شناسایی زود هنگام هیبریدهای خود گشن بادام حاصل از تلاقی تونو" و "دی۹۹"با استفاده از نشانگرهای مولکولی

آروین عابدینی[1*]، علی ایمانی[2]، وحید عبدوسی[1]

۱- داشجوی دکتری گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران. ۲- دانشیار بخش تحقیقات باغبانی موسسه اصلاح وتهیه نهال و بذر. ۱- استاد یار گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران.

*نویسنده مسئول:arvinabedini @yahoo.com

چکیده

بادام با نام علمی (*Prunus amigdalus* 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 نهایتا ایجاد مشکل در مدیریت باغ می گردد. بنابرین اصلاح بادام به منظور ایجاد ارقام خود سازگار اهمیت بالایی دارد. در این آزمایش شناسایی وغربال گری ۵۴ هیبرید بادام حاصل از تلاقی رقم خود سازگار تونو (والد پدری) و رقم خود ناسازگار دی ۹۹ (والد مادری) به کمک PCR بررسی شد. نتایج بررسی های مولکولی هیبریدهای مورد ارزیابی در این پژوهش نشان داد که ۵۰٪ هیبریدها تشکیل باند داده که این باندها با توجه به نوع پرایمر اختصاصی مورد استفاده شده نشان دهنده ی خود گشن بودن ۵۰٪ این هیبریدها می باشد. بنابراین در تحقیق حاضر هیبرید های خود سازگار شناسایی شده اند که می توانن در آینده همچنین در برنامه های اصلاحی مورد استفاده قرار گیرند تا گامی دیگر در جهت شناسایی و معرفی ارقام خود سازگار برای ایجاد کشت های تک رقمی و استفاده در برنامه های اصلاحی بعدی باشد.

کلمات کلیدی: بادام، خود سازگار، هیبرید، PCR، مورفولوژی

مقدمه

اکثر ارقام بادام خود ناسازگار بوده و برای تولید میوه تجاری نیاز به گرده دهنده مناسب وسازگار دارد ولذا دستیابی ارقام خود گشن وتعیین سازگاری ارقام مختلف از اهمیت بالائی در صنعت بادام کاری برخوردار است. با توجه به اینکه بسیاری از ارقام تجاری بادام دارای خود یا دگرناسازگاری ازنوع گامتوفیتیک می باشد جزءگیاهان دگر ناسازگارمحسوب می شودسیستم ناسازگاری گامتوفیتیک به وسیله یک مکان ژنی به نام s کنترل می شود .در این سیستم الل های خود ناسازگاری (SI) که در خامه بیان می شوند ریبونوکلئازهایی (S-RNases) تولید می نمایند که به طور اختصاصی رشد لوله گرده با ژنوتیپ مشابه درمکان s را متوقف می نماید .همچنین در ارقام مختلف بادام دگرناسازگاری نیز وجوددارد(Lopez. *et al.*, 2006;Boskovi *et al.*,2007). با توجه به اهمیت تعیین ژنوتیپ های خودسازگار در بین ژنوتیپ های بادام تحقیقات متعددی در این زمینه انجام گرفته است.یکی از این موارد استفاده از روش PCR می باشد که از این روش برای کار های اصلاحی و انتخاب نتاج و تولید هیبرید استفاده می شود)(.Momenpour et al,.2011)

مومنپور وهمکاران (2011) با استفاده از تکنیک PCR آلل های خودناسازگاری را در چند رقم بادام ایرانی شناسایی کردند. در این مطالعه آلل های خود سازگاری ۴۸ رقم بادام ایرانی مورد ارزیابی قرار گرفته اند. با این روش توانستند آلل های Sf رقم های خود سازگار شناسایی کنند.

در این راستا شناسایی هیبرید های خود گشن از میان نتاج ترکیب تلاقی ژنوتیپ امید بخش انتخابی "دی۹۹" و" تونو" با استفاده از نشانگرهای ملکولی انجام شده تا هیبرید خود گشن از میان توده هیبرید های حاصل از ترکیب فوق به طوری سریع و در کوتاه ترین زمان بررسی و شناسایی قرار گیرند تا بتوان از این هیبرید های خود گشن شناسایی شده در برنامه های اصلاحی بادام مورد بهره برداری قرار داد. بنابراین شناخت سریع و عرضه ارقام بادام اصلاح شده جدید سازگار می تواند در پیشبرد برنامه های اصلاحی حائز اهمیت باشد.

مواد و روش ها

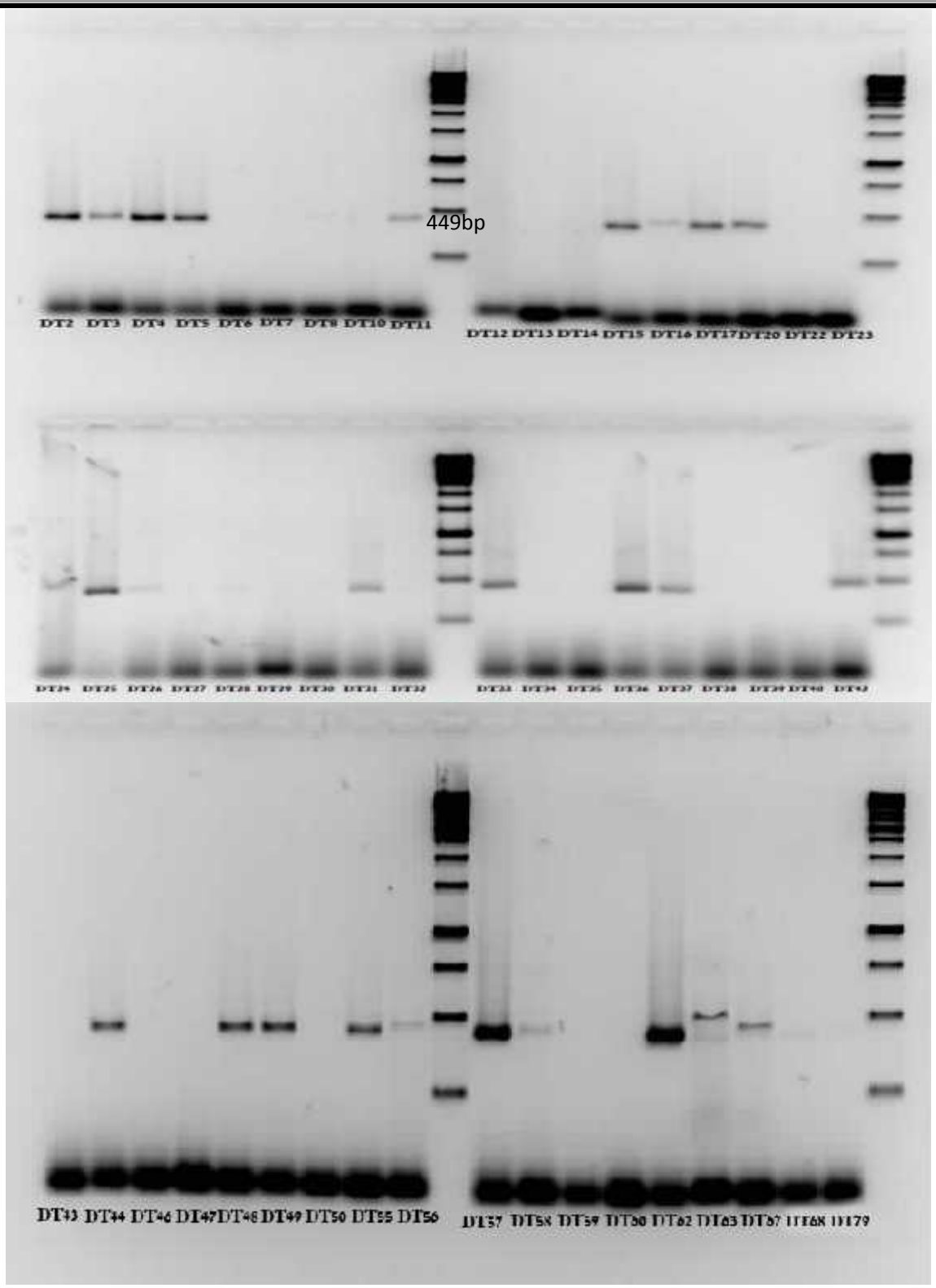
در این مطالعه ۵۴ هیبرید که به صورت دو رگ های حاصل از گرده افشانی ژنوتیپ انتخابی "دی ۹۹" با رقم "تونو"بود انتخاب شد،که شناسایی و غربال گری هیبرید های خود گشن بادام با استفاده از نشانگرهای مولکولی و متد S-allele صورت گرفت.DNA ژنومی به روش CTAB استخراج شد که از طریق روش های اسپکتوفتومتری وژل آگارز(۸/. درصد) مورد ارزیابی کمی،کیفی قرار گرفت. شناسایی آلل های خود سازگار با استفاده از آغازگرهای اختصاصی(S-allele specific PCR)صورت گرفت. مجموعه آغازگرهای مطالعه شده برای واکنش زنجیره ای پلیمراز سادهAmyc5R(معکوس) وCEBASF (رو به جلو) طراحی شده،برای آلل خود سازگاری Sf بودند. زنجیره های پلیمراز در حجم ۱۰ ماکرو لیتر،که از ۱۰ ماکرولیتر آن ۳ ماکرولیتر مربوط به DNA الگو،۹/. ماکرولیتر بافر PCR(4 2SO4)(NH)با Ph=8.8، ۶/. ماکرولیتر(کلرید منیزیم mgcl2)،۹/. ماکرولیتر مخلوط نوکلئوتید ها(dntps)،۱ ماکرو لیتر آغازگر رو به جلوp1،۱ ماکرو لیتر آغازگر معکوس p2 و در نهایت ۲/. ماکرو لیتر آنزیم تک پلیمراز(Taq)اضافه شد.چرخه های حرارتی شامل یک چرخه واسرشت سازی اولیه یا همان دناتوره شدن به مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد، ۳۰ چرخه ی واسرشت سازی در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه،اتصال آغازگرها به مدت یک دقیقه در دمای ۵۳ درجه سانتی گراد،بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه و بسط نهایی(ساخت نهایی زنجیره)در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود.محصولات تکثیر شده با استفاده از ژل آگارز ۱درصد و رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید تفکیک شدند. امتیاز دهی و تعیین اندازه آلل ها بوسیله نرم افزار آنالیز ژل Gene tools از شرکت Syngene انجام شد.

نتایج وبحث

نتایج تجزیه ی مولکولی آلل خودباروری Sf

در این تحقیق شناسایی هیبرید های خودسازگار از خودناسازگاری با استفاده از روش PCR با آغازگرهای اختصاصی سادهAmyc5R(معکوس) وCEBASF (رو به جلو) مشاهده شد (شکل۱).

همان طوری که در شکل ۱ مشخص است هیبرید های خودسازگاری از خودناسازگاری کاملاً تفکیک شده است که این نتایج مطابق با گزارش (Alonso and Socias i Company, 2005; Kamali *et al.*, 2010) بود. نتایج به دست آمده برای جفت آغازگرها CEBACF+AMYC5R مشابه با نتایج ارائه شده طول باندهای تکثیر شده در گزارشی(Channuntapipat *et al.,2001,*) مطابقت داشت که طبق گزارش آنها این حالت احتمالا مربوط غالبیت آلل های خودسازگاری دربین گیاهان خانواده رزاسه باشد.



شکل ۱هیبرید های مورد مطالعه

در مجموع در این پژوهش ۵۴ هیبرید مورد ارزیابی قرار گرفت که در این بین هدف اصلی شناسایی هیبرید های خود گشن ارقام بادام مورد نظر بود.در این بین از ۵۴ نمونه هیبرید موجود ۲۶ نمونه تشکیل باند داده که این باندها با توجه به نوع پرایمراختصاصی مورد استفاده شده نشان دهنده ی خود گشن بودن این هیبرید ها می باشد.که با دقت به عکس هایی که توسط

دستگاه ترانس لیمینایتور گرفته شده است می توان نحوه ی تشکیل باند را مشاهده کرد.که به راحتی تفکیک هیبرید های خود گشن از هیبرید های دگر گشن قابل مشاهده است (شکل۱ و ۲). همچنین یکی از نتایج جالب توجه تحقیق حاضر به وراثت پذیری آلل خود گشنی حاصل از مطالعه مورد نظر اشاره نمود که کاملا با قانون اول مندل صدق می کند که نسبت هیبرید های خودگشن نسبت به کل هیبرید ها ۲:۱ بود(شکل۱ و ۲).

نتیجه گیری کلی

مطالعه تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی ارقام و تعیین ژنوتیپ های خودسازگاری، مکمل همدیگر بوده و انجام هم زمان این گونه مطالعات،اطلاعات مفید تری نسبت به انجام و بررسی منفرد در یکی از این زمینه ها می باشد. یکی از مشکلات تولید بادام خود ناسازگاری است که موجب کاهش شدید تشکیل میوه و نهایتا ایجاد مشکل در مدیریت باغ می گردد. بنابرین اصلاح بادام به منظور ایجاد ارقام خود سازگار اهمیت بالایی دارد. در این آزمایش شناسایی وغربال ارقام خود سازگار با استفاده از بررسی های مولکولی نشان داد که ۵۰٪ هیبریدها تشکیل باند داده که این باندها با توجه به نوع پرایمر اختصاصی مورد استفاده شده نشان دهنده ی خود گشن بودن ۵۰٪ این هیبریدها می باشد. بنابراین در تحقیق حاضر هیبرید های خود سازگار شناسایی شده اند که می توانن در آینده همچنین در برنامه های اصلاحی مورد استفاده قرار گیرند تا گامی دیگر در جهت شناسایی و معرفی ارقام خود سازگار برای ایجاد کشت های تک رقمی و استفاده در برنامه های اصلاحی بعدی باشد.

منابع

1. Alonso, J.M. and Socias i Company, R. 2005. Self-incompatibility expression in self-compatible almond genotypes may be due to inbreeding. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 130:865–869.
2. Boskovic RI, K. R. Tobutt ,E. Ortega , B. G. Sutherland ,A. Godini. 2007.Self-(in)compatibility of the almonds P. dulcis and P. webbii:detection and cloning of ‘wild-type Sf’ and new self-compatibility alleles encoding inactive S-RNases. Mol Genet Genomics (2007) 278:665–676
3. Channuntapipat, C., Sedgley, M., and Collins, G. 2001. Sequences of the cDNAs and
4. genomic DNAs encoding the S1, S7, S8 and Sf alleles from almond, *Prunus dulcis*. Theoretical and Appllied Gentics 103:1115-1122.
5. Lopez M., F. J. Vargas, I. Batlle.2006.Self-(in) compatibility almond genotypes: A review. Euphytica 150: 1–16
6. Momenpour A., A.Ebadi, A. Imani .2011.Discrimination of almond self compatible genotypes by different methods in a breeding program in Iran. African Journal of Agricultural Research 6(23): 5251-5260.

Early identification the new self compatible almond hybrids from Touno×D99 using molecular markers

A. abdini[1*] , A. Imani[2]. V. abdousi[1]

1- Department of Horticultural Science, Science and Research Branch, IslamicAzad, UniversityTehran- Iran. 2- Horticultural Department of Seed and Plant Improvement Institute (SPII), P. O. Box 31585-4119 Karaj, Iran. 1- Department of Horticultural Science, Science and Research Branch, IslamicAzad, UniversityTehran- Iran.

*Corresponding author: arvinabedini @yahoo.com

Abstract

Almond*(prunus amigdalus Batch syn .prunus dulicis mill)(D.A.webb)* is one of the temperate zone fruit trees which are cultivated in different countries due to the harvest and transportation easily, tolerance of calculus and semi drought soil and economical value. Self-incompatibility is one of the most important difficulties in almond production which reduce fruit set dramatically and makes orchard management difficult. Therefore, breeding almond to produce self-compatible genotypes is very important. In this research work, identification and screening of 54 almond hybrids obtained from crossing between Touno (male parent) and D99 (female parent) after the self pollination by PCR

reaction with specific primers of SfF and SfR. PCR results confirmed the situation of self-compatible hybrids. In addition, it indicated that, 50% of genotypes were realized as self-compatible and another 50% were self-incompatible. Also self-compatible hybrids had been identified that can be used in almond breeding programs particularly to development the monoculture orchards of almond

Key words: almond, self-compatible, hybrid, PCR.