هفتمین کنگره علوم باغبانی ایران، ١٤ تا ١٧ شهریور ماه ١٣٩٠،دانشگاه صنعتی اصفهان

شناسایی و تکثیر آلل های خودناسازگاری در برخی از ژنوتیپ های آلو با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلیمراز

مرضیه اتحادپور (۱)، محمدرضا فتاحی مقدم (۲)، ذبیح اله زمانی (۳)

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد ۲ و ۳- دانشیار گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

به نظر می رسد که بیشتر ژنوتیپ‌های آلو خودناسازگار بوده و جهت تشکیل میوه کافی به دگرگرده افشانی نیاز دارند. در این بررسی، ژنوتیپ‌های S-RNase مربوط به ٣٤ ژنوتیپ آلو از مناطق مختلف کشور به همراه ۵ رقم تجاری و نمونه میروبالان بوسیله تکثیر آلل‌های S با جفت آغازگرهای دژنره و به روش PCR مورد مطالعه قرار گرفت. با استفاده از جفت آغازگرهای دژنره EM PC2consFD/ EM PC3consRD تعداد ٢٣ باند در محدوده ١٨٣٠-٣٢٠ جفت باز مشاهده شد که ١٤ باند مربوط به آلل‌هایی بودند که قبلا توسط سایر محققین گزارش شده بودند و ۹ باند جدید بود. در ژنوتیپ‌های مورد بررسی، ٢٣ ژنوتیپ تعداد دو باند نشان دادند که هتروزیگوتی در این مکان را نشان می‌دهد و بقیه ژنوتیپ‌ها فقط یک باند نشان دادند. بر اساس نتایج به‌دست آمده آلل‌های S_c، باند bp ٦٢١ و S_i بیشترین فراوانی را در ژنوتیپ آلو های ایرانی داشتند که آلل S_c بیشترین فراوانی را در جمعیت ولیان کرج نشان داد. جفت آغازگر دژنره PaConsI-F/ EM PC5consRD تعداد ١٤ باند در محدوده ٢٤٩۵-٨٧۵ جفت باز در ژنوتیپ‌های مورد بررسی ایجاد کرد. نتایج این بررسی نشان داد که PCR یک روش سریع و مؤثر برای تعیین ژنوتیپ های خودناسازگاری در آلو می‌باشد.

کلمات کلیدی: خودناسازگاری گامتوفیتیک، *Prunus saliciana*، آغازگرهای دژنره، آلل‌های S-RNase

مقدمه:

شناسایی آلل‌های خودناسازگاری جهت انتخاب صحیح درختان گرده‌زا و افزایش عملکرد در باغهای تجاری و همچنین در برنامه‌های اصلاحی به منظور اطمینان از موفقیت در تلاقیهای کنترل شده حائز اهمیت می‌باشد. هدف این بررسی شناسایی آلل‌های ناسازگاری در ژنوتیپ‌های آلوی موجود در ایران و چند ژنوتیپ تجاری با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بوده است.

مواد و روش‌ها:

مواد گیاهی در این تحقیق شامل ٣٤ ژنوتیپ آلو موجود در ایستگاه تحقیقات گروه علوم باغبانی دانشگاه تهران در کرج که از مناطق مختلف کشور جمع آوری شده است به همراه ۵ رقم تجاری و نمونه میروبالان بودند (جدول ١).

جدول ١) اسامی ژنوتیپ‌های آلوی مورد بررسی

شماره	ژنوتیپ	شماره	ژنوتیپ	شماره	ژنوتیپ	شماره	ژنوتیپ
١	جواهرده١	١١	4M-47	٢١	برجی نیشابور ٢	٣١	86-n-4
٢	جواهرده٢	١٢	86-4mm-15	٢٢	آلوی وحشی	٣٢	18-3
٣	جواهرده٣	١٣	ولیان ١	٢٣	آلوی شیرین هسته جدا (چناران)	٣٣	86-b3-4
٤	جواهرده٤	١٤	ولیان ٢	٢٤	اسجیل (چناران)	٣٤	درگزی
۵	4M-63	١۵	ولیان ٣a	٢۵	آلوچه کلات نادر٢	٣۵	سانتاروزا
٦	4M-25	١٦	ولیان ٣b	٢٦	آلوچه کلات نادر٤	٣٦	شابرون
٧	4M-91	١٧	ولیان ٤	٢٧	بی نام١	٣٧	مجار
٨	4M-69	١٨	ولیان ۵	٢٨	٣-۵١-٨٦	٣٨	شایرو
٩	4M-44	١٩	ولیان ٦	٢٩	بی نام ٢	٣٩	قطره طلا
١٠	4M-12	٢٠	برجی نیشابور ١	٣٠	n-1	٤٠	میروبالان

استخراج DNA از نمونه های برگی و با استفاده از روش موری و تامسون (١٩٨٠) با اندکی تغییرات صورت گرفت. برای تکثیر عمومی آلل‌های S از جفت آغازگر دژنره اینترون دوم شامل آغازگر پیش‌رو EM PC2consRD و پس‌رو EM

PC3consRD و جفت آغازگر دژنره جفت اینترون شامل آغازگر پیش‌رو PaConsI-F (Sonneveld et al., 2003) با آغازگر پس‌رو EM PC5consRD استفاده گردید. الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز انجام گردید. رنگ آمیزی ژل در محلول اتیدیوم انجام شد. اندازه باندهای تکثیر یافته در ارقام آلو با استفاده از نشانگر اندازه یک کیلو جفت بازی (ساخت شرکت Fermentase به شماره کاتالوگ ٠٣٣١ SM) مقایسه شدند. اندازه آلل‌های S آلو که توالی یابی آنها در NCBI گزارش شده بدست آمدند و با اندازه باندهای بدست آمده در این بررسی مقایسه شدند.

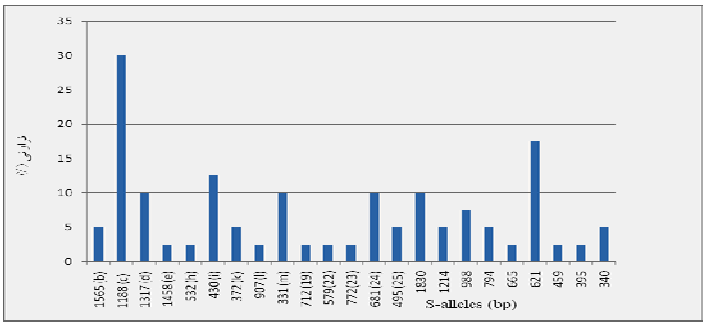
نتایج و بحث: بر اساس نتایج بدست آمده از تکثیر آلل‌های S آلو بوسیله جفت آغازگر مربوط به اینترون دوم هسته‌دارها، ٢٣ باند با اندازه‌های ١٨٣٠-٣٢٠ مشاهده شد که ١٤ آلل آن قبلا شناسایی شده بود و ٩ باند با طول‌های متفاوت بدست آمد (جدول ٢). در ژنوتیپ‌های مورد بررسی، ٢٣ ژنوتیپ دو باند نشان دادند که نشان دهنده هتروزیگوت بودن مکان S آنها می‌باشد بقیه ژنوتیپ‌ها فقط یک باند نشان دادند که ممکن است به دلیل هموزیگوت بودن در مکان S باشد (جدول ٣). ژنوتیپ‌هایی که دارای یک آلل S مشترک هستند سازگاری نسبی با یکدیگر داشته و پتانسیل پایینی به عنوان گرده دهنده برای یکدیگر دارند. در این پژوهش آلل خودباروری (S_e) در ژنوتیپ‌های ولیان ٤، n-1 و آلوی وحشی شناسایی شد. آلل S_e به عنوان آلل خودسازگاری در آلو شناخته شده است که معادل S_5 است. Halasz (٢٠٠٧) طول باند bp ١٤٥٠ را با استفاده از آغازگر EM PC2consFD/ EM PC3consRD برای S_e در نظر گرفتند.

جدول ٢) اندازه باندهای مشاهده شده، اندازه نزدیکترین آلل در NCBI و تفاوت آلل های مشاهده شده با آلل‌های متناظر در NCBI

اندازه باندهای مشاهده شده (bp)	نزدیکترین آلل در NCBI (bp)	نام آلل	اندازه باندهای مشاهده شده (bp)	نزدیکترین آلل در NCBI (bp)	نام آلل
1574	1565	S_b	364	372	S_k
1430	1458	S_e	326	331	S_m
1317	1317	S_d	* اندازه باندهای جدید مشاهده		
1181	1188	S_c	1214	-	S_{II}
923	907	S_l	988	–	S_{III}
768	772	S_{23}	794	–	S_{IV}
731	712	S_{19}	665	–	S_V
692	681	S_{24}	621	–	S_{VI}
596	579	S_{22}	459	–	S_{VII}
534	532	S_h	395	–	S_{VIII}
505	495	S_{25}	340	–	S_{IX}
412	430	S_i			

* نام باندهای جدید با حروف یونانی مشخص شده است.

بر اساس نتایج بدست آمده با استفاده از روش PCR آلل S_c، باند ٦٢١ و آلل S_i بیشترین فراوانی را در ژنوتیپ‌های آلو ایرانی داشتند که آلل S_c بیشترین فراوانی (١٧/١ درصد) را در جمعیت ولیان کرج نشان داد. (شکل ١).



شکل ۱) مقایسه فراوانی نسبی آلل‌های S در ژنوتیپ‌های مورد بررسی آلو با استفاده از جفت آغازگر EM PC3consRD EM PC2consFD/

تعداد ۱۴ باند با اندازه‌های ۲۴۹۵-۸۷۵ با استفاده از جفت آغازگر مربوط به هر دو اینترون مشاهده گردید. به دلیل عدم وجود توالی‌های مربوط به اینترون اول در NCBI، نوع آلل تکثیر شده با این روش مشخص نگردید.

جدول ۳) طول باند S در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با استفاده از دو جفت آغازگرهای EM PC2consFD/ EM PC3consRD و PaConsI-F/ EM PC5consRD

شماره	رقم	ژنوتیپ	اندازه باند	شماره	رقم	ژنوتیپ	اندازه باند مشاهده شده
۱	جواهر ده۱	S_c	۱۶۶۰,۱۹۰۵	۲۱	برجی نیشابور ۲	S_{VIII}	۱۰۷۰,۱۶۶۰
۲	جواهر ده۲	S_c	۱۰۲۰,۱۶۶۰	۲۲	آلوی وحشی	S_IS_e	۱۶۶۰,۲۴۹۵
۳	جواهر ده۳	S_dS_m	۱۶۶۰	۲۳	آلوی شیرین	$S_{II}S_i$	۱۲۵۰,۱۸۰۰
۴	جواهر ده۴	$S_{IV}S_{25}$	۱۱۷۰,۱۶۶۰	۲۴	اسجیل (چناران)	S_{VII}	۱۰۷۰
۵	4M-63	S_d	۱۶۶۰,۲۱۴۱	۲۵	آلوچه کلات	S_I S_{VI}	۲۴۹۵و۱۸۰۰
۶	4M-25	S_{24} S_I	۱۵۲۰,۲۴۹۵	۲۶	آلوچه کلات	S_c S_{VI}	۱۳۹۰,۱۹۰۵
۷	4M-91	S_dS_m	۹۴۰,۲۱۴۱	۲۷	بی نام۱	$S_{VI}S_m$	۸۷۵
۸	4M-69	S_IS_d	۲۴۹۵و۲۰۵۳	۲۸	۳-۵۱-۸۶	S_{VI} S_V	۱۰۲۰,۱۲۵۰
۹	4M-44	S_cS_{III}	۱۶۶۰,۱۹۰۵	۲۹	بی نام ۲	$S_{23}S_i$	۱۵۲۰
۱۰	4M-12	S_c	۱۹۰۵	۳۰	n-1	S_e S_I	۲۱۴۱,۲۴۹۵
۱۱	4M-47	S_cS_{III}	۱۲۵۰,۱۹۰۵	۳۱	86-n-4	S_{VI}	۱۶۶۰,۲۱۴۱
۱۲	86-	$S_{22}S_{24}$	۱۳۹۰,۱۶۶۰	۳۲	18-3	S_{VI} S_c	۱۹۰۵
۱۳	ولیان ۱	S_{IX}	۱۰۲۰,۱۶۶۰	۳۳	86-b3-4	S_i	۱۱۷۰
۱۴	ولیان ۲	S_c	۱۰۲۰,۲۰۵۳	۳۴	درگزی	S_kS_{24}	–
۱۵	ولیان ۳a	S_cS_I	۱۰۲۰ ,۱۶۶۰	۳۵	سانتاروزا	S_bS_c	۱۹۰۵,۲۲۸۰
۱۶	ولیان ۳b	S_{IX}	۸۷۵,۹۴۰	۳۶	شابرون	S_bS_c	۱۹۰۵,۲۲۸۰
۱۷	ولیان ۴	S_e	۲۱۴۱	۳۷	مجار	$S_{19}S_{24}$	۱۳۹۰,۱۵۲۰
۱۸	ولیان ۵	S_k	۱۰۲۰,۹۴۰	۳۸	شایرو	S_hS_i	۱۰۷۰,۱۲۵۰
۱۹	ولیان ۶	S_c	۱۹۰۵	۳۹	قطره طلا	$S_{IV}S_{25}$	۱۱۷۰,۱۳۹۰,۱۵۲۰,۲۲۸۰
۲۰	برجی	-	–	۴۰	میروبالان	S_kS_{24}	–

سازگاری و عدم سازگاری در گرده‌افشانی بین ژنوتیپ ها از اهمیت ویژه ای برخوردار است و با تعیین دقیق آلل های ناسازگاری در برنامه های اصلاحی می توان از آن ها استفاده کرد و مشکلات موجود بر سر راه تشکیل میوه را برداشت و در صورت احداث باغ های جدید از خسارت احتمالی وارده جلوگیری کرد. لازم است مطالعات در این زمینه برای تعیین تطابق گلدهی ارقام و مشخص نمودن دوره گرده‌افشانی موثر ادامه یابد.

منابع

Halasz, J. 2007. DNA-based S-genotyping of Japanese Plum and Pluot cultivars to clarify incompatibility relationship. HortScience. 42:46–50.
Hegedus, A. and Halasz, J. 2006. Self- incompatibility in plums (prunus salicina Lindl., prunus cerasifera Ehrh. and prunus domestica L.). International Journal of Horticultural Science. 12: 137–140.
Lopez, M., Vargas, F.J. and Batlle, I. 2006. Self-incompatibility in almond genotypes: A review. Euphytica 150:1-16.

Identification and amplification of self incompatibility alleles in some plum genotypes by PCR

It seems that most Japanese plum-type cultivars are self-incompatible and cross pollination is necessary to ensure fruit set. In this study, the S-RNase genotype of 36 plum genotypes from different area of Iran, four commercial cultivars and Mirobolan cultivar were determined by PCR amplification of the S-RNase gene.
A total of 23 bands ranged 320-1830 bp were amplified using EM PC2consFD/ EM PC3consRD primers that 14 alleles were already reported by researchers and 9 bands were new. Twenty-three genotypes amplified two bands showing hetetrozigoty in this locus and the rest of them indicated one band. According to the results S_c, 621 bp and S_i had the highest frequencies that S_c had highest frequency (17.1%) in Velian Karaj population. PaConsI-F/ EM PC5consRD primers produced 14 bands ranged 875-2495 bp in all genotypes. The results of this study showed that PCR was a rapid and effective method for determination of S genotypes in plum.
Key words: *Prunus salicina*, S-RNase alleles, Gametophytic self-incompatibility