بررسی فراوانی آلل های خودناسازگاری (S) در تعدادی از ارقام و ژنوتیپ های سیب بومی ایران

مهین نیازی زینی ونی [۱*]، رحیم قره شیخ بیات [۲]، حسن حاج نجاری [۲]
۱-دانشجوی کارشناسی ارشد باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج.
۲- استادیار، عضو هیئت علمی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذرکرج.
Mahinniazi@yahoo.com*

چکیده

گونه سیب از نظر گیاهشناسی نوعاً خودناسازگار است و جهت لقاح و تولید میوه نیاز به رقم گرده افشان دارد. در این مطالعه، خودناسازگاری بر ۲۲ رقم و ژنوتیپ سیب ایرانی و ۳ رقم سیب تجارتی وارداتی به کمک واکنش زنجیره ای پلیمراز و با استفاده از ۸ جفت آغازگر اختصاصی مطالعه شد. نتایج نشان داد ارقام و ژنوتیپ های عسلی، آی آر آی۶ (S۳)، مشهد (S۱)، آی آر آی۸ (S۲) یک آلل، در ارقام و ژنوتیپ های قره قاچ، گلاب اصفهان، زینتی، آی آر آی۱، آی آر آی۵، گلدن اسموتی و گلدن دلیشز دو آلل (S۲S۳) و در ارقام و ژنوتیپ های نارسیب مشهد، اردبیل۲ (S۱S۲S۳)، و ژنوتیپ انگلیسی شیراز (S۲S۳S۴) سه آلل شناسایی شد. در بقیه ارقام و ژنوتیپ ها هیچ آلل ناسازگاری در دامنه S۱ تا S۱۰ یافت نشد همچنین ژنوتیپ S۲S۳ در رقم گلدن دلیشز که به عنوان شاهد مورد بررسی قرار گرفت، تایید شد. فراوانی آلل های S۱، S۲ و S۳ در این تحقیق در بین نمونه های مورد مطالعه قابل ذکر است.

واژه های کلیدی: سیب ،خودناسازگاری ، S-alleles، PCR.

مقدمه

سیب از مهمترین محصولات باغی است که هر ساله سهم زیادی از تجارت محصولات کشاورزی را به خود اختصاص داده است. تنوع ژنتیکی و سازگاری گسترده به شرایط مختلف آب و هوائی باعث شده است که این درخت گسترده ترین میوه کشت شده در مناطق معتدله باشد . گونه سیب از نظر گیاهشناسی نوعاً خودناسازگار است و جهت لقاح و تولید میوه نیاز به رقم گرده افشان دارد. خودناسازگاری یک صفت ژنتیکی است و از بارور شدن گل ها توسط دانه گرده خودی یا دانه گرده رقم دیگر با آلل های S یکسان جلوگیری می کند. در اکثر گونه های گیاهی، خودناسازگاری توسط یک مکان ژنی با چند آلل کنترل می شود(هوی تیک و همکاران، ۲۰۰۸) مزیت روش مولکولی مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در آن است که به درخت بالغ و گل برای تعیین ناسازگاری نیازی نیست و با مقدار کمی از بافت گیاهی می‌توان آلل های ناسازگاری را در ژنوتیپ مورد مطالعه تعیین کرد(نصرآبادی و همکاران، ۱۳۹۰). شناسایی آلل های خودناسازگاری جهت انتخاب صحیح درختان گرده زا و افزایش عملکرد در باغ های تجارتی و همچنین در برنامه های اصلاحی به منظور اطمینان از موفقیت در تلاقی های کنترل شده حائز اهمیت می باشد (اتحادپور و همکاران، ۱۳۹۰)

مواد و روش ها

این تحقیق بر ۲۲ رقم و ژنوتیپ سیب ایرانی شامل قره قاچ، عسلی، اردبیل۱، گلشاهی، مشهد، اهر۲، شیشه ای تبریز، پاییزه مشهد، شیخ احمد، مربایی، نارسیب مشهد، گلاب اصفهان، زینتی، اردبیل۲، آی آر آی۱، آی آر آی۳، آی آر آی۴، آی آر آی۵، آی آر آی۶، آی آر آی۸، انگلیسی شیراز و سه رقم سیب تجارتی وارداتی به اسامی گلدن اسموتی، گلدن دلیشز(شاهد) و تاپ رد دلیشز، صورت گرفت. نمونه ها ی برگ در بهار ۱۳۹۱ از درختان کلکسیون ملی ارقام تجارتی سیب واقع در ایستگاه تحقیقات باغبانی کمال شهر وابسته به موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج در استان البرز جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل و سپس در یخچال ۸۰- تا موقع شروع آزمایش ها نگهداری شدند . استخراج دی.ان.ا با روش CTAB صورت گرفت .تکثیر دی.ان.ا با استفاده از ۸ جفت آغازگر اختصاصی (شن شان و همکاران، ۲۰۱۰)، (جدول ۱) به کمک واکنش زنجیره ای پلیمراز برای شناسایی آلل های

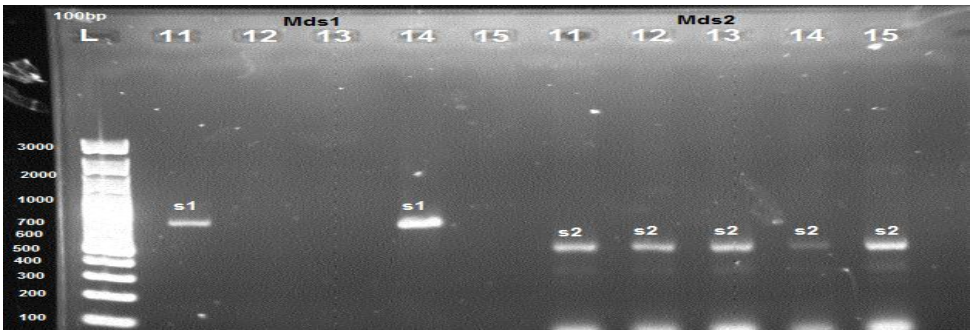
خودناسازگاری صورت گرفت. بعد از استخراج دی. ان. ای.، کیفیت و کمیت آن با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر نانودراپ و الکتروفورز تعیین گردید. واکنش زنجیره ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرو لیتر با استفاده از 2X PCR Master Kit CinnaGen مطابق پروتکل توصیه شده شرکت سازنده و با استفاده از ۱ میکرولیتر نمونه دی ان ای با غلظت ۵۰ نانوگرم انجام گرفت. برنامه چرخه حرارتی برای هر آغازگر جداگانه با در نظرگرفتن دمای اختصاصی اتصال آغازگر به صورت ۳۰چرخه شامل واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر(اختصاصی برای هر آغازگر مطابق جدول ۱) به مدت ۳۰ ثانیه، و بسط دی ان ای در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، تنظیم شد. محصولات پی سی آر بر روی ژل آگارز ۲-۱,۵ درصد، الکتروفورز شده و به کمک دستگاه ژل داک، الگوی باندهای تکثیر یافته ظاهر شده و مورد آنالیز قرار گرفتند.

جدول ۱- آغازگرهای اختصاصی استفاده شده در این تحقیق به همراه دمای اتصال اختصاصی، (شن شان وهمکاران، ۲۰۱۰)

نام آغازگر	توالی ´۳ -´۵	دمای اتصال(C^o)
MdS1SpF	´۳-TgT-AAg-gCA-CCg-CCA-TAT-CAT-A-<C>-´۵	۶۲
MdS1SpR	´۳-CAA-CCT-CCA-ATT-CAg-TCA-ATg-<A>-´۵	
MdS2SpF	´۳-AAC-ATg-AAT-CgA-AgT-gAA-TTA-TTT-<A>-´۵	۵۵
MdS2SpR	´۳-Agg-TTT-ggT-TCC-TTA-CCA-T-<g>- ´۵	
MdS2SpF	´۳-ggC-Gaa-AAT-TAA-ACC-ggA-Gaa-Ga-<A>-´۵	۵۸
MdS3SpR	´۳-CCT-CTC-gTC-CTA-TAT-ATg-gAA-ATC-A-<C>-´۵	
MdS4SpF	´۳-ATT-gCA-AgA-CAA-ggA-ATC-gTC-ggA-<g>-´۵	۶۳
MdS4SpR	´۳-AgA-AAT-gTg-CTC-TgT-TTT-TAT-C-<g>-´۵	
MdS5SpF	´۳-ggT-CAA-ACC-CAC-ggC-gTC-TC-<A>-´۵	۶۳
MdS5SpR	´۳-ATT-CAg-TTA-TCC-CAT-TCT-TC-<g>-´۵	
MdS7SpF	´۳-AgT-AAA-TCA-ACC-gTg-gAT-gCT-CA-<g>-´۵	۶۳
MdS7SpR	´۳-TTA-CAA-TAT-CTA-CCT-gTT-TCC-Tgg-<g>-´۵	
MdS9SpF	´۳-CCA-CTT-TAA-TCC-TAC-TCC-TTg-Tag-<A>-´۵	۶۳
MdS9SpR	´۳-CCA-CTT-TAA-TCC-TAC-TCC-TTg-TAg-<A>-´۵	
FTC12a	´۳-CCA-AAC-gTA-CTC-AAT-CgA-A-<g>-´۵	۶۶
MdS10SpR	´۳-TCC-CgT-gTC-AAT-AAT-CTC-C-<C>-´۵	

نتایج وبحث

مطالعات حاضر اولین بررسی های مولکولی بر ۲۲ رقم سیب ایرانی ذکر شده بوده که در این تحقیق با استفاده از ۸ جفت نشانگر اختصاصی مورد آزمایش قرار گرفتند . با توجه به آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق، فراوانی آلل های S1، S2 وS3 در بین ارقام مورد بررسی مشخص شد. نتایج نشان داد که ارقام و ژنوتیپ های قره قاچ، عسلی، مشهد، نارسیب مشهد، گلاب اصفهان، زینتی، اردبیل۲، انگلیس شیراز، آی آر آی۱، آی آر آی۵، آی آر آی۶، آی آر آی۸، گلدن اسموتی، گلدن دلیشز، تاپ رد دلیشز دارای آلل خودناسازگاری می باشند (شکل ۱- تشکیل باند در برخی ارقام را نشان می دهد) و در بین این ارقام نارسیب مشهد، اردبیل۲ و ژنوتیپ امید بخش انگلیسی شیراز هر کدام تولید ۳ باند با اندازه های متفاوت، ارقام تری پلوئید شناخته شدند (جدول ۲)



شکل ۱- باندهای اختصاصی آلل s۱ و s۲ در ارقام نارسیب مشهد۱۱، گلاب اصفهان۱۲، زینتی۱۳، اردبیل۱۴۲،انگلیسی شیراز۱۵.

جدول ۲- الگو و ترکیب آلل های شناسایی شده

		آغازگرهای اختصاصی									
شماره	ژنوتیپ/ رقم	۱MdS	۲MdS	۳MdS	۴MdS	۵MdS	۷MdS	۹MdS	MdS۱۰	ترکیب آلل ها
۱	قره قاچ	–	+	+	–	–	–	–	–	S2 S3
۲	عسلی	–	–	+	–	–	–	–	–	S3 S?
۳	اردبیل۱	–	–	–	–	–	–	–	–	–
۴	گلشاهی	–	–	–	–	–	–	–	–	–
۵	مشهد	+	–	–	–	–	–	–	–	S1 S?
۶	اهر۲	–	–	–	–	–	–	–	–	–
۷	شیشه ای تبریز	–	–	–	–	–	–	–	–	–
۸	پاییزه مشهد	–	–	–	–	–	–	–	–	–
۹	شیخ احمد	–	–	–	–	–	–	–	–	–
۱۰	مربایی	–	–	–	–	–	–	–	–	–
۱۱	نارسیب مشهد	+	+	+	–	–	–	–	–	S1 S2 S3
۱۲	گلاب اصفهان	–	+	+	–	–	–	–	–	S2 S3
۱۳	زینتی	–	+	+	–	–	–	–	–	S2 S3
۱۴	اردبیل۲	+	+	+	–	–	–	–	–	S1 S2 S3
۱۵	انگلیسی شیراز	–	+	+	+	–	–	–	–	S2 S3 S4
۱۶	گلاب کهنز	–	–	–	–	–	–	–	–	–
۱۷	آی آر آی۱	–	+	+	–	–	–	–	–	S2 S3
۱۸	آی آر آی۳	–	–	–	–	–	–	–	–	–
۱۹	آی آر آی۴	–	–	–	–	–	–	–	–	–
۲۰	آی آر آی۵	–	+	+	–	–	–	–	–	S2 S3
۲۱	آی آر آی۶	–	–	+	–	–	–	–	–	–
۲۲	آی آر آی۸	–	+	–	–	–	–	–	–	S2 S?

۲۳	گلدن اسموتی	–	+	+	–	–	–	–	–	S2 S3
۲۴	گلدن دلیشز	–	+	+	–	–	–	–	–	S2 S3
۲۵	تاپ رد دلیشز	–	–	–	–	–	–	–	–	–

پیش از این ارشادی (۱۳۸۲) هیچ گونه آلل خودناسازگاری را در رقم گلاب اصفهان شناسایی نکرد این در حالی است که در تحقیق حاضر دو آلل خوناسازگاری S۲ S۳ در رقم گلاب اصفهان مشخص شد. همچنین آلل های S۲ S۳ در رقم تجارتی گلدن دلیشز که به عنوان شاهد مورد بررسی قرار گرفت، شناسایی شد که قبلا این آلل ها توسط کیتاهارا و همکاران (۲۰۰۵) شناسایی شده بودند. نتایج نشان داد که ژنوتیپ انگلیسی شیراز، دارای ژنوتیپ S2S3S4 است. این آلل ها در سیب "Charden " (شن شان و همکاران ۲۰۱۰) گزارش شدند. یکی از نتایج حائز اهمیت در این تحقیق دستیابی به ترکیب و تلاقی های سازگار و ناسازگار است که می تواند در برنامه های احداث باغ های جدید و نیز در انتخاب والدین در برنامه های بهنژادی مورد استفاده قرار گیرد. به طوری که ژنوتیپ هائی که دارای آلل های یکسانی هستند در گروه خودناسازگار قرار می گیرند. در این میان ژنوتیپ های تری پلوئید وضعیت خاصی دارند چرا که پلی پلوئیدی می تواند خودناسازگاری را در هم بشکند و موانع خودتلقیحی را از میان بردارد. در مورد ارقامی که ژنوتیپ لوکوس اس آنها با این تحقیق مشخص گردید نتایج مستقیماً قابل استفاده هستند و در مورد تعدادی از ارقام که ژنوتیپ آن ها به طور نسبی مشخص گردید و یا اصلاً هیچ آللی برای آن ها شناسائی نشد می توان به میزان اشتراک آلل های آنها پی برد و در ترکیب ارقام جهت احداث باغ و انتخاب والدین، این نتایج را مورد استفاده قرار داد.

فهرست منابع

۱)ارشادی، ا. ۱۳۸۲ . بررسی گرده افشانی و تشکیل میوه و ارزیابی ارقام سیب ایرانی با استفاده از نشانگرهای مولکولی، پایان نامه دکتری دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

۲) اتحادپور، م .،م . ر. فتاحی مقدم ، و ذ. زمانی.۱۳۹۰. شناسایی و تکثیر آلل های خودناسازگاری در برخی از ژنوتیپ های آلو با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز، هفتمین کنگره علوم باغبانی ایران

۳) نصرآبادی، م .، ا، سیفی، س، رمضانپور، و م. شریفانی. ۱۳۹۰ . تعیین آلل S1 خودناسازگاری در بعضی از ارقام بومی سیب با سه آغازگر مختلف، هفتمین کنگره علوم باغبانی ایران

4)Hoytaek, k., P. Jongin, H. Yutaka, and N. IIIs up. 2008. Molecular characteri zation of New s-RNases (S31 and S32) in Apple (Malus × domestica Borkh). Jourunal of Plant Biology 51 (3): 202-208

5)Kitahara, K. & S. Matsumota, T. Yamamota, J. Soejima, T. Kimura, H. Komatsu, and K. Abe. 2005. Molecular characterization of apple cultivars in Japan by S-RNase and SSR markers. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 130(6): 885-892.

7)Shenshan, L., Li. Maofu, H. Zhenhai, W. Kun. 2010. Characterization of three new S-alleles and development of an S-allele-specific PCR system for rapidly identifying the S-genotyp in apple cultivars. Genetics & Gonomes 6: 161-168.

Evaluation of S-alleles frequency in Iranian endemic apples(Malus domestica BORKH).

M. Niazi zeinivani[1*], R. Gharesheikhbayat[2] and H. Hajnajari[2]

1- Horticulture M.Sc. student, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University of Karaj.

2- Research Assistant professor, Horticulture Department, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj.

*Mahinniazi@yahoo.com

Abstract

Almost all apple (Malus domestica Borkh) varieties are self-incompatible and need cross pollination for fertilization and producing fruits. In this study 22 Iranian endemic cultivars and promising genotypes are evaluated for their S alleles combination by PCR based experiments using eight S-allele specific primers according to high frequency of these alleles reported for apple, previously. We identified S1 for MASHAD, S3 for ASALI and IRI6, S2 for IRI8. S2S3 genotype for GHAREGHACH, GOLAB IESFAHAN, ZINATI, IRI1, IRI5, GOLDEN SMOTHY, and GOLDEN DELECIOUS.cultivars. S1S2S3 genotype was assigned to NARSIB E MASHAD and ARDEBIL cultivars and S2S3S4 to ENGLISI SHIRAZ, indicating triploid situation of these three cultivars. The S2S3 genotype of GOLDEN DELICIOUS as control in the experiments, was confirmed. For remain cultivars no s-allele were detected by applying these set of primers. The frequency of alleles S1, S2 and S3 is considerable.

Keywords: Apple, Incompatability, S-alleles، PCR.