استفاده از مارکرهای مولکولی برای تشخیص هیبریدهای بین گونه‌ای چغندرقند (*Beta vulgaris L.*)

روزبه فرانک [۱ و ۲]، صادقیان سیدیعقوب [۱]، نادری منش حسین [۲]، زارع مایوان حسن [۲]، مصباح محمود [۱]، ملبوبی محمدعلی [۳] و یاوری نسرین [۱].

۱ - مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند ۲ - دانشگاه تربیت مدرس - تهران ۳ - مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی

گونه‌های وحشی چغندرقند از جمله گروه Procumbentes بعلت دارا بودن ژنهای مقاومت به آفات و بیماریها مورد توجه بهنژادگران قرار گرفته و سه گونه موجود در این گروه دارای ژن یا ژنهایی است که به نماتد چغندرقند مقاومت کامل دارند.

در این تحقیق جهت تهیه هیبریدهای بین گونه‌ای، تلاقی چغندرقند زراعی توده تتراپلوئید 37RT بعنوان والد مادری دو گونه وحشی گروه Procumbentes بعنوان والدین پدری به شرح ذیل انجام شد :

37RT(4n) x B. wbbiana(2n) و 37RT(4n) x B. procumbens(2n)

جنین‌های هیبرید حدود ۲۵ روزه در محیط غذایی N6 در شرایط آزمایشگاهی کشت و در دمای ۲۵c° و تاریکی قرار گرفتند. سپس جنین‌های جوانه‌زده در شرایط فتوپریود ۱۶ ساعت روشنائی و دمای ۲۵c° قرار داده شدند.

در مطالعات مولکولی از DNAژنومی والدین و ۶ هیبرید انتخابی جهت انجام واکنشهای تکثیری PCR استفاده شد. در این بررسی از پرایمرهای تصادفی OPX15 و OPX2 جهت مطالعات مقایسه‌ای استفاده گردید. پس از انجام PCR ، DNA تکثیر شده در ژل آگارز ۱ % لود شده و پس از طی زمان رانژل درمحلول رنگ اتیدیوم بروماید قرار گرفت و سپس باندهای حاصل با دستگاه ترانس ایلومینتور مشاهده گردید.

از مطالعه باندهای حاصل از تکثیر با پرایمرهای فوق‌الذکر در مقایسه با مارکر SPPI مشخص گردید که هیبریدهای مورد آزمایش دارای باندهای مشترک با والدین زراعی و وحشی بودند. از مطالعات مولکولی انجام شده مشخص گردید که گیاهان حاصل از تلاقیهای انجام شده هیبرید بین گونه‌ای بوده و در تحقیقات بعدی این پروژه مورد استفاده قرار خواهند گرفت.

مقدمه

آفات و بیماریهای چغندرقند نقش مهمی در اقتصاد این محصول داشته و موجب کاهش تولید قند در واحد سطح می‌شود. شناسائی منابع ژنتیکی مقاوم به بیماریها و آفات و متحمل به تنش‌های محیطی از آرزوهای دیرینه بهنژادگران چغندرقند بوده است. اهمیت انجام هیبریداسیون دور با گونه‌های وحشی چغندرقند که دارای صفات مورد نظر مقاومت به آفات و بیماریها هستند کاملاً بارز است هرچند در این موارد بهنژادگر نبات با مشکلات عدیده‌ای چون عدم تشکیل جنین، عدم رشد و توسعه جنین و یا عدم رشد و نمو گیاهچه‌های F_1 مواجه می‌شود. ژنهای مقاوم به بعضی از بیماریهای چغندرقند به ویژه ژن یا ژنهای مقاومت به نماتد در گونه‌های زراعی پیدا نشده است. مطالعات و تحقیقات وسیعی که در این زمینه انجام شد انتقال ژنهای مقاوم به نماتد از گونه‌های دور به ویژه گروه *Procumbentes* را مورد تأیید قرار داد اما در روشهای کلاسیک این انتقال ژن بسیار مشکل است.

تکنیک کشت جنین بعنوان روشی مفید و مطمئن جهت تولید گیاهان هیبریدی که در شرایط طبیعی آمیزشهای سخت یا غیرممکن دارند بکار می‌رود. در این روش جنین هیبرید قبل از نابود شدن در شرایط این ویترو کشت و نگهداری می‌گردد(۲، ۹، ۱۲، ۱۶، ۱۷ و ۲۰).

مشکل تلاقی بین چغندرقند (*Beta vulgaris L.*) و گونه‌های وحشی گروه *procumbentes* به طور عمده در مرحله بعد از تشکیل جنین بروز می‌یابد. جنین‌ها تشکیل می‌شوند اما رشد هیبریدها به علت عدم تشکیل ریشه متوقف می‌گردد(۱۴ و ۱۵).

با توجه به مشکلات موجود در روشهای کلاسیک هیبریداسیون چغندرقند و نیاز مبرم آن به انجام این گونه تلاقیها برای انتقال صفات مطلوب از گونه‌های وحشی، در این تحقیق روش نجات جنین برای دستیابی به هیبریدهای بین گونه‌ای چغندر زراعی و چغندر وحشی گروه *Procumbentes* که دارای صفات مطلوب مقاومت به آفات و بیماریهای چغندرقند می‌باشد مورد استفاده قرار گرفت.

مارکرهای مولکولی بعلت توانائیها، نامحدود بودن و سرعت عملی که در تحقیقات از خود نشان داده‌اند از جایگاه ویژه‌ای در علوم مختلف به ویژه علوم زیستی برخوردار هستند. یکی از جنبه‌های ارزشمند این مارکرها استفاده از آنها در تاکسونومی گیاهی و همچنین تعیین منشاء هیبریدهای بین جنسی و بین گونه‌ای است(۵، ۸، ۱۹، ۲۱، ۲۲ و ۲۳) و بر این اساس تشخیص هیبریدهای حاصل از تلاقی بین گونه‌ای چغندرقند نیز با استفاده از مارکرهای RAPD تعیین گردید.

مواد و روشها

در این بررسی به منظور انجام تلاقی بین گونه‌ای، توده تتراپلوئید گونه زراعی چغندرقند (*Beta vulgaris*) با نام 37RT بعنوان والد مادری و گونه‌های وحشی *B. Prcombens* و *B. webbiana* بعنوان والد پدری انتخاب شدند.

عقیم سازی پایه‌های مادری پس از ساقه‌دهی و رشد گل آذین انجام پذیرفت و ۴ تا ٦ روز پس از عقیم سازی عمل گرده دهی با دو تکرار بفاصله دو روز بعد از گرده‌دهی انجام شد.

۲۰ تا ۲۵ روز پس از اولین گرده‌دهی گل آذینها از گیاه مادری جدا شده و پس از انتقال به آزمایشگاه برگچه‌های اضافه آذین حذف و ضدعفونی شدند. سپس جنین‌ها با استفاده از استریو میکروسکوپ در شرایط کاملاً استریل لامینیر با دقت توسط اسکالپل و پنس کوچک از تخمدان جدا شده و در محیط غذایی پایه N6 کشت گردیدند و تحت شرایط تاریکی و دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد تا ظهور جوانه‌زنی نگهداری شدند(شکل ۱). سپس جنین‌های جوانه زده بلافاصله پس از ظهور علائم جوانه‌زنی در شرایط محیطی ۱٦ ساعت روشنائی و دمای ۲۵$\dot{C}$ قرار داده شدند.

جهت مطالعات مولکولی از DNA ژنومی والدین و ٦ گیاهچه هیبرید (از هر دو نوع تلاقی) که بطور تصادفی انتخاب شدند استفاده گردید.

پرایمرهای تصادفی (۱۰ نوکلئوتیدی) مورد استفاده عبارت بودند از دو پرایمر با نامهای OPX_{15} و OPX_2 و با مشخصات زیر (۱۰) که در مرکز تحقیقات ملی مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی ساخته شدند.