

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

بهرز گل‌عین، مالک قاسمی، رضا فیفایی، جواد فتاحی مقدم، یحیی تاجور

اعضاء هیئت علمی موسسه تحقیقات مرکبات کشور

در برنامه‌های به‌نژادی مرکبات بعد از دورگ‌گیری، تشخیص دانهال‌های جنسی از نوسلار به منظور حذف گیاهان ناخواسته مشکل است. در این تحقیق به منظور شناسایی دانهال‌های جنسی از غیرجنسی حاصل از دورگ‌گیری بین ارقام مینتولا تانجلو در شانگشا با نارنگی‌های پیچ، شانگشا و یونسی و پرتقال‌های 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 نوسلار 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 متشکل از درصد بالایی نهال نوسلار مسئله‌ای مهم قلمداد می‌شود، چرا که نتاج نوسلار بطور جدی باعث پیچیدگی فعالیت‌های به‌نژادی در مرکبات شده و از تولید تعداد کافی نتاج دورگ جهت دستیابی به صفات مطلوب جلوگیری می‌کنند (۲). روش‌های متفاوتی از قبیل نورنگاری، مرفولوژی، کروماتوگرافی و ایزوآنزیم جهت تفکیک دانهال‌های جنسی از نوسلار گسترش پیدا کرده‌اند. با این وجود، هیچ‌کدام 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 SSR، RAPD و ISSR از روش‌هایی هستند که در سطح وسیع برای تمایز دورگ‌ها در برنامه‌های به‌نژادی مرکبات مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷). در کشور اکثر برنامه‌های به‌نژادی برای توسعه ارقام یا پایه‌های جدید بر اساس انجام تلاقی‌های کنترل 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 نوسلار در برنامه‌های به‌نژادی سنتی مرکبات در کشور وجود دارد، آزمایشی با هدف تفکیک دانهال‌های جنسی از غیرجنسی در نتاج حاصل از تلاقی 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 اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد تعیین شد. محصولات PCR از طریق ژل پلی‌اکریل آمید ۶ درصد تفکیک شده و سپس ژل‌ها با نیترات نقره رنگ‌آمیزی و از آنها عکس‌برداری 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 تلاقی بین ارقام مینولتانجلو در شانگشا با پیچ، شانگشا، یونسی، هاملین و مارس و والدین آنها آزمون شدند. از بین آنها ۴ نشانگر چندشکلی بالایی نشان دادند و تعدادی نتاج نوسلار از دورگ با استفاده از آنها تشخیص داده شد. بر اساس الگوی باندهای والدین و نتاج، در توده حاصل از تلاقی بین مینولتانجلو در شانگشا (والد پدری) با شانگشا (والد مادری) ۳۸ دانهال دورگ و ۱۱ دانهال نوسلار، در نتاج حاصل از مینولتانجلو در شانگشا (والد پدری) با یونسی (والد مادری) ۳۷ دانهال دورگ، در نتاج حاصل از تلاقی بین نارنگی پیچ (والد پدری) و مینولتانجلو در شانگشا (والد مادری) ۲۵ دانهال دورگ و ۱۰ دانهال نامشخص، در نتاج حاصل از مینولتانجلو در شانگشا (والد پدری) با نارنگی پیچ (والد مادری) ۱۱ دورگ و ۱۱ دانهال نامشخص، در نتاج حاصل از تلاقی بین نارنگی یونسی (والد پدری) با مینولتانجلو در شانگشا (والد مادری) همه نمونه‌ها نامشخص (۲۷ نمونه)، در نتاج حاصل از مینولتانجلو در شانگشا (والد پدری) با پرتقال هاملین (والد مادری) ۱۰ دانهال دورگ، ۱۲ دانهال نوسلار و ۲ دانهال نامشخص، در نتاج حاصل از پرتقال هاملین (والد پدری) با مینولتانجلو در شانگشا (والد مادری) ۱۲ دانهال دورگ، ۷ دانهال نوسلار و ۶ دانهال نامشخص و در نتاج حاصل از مینولتانجلو 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 نوسلار مشخص می‌نماید که ژنوتیپ هر گیاه را می‌توان با کمترین اشتباهی ارزیابی نمود. آزمایشات مشابهی در این خصوص توسط محققان دیگر (رائو و همکاران ۲۰۰۸؛ تان و همکاران، ۲۰۰۷؛ اولیویرا و همکاران، ۲۰۰۲؛ رویز و همکاران، ۲۰۰۰؛ گلچین و همکاران، ۱۳۸۴) گزارش شده است که با نتایج تحقیق به عمل آمده مطابقت دارد. اما در مقابل، در این آزمایش تعداد ۶۱ 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 ژنی 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 مرفولوژی ممکن است سودمند باشد.



## 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.