

آنالیز PCR-RFLP و SSR در دورگ‌های بین‌گونه‌ای و بین جنسی در مرکبات

اسد اسدی آبکنار^{۱*}، عطاالله شرفی^۲

*۱- سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، مدیریت بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه

شمال کشور، رشت، صندوق پستی ۴۱۱۵-۴۱۶۳۵

۲- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشگاه پیام نور- تهران

*نویسنده مسئول: asadiabkenarasad@gmail.com

چکیده

هدف از انجام این تحقیق تعیین ژنوتیپ در افراد هیبرید نسل اول حاصل از تلاقی‌های بین دو گونه و بین دو جنس در مرکبات با استفاده از نشانگرهای مولکولی می‌باشد. در این تحقیق DNA کلروپلاست و هسته، در سه فرد حاصل از تلاقی $\text{Fortunella margarita} \times \text{Citrus aurantifolia}$ و پنج فرد حاصل از تلاقی $\text{Citrus aurantifolia} \times \text{Citrus reticulata}$ به ترتیب با نشانگرهای PCR-RFLP و SSR مورد آنالیز قرار گرفت. DNA کلروپلاست با توارث یک طرفه مادری و نشانگر SSR با توارث دو طرفه تعلق افراد هیبرید را به تلاقی مربوطه شان به اثبات رساندند. این تحقیق کاربرد نشانگرهای مولکولی را در اطمینان از دست یابی به هیبرید در دورگ گیری‌های کنترل شده نشان می‌دهد.

کلمات کلیدی: دورگ گیری، نشانگر مولکولی، کلروپلاست

مقدمه

در مرکبات انجام تلاقی بین دو گونه مختلف از جنس *Citrus* (دورگ گیری بین گونه‌ای)، و یا بین دو جنس متفاوت از گروه مرکبات حقیقی، مثلاً بین *Citrus* و *Fortunella* (کامکوات) به راحتی امکان پذیر است. پس از انجام تلاقی و دست یابی به نهالهای بذری جدا سازی نهال‌های نوسلار از جنسی، در صورتی که والد مادر چند جنین باشد، ضروری و اجتناب ناپذیر می‌باشد. اما اگر والد مادر تک جنین باشد اگر چه همه نهال‌های به دست آمده دورگ یا هیبرید خواهند بود ولی می‌توان به روش‌های گوناگون به درستی دورگ بودن آنها پی برد. استفاده از نشانگرهای مولکولی یکی از این روش‌هاست (Yildizi et al., 2013). هدف از انجام این تحقیق تعیین ژنوتیپ با استفاده از نشانگرهای مولکولی در افراد هیبرید نسل اول حاصل از تلاقی‌های بین دو گونه (دورگ گیری بین گونه‌ای) و بین دو جنس مختلف (دورگ گیری بین جنسی) در مرکبات می‌باشد تا بتوان از درستی هیبرید بودن نهال‌های به دست آمده اطمینان حاصل نمود.

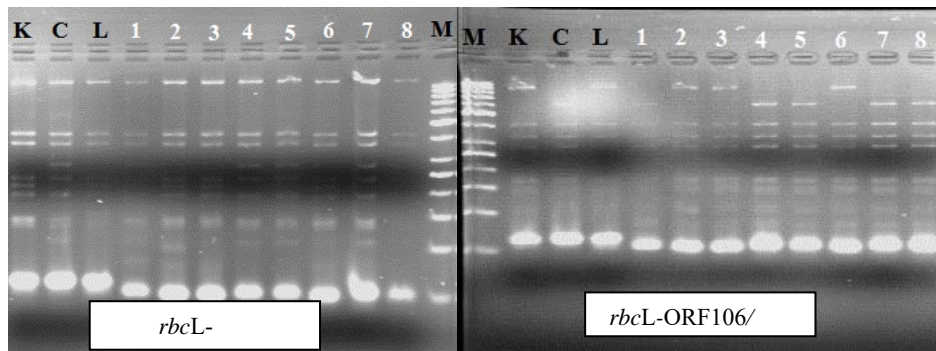
مواد و روش‌ها

در هشت فرد هیبرید نسل اول متعلق به دو گروه متفاوت از تلاقی‌های بین گونه‌ای و بین جنسی در مرکبات شامل $\text{F. margarita} \times \text{C. aurantifolia}$ (لیمو آب \times کامکوات ناگامی) و $\text{C. reticulata} \times \text{C. aurantifolia}$ (لیمو آب \times نارنگی کلمانتین) DNA کلروپلاست با نشانگر PCR-RFLP و DNA هسته با نشانگر SSR مورد آنالیز قرار گرفت. برای نشانگر PCR-RFLP از ترکیب *TaqI* و *rbcL-ORF106/HinfI* (Asadi Abkenar et al., 2008) و برای SSR از دو مکان ژنی مربوط به CMS7 استفاده گردید (Ahmad et al., 2003).

نتایج و بحث

آنالیز DNA کلروپلاست با نشانگر PCR-RFLP

تصویر ۱ نشان می‌دهد که DNA کلروپلاست با توارث یک طرفه از والد مادر به نتاج منتقل شده است که با یافته‌های پیشین (Asadi Abkenar et al., 2008) مطابقت دارد. دورگ‌های شماره ۲، ۳ و ۶ به عنوان دورگ‌های کامکوات ناگامی و دورگ‌های شماره ۱، ۴، ۵ و ۷ به عنوان دورگ‌های نارنگی کلمانتین شناخته شدند.



تصویر ۱. آنالیز DNA کلروپلاست با نشانگر PCR-RFLP در دورگ‌های بین‌گونه‌ای و بین‌جنسی در مرکبات. M: نردبان 100bp، K: کامکوات، C: کلمانتین، L: لیمو ترش (آب)، شماره‌های ۱ تا ۸ هیبریدها.

آنالیز DNA هسته با نشانگر SSR

در جدول ۱ ژنوتیپ والدین و هشت فرد هیبرید نسل اول مورد استفاده در این تحقیق درج گردیده است. ژنوتیپ‌های والدین و افراد هیبرید در هردو لوکوس (مکان ژنی) مربوط به CMS7 با توارث دو طرفه نشان می‌دهند که هیبریدهای شماره ۲، ۳ و ۶ متعلق به کامکوات و لیمو آب و هیبریدهای شماره ۱، ۴، ۵، ۷ و ۸ متعلق به نارنگی کلمانتین و لیمو آب می‌باشند. این نتایج با نتایج حاصل از آنالیز DNA کلروپلاست با نشانگر PCR-RFLP یکسان است که بیانگر دقت و یکنواختی روش مولکولی در جدا سازی هیبریدهای مرکبات از یکدیگر می‌باشد.

جدول ۱- ژنوتیپ والدین و هشت فرد دورگ آنالیز شده در این تحقیق با نشانگر SSR

لوکوس	کامکوات (مادر)	کلمانتین (مادر)	لیمو آب (پدر)	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸
CMS7-1	AA	CC	BC	BC	AC	AC	CC	CC	AC	CC	CC
CMS7-2	CC	BB	AC	AB	CC	AC	BB	BB	AC	BB	BC

منابع

- Ahmad, R., Struss, D. and Southwick, S.M. 2003. Development and characterization of microsatellite markers in *Citrus*. Journal of American Society for Horticultural Science. 128: 584-590.
- Asadi Abkenar, A., Isshiki, S., Matsumoto, R. and Tashiro, T. 2008. Comparative analysis of organelle DNAs in acid citrus grown in Japan using PCR-RFLP method. Genetic Resources and Crop Evolution. 55: 487-492.
- Yildizi, E., Kaplankiran, M., Demirkeser, T.H., Uzun, A. and Toplu, C. 2013. Identification of zygotic and nucellar individuals produced from several citrus crosses using SSRs markers. Not Bot Horti Agrobo. 41(2):478-484.

PCR-RFLP and SSR analysis in citrus inter-species and inter-generic hybrids

Asad Asadi Abkenar^{1*}, Ata Alla Sharafi²

^{1*} Agricultural Research, Education and Extension Organization, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Branch of North Region, Rasht, Iran, P. O. Box 41635-4115

² Previous MSc student, Payam e Nur University, Tehran, Iran

*Corresponding author: asadiabkenarasad@gmail.com

Abstract

The aim of this research is to determine the genotype of F₁ hybrid individuals resulted from inter-specific and inter-generic crosses in citrus using molecular markers. In this study, chloroplast DNA and nuclear DNA of three individuals of ♀ *Fortunella margarita* × *Citrus aurantifolia* ♂ and five individuals of ♀ *C. reticulata* × *C. aurantifolia* ♂ were analyzed using PCR-RFLP and SSR, respectively. Chloroplast DNA with uniparental inheritance, and SSR marker with biparental inheritance revealed the belonging of the given hybrids to their own crosses. This study showed the application of molecular markers to have confidence on getting hybrids in controlled crosses.

Keywords: Hybridization, Chloroplast, Molecular markers.

