ارزیابی خلوص ژنتیکی هیبریدهای گوجه فرنگی با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD

شمسه جانعلی زاده[۱]، غفارکیانی[۲]، سید کمال کاظمی تبار[۳]، محمد سیه چهره[٤]

[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
janalizadeh.shamseh@gmail.com

[۲،۳]دانشیار گروه اصلاح نباتات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
[٤]دانشجوی دکتری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

چکیده

گوجه فرنگی با نام علمی(*solanum lycopersicum*)، یک محصول گیاهی مهم در سراسر جهان است. امنیت غذایی جهانی خواستار توسعه فناوری‌های جدید برای افزایش تولید محصولات کشاورزی در زمین‌های زراعی محدود است. یکی از این فرصت‌های جدید، تولید بذرهای هیبرید است که دارای توانایی بالایی برای افزایش عملکرد هستند. موفقیت در برنامه های اصلاحی تولید بذر هیبرید به توانایی اصلاح‌کنندگان در شناخت لاین های والدینی که کارایی بالا در تولید بذر هیبرید دارند وابسته است. تکنیک نشانگرهای مولکولی ظرفیت خوبی برای تعیین خلوص ژنتیکی هیبرید ها دارند. در این پژوهش ۲ هیبرید F1 (M\L,SC\L) به همراه والدین آنها (M,SC,L) در محیط گلخانه کشت و استخراج DNA از برگ تک بوته ها به روش CTAB انجام شد. برای ارزیابی خلوص ژنتیکی بذر های گوجه فرنگی از نشانگر RAPD با دو پرایمر (OF-7 و OH-8) استفاده شد. نتایج pcr نشان داد از میان دو پرایمر، می توان از پرایمر OF-7 برای شناسایی ناخالصی در هیبرید های گوجه فرنگی در برنامه های اصلاحی استفاده نمود. این مطالعه نشان داد که نشانگر RAPD می توانند ابزاری کاربردی و کارآمد در کنترل کیفیت بذر هیبرید باشد.

کلمات کلیدی: نشانگر مولکولی، هیبرید، گوجه فرنگی، خلوص ژنتیکی، RAPD

مقدمه

گوجه فرنگی با نام علمی(*solanum lycopersicum*)یک محصول زراعی مهم در سراسر جهان است. گوجه فرنگی یکی از پر اهمیت ترین محصولات کشاورزی از نظر اقتصادی است و همچنین تولید بذر هیبرید در این گیاه از اهمیت زیادی برخوردار است(نبی پور و همکاران،۱۳۹۰). رقم هیبرید در واقع اشاره به بذر F1 دارد که از تلاقی دو والدی که از نظر ژنتیکی متفاوت هستند تولید می گردد

و در نهایت به بذری تبدیل میشود که دارای ترکیبی از صفات کیفی و مفید هر دو والد خواهد بود. بذر های هیبرید نسبت به بذر های دیگر برتری دارند. موفقیت در برنامه‌های اصلاحی تولید بذر هیبرید به توانایی اصلاح کنندگان در شناخت لاین های والدینی که کارایی بالا در تولید بذر هیبرید دارند وابسته است. یکی از مهم ترین مراحل در برنامه های اصلاحی تولید بذر هیبرید شناخت ترکیبات والدینی برتر است (نبی پور و همکاران،۱۳۹۰). تعیین خلوص ژنتیکی لاین ها و ارقام هیبرید نیاز به کنترل کیفیت از اهمیت حیاتی در اصلاح نباتات و تولید بذر برخوردار است. آگاهی از این داده ها برای کنترل عملکرد و یکنواختی و همچنین جلوگیری از سطح غیر قابل قبول در تعداد زیادی بذر قبل از توزیع در بازار ضروری است (Rom et al.,1994). برای جلوگیری از کاهش عملکرد ناشی از اختلاط در بذر هیبرید یا وجود بذرهای حاصل از دگرگشنی و خودگشنی ناخواسته،توسعه یک روش دقیق، سریع و ساده برای ارزیابی خلوص ژنتیکی اهمیت فراوانی دارد (جزایری و همکاران،۱۳۹۸). برای یک محصول خودگرده افشانی مانند گوجه فرنگی یکی از چالش های تولید بذر هیبرید جلوگیری از خودگرده افشانی در لاین والدین برای اطمینان از خلوص ژنتیکی بالا است. تکنیک نشانگرهای مولکولی پتانسیل خوبی برای تعیین خلوص ژنتیکی هیبرید ها دارند (Liu et al.,2007). طی پژوهشی به بررسی کنترل خلوص F1 هیبرید ارقام گوجه فرنگی پرداختند، این محققین از نشانگرهای RAPD در آزمون های کنترل خلوص بذر هیبرید گوجه فرنگی استفاده کردند. DNA حاصل از ۳ رقم تجاری هیبرید و لاین های والدینی آنها با ۵۰ آغازگر تحت غربالگری RAPD قرار گرفت. دو از چهار آغازگر که چندشکلی را بین والدین آزمایش شده تشخیص داده اند، RAPD های مخصوص پدر را ایجاد می کنند، تمایز واضحی بین هیبرید ها و والدین مادر آنها ایجاد می شود (Rom et al.,1994).

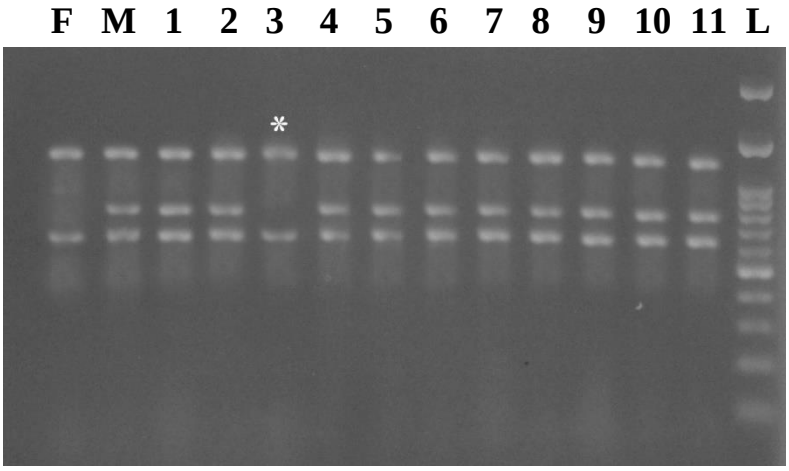
در تحقیقی ارزیابی خلوص ژنتیکی هیبرید گوجه فرنگی با استفاده از نشانگر های مولکولی بررسی شد. این محققین از سه نوع نشانگرهای مولکولی– RAPD, SSR, ISSR برای آزمایش خلوص ژنتیکی بذر دو نوع گوجه فرنگی هیبرید استفاده کردند. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل نشان داد که ۸ گیاه از ۲۱۰ گیاه F1 در یک رقم و۱۳ گیاه از ۲۱۰ مورد در رقم دیگر هیبرید های کاذب بودند. همچنین خلوص ژنتیکی دو بذر هیبرید F1 به ترتیب ۹۶/۲ و ۹۳/۸ درصد بوده است (Liu et al., 2007). با توجه به مخلوط بذرهای هیبرید با سایر ناخالصی ها که موجب کاهش خلوص بذر های هیبرید می شود، استفاده از روشی که قادر به تشخیص این ناخالصی ها باشد یکی از نیاز ها می باشد. هدف از انجام این پژوهش استفاده از روشی است که بتواند این ناخالصی را در بذر هیبرید تشخیص دهد.

مواد و روش ها

در این پژوهش از ۲ رقم هیبرید گوجه فرنگی (M\L,SC\L) به همراه والدین آنها (M,SC,L) استفاده شد. ارقام هیبرید به همراه والدین خودشان در محیط گلخانه کشت شدند. در مرحله گیاهچه ای استخراج DNA از برگ تک بوته های هیبریدهای مورد مطالعه و والدین آنها به روش CTAB انجام شد (Murray and Thompson. 1980). از نشانگر RAPD (OF-7 و OH-8) برای بررسی خلوص ژنتیکی هیبریدهای گوجه فرنگی استفاده شد. پس از به دست آوردن DNA کمیت و کیفیت آن با استفاده از اسپکتروفوتومتر و روش الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد. برنامه PCR مطابق روش ارائه شده رام و همکاران (۱۹۹۴) انجام شد. فراورده های PCR با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد تفکیک و سپس با اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و با دستگاه ژل داک عکس برداری شده و باند ها مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج و بحث

الگوهای باندی تولید شده توسط پرایمر ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. در مجموع از دو پرایمر استفاده شده در این پژوهش پرایمر OF-7 تمایز واضحی بین والد مادر و رقم هیبرید M\L را نشان می دهد (شکل ۱). همانطور که در شکل ۱ مشاهده می شود والد مادری دارای ۲ باند و والد پدری دارای ۳ باند می باشد. ۱۰ بوته از ۱۱ بوته هر دو باند والد مادری و پدری، در واقع باند اضافی والد پدری را نیز تولید کردند و ستون شماره ۳ باند مشابه باند والد مادری را نشان می دهد یعنی فاقد باند اضافی والد پدری می باشد که می توان نتیجه گرفت این بوته حاصل خود گرده افشانی والد مادر می باشد. با استفاده از این پرایمر میتوان بین هیبرید واقعی و ناخالصی تمایز قائل شد.



شکل ۱. تجزیه و تحلیل RAPD از بوته های هیبرید تلاقی M\L با پرایمر OF-7. ستون F: والد مادر، ستون M: والد پدر، ستون ۱ تا ۱۱ افراد F1 ستون شماره ۳ ناخالصی در بین ۱۱ بوته را نشان می دهد که نتیجه خودگرده افشانی گیاه مادر است. ستون L: DNA LADDER

جدول ۱. پرایمر های RAPD مورد استفاده در این تحقیق

نام نشانگر	توالی	وزن باند (kb)
OF-7	5-CCGATATCCC-3'	0.75
OH-8	5-GAAACACCCC-3'	0.70

از نشانگرها برای شناسایی ارقام هیبرید در برخی صیفی جات دیگر استفاده شده است. به عنوان مثال در فلفل (Ilbi et al.,2002) نتایج نشان داد که نشانگرهای RAPD برای شناسایی رقم و آزمایش خلوص هیبرید می توانند کارآمد و قابل اعتماد باشند. در کلم بروکلی و گل کلم (Hu and Quiros, 1991) نتایج نشان داد نشانگرهای RAPD یک گزینه سریع و قابل اعتماد برای شناسایی ارقام ارائه می کنند. در کرفس (Yang and Quiros, 1993) فناوری RAPD جایگزین جدیدی برای شناسایی و طبقه بندی ارقام در این گیاه فراهم می کند. با توجه به یافته های مشابه در مطالعات قبلی و نتایج حاصل می توان نتیجه گرفت که نشانگر RAPD تکنیکی مفید و کارآمد برای مشخص کردن ناخالصی های بذر هیبرید می باشد و این مطالعه می تواند توسط تولیدکنندگان بذر، شرکت ها و آزمایشگاه ها مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

جزایری نوش آبادی، م.، اصغری، ج.، سمیع زاده لاهیجانی، ح. و حمیدی، آ. ۱۳۹۸. ارزیابی خلوص ژنتیکی بذر ارقام ذرت تجاری ایران با استفاده از صفات DUS و نشانگرهای ریزماهواره. نشریه علوم و فناوری بذر ایران، ۸(۲):۲۴۰-۲۲۹.

کاظمی بیدهندی، ز. ۱۴۰۰. تولید بذر هیبرید گوجه فرنگی. مجله علمی تخصصی جوانه، ۱۷(۲): ۴۳-۵۲.

نبی پور، م.، فارسی، م.، نعمتی، ح. و ملک زاده، س.۱۳۹۰. بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ های گوجه فرنگی با استفاده از نشانگر های مولکولی AFLP و ارتباط آن با هتروزیس. نشریه پژوهش های زراعی ایران، ۱۰(۲):۳۵۴-۳۶۰.

Hu, J., Quiros, C.F., 1991. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. Plant Cell Rep. 10, 505–511.

Ilbi, h. 2002. RAPD markers assisted varietal identification and genetic purity test in pappper. Scientia horticulturae ,97:211-218.

Liu, L. W., Wang, Y., Gong, Y. Q., Zhao, T. M., Liu, G., Li, X. Y., & Yu, F. M. 2007. Assessment of genetic purity of tomato (Lycopersicon esculentum L.) hybrid using molecular markers. Scientia horticulturae, 115(1), 7-12.

Murray, M.G., W.F, Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research, Volume 8, Issue 19, 10 October 1980, Pages 4321-4326.

Rom, M., Bar, M., Rom, A., Pilowsky and Gidoni, D. 1994. Purity control of F1-hybrid tomato cultivars by RAPD markers. Plant breeding, 114: 188-190.

Yang, X., Quiros, C., 1993. Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. Theor. Appl.Genet. 86, 205–212.

Assessment of genetic purity of tomato hybrids using RAPD molecular markers

Shamseh Janalizadeh * 1, Ghaffarkiani 2, Seyed Kamal Kazemi Tabar 3, Mohammad Siyah Chehreh 4

1.Master student of Biotechnology, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources
janalizadeh.shamseh@gmail.com

2,3.Associate Professor, Department of Plant Breeding, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources
4.PhD students of Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Abstract

Tomato with the scientific name (*solanum lycopersicum*), is an important plant product worldwide. Global food security calls for the development of new technologies to increase agricultural production on limited arable land. One of these new opportunities is the production of hybrid seeds that have a high ability to increase yield. The success of hybrid seed breeding programs depends on the ability of breeders to identify parent lines that are highly efficient in hybrid seed production. Molecular marker techniques have good potential for determining the genetic purity of hybrids. In this study, 2 F1 lines (M \ L, SC \ L) with parents (M, SC, L) were cultured in greenhouse and DNA extraction from single plant leaves was performed by CTAB method with slight changes. RAPD marker with two primers (OF-7 and OH-8) was used to evaluate the genetic purity of tomato seeds. PCR results showed that among the two primers, OF-7 primer can be used to identify impurities in tomato hybrids in breeding programs. This study showed that RAPD markers can be a practical and effective tool in quality control.

Keywords: Molecular marker, hybrid, tomato, genetic purity, RAPD