بررسی تنوع درون گونه ای در کیوی فروت با استفاده از نشانگرهای مولکولی

اسد اسدی آبکنار (۱)، فریبرز زارع نهندی (۲) زهرا موحدی (۳)

۱- مدیریت بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه شمال کشور، رشت ۲- دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی، گروه علوم باغبانی ۳-دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشگاه پیام نور، واحد تهران

کیوی فروت (*Actinidia deliciosa*) گیاهی دوپایه است که از لحاظ سیتولوژیکی و ویژگی های گیاهی دو پایه نر و ماده قبل از گل دهی از هم قابل تشخیص نیستند. تعیین هویت رقم های مختلف درون گونه ای و جدا سازی جنس نر از ماده، اولین مرحله در طبقه بندی ژرم پلاسم و به نژادی کیوی محسوب می شود. هدف از این تحقیق آن است که به کمک نشانگر های مولکولی تنوع ژنتیکی ارقام کیوی مشخص گردد و با استفاده از نشانگر وابسته به جنس، جنس نر از جنس ماده سوا شود. به همین منظور پنج رقم ماده شامل 'Abbott'، 'Bruno' ، 'Hayward' ، 'Allison' و'Monty' و دو رقم نر شامل 'Tomuri' و 'Matua' انتخاب شدند. سه روش RAPD، PBR (PCR-RFLP) کلروپلاست DNA و PCRمستقیم با آغازگرهای SCARs (Sequence-characterised amplified regions) مورد مقایسه قرار گرفتند. با روش های RAPD و PBR چند شکلی به دست نیامد. در آزمایش PCR مستقیم با جفت آغازگر (Smyf-Smyr)؛ ارقام'Bruno' ،'Tomuri'،'Abbott' و 'Matua' با الگوی باندی یکسان از ارقام 'Hayward' ،'Monty' و 'Allison'تفکیک شدند. با استفاده از جفت پرایمر Smyf1– Smyr1 یک قطعه bp ۹۰۰ در رقم 'Tomuri' آن را از ارقام دیگر سوا نمود. از این یافته شاید بتوان برای تعیین جنسیت نهال های بذری پیش از گلدهی استفاده کرد.

کلمات کلیدی: Cultivar Identification, Kiwifruit, Molecular markers

مقدمه

کیوی فروت (*Actinidia deliciosa* var. deliciosa) از خانواده Actinidiacea و بومی چین می باشد. گیاهی چند ساله و تاک مانند است. رقم های 'Abbott'، 'Bruno'، 'Hayward' و'Monty' از رقم های معروفی هستند که به طور وسیع پرورش می یابند (Ferguson ،۱۹۹۰). همه گونه های جنس *Actinidia* دو پایه بوده و چون از لحاظ سیتولوژیکی و مورفولوژیکی پایه های نر از ماده قابل تشخیص نیستند، نمی توان جنسیت نهال های بذری را قبل از گل دهی تعیین کرد. بالغ شدن (گلدهی) گیاه حاصل از کاشت بذر نیز ۵-٤ سال طول می کشد. عقیده بر این است که ۵۰٪ نهال های بذری نر می باشند (Gill و همکاران، ۱۹۹۸). تعیین هویت رقم های درون گونه ای و جدا سازی جنس نر از ماده اولین مرحله در طبقه بندی ژرم پلاسم و به نژادی کیوی محسوب می شود. در دنیا برنامه هایی برای توسعه رقم های جدید فراهم آمده اند اما دو پایگی یک مشکل عمده است. هدف از مطالعه اخیر آن است که با استفاده از نشانگر های مولکولی وابسته به جنس در کیوی فروت، جنس نر از جنس ماده سوا شود تا پس از کاشت بذر و تولید جمعیت نهال های بذری، این دو جنس از یکدیگر قابل تفکیک باشند. نشانگر های ژنتیکی پیوسته به جنس، اغلب به طور مناسبی در برنامه های به نژادی به کار می روند و تشخیص دو پایه کیوی فروت را امکان پذیر می سازند (Shirkot و همکاران، ۲۰۰۱).

مواد و روش ها

پنج رقم کیوی فروت ماده شامل 'Abbott'، 'Bruno'، 'Hayward'، 'Allison' و'Monty' و دو رقم نر شامل'Tomuri' و 'Matua' از مناطق کیوی کاری رامسر و تنکابن برای تعیین تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای مولکولی وابسته به جنس، مبتنی بر DNA و PCR مورد استفاده قرار گرفتند. استخراج DNA از نمونه های برگی با استفاده از کیت شرکت کیاژن انجام گرفت. در آزمایش RAPD واکنش زنجیره ای پلی مراز براساس روش Shirkot و همکاران (۲۰۰۱) انجام پذیرفت. توالی آغازگرها عبارتند از: ('5'ACTGAACGCC 3) OPN-05 و '5 ACGGACCTCA .OPU-01(3')

در آزمایش PCR-RFLP واکنش زنجیره ای پلی مراز و سپس هضم آنزیمی با دو آنزیم برشگر چهار بازی (*Msp*I و *Taq*I) و یک آنزیم برشگر پنج بازی (*Hin*fI) براساس تحقیق انجام شده توسط Asadi Abkenar و همکاران (۲۰۰٤)

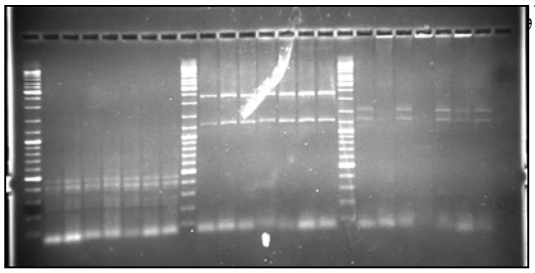
برای ژنوم کلروپلاست انجام گرفت. توالی آغازگرهای مورد استفاده عبارتند از: *rbcl* (5'ATGTCACCACAAACAGAAACTAAAGCAAGT3') و ORF106 (5'ACTACAGATCTCATACTACCCC3').

برای PCR مستقیم با آغازگرهای SCARs واکنش زنجیره ای پلی مراز بر اساس تحقیق انجام شده توسط Gill و همکاران (۱۹۹۸) انجام پذیرفت، توالی آغازگرهای مورد استفاده عبارتند از:

Smyf (5'GACGCGAACCCGGCAAGTCGAAC3'), Smyr (5'GACGCGAACCCACCCACATTTGAG3')
Smyf1(5'TCGCAATTCGTTAGGGATGATGCG3'), Smyr1(5'CATAATCAACCATCCATAAAAAAACCAT3')

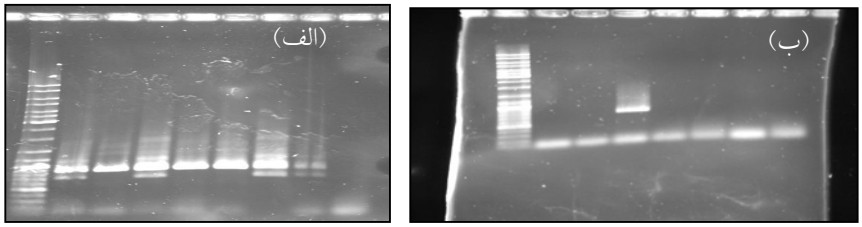
نتایج و بحث

انجام PCR با آغازگر های OPN-05 و OPU-01 که برای نشانگر RAPD به کار رفتند هیچ گونه باندی تولید ننمود. در آزمایش PCR-RFLP ژنوم کلروپلاست، پس از PCR و هضم آنزیمی توسط سه نوع آنزیم برشگر (*Msp*I ، *Taq*I و *Hin*fI) چند شکلی قابل تشخیصی برروی ژل آگاروز مشاهده نشد و قطعات ایجاد شده در دو رقم نر و پنج رقم ماده مشابه بودند (شکل ۱). شکل ۱ : الگوی باندی پس از هضم آنزیمی فرآ



PCR به دست آمده با آغازگرهای *rbc*l-ORF106.
ترتیب نمونه ها در کلیه تصاویر از چپ به راست عبارتند از : سایز مارکر،'Bruno' ،'Monty' ،'Tomuri' ، 'Hayward' ،'Allison' ،'Abbott' و 'Matua'

با PCR مستقیم توسط آغازگرهای **SCARs**، با استفاده از جفت آغازگر (Smyf-Smyr)؛ ارقام'Bruno' ،'Tomuri' ، 'Abbott' و 'Matua' با الگوی باندی یکسان از ارقام 'Hayward' ،'Monty' و 'Allison' تفکیک شدند (شکل ۲-الف).



شکل ۲ : باند های حاصل از PCR بدست آمده با آغازگرهای
الف) SmYf و SmYr
ب) SmYf1 و SmYr1

همچنین همانطور که در شکل ۲-ب نشان داده شده است جفت آغازگر Smyr1 و Smyf1 با تکثیر یک قطعه bp ۹۰۰ در رقم نر'Tomuri' آن را از ارقام دیگر سوا نمود.

Shirkot و همکاران (۲۰۰۱) برای تعیین جنسیت در کیوی با نشانگر های RAPD، از ۳٤ نوع آغازگر در مرحله اول و سپس ۲۱ نوع انتخاب شده در مرحله دوم استفاده کردند که دو آغازگر OPN05 و OPU01 چند شکلی وابسته به جنس نر نشان دادند. در آزمایش اول این تحقیق دو آغازگر اخیر مورد استفاده قرار گرفتند اما بعد از PCR هیچ باندی به دست نیامد. این موضوع می تواند به عدم تکرار پذیری RAPD مربوط باشد که دلایل آن عبارتند از : استفاده از آغازگر های کوتاه (۱۰ نوکلئوتیدی)، دمای پایین (٤۲-۳٦ درجه سانتی گراد) اتصال آغازگرها به DNA ی الگو که باعث تکثیر غیر اختصاصی و تصادفی برخی از نقاط می شود و حساسیت فوق العاده به آلودگی.

در آزمایش دوم ، براساس تحقیق انجام شده توسط Asadi Abkenar و همکاران (۲۰۰٤) با آنالیز DNA کلروپلاست به روش PCR-RFLP هدف آن بود که چند شکلی را در رقم های نر و ماده بررسی نماییم. برای این منظور از جفت آغازگر *rbc*l-ORF106 استفاده شد ولی پس از PCR و هضم آنزیمی چند شکلی به دست نیامد. با توجه به این که از تعداد محدودی ترکیب آغازگر و آنزیم برشگراستفاده شد، انتظار می رود که با بکارگیری ترکیب آغازگرها و آنزیم های بیشتر بتوان دو رقم نر را از یکدیگر واز ارقام ماده سوا نمود. نتیجه این کار می تواند در تائید هویت هیبریدها مورد استفاده قرار گیرد، زیرا طبق نتایج Chat و همکاران (۱۹۹۹) در کیوی DNA کلروپلاست از والد پدری به ارث می رسد، همچنین اگر در نتاج یک تلاقی معین نشانگر مولکولی مربوط به پدر مشاهده شود می توان یقین حاصل کرد که آلودگی به گرده دیگر که توسط باد یا زنبور عسل به وجود می آید، وجود نداشته است.

در مرحله سوم، براساس تحقیق انجام شده توسط Gill و همکاران (۱۹۹۸) که با توسعه نشانگر های وابسته به جنس تعیین جنسیت در گونه *Actinidia chinensis* را دنبال می کردند، دو جفت آغازگر Smyf-Smyr و Smyf1-Smyr1 انتخاب شدند. پس از PCR، رقم 'Tomuri' از پنج رقم ماده و دیگر رقم نر سوا گردید. قطعه ۹۰۰bp مشاهده شده در رقم 'Tomuri' در رقم نر 'Matua' مشاهده نشد این درحالی است که قطعه اخیر به عنوان نشانگر تعیین کننده جنس نر معرفی شده بود. در به نژادی کیوی از نتیجه این تحقیق شاید بتوان برای تعیین جنسیت نهال های بذری با والد پدری 'Tomuri' در زمانی که تنها دو یا چند برگ دارند استفاده کرد. با توجه به این که حدود ۵ سال طول می کشد تا نهال بذری به بار بنشیند، وقت و هزینه زیادی صرف نگهداری نهال های نر می شود که محصولی تولید نمی کنند و این از نظر اقتصادی به صرفه نیست. یافتن نشانگر وابسته به جنس می تواند باعث صرفه جویی در وقت و دیگر هزینه ها گردد. در آخر پیشنهاد می شود جمعیتی شامل والد پدری'Tomuri' با این روش آنالیز گردد تا صحت فرضیه بالا به اثبات برسد.

منابع

Asadi Abkenar, A., Isshiki, S., Tashiro, Y., 2004. Phylogenetic relationships in the ''true citrus fruit trees'' revealed by PCR-RFLP analysis of cpDNA. Sci. Horti. 88, 233 -242.

Chat, J., Chalak, L., Petit, R.J., 1999. Strict paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in intraspecific crosses of kiwifruit. Theor Appl Genet 99, 314- 322.

Ferguson, A. R., 1990. The genus *Actinidia*. In: Warrington, I. J, Weston, G.C.(eds), Kiwifruit : science and management. Ray Richards Publ. Auckland, NZ, pp 15-35.

Gill, G.P, Harvey, C.F., Gardner, R.C., Fraser, L.G., 1998. Development of sex-linked PCR markers for gender identification in *Actinidia*. Theor Apple Genet 97, 439-445.

Shirkot, P., Sharma, D.R., Mohapatra, T., 2002. Molecular identification of sex in *Actinidia deliciosa* var. *deliciosa* by RAPD markers. Sci. Horti. 94, 33-39.