR پس از استخراج DNA ژنومیک (هسته و کلروپلاست) اقدام به تکثیر آن در مخلوط PCR گردید. این مخلوط شامل ۷/۵ میکرو مولار از Master Mix آماده، ساخت شرکت سیناژن (با غلظت ۲X) موجود بود که شامل تمام اجزاء واکنش به غیر از DNA و آغاز گر بود. ۰/۶۲۵ میکرو لیتر از هر آغازگر با غلظت ۱۰ ماکرو مولار در لیتر و ۱۰ میکرو لیتر از DNA با غلظت ۱۰ نانوگرم در لیتر برای این مخلوط استفاده شد. از آنجایی که حجم نهایی این مخلوط ۲۵ میکرولیتر بود، به منظور رساندن حجم مخلوط PCR به این مقدار از آب مقطر استریل استفاده شد (جدول ۲).

جدول ۲-مواد لازم و مقدار آنها برای تهیه محلول پایه PCR با استفاده از کیت PCR

ماده	غلظت پایه	غلظت نهایی در تیوب	مقدار لازم برای واکنش ۲۵ میکرو لیتر
PCR kit	X۲	X۱	۷/۵ میکرولیتر
Primer	۱۰ میکرو مولار	۰/۲۵ میکرو مولار	۰/۶۲۵ میکرو لیتر
DNA	۱۰ نانوگرم در لیتر	۴ نانوگرم در لیتر	۱۰ میکرو لیتر
Distill water	-	-	۶/۲۵ میکرو لیتر
مجموع	-	-	۲۵

برنامه PCR در این آزمایش شامل ۳ دقیقه واسرشت سازی اولیه در ۹۵ در جه سانتیگراد و در ادامه ۳۴ چرخه شامل ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سانتیگراد، ۴۵ ثانیه در ۵۳ درجه سانتیگراد و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد بود و پس از اتمام چرخه ها ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد و در نهایت در دمای ۴ درجه سانتیگراد تا زمان الکتروفورز بود. پس از انجام PCR مقدار ۵ میکرولیتر از ماده رنگی برموفنل بلو به هر اپندرف اضافه شد و کاملا مخلوط گردید. سپس محصولات PCR روی ژل آگارز ۲ درصد در بافر بارگذاری TBE شامل به مدت ۱ ساعت و ۴۵ دقیقه در ولتاژ ۸۰ وات الکتروفورز گردیدند. جهت تعیین اندازه باند های به دست آمده از سایز مارکر ۱Kbp در غلظت ۱۰۰ نانو گرم در میکرو لیتر استفاده شد که به مقدار ۳ میکرولیتر در چاهک اول ژل ریخته شد. پس از پایان الکتروفورز، ژل با اتیدیوم بروماید سه میکرولیتر در لیتر از محلول پایه ا میکرو گرم در میلی لیتر به مدت ۱۵ دقیقه رنگ آمیزی شد و پس از دو بار شست و شو با آب دو بار تقطیر (هر بار ۱۰ دقیقه) با استفاده از دستگاه عکس برداری از ژل باند های به دست آمده مورد بررسی قرار گرفتند. آغازگرهای مورد استفاده در این آزمایش شامل SfF و SfR بودند که توسط محققانی چون چانون پیتات و همکاران (Channuntapipat *et al.*, 2003) به منظور تعیین آلل خود سازگای در بادام به کار برده شده بودند. وجود باند دلیل بر خودسازگاری و عدم وجود باند دلیل بر خودناسازگاری بیان شده است.

جدول ۳-مشخصات آغاز گرهای مورد استفاده برای تعیین آلل Sf در نتاج بادام

آغاز گر	توالی	ترکیب آغازگر	اندازه باند (bp)	آلل های قابل تشخیص	دمای اتصال	منبع
SfF SfR	GTGCCCTATCTAATTTGTTGAC GACTTTTTTTTAGAAAGAGTG	SfF/ SfR	۴۴۹	S_f	۶۰ درجه سانتیگراد	(چانون پیتات و همکاران، ۲۰۰۳ ؛ تامورا و همکاران.، ۲۰۰۰

نتیجه و بحث

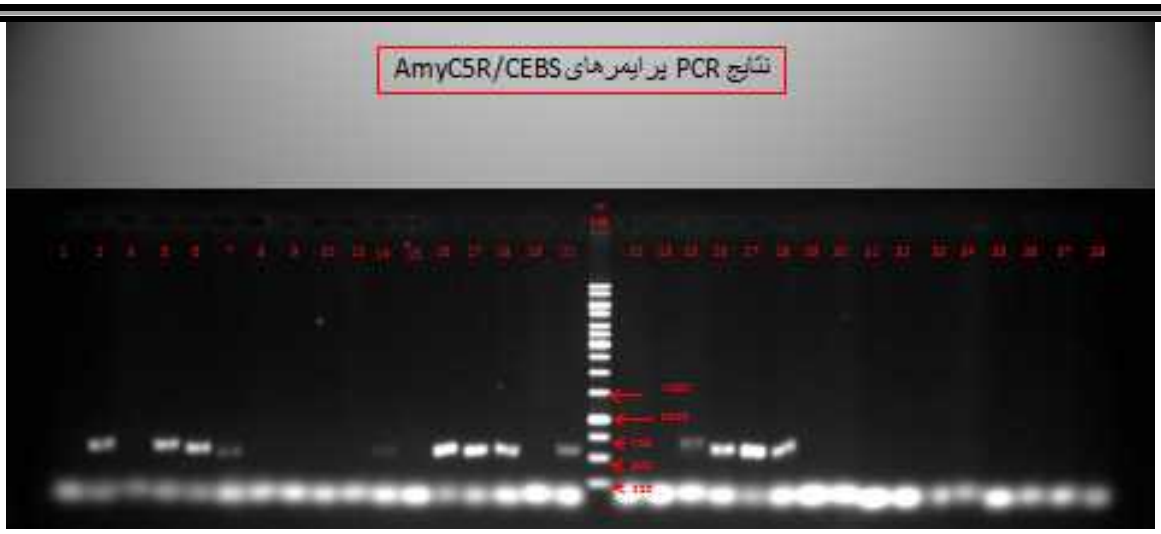
در پژوهش حاضر به منظور شناسایی ژنوتیپ‌های خودسازگار و خودناسازگار حاصل از گرده‌افشانی آزاد رقم تونو موجود در باغ از روش PCR با آغازگرهای اختصاصی استفاده شد. آغازگرهای استفاده شده در این پژوهش، محدوده‌ای از الل‌های خودسازگاری و خودناسازگاری را در ژنوتیپ‌های امیدبخش بادام تکثیر کردند. اندازه‌ی الل‌های تکثیرشده توسط آغازگرهای دژنره اینترون اول (*PaConsI-F/EM-PC1consRD*)، از ۲۷۰ جفت باز تا ۷۰۰ جفت باز متغیر بود. بیشتر اندازه‌ی الل‌ها بین ۲۰۰ تا ۴۰۰ جفت باز بود و فقط اندازه باندهای بزرگ‌تر ۵۹۰ و ۷۰۰ جفت باز بود که نشانگر الل S_1 می‌باشد که با نتایج گزارش شده‌ی عبادی و همکاران (۱۳۹۱) و زین‌العابدینی و همکاران (۱۳۹۱) همخوانی داشت.

جدول ۴ ژنوتیپ‌های دارای باند با توجه به نوع پرایمر اختصاصی مورد استفاده

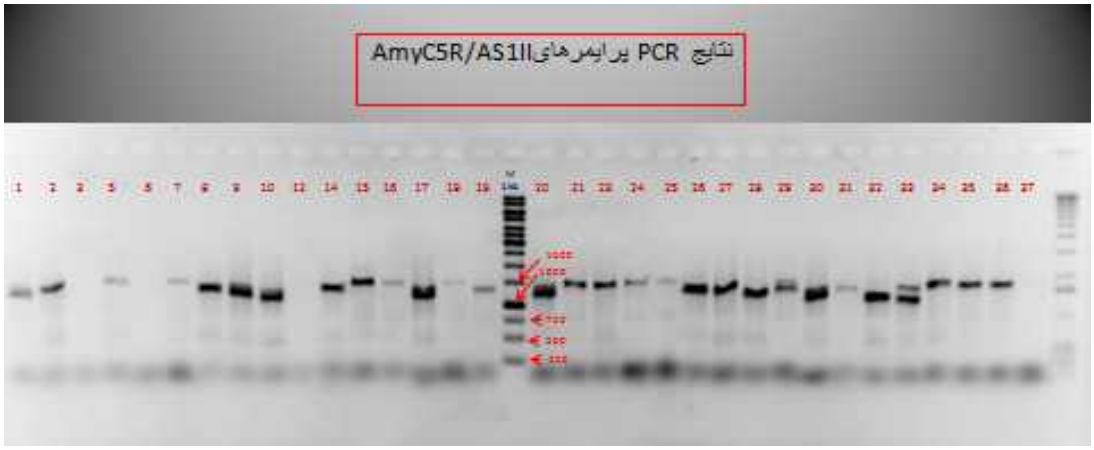
ژنوتیپ	AS1II/Amy	CEB/Amy	ژنوتیپ	AS1II/Amy	CEB/Amy
۱	*		۲۰	*	
۲	*	*	۲۱	*	
۳			۲۲	*	*
۴			۲۳	*	
۵	*	*	۲۴	*	
۶		*	۲۵	*	*
۷	*	*	۲۶	*	*
۸	*		۲۷	*	*
۹	*		۲۸	*	*
۱۰	*		۲۹	*	
۱۱			۳۰	*	
۱۲	*		۳۱	*	
۱۳			۳۲	*	
۱۴	*	*	۳۳	*	
۱۵	*		۳۴	*	
۱۶	*	*	۳۵	*	
۱۷	*	*	۳۶	*	
۱۸	*	*	۳۷	*	
۱۹	*		۳۸		

درمجموع هدف از ارزیابی ۳۸ ژنوتیپ بادام مورد مطالعه در پژوهش حاضر، شناسایی ژنوتیپ‌های خودگشن بادام بود. در بین ۳۸ ژنوتیپ ۱۳ ژنوتیپ تشکیل باند خودگشنی داده که این باندها با توجه به نوع پرایمر اختصاصی مورد استفاده شده (جدول۴) نشان‌دهنده‌ی خودگشن بودن این ژنوتیپ‌ها می‌باشد. که با دقت به عکس‌هایی که توسط دستگاه ترانس لیمینایتور گرفته شده است می‌توان نحوه‌ی تشکیل باند را مشاهده کرد (اشکال۱ و ۲). همچنین فراوانی الل‌های Sf، S_1، به ترتیب ۳۴/۲۱ و ۸۱/۵۷ درصد بوده است.

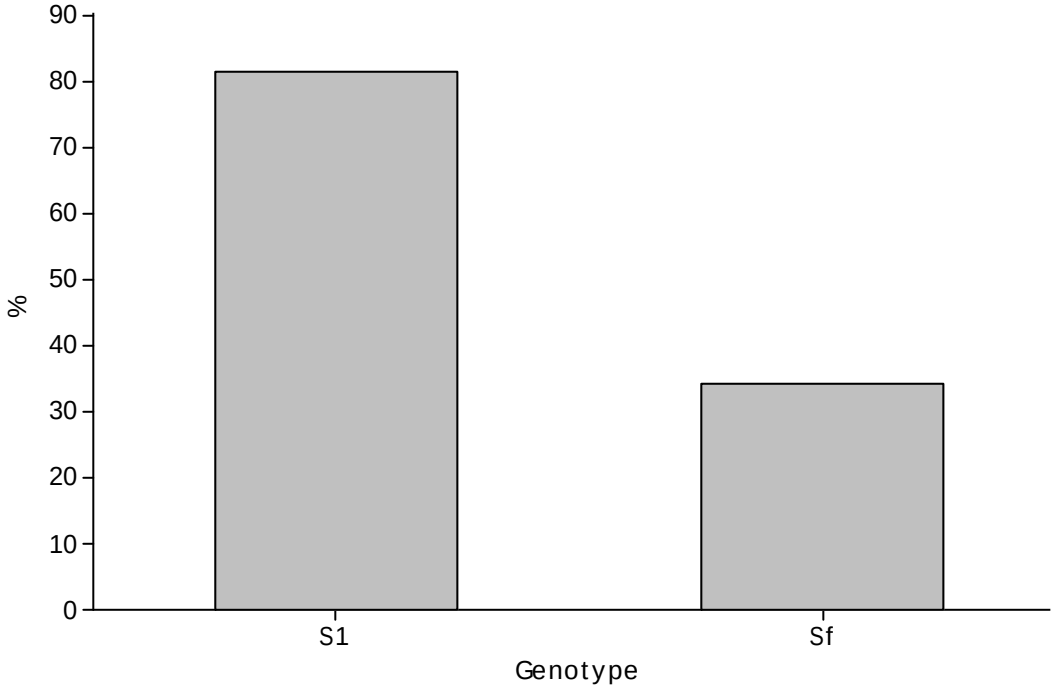
بر اساس نتایج حاضر تمام ژنوتیپ‌ها به غیر از ۳ ژنوتیپ خودناسازگار بوده و فراوانی و تنوع الل S در ژنوتیپ‌های بادام مورد مطالعه آشکار می‌باشد.



شکل ۳-۱۵ باندهای مشاهده‌شده با آغازگر اختصاصی *CEB/Amy*



شکل ۳-۱۶ باندهای مشاهده‌شده با آغازگر اختصاصی *AS1II/Amy*



شکل ۳-۱۷ فراوانی الل‌های S

نتیجه‌گیری کلی

از پژوهش حاضر می‌توان به ژنوتیپ‌های دیر گل K26 و K28 اشاره نمود که ژنوتیپ K26 علاوه بر دیر گل بودن دارای صفت خودگشنی نیز می‌باشد که این مورد در آنالیز مولکولی با تشکیل نوار به‌اندازه bp ۴۹۹ مشخص شد. با توجه به نتایج حاصل می‌توان از ژنوتیپ‌های منتخب در برنامه‌های اصلاحی با هدف ایجاد ارقام دیرگل با عملکرد بالا بهره برد.

منابع

۱. زین العابدینی، م.، خیام نکوئی، م.، ایمانی ، ع.، و مجیدیان، پ.، ۱۳۹۱. شناسائی ژنوتیپ های خودسازگار و خودناسازگار در بادام و برخی از گونه های جنس Prunus با استفاده از نشانگرهای مولکولی.۲۲۷:۲۸-۲۳۸

۲. عبادی ع.،کاظم ، ک.، فتاحی مقدم، م.، نقوی، م.، و ایمانی، ع.، و افقی، ح.، ۱۳۹۱. تعیین ژنوتیپ های خودسازگاربادام حاصل از یک برنامه اصلاحی وتشخیص آلل های s در برخی ازارقام وژنوتیپ های خارجی بادام با استفاده از روش PCR .مجله بهنژادی نهال و بذر۱:۱-۲۷

۳. مومن پور، ع.، عبادی، ع.، ایمانی، ع.، ۱۳۹۰. تعیین میزان خودناسازگاری در نتاج بدست آمده از تلاقی ارقام تونو و شاهرود به وسیله میکروسکوپ فلورسنس،مجله پژوهش‌های تولیدات گیاهی ۱۸: ۲.

4. Lopez M, Vargas FJ, Batlle I (2006). Self (in) compatibility almond genotypes: A review. Euphytica 150:1-16.
5. Rahemi, A, R. Fatahi and A. Ebadi. 2010. Genetic variation of S-alleles in wild almonds and their related Prunus species. AJCS. 4: 648-659.

6. . Channuntapipat, C.M., Wirthensohn, S.A., Ramesh, Batlle, I., Sedgley, P.M., Collins, G,. 2003. Identification of incompatibility genotypes in almond (*Prunus dulcis* Mill.) using specific primers based on the introns of the S-alleles. Plant breeding 122, 164-168.
7. 50. Martinez-Gomez, P., Sanchez-Perez, R., Rubio, M., Dicenta, F., Gradziel, T.M., and Sozzi, G.O., 2005. Application of recent biotechnologies to Prunus tree crop genetic improvment. Cien. Inv. Agr. 32(2): 55-78
8. Socias I company, R., and A.J., Felipe, 1992. Self-compatibility and autogamy in Guara, almond. Journal of horticultural science 67(3), 313-317
9. Socias I Company, R., and Alonso, J. M., 2004.Cross- incompatibility of Ferralise and Ferragnes and pollination efficiency for self-compatibility transmission in almond. Euphytica 135: 333-338.

Determination of self (cross)-compatible in almond genotypes using PCR technique

Diba Taba[1], Ali Imani [2] ,Mehrshad Zinalabdini [3]

1- Department of Horticulture Science, Karaj branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran. 2- Horticultural Department of Seed and Plant Improvement Institute (SPII), P.O. Box31585-4119 Karaj, Iran. 3-Agricultural Biotechnology Research, Karaj, Iran.

*Corresponding author: Imani_a45@yahoo.com

Abstract

38 promising almond genotypes using PCR method was evaluated in the year 2014. DNA extraction was done by modified dlaporta method. Then all the genotypes with the general primers (AS1II/AmyC5R) and specific primers (CEBASf/AmyC5R) was specified for the allele of compatible genotype or S_f. At the end of the gel electrophoresis images after electrophoresis with ultraviolet light. The results of the investigation of molecular indicated that from among the late blooming genotypes, genotype K26 in addition to being a late-flowering was self-compatible. This item in the molecular analysis with the formation of the band 499bp was identificated. Also molecular investigations indicated that the frequency of the alleles S_f and S_1 in 38 studied genotypes was 21.34 and 58.81% respectively.

Key words: genotype, almond, self-compatible, cross-compatible