

شناسایی نتاج جنسی در جمعیت حاصل از دورگ‌گیری بین مینوولا تانجلو در شانگشا با برخی از ارقام پرتفال و نارنگی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره (SSR)

بهروز گلعین، مالک قاسمی، رضا فیضایی، جواد فتاحی مقدم، یحیی تاجور
اعضاء هیئت علمی موسسه تحقیقات مرکبات کشور

در برنامه‌های بهنژادی مرکبات بعد از دورگ‌گیری، تشخیص دانهال‌های جنسی از نوسلاور به منظور حذف گیاهان ناخواسته مشکل است. در این تحقیق به منظور شناسایی دانهال‌های جنسی از غیرجنسی حاصل از دورگ‌گیری بین ارقام مینوولا تانجلو در شانگشا با نارنگی‌های پیچ، شانگشا و یونسی و پرتفال‌های هاملین و مارس (۲۲۷ دانهال) از نشانگرهای SSR استفاده شد. پس از استخراج DNA از نتاج و والدین، واکنش PCR با ۴ تا ۷ جفت آغازگر SSR برای آنها انجام گرفت. در نهایت در این آزمایش، ۱۳۶ دانهال دورگ و ۳۰ دانهال نوسلاور شناسایی و ۶۱ دانهال با استفاده از این نشانگرها قابل تشخیص نبودند.

واژه‌های کلیدی: مرکبات، بهنژادی، ریزماهواره (SSR)، مارکرهای ملکولی، دانهال جنسی

مقدمه

در برنامه‌های بهنژادی مرکبات بعد از دورگ‌گیری، تشخیص نهال‌های بذری با منشأ جنسی در جمعیتی متشكل از درصد بالایی نهال نوسلاور مسئله‌ای مهم قلمداد می‌شود، چرا که نتاج نوسلاور بطور جدی باعث پیچیدگی فعالیت‌های بهنژادی در مرکبات شده و از تولید تعداد کافی نتاج دورگ جهت دستیابی به صفات مطلوب جلوگیری می‌کند (۲). روش‌های متفاوتی از قبیل نورنگاری، مرفلولوژی، کروماتوگرافی و ایزوآنزیم جهت تفکیک دانهال‌های جنسی از نوسلاور گسترش پیدا کرده‌اند. با این وجود، هیچ کدام از این روش‌ها مانند استفاده از نشانگرهای ملکولی دقیق نبوده و نمی‌توانند در مورد انتخاب صحیح دانهال‌ها تشخیص واقعی را ارائه دهند (۳ و ۶). استفاده از چندشکلی DNA برای شناسایی دانهال‌های جنسی در برنامه‌های بهنژادی مرکبات حائز اهمیت بوده به طوری که غربال کردن نتاج را سرعت می‌بخشد. از روش‌های مبتنی DNA، تجزیه ISSR و RAPD، SSR، از روش‌هایی هستند که در سطح وسیع برای تمایز دورگ‌ها در برنامه‌های بهنژادی مرکبات مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱، ۴، ۳، ۵، ۶ و ۷). در کشور اکثر برنامه‌های بهنژادی برای توسعه ارقام یا پایه‌های جدید بر اساس انجام تلاقي‌های کترل شده دستی و انتخاب نمودن انواع برگزیده از بین هزاران دانهال می‌باشد. با توجه به مشکلات تکنیکی و هزینه‌های فراوانی که برای شناسایی دانهال‌های هیبرید و نوسلاور در برنامه‌های بهنژادی سنتی مرکبات در کشور وجود دارد، آزمایشی با هدف تفکیک دانهال‌های جنسی از غیرجنسی در نتاج حاصل از تلاقي دستی بین ارقام مختلف مرکبات با استفاده از نشانگرهای SSR انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

پس از جمع‌آوری نمونه‌های برگی، استخراج DNA انجام گرفت و کمیت و کیفیت DNA حاصله از طریق روش‌های اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد تعیین شد. محصولات PCR از طریق ژل پلی اکریل آمید ۶ درصد تفکیک شده و سپس ژل‌ها با نیترات نقره رنگ‌آمیزی و از آنها عکس برداری به عمل آمد. تشخیص دانهال‌های جنسی از غیرجنسی بر اساس الگوی باندهای نتاج و والدین در مجاورت نشانگر اندازه انجام شد.

نتایج و بحث

تعداد ۷ جفت آغازگر برای تکثیر مکانهای هدف در نتاج حاصل از تلاقي بین ارقام میتولاتانجلو در شانگشا با پیچ، شانگشا، یونسی، هاملین و مارس و والدین آنها آزمون شدند. از بین آنها ۴ نشانگر چندشکلی بالای نشان دادند و تعدادی نتاج نوسلا ر از دورگ با استفاده از آنها تشخیص داده شد. بر اساس الگوی باندهای والدین و نتاج، در توده حاصل از تلاقي بین میتولاتانجلو در شانگشا (والد پدری) با شانگشا (والد مادری) ۳۸ دانهال دورگ و ۱۱ دانهال نوسلا ر، در نتاج حاصل از میتولاتانجلو در شانگشا (والد پدری) با یونسی (والد مادری) ۳۷ دانهال دورگ، در نتاج حاصل از تلاقي بین نارنگی پیچ (والد پدری) و میتولاتانجلو در شانگشا (والد مادری) ۲۵ دانهال دورگ و ۱۰ دانهال نامشخص، در نتاج حاصل از میتولاتانجلو در شانگشا (والد پدری) با نارنگی پیچ (والد مادری) ۱۱ دورگ و ۱۱ دانهال نامشخص، در نتاج حاصل از تلاقي بین نارنگی یونسی (والد پدری) با میتولاتانجلو در شانگشا (والد مادری) همه نمونه‌ها نامشخص (۲۷ نمونه)، در نتاج حاصل از میتولاتانجلو در شانگشا (والد پدری) با پرتقال هاملین (والد مادری) ۱۰ دانهال دورگ، ۱۲ دانهال نوسلا ر و ۲ دانهال نامشخص، در نتاج حاصل از پرتقال هاملین (والد پدری) با میتولاتانجلو در شانگشا (والد مادری) ۱۲ دانهال دورگ، ۷ دانهال نوسلا ر و ۶ دانهال نامشخص و در نتاج حاصل از میتولاتانجلو در شانگشا (والد پدری) با پرتقال مارس (والد مادری) ۳ دانهال دورگ و ۵ دانهال نامشخص تمیز داده شد.

مشاهدات در مورد بررسی استفاده از نشانگرهای SSR در شناسایی دانهالهای دورگ از نوسلا ر مشخص می‌نماید که ژنوتیپ هر گیاه را می‌توان با کمترین اشتباہی ارزیابی نمود. آزمایشات مشابهی در این خصوص توسط محققان دیگر (راثو و همکاران، ۲۰۰۸؛ تان و همکاران، ۲۰۰۷؛ اولیویرا و همکاران، ۲۰۰۲؛ رویز و همکاران، ۲۰۰۰؛ گلین و همکاران، ۱۳۸۴) گزارش شده است که با نتایج تحقیق به عمل آمده مطابقت دارد. اما در مقابل، در این آزمایش تعداد ۱۶ دانهال با استفاده از آغازگرهای آزمون شده غیرقابل تشخیص بودند زیرا باندهای تولید شده در نتاج شبیه باندهای والدین بوده و امکان جداسازی وجود نداشت و به امتیازبندی تعداد بیشتری مکان ثُنی نیاز است. این عدم توانایی در نشانگرهای SSR استفاده شده می‌تواند به دلیل نزدیکی ژنتیکی بسیار زیاد والدین و پایین بودن سطح هتروزیگوتی باشد. در چنین مواردی استفاده از نشانگرهای ملکولی دیگر و صفات مرغولوژی ممکن است سودمند باشد.



شکل ۱- تکثیر آلل‌های SSR از طریق PCR توسط آغازگر TAA15. نمونه‌های دورگ (Z)، نمونه‌های نامشخص (؟)، والد پدری (Mt*Ch = میتوپلاتانجلو در شانگشا) و والد مادری (Page = پیج).

منابع

- ۱- گلعن، بهروز. ۱۳۸۴. شناسایی و جداسازی ریزماهواره‌های مرکبات به منظور تشخیص هیبریدها و ارزیابی پرتقال و نارنگی ایرانی. رساله دکتری باگبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.
- 2- Gmitter, F.G., J.W. Grosser, and A.G. Moore. 1992. Citrus. In: Biotechnology of Perennial Fruit Crops. Hammerschlag, F.A. & Litz, R.E. (eds.). CAB International, Wallingford, Oxon pp. 335-369.
- 3- Oliveira, A.C., A.N. Garcia, M. Cristofani and M.A. Machado. 2002. Identification of citrus hybrids through the combination of leaf apex morphology and SSR markers. Euphytica 128: 397-403.
- 4- Rao, M.N., J.R. Soneji, C. Chen, S. Huang and F. Gmitter. 2008. Characterization of zygotic and nucellar seedlings from sour orange-like citrus rootstock candidates using RAPD and EST-SSR markers. Tree Genetics & Genomes 4: 113-124.
- 5- Rodriguez, M.A., A.V. Monter, G.C. Castaneda and A.G. Velazquez. 2004. Polyembryony and identification of Volkamerian lemon zygotic and nucellar seedlings using RAPD. Pesq. Agropec. Bras., Brasilia, V.39 (6): 551-559.
- 6- Ruiz, C., M.P. Breto and M.J. Asins. 2000. A quick methodology to identify sexual seedlings in citrus breeding programs using SSR markers. Euphytica 112: 89-94.
- 7- Tan, M.L., J.K. Song and X.X. Deng. 2007. Production of two mandarin × trifoliolate orange hybrid populations via embryo rescue with verification by SSR analysis. Euphytica 157: 155-160.

Identification of zygotic seedlings from offspring of crosses between Mineola tangelo and Shangsha with some oranges and mandarins using SSR markers

Golein Behrouz, Malek Ghasemi, Reza Fifaei, Javad Fattahi, Yahya Tajvar
Iran Citrus Research Institute

Abstract

In citrus breeding programs after hybridization, it is difficult to distinguish between zygotic and nucellar seedlings in order to eliminate unwanted genotypes. In this study, microsatellite markers (Simple Sequence Repeats) used to differentiate hybrid from nucellar seedlings derived from crosses between Mineola tangelo*Shangsha with Page, Shangsha, Younesi mandarins and Marss and Hamlin oranges (227 plants). After DNA extraction from parents and offspring, PCR reaction was done by 4-7 microsatellite primer pairs. Finally 136 hybrids, 30 nucellars and 61 unknown seedlings in 227 tested offspring, were recognized.