شناسایی آلل‌های خودناسازگاری در ارقام بادام ایرانی به روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR)

سید اصغر موسوی (۱) و (۳)، محمد رضا فتاحی مقدم (۱)، ذبیح ا... زمانی (۱)، علی ایمانی (۲)، اینکارنا اورتگا (۴) و فدریکو دیسنتا (۴)

۱- گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم باغبانی و گیاه پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ۲- بخش تحقیقات باغبانی، موسسه تحقیقات اصلاح وتهیه نهال وبذر، کرج، ۳- بخش تحقیقات باغبانی، مرکز تحقیقات کشاورزی ومنابع طبیعی، شهرکرد ۴- گروه اصلاح نباتات، موسسه تحقیقات**CEBAS** ، مورسیا، اسپانیا

بادام دارای خودناسازگاری گامتوفتیک بوده که توسط یک مکان ژنی با چندین فرم آللی به صورت هم بارز کنترل می‌شود. در این مطالعه ژنوتیپ خودناسازگاری حدود ۷۰ رقم و ژنوتیپ بادام ایرانی و ۱۶ رقم خارجی به روش واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR) و با استفاده ترکیب آغازگرهای دیجنریت EM-PC$_2$consFD (آغازگر رو به جلو) و EM-PC$_3$consRD (آغازگر رو به عقب) که بر اساس توالی مناطق حفاظت شده C_2 و C_3 مکان ژنی خودناسازگاری در جنس پرونوس طراحی شده‌اند، تعیین گردید. با استفاده ازاین آغازگرها، تعداد ۲۸ آلل خود ناسازگاری از مجموع ۲۹ آلل خودناسازگاری شناخته شده در بادام در ارقام و ژنوتیپ‌های ایرانی شناسایی گردید. بر اساس نتایج در ۵۰ رقم و ژنوتیپ ایرانی هر دو آلل خودناسازگاری و در ۲۰ رقم و ژنوتیپ تنها یک آلل شناسایی گردیده و تعداد ۸ باند جدید با اندازه متفاوت در این ۲۰ رقم و ژنوتیپ ایرانی مربوط به آلل‌های جدید خودناسازگاری است. ژنوتیپ ناسازگاری در برخی از ارقام و ژنوتیپ‌های ایرانی شامل: ارقام ربیع (S_7S_{27})، یلدا(S_1S_7)، حریر(S_4S_{24}) ، سهند (S_1S_2)، منقا (S_7S_{14}) ، خورشیدی (S_4S_8)، شیربادام (S_2 S_4)، شمشیری (S_7S_{24})، شیر بادام(S_2S_4) و ژنوتیپ‌های15-K-10(S_8S_9) ، A-92 (S_8S_{23})، و ارقام مامایی($S_{25}S_x$)،سفید(S_7S_x)، تجاری($S_{24}S_x$) و29-K-2(S_8S_x) تعیین گردید.در بین جمعیت بادامهای ایرانی مورد مطالعه آلل‌های خود ناسازگاری S_1 ، S_2 ، S_4، S_7، S_8، S_9 و S_{12} بیشترین فراوانی را نشان دادند. استفاده از این آغازگرها یک روش مناسب برای شناسایی ژنوتیپ خودناسازگاری در ارقام و ژنوتیپ‌های بادام می‌باشد.

کلمات کلیدی: بادام، رقم، آلل خودناسازگاری،PCR

مقدمه

بادام (*Prunus dulcis*) یکی از گونه های اقتصادی جنس پرونوس بوده و قسمت تجاری میوه بادام بذر قابل خوراکی آن (مغز) می باشد، بنابراین انجام گرده افشانی و تلقیح برای تولید محصول در بادام ضروری است، اما اکثر ارقام تجاری بادام، خودناسازگار و برخی نیز دگرناسازگار هستند. خودناسازگاری در بادام گامتوفیتیک بوده و به وسیله یک مکان ژنی با چندین آلل کنترل می شود . مکان ژنی کنترل کننده خودناسازگاری گامتوفیتیک دو قسمتی است شآلل یک ترکیب گلیکوپروتئینی با فعالیت ریبونوکلئازی به نام ژن S-RNase به عنوان عآلل تشخیص بافت ماده که در قسمت مادگی (والد مادری) قرار دارد و یک ترکیب پروتئینی مخصوص در دانه گرده به نام ژن F-box یا SFB که به عنوان عآلل تشخیص دانه گرده عمل می کند و ترکیب این دو قسمت منجر به تشخیص و بیان حالت خودناسازگاری در خامه می شود. تعیین ژنوتیپ خودناسازگاری در ارقام بادام جهت انتخاب صحیح درختان گرده زا در احداث باغات به منظور

افزایش عملکرد و همچنین انتخاب والدین مناسب در برنامه های اصلاحی جهت اطمینان از موفقیت در تلاقی های کنترل شده مفید و حائز اهمیت می باشد. مطالعات اولیه برای تعیین آلل های خودناسازگاری و تعیین گروه های خودناسازگاری در بادام با استفاده از تلاقی های کنترل شده در شرایط مزرعه ویا در شرایط آزمایشگاه انجام و نتایج حاصل از جوانه زنی و رشد لوله گرده و تلقیح توسط روش میکروسکوپ فلورسنس مورد مطالعه قرار می گیرد. اخیرا توالی DNA تعدادی از آلل های S قابل دسترس بوده و روش های مولکولی مبتنی بر PCR برای شناسایی آلل های S توسعه پیدا کرده است و آغازگرهای عمومی بر اساس توالی های حفاظت شده در آلل های S در بادام و دیگر گونه های پرووس (۵) و همچنین آغازگرهای اختصاصی برای شناسایی برخی از آلل های S (۱). پرایمرهای دیجنریت بر اساس توالی مناطق حفاظت شده، ژن خودناسازگاری در گونه های پرونوس طراحی شده اند (۲و۴). ترکیب های متفاوت این آغازگرهای دیجنریت به طور موفقیت آمیزی جهت تشخیص و شناسایی آلل های S در بادام کارایی دارند(۲). اورتگا و همکاران (۲) با استفاده از ترکیب جفت آغازگرهای دیجنریت EM-PC2cons FD/EM-PC3cons RD و Pacons I-F/EM-PC1cons RD اندازه آلل های S1 تا S29 و همچنین آلل Sf را تعیین کردند. آغازگرهای رو به جلو EM-PC2cons FD و رو به عقب EM-PC3cons RD بر اساس توالی حفاظت شده و ثابت مناطق C2 و C3 آلل های S در جنس پرونوس توسط ساترلند و همکاران (۴) طراحی شده اند. تا کنون ۲۹ آلل خود ناسازگاری در ارقام بادام شناسایی شده است و ارقام بر اساس ژنوتیپ به ۲۱ گروه دگر ناسازگار (Cross incompatibility) تقسیم بندی شده اند (۲و۳). شناسایی آلل های خودناسازگاری و تعیین گروه های خود و دگر ناسازگار در بین ارقام بادام به منظور تعیین ترکیب کشت ارقام در احداث باغات جدید و تعیین دقیق والدین جهت تلاقی های کنترل شده از اهمیت زیادی برخوردار است، لذا هدف از این تحقیق شناسایی ژنوتیپ خودناسازگاری در تعدادی از ارقام و ژنوتیپ های امیدبخش بادام با استفاده از پرایمرهای دیجنریت بود که بر اساس اندازه حاصل از تکثیر آلل های خودناسازگاری در ارقام بادام ایرانی با ارقام استاندارد و سایز مارکر تعیین و ژنوتیپ خودناسازگاری آنها شناسایی شدند.

مواد و روش‌ها:

مواد گیاهی: ارقام و ژنوتیپ‌های مورد بررسی شآلل ۷۰ رقم و ژنوتیپ بادام ایرانی از مناطق مختلف کشور از کلکسیون‌های کرج، شهرکرد، تبریز و شیراز و تعداد ۲۰ رقم خارجی از کلکسیون بادام در مؤسسه تحقیقاتی CEBAS کشور اسپانیا شآلل ارقام خارجی کریستومورتو (S_1S_2)، فرانیس (S_1S_3) ، CEBAS-1(S_4S_{13})، پریمورسکی (S_5S_9)، رامیلت (S_6S_{23})، I.X.L (S_7S_8)، اردچویس (S_1S_{10})، مارکونا($S_{11}S_{12}$)، تیتان (S_8S_{14})، رومبتا ($S_{11}S_{21}$)، آولانرا گروسا ($S_{22}S_{26}$)، لامونا ($S_{23}S_{25}$)، فورنات دبرزند ($S_{24}S_{27}$) ، فینادل آلتو ($S_{28}S_{29}$) ، پادر (S_1S_{18}) و A_2-198 (S_fS_f) به عنوان ارقام شاهد استفاده گردید. پس از استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های برگی ارقام و ژنوتیپ‌های مورد بررسی، واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر به روش (۲و۴) انجام گردید. تکثیر محصول PCR با استفاده از آغازگرهای عمومی دیجنریت EM-PC_2consFD (آغازگر رو به جلو) و EM- PC_3consRD (آغازگر رو به عقب) طراحی شده توسط ساترلند و همکاران (۲۰۰۴) انجام گرفت. الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TAE یک برابر غلظت به مدت ۵-۴/۵ ساعت در ۷۵ ولت و رنگ‌آمیزی ژل در محلول

ایتدیوم برماید برای مدت یک ساعت انجام گردید. باندهای حاصل از تکثیر PCR در دستگاه ژل داک در زیر نور ماوراء بنفش نمایان و عکس برداری از آنها انجام گردید. با توجه به اینکه آلل S_4 با S_{20}، آلل S_{13} با S_{19} ، آلل S_1 با آللهای S_{16} و S_{17} و آلل S_5 با S_{15} از نظر اندازه و توالی مشابه هستند (۲ و ۳). در هر ژل از ارقام خارجی که پوشش دهنده کلیه آللهای خودناسازگاری شناخته شده در بادام بودند به عنوان ارقام شاهد برای نتیجه گیری بهتر استفاده گردید و اندازه باندهای تکثیر شده توسط آغازگرهای دیجنریت در ارقام بادام ایرانی با استفاده از اندازه باندهای مرتبط با آللهای شناخته شده در ارقام خارجی (شاهد) و همچنین با نشانگر اندازه یک کیلو جفت بازی (سایز مارکر) مورد مقایسه قرار گرفتند و نهایتاً اندازه و نوع آلل خودناسازگاری در ارقام و ژنوتیپ‌های ایرانی تعیین گردید.

نتایج و بحث

با استفاده از آغازگرهای عمومی دیجنریت EM-PC_2 cons FD، (آغازگر رو به جلو) و EM-PC_3consRD (آغازگر رو به عقب) تعداد ۲۸ آلل از مجموع ۲۹ آلل خودناسازگاری شناخته شده در ارقام بادام خارجی در ارقام و ژنوتیپ‌های بادام ایرانی تکثیر گردیدند و از مجموع ۷۰ رقم در ۵۰ رقم و ژنوتیپ هر دو آلل خودناسازگاری و در ۲۰ رقم و ژنوتیپ دیگر یک آلل ناسازگاری مشخص گردید و تعداد ۸ باند جدید با اندازه متفاوت در این ۲۰ رقم و ژنوتیپ شناسایی گردید که مربوط به آللهای جدید خودناسازگاری بودند. با محاسبه اندازه باندهای تکثیر شده در ارقام و ژنوتیپ‌های ایرانی و مقایسه آنها با اندازه باندهای مرتبط با آلل‌های ناسازگاری در ارقام شاهد و همچنین با مقایسه با سایز مارکر، ژنوتیپ خودناسازگاری ارقام ایرانی تعیین شد. اندازه باندهای حاصل از تکثیرآلل ها در ارقام خارجی و ایرانی در رنج ۳۰۰ جفت بازگشت به نامه شماره(آلل s_{10}) تا ۳۰۰۰ جفت باز(آللs_{26}) متغیر بود و تقریباًهمه ۲۹ آلل شناخته شده در بادام (۲) در ارقام و ژنوتیپ های ایرانی مشاهده شدند و تعداد ۸ باند متفاوت مربوط به آللهای جدید در بادامهای ایرانی مشاهده گردید. به طور مثال ژنوتیپ ناسازگاری در برخی از ارقام و ژنوتیپ‌های ایرانی که در این بررسی تعیین گردیدند عبارتند از: ارقام ربیع (S7S27)، یلدا (S1S7)، آذر (S3S4) ، حریر (S4S24) ، سهند (S1S2)، زرقان ۷ (S1S4)، زرقان ۸ (S1S2) ، منقای دیرگل (S1S13)، منقا (S7S14) ، خورشیدی (S4S8)، شیربادام (S2 S4) ، شمشیری (S7S24) ، مامایی اصفهان (S10 S13) و ژنوتیپ‌های A-92 (S8S23)، A-2 (S8S13) ، K-10-15(S8S9)، K-1-16(S7S24)، K-11-40 (S1S4) و (S1S9) A200 ودر برخی از ارقام و ژنوتیپ‌های مورد بررسی یک آلل شناسایی گردید و آلل دیگر اندازه باند تکثیر یافته در آنها متفاوت با اندازه آلل های شناخته شده در بادام(۲) بود که به طور مثال رقم مامایی دارای آلل S25 و یک باند جدید به اندازه ۱۲۵۰ جفت باز، رقم سفید دارای آلل S7 و یک باند جدید به اندازه ۱۰۰۰ جفت باز، رقم تجاری دارای آلل S24 و یک باند جدید به اندازه ۱۱۰۰ جفت باز، ژنوتیپ K-2-29 دارای آلل S8 و یک باند جدید ۱۰۶۰ جفت باز و ژنوتیپ G-2 دارای آلل S5 و یک باند جدید به اندازه ۱۰۰۰ جفت باز بودند. در بین جمعیت بادامهای ایرانی مورد مطالعه آلل‌های خود ناسازگاری S_1 ، S_2 ، S_4، S_7، S_8، S_9 و S_{12} بیشترین فراوانی و آللهای S_5 ، S_{21} ، S_{22} و S_{29} کمترین فراوانی را نشان دادند. ساترلند و همکاران (۴) و اورتگا و همکاران (۲) گزارش کردند که این آغاز گرهای عمومی دیجنریت قابلیت بالایی در تکثیر و شناسایی آلل‌های ناسازگاری در بادام دارند بنابراین استفاده از این آغازگرها در شناسایی آلل‌های جدید در جمعیت بادام های ایرانی بسیار کارآمد خواهند بود.

References:

1- Channuntapipat C, Wirthensohn M, Ramesh SA, Batlle I, Aru´s P, Sedgley M, Collins G. 2003. Identification of incompatibility genotypes in almond (*Prunus dulcis* Mill.) using specific primers based on the introns of the S-alleles. Plant Breeding, 122:164-168.

2- Ortega E., B.G. Sutherland, F. Dicenta, R.I. Boskovic and K.R. Tobutt. 2005. Determination of incompatibility genotypes in almond using first and second intron consensus primers: detection of new *S*-alleles and correction of reported *S*-genotypes. Plant Breeding, 124:188-196.

3- Ortega E., R.I. Boskovic, D.J. Sargent, K.R. Tobutt. 2006. Analysis of S-RNase alleles of almond (*Prunus dulcis*): characterization of new sequences, resolution of new synonyms and evidence of intragenic recombination. Mol. Genet. Genomics, 276:413–426.

4- Sutherland B.G., T.P. Robbins, K.R. Tobutt. 2004. Primers amplifying a range of Prunus *S*-alleles. Plant Breeding, 123:582-584.

5- Tamura, M., K. Ushijima, , H. Sassa, , H. Hirano, , R. Tao, T.M. Gradziel and A.M. Dandekar. 2000. Identification of self-incompatibility genotypes of almond by allele-specific PCR analysis. Theor. Appl. Genet., 101: 344–349.