Archive of SID

نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیست و هفتم، شماره دوم، ۱۳۹۹
۱۲۱-۱۳۰
http://jopp.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/jopp.2020.16255.2478

اعتبارسنجی برخی نشانگرهای مولکولی در تعیین جنسیت ژنوتیپ‌های مختلف کیوی‌فروت حاصل گرده‌افشانی آزاد

سونیا جمالی انجیلانی[۱]، *محمود قاسم‌نژاد[۲]، حبیب‌الله سمیع‌زاده[۳] و یوسف حمیداوغلی[۲]

[۱]دانشجوی دکتری گروه علوم باغبانی، دانشگاه گیلان، [۲]استاد گروه علوم باغبانی، دانشگاه گیلان، [۳]استاد گروه بیوتکنولوژی، دانشگاه گیلان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۹/۲٤؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۷/۰۳

چکیده

سابقه و هدف: کیوی‌فروت یکی از مهم‌ترین محصول باغی صادراتی ایران است. اما تمایل مشتریان بین‌المللی به خرید میوه‌های کیوی متفاوت از نظر رنگ گوشت و مزه افزایش یافته است، جهت ارتقای جایگاه کیوی ایران تولید ارقام جدید اهمیت دارد. یکی از موانع اصلاح نونهالی نسبتاً طولانی و هم‌چنین دوپایگی می‌باشد که تا قبل از گلدهی تفاوتی ظاهری دانهال نر و ماده وجود ندارد. بنابراین، تعیین جنسیت دانهال‌ها و جداسازی افراد نر و ماده در کوتاه‌ترین زمان اهمیت زیادی در برنامه‌های به‌نژادی دارد. در این پژوهش اعتبارسنجی برخی از نشانگرهای مولکولی مرتبط با جنسیت جهت تفکیک دانهال‌های نر و ماده کیوی‌فروت حاصل از گرده‌افشانی آزاد مورد آزمون قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش از دو نوع ژنوتیپ کیوی‌فروت گوشت زرد (به اسامی نواب و خورشید) و یک نوع ژنوتیپ گوشت قرمز (خونی) که همگی متعلق به گونه *Actinidia chinesis* و دیپلوئید بودند، استفاده شد. استخراج DNA ژنومی از برگ‌های جوان ۱۰ گیاه بالغ نر و ماده بالغ کیوی‌فروت به روش CTAB با کمی تغییرات صورت گرفت. برای تعیین دقیق غلظت DNA هر نمونه، از دستگاه اسپکتروفوتومتری (Biophotometra, Plus Eppendorff) استفاده می‌شود و غلظت DNA در طول موج ۲٦۰ نانومتر ارزیابی شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در حجم ۱۰ میکرولیتر با استفاده از دستگاه برای هر نمونه انجام گرفت. برای هر پرایمر برنامه (PCR)، غلظت ژل آگارز و مدت زمان بارگذاری بهینه استفاده شد. در نهایت، اعتبارسنجی برخی از نشانگرهای مولکولی مرتبط با جنسیت شامل سه نشانگر SCAR (SmX، SmY و SmY_1) و سه نشانگر SSR (A00I، A00II و A00II) در DNA استخراج شده از برگ ژنوتیپ‌های مورد آزمایش، مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج این پژوهش نشان داد از بین چندین نشانگر SCAR و SSR که قبلاً گزارش شده بود، برخی قادر به جداسازی دقیق دانهال‌های نر و ماده کیوی‌فروت نبودند. از بین سه نشانگر SCAR (SmX، SmY و SmY_1) که مورد آزمون قرار گرفتند، تنها دو نشانگر SmY_1 (bp ۷۷۰) در افراد نر (بدون ظهور هیچ باندی در افراد ماده) و در افراد ماده و SmX (bp۹۵۰) در افراد ماده (بدون ظهور هیچ باندی در افراد نر) به خوبی قادر به جداسازی دانهال‌های کیوی‌فروت شدند. با توجه به نوارهای چندشکل به‌دست آمده از سه نشانگر SSR (A00I، A00II و A00II) معرفی شده برای شناسایی افراد نر و ماده، فقط نشانگر A00II با باند ویژه (bp۲۳۰) در افراد نر و باند ویژه (bp۲۱۹) در افراد ماده قادر به تفکیک جنسیت دانهال‌های کیوی‌فروت بود. دو نشانگر A00I و A00III در افراد نر و ماده الگوی باندی مشابه ظاهر نموده قادر به جداسازی افراد از نظر جنسیت نبودند.

* مسئول مکاتبه: ghasemnezhad@guilan.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

نتیجه‌گیری: در مجموع، نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده توأم از نشانگرهای SmX، SmY_1 و A00II با کم‌ترین خطا قادر به تفکیک دانهال‌های نر و ماده کیوی‌فروت در مراحل اولیه نونهالی می‌باشند.

واژهای کلیدی: اصلاح، نشانگر تعیین جنسیت، نشانگر SCAR، نشانگر SSR، نونهالی

مقدمه

میوه کیوی بومی جنوب کشور چین است که در قرن بیستم در کشور نیوزیلند اصلاح شده است (۱٤). نظر به ارزش غذایی بالای این میوه در سال‌های اخیر، مورد توجه بسیاری از مصرف‌کنندگان و تولیدکنندگان قرار گرفته است (۱۵).

کیوی‌فروت متعلق به جنس *Actinidia* از خانواده Actinidiaceae می‌باشد که دارای بیش از ٦۰ گونه مختلف است که ظاهراً، همگی گیاهان دوپایه هستند. گیاهان نر واجد گل‌های با تعداد بی‌شماری پرچم با گرده زیوا و تخمدان‌های اولیه با خامه ناقص بوده که تخمک در آن شکل نمی‌گیرد و گیاهان ماده دارای گل‌هایی با تخمدان کاملاً نمو یافته و شامل تعداد زیادی تخمک و گرچه ظاهراً پرچم‌های کاملاً توسعه‌یافته دارند که تولید گرده می‌کنند، ولی فاقد زیوایی هستند (۱٦).

در ایران نیز، کیوی‌فروت یکی از مهم‌ترین محصولات کشاورزی صادراتی می‌باشد، به‌طوری‌که بعد از سیب و پسته سومین محصول باغی صادراتی ایران از لحاظ وزنی با ارزش حدود٤۰ میلیون دلار به حساب می‌آید (آمارنامه صادرات وزارت جهاد کشاورزی، ۱۳۹۳). ایران با سطح زیر کشت ۱۰۲۲۷ هکتار و با تولید سالانه ۲۹٤٤۱۳ تن در مقام چهارم جهان قرار دارد (٦). با توجه شرایط مساعد اقلیمی و جغرافیایی که وجود دارد در آینده نزدیک ایران به‌عنوان مهم‌ترین کشور رقیب برای کشورهای اصلی صادرکننده کیوی در جهان به‌خصوص در نیم‌کره شمالی تبدیل خواهد شد (۱ و ۵).

به‌طورکلی، ظاهر میوه کیوی‌فروت به‌خصوص رنگ گوشت یکی از مهم‌ترین عوامل تعیین‌کننده تمایل مصرف‌کننده به خرید میوه کیوی‌فروت است (۹). این امر باعث شد به‌نژادگرها نیز به دنبال معرفی ارقام جدید کیوی با عطر و طعم و رنگ متفاوت باشند (۲ و ۱۳). به‌عنوان مثال، کشور نیوزیلند به تنهایی ۳۰ درصد تجارت جهانی کیوی را به خود اختصاص داد، که یکی از دلایل بالا بودن ارزش اقتصادی میوه کیوی در این کشور معرفی رقم جدید کیوی با گوشت زرد یا طلایی (Gold Kiwifruit) که معروف به G3 با نام تجاری SunGold می‌باشد (۱۱).

کیوی‌فروت یک میوه با اهمیت ویژه است، که به‌دلیل تجارت جهانی و ارقام بهبود یافته محدود، از تنوع ژنتیکی پایین رنج می‌برد. تکثیر جنسی (بذر) بهترین راه ایجاد تنوع در ژرم‌پلاسم است. امروزه عمده ارقام تجاری کیوی که در جهان کشت و کار می‌شوند، عمدتاً از طریق جهش در جوانه، انتخاب افراد متنوع درون جمعیت دانهال‌ها و یا تلاقی‌های کنترل شده حاصل شده‌اند (۱۷). در چین پژوهشگران با توجه به تنوع بالای حاصل از کاشت بذر ارقام وحشی *A. chinensis* توانسته‌اند جمعیتی از دانهال‌ها با تنوع بالا در رنگ گوشت، اندازه، شکل، ترکیبات معطر، مدت انبارمانی و سایر ویژگی‌ها تولید کنند (۱۷). در ترکیه شروع برنامه به‌نژادی با انتخاب دانهال‌های برتر حاصل از کاشت بذر حاصل از گرده‌افشانی آزاد یا کنترل شده ارقام گوشت زرد مانند Hort16A و Jingold بوده است (۲). اما در کشور

www.SID.ir

Archive of SID

نیوزیلند عمده ارقام تجاری معرفی‌شده نتیجه تلاقی‌های کنترل شده و هدف می‌باشند (۱۱). در ایران تاکنون هیچ برنامه مدونی در خصوص اصلاح و معرفی ارقام کیوی گزارش نشده است.

طولانی بودن دوره نونهال همراه با دوپایگی دانهال‌ها از جمله موانع اصلی به‌نژادی کیوی می‌باشد. بنابراین تعیین جنسیت زود هنگام در گیاهان برای به‌نژادگران اهمیت ویژه‌ای دارد. آن‌ها گیاهان ماده و نر را بسته به برنامه به‌نژادی ارزش‌گذاری می‌کنند (۱۲). در واقع بسته به هدف به‌نژادگر گیاهان نر و ماده ارزش‌گذاری می‌شوند (۱۲).

یکی از راه‌های تشخیص سریع و آسان جنسیت در مراحل اولیه زندگی، استفاده از نشانگرهای DNA، مبتنی بر تکنیک‌های PCR است (۱٤). به‌نظر می‌رسد تنها یک عامل در کنترل جنسیت در همه سطو پلوئیدی وجود دارد، زیرا نسبت ۱:۱ در بین جمعیت حاصل از تلاقی گیاهان نر و ماده برقرار است (۱٦). تشخیص جنسیت در مراحل اولیه رشد قبل از مرحله گلدهی در گیاهان دوپایه از لحاظ ریخت‌شناسی مشکل می‌باشد، اما در گیاهان بالغ وجود دیمورفیسم جنسی در مرحله گلدهی کاملاً مشخص است (۱۲).

طولانی بودن دوره نونهالی در درختان دو پایه، سبب استفاده گسترده از نشانگرهای ژنتیکی مولکولی به‌منظور صرفه‌جویی در زمان و منابع اقتصادی در برنامه‌های به‌نژادی شده است. مهم‌ترین نشانگرهای تعیین جنسیت در گیاهان شامل RAPD[1]، SCAR[2]، AFLP[3] و RFLP[4] ریزماهواره است. در پژوهش‌های قبلی با استفاده از نشانگرهای مولکولی مختلف الگوی باندی پیوسته با جنسیت را در پاپایا، کیوی هایوارد (۱۰ و ۱۵)، مارچوبه، پسته و بسیاری از گیاهان دوپایه در مرحله رویشی مشاهده نمودند (۱۲). در گزارشی با استفاده از نشانگر RAPD وابسته به جنس در کیوی مشخص شد که جنسیت در کیوی توسط سیستم XY در گامت نر تعیین می‌شود (۷ و ۸). هم‌چنین ژانگ و همکاران (۲۰۱۵) نیز برای تعیین جنسیت کیوی نقشه پیوستگی ژن با چگالی بالا تهیه و توانستند توالی سه نشانگر SSR ویژه تعیین جنسیت در کیوی را معرفی کنند (۱۸).

اگرچه در سال‌های اخیر کیوی‌فروت به‌عنوان یک محصول بسیار مهم و اقتصادی در ایران تبدیل شده است، اما متأسفانه هیچ پژوهش خاصی در ارتباط با اصلاح این میوه با ارزش گزارش نشده است. بنابراین پژوهش حاضر را می‌توان اولین گام در شروع یک برنامه به‌نژادی مدون کیوی دانست. این پژوهش به‌منظور اعتبارسنجی و اطمینان از انتخاب مناسب‌ترین نشانگر مولکولی مرتبط با جنسیت در جهت کاهش میزان خطا در حذف افراد ناخواسته طی مراحل اولیه رشد رویشی کیوی‌فروت انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: برای انجام این پژوهش از دو نوع ژنوتیپ کیوی‌فروت گوشت زرد به اسامی خورشید و نواب و یک ژنوتیپ گوشت قرمز (خونی) که امروز به‌صورت تجاری در برخی از نواحی شمال ایران کشت و کار می‌شوند، استفاده شد. هر سه ژنوتیپ دیپلوئید و متعلق به گونه *A. chininces* با عدد کرموزمی 2n=54 می‌باشند. برای این منظور برای هر ژنوتیپ از ۱۰ گیاه بالغ نر و۱۰ گیاه بالغ ماده در مجموع ۲۰ نهال نمونه برگی جهت استخراج DNA انتخاب گردید. نمونه‌های برگی ۲۵ فروردین ۱۳۹٦ از سرشاخه‌های حاصل از جست رشدی جدید تهیه شدند. بعد از ضدعفونی سطحی برگ‌ها با پنبه الکی، سریعا کدگذاری و در نیتروژن مایع منجمد گردید و

1- Random Amplified Polymorphic DNA
2- Sequence-characterized Amplified Region
3- Amplified Fragment Length Polymorphism
4- Restriction Fragment Length Polymorphism

www.SID.ir

Archive of SID

به فریز ۸۰- درجه سانتی‌گراد دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان انتقال داده شدند.

نحوه استخراج: DNA استخراج DNA ژنومی از برگ‌های جوان به روش CTAB[1] با کمی تغییرات صورت گرفت (٤). کمیت و کیفیت DNA استخراجی با استفاده دستگاه نانو دارپ و الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد مورد سنجش قرار گرفت و به کمک آن‌ها غلظت یکسان از DNA نمونه‌ها (۲۵ نانو گرم در میکرولیتر) آماده شد.

شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و الکتروفورز محصول PCR: واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل ۳ میکرولیتر کیت PCR (تهیه شده از شرکت سیناژن ایران شامل بافر PCR، $MgCL_2$، dNTP و آنزیم تگ پلیمراز)، بین ۰/٦ تا ۰/۸ میکرولیتر آغازگر (۱۰ میکرومول)، ۲ میکرولیتر DNA (۲۵ نانوگرم) بود که با آب مقطر دوبار تقطیر به حجم ۱۰ میکرولیتر رسانده می‌شد. هر چرخه دمایی شامل واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹٤ به‌مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه با دمای واسرشته‌سازی در ۹٤ درجه به‌مدت ۵۰ ثانیه، دمای اتصال بسته به پرایمر مورد استفاده برای ۵۵ ثانیه، دمای ۷۲ درجه به‌مدت ۵۰ ثانیه برای بسط قطعات و در آخرین چرخه مدت ۷ دقیقه بسط نهایی قطعات در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Senscquest, Labcycler) انجام شد.

به‌منظور بررسی محصول تکثیرشده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱، ۱/۵ و ۲ درصد بسته به نوع پرایمر استفاده شد. پس از رنگ‌آمیزی قطعات DNA تکثیر شده با کیت رنگی Safe Stain تهیه شده از شرکت سیناژن ایران، ژل‌ها تحت نور UV با استفاده از سیستم ژل داک Photo- Print Gel Documen (UVP, USA) مرئی‌سازی و تصویربرداری شدند. ویژگی‌های نشانگرهای مولکولی مرتبط با جنسیت در کیوی‌فروت، دمای اتصال و الگوی باندی آن‌ها مطابق با پژوهش‌های قبلی در جدول ۱ خلاصه شد.

جدول ۱- ویژگی‌های نشانگرهای مولکولی، توالی و دمای بهینه اتصال و الگوی باندی.

Table 1. Molecular markers, sequence, optimal annealing temperature and band pattern.

Molecular Marker	Sequence	Annealing Temperature	Band Size		Source
			Female	Male	
SmXf SmXr	AGGAGTCGGAGAGAGTAGAGAAG AGGAGTCGGATGACCGTTGGTGA	63-58°C Tuchdown	950	Null	Gill et al. (1998); Harvey et al. (1997)
SmYf SmYr	GACGCGAACCACCCACATTTGAG GACGCGAACCCGGCAAGTCGAAC	60°C	Null	870	
SmYf1 SmYr1	TCGCAATTCGTTAGGGATGATGCG CATAATCAACCATCCATAAAAACCAT	55°C	Null	770	
AooIf AooIr	TCAATGCATTTAGACATTCCTTTGTCCA TGGGTAAACATAACCACATGCCAAC	60°C	202	Null	Zhang et al. (2015)
AooIIf AooIIr	TACTGACGGTCACTCCCTAATCCC CATGGATGGAACTGGTGGAGGAAG	64°C	219	230	
AooIIIf AooIIIr	GCAAGCGGGGGTAAATTTGTACAG GGATAGGAGGAGCTTTACGGACCT	62°C	304	287	

1- Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide

www.SID.ir

Archive of SID

تجزیه آماری: داده‌های به‌دست آمده از محصول PCR هر پرایمر با استفاده از نرم‌افزار SAS و آزمون کای‌اسکوئر (X^2) مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۲).

جدول ۲- مقایسه تعداد نوارهای تولیدشده در هر جنس از ژنوتیپ‌های کیوی.

Table 2. Comparison of the number of line produced in each sex from genotypes of kiwifruit.

Total	Genotype			Band size	sex	نشانگر
	Red	Sun	Navab			
30	10	10	10	870	Male	smy
30	10	10	10	870	Female	
1^{ns}	1^{ns}	1^{ns}	1^{ns}			χ^2
0	0	0	0	950	Male	smx
30	10	10	10	950	Female	
60^{**}	20^{**}	20^{**}	20^{**}			χ^2
30	10	10	10	770	Male	Smy1
0	0	0	0	770	Female	
60^{**}	20^{**}	20^{**}	20^{**}			χ^2
30	10	10	10	202	Male	AooI
30	10	10	10	202	Female	
1^{ns}	1^{ns}	1^{ns}	1^{ns}			χ^2
30	10	10	10	230	Male	AooII
30	10	10	10	219	Female	
60^{**}	20^{**}	20^{**}	20^{**}			χ^2
30	10	10	10	330	Male	AooIII
30	10	10	10	330	Female	
1^{ns}	1^{ns}	1^{ns}	1^{ns}			χ^2

الف) ^{ns}، * و ** به‌ترتیب نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار و تفاوت معنی‌دار در سطوح ۵ و ۱ درصد با نسبت مورد انتظار ۱:۱ در جنسیت‌های مختلف است.

a) ns, * and ** respectively show no significant difference and significant difference at the levels of 5 and 1% with the expected ratio of 1: 1 in different genders.

ب) در پرایمر AooIII باند برای هر دو جنس بر خلاف انتظار در اندازه 330 bp تولید شد.

b) In the AooIII primer, a band of 330 bp was produced for both sexes, contrary to expectations.

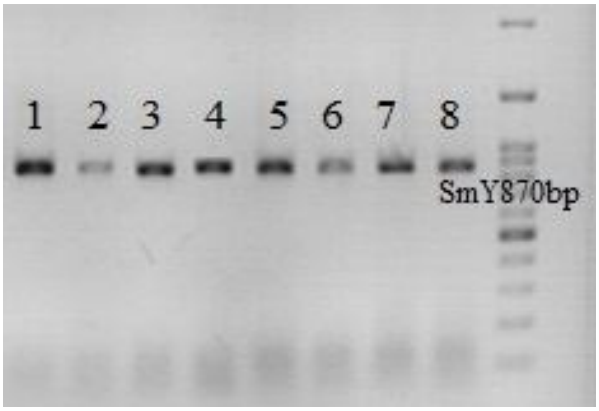
نتایج و بحث

بعد از استخراج DNA با سطح خلوص بالا، از برگ‌های نو رسته دانهال‌های کیوی‌فروت از چندین نشانگر مولکولی جهت تعیین جنسیت افراد جمعیت استفاده شد. سیستم‌های مختلف نشانگرها، با استفاده از گیاهان ماده و نر بالغی که به‌طور واضح از نظر مورفولوژی گل‌های آن‌ها، قابل شناسایی بود، مورد آزمون قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که برخی از نشانگرهای معرفی شده توسط پژوهشگران قبلی برای تعیین جنسیت *Actinidia chinensis* توانایی جداسازی جنسیتی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در این پژوهش را نداشتند. نشانگر SmY SCAR

www.SID.ir

Archive of SID

اختصاصی شده از نشانگر RAPD توسط پژوهشگران قبلی (۸) در هر سه ژنوتیپ مورد مطالعه (خورشید، نواب و خونی رد) برخلاف انتظار برای هر دو جنس الگوی باندی (الگوی باند (870(bp) یکسانی برای افراد نر و ماده نشان دادند (شکل ۱). بنابراین، به‌نظر می‌رسد این نشانگر قادر به تفکیک موفق دانهال‌های نر و ماده برای ژنوتیپ‌های مورد بررسی نمی‌باشد (جدول ۲). در موافقت با یافته‌های این پژوهش تحقیقات پژوهشگران پیشین (۸) نیز پیش‌بینی عدم توانایی جداسازی سایر ژنوتیپ‌های *A. chinensis* توسط این نشانگر را بیان نموده بودند، چرا که امکان این‌که نشانگر SmY در جداسازی جنسیت دچار اشتباه شود، ۱۲ درصد است. که ۳ درصد این خطا را به نوترکیبی جایگاه نشانگر و ۹ درصد آن را به آلودگی DNA استخراج شده مربوط دانستند (۸)، اگرچه روش استخراج CTAB یکی از روش‌های مناسب برای استخراج DNA از برگ گیاهان است که در این آزمایش نیز غلظت و خلوص مناسبی برای DNA استخراجی با این روش با استفاده از دستگاه نانو دارپ ثبت شده است. نتایج مشابه با نتایج پژوهش حاضر در آزمایش مشابه توسط پژوهشگران دیگر نیز گزارش شد (۲). به‌دست آوردن یک باند موردنظر برای تشخیص یک صفت از جمله جنسیت کار چندان آسانی نیست، دلیل احتمالی مغایرت بین نتایج را می‌توان عدم طراحی دقیق پرایمرهای نشانگر SCAR و تفاوت در تلاقی‌های والدینی و تفاوت ژنوتیپ‌های مورد بررسی *A. chinensis* بیان کرد.



شکل ۱- الگوی باندی نشانگر ((SmY(870(bp برای افراد نر و ماده کیوی‌فروت.

(۱: فرد نر ژنوتیپ نواب، ۲: فرد نر ژنوتیپ خونی رد، ۳: فرد نر ژنوتیپ خورشید، ٤: فرد ماده ژنوتیپ نواب، ٥: فرد ماده ژنوتیپ خونی رد، ٦: فرد ماده ژنوتیپ خورشید، ۷ و ۸: دانهال‌های حاصل از گرده‌افشانی آزاد).

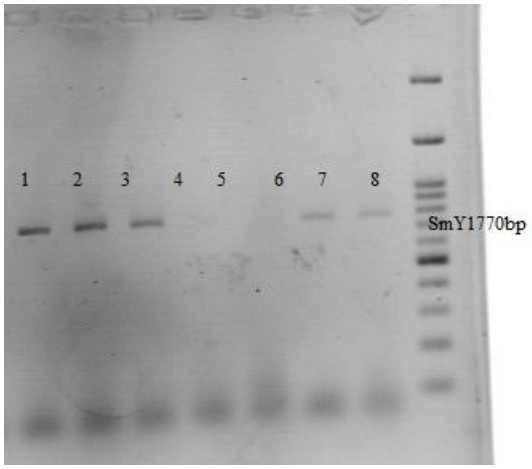
Fig. 1. The band pattern of SmY (870(bp)) for male and female kiwifruit plants.

(1: Male genotype Navab, 2: Male genotype Red, 3: Male genotype Sun, 4: Female genotype Navab, 5: Female genotype Red, 6: Female genotype Sun, 7 and 8: Seedlings Free pollinating).

نشانگر SmY1 اساساً براساس تفاوت‌های بین جنس‌های مختلف *A. chinensis* طراحی شد و الگوی باندی کوچک‌تر از ۷۷۰ (bp) را داراست (۱۸). این نشانگر در این پژوهش توانست افراد نر هر سه ژنوتیپ کیوی مورد مطالعه را به درستی تفکیک کند (شکل ۲). همین‌طور نشانگر SmX در هر سه ژنویپ برای افراد جنس ماده الگوی باندی ۹۵۰ (bp) ظاهر نمود (شکل ۳).

www.SID.ir

Archive of SID

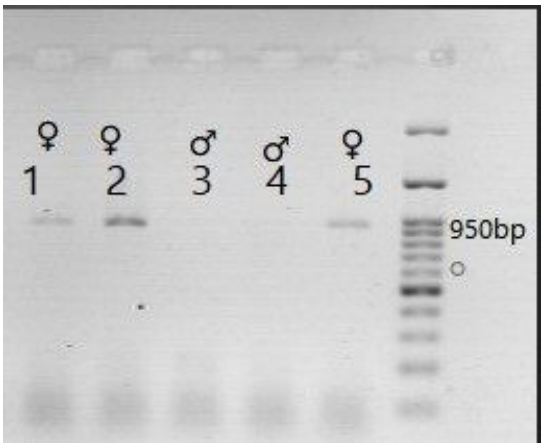


شکل ۲- الگوی باندی نشانگر ((SmY1 (770(bp برای افراد نر کیوی‌فروت.

(۱: فرد نر ژنوتیپ نواب، ۲: فرد نر ژنوتیپ خونی رد، ۳: فرد نر ژنوتیپ خورشید، ٤: فرد ماده ژنوتیپ نواب، ٥: فرد ماده ژنوتیپ خونی رد، ٦: فرد ماده ژنوتیپ خورشید، ۷ و ۸: دانهال‌های حاصل از گرده‌افشانی آزاد).

Fig. 2. The band pattern of the SmY1 (770(bp)) for male kiwifruit plants.

(1: Male genotype Navab, 2: Male genotype Red, 3: Male genotype Sun, 4: Female genotype Navab, 5: Female genotype Red, 6: Female genotype Sun, 7 and 8: Seedlings Free pollinating).



شکل ۳- الگوی باندی نشانگر ((SmX (950(bp برای افراد نر و ماده کیوی‌فروت.

(۱: فرد ماده ژنوتیپ نواب، ۲: فرد ماده ژنوتیپ خونی رد، ۳: فرد نر ژنوتیپ نواب، ٤: فرد نر ژنوتیپ خونی رد، ٥: فرد ماده در دانهال حاصل گرده‌افشانی باز ژنوتیپ‌ها) در افراد ماده مشاهده شد.

Fig. 3. The band pattern of the SmX (950(bp)) for male and female kiwifruit plants.

(1: Female genotype Navab 2: Female genotype Red, 3: Male genotype Navab , 4: Male genotype Red, 5: Female Seedlings Free pollinating).

نتایج این پژوهش با یافته قبلی سکلاریو و همکاران (۲۰۱٦) مطابقت داشت آن‌ها بیان داشتن که توسط نشانگر SmX و SmY1 در کولتیوارهای Tsechelidi و Hayward الگوهای باندی تک شکل[1] ۹۵۰ (bp) و ۷۷۰ (bp) را جداسازی و به‌منظور کشف تمامی SNPهای موجود در بین ژنوتیپ‌های مختلف

1- Monomorphism

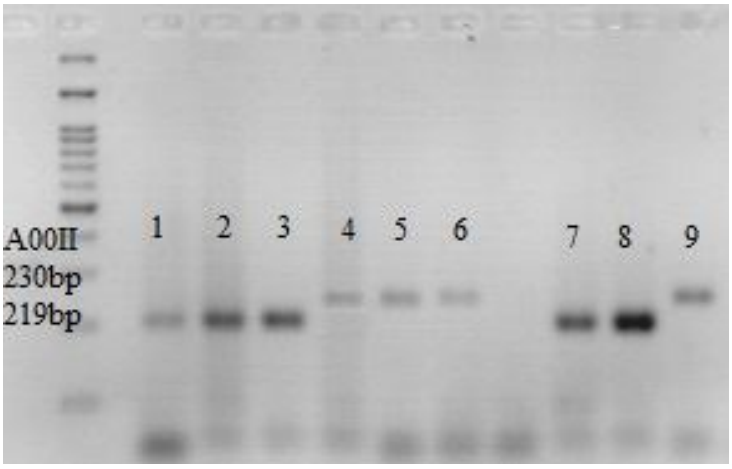
www.SID.ir

Archive of SID

آن‌ها را توالی‌یابی کردند (۱٤). در موافقت با نتایج این پژوهش هم‌چنین می‌توان بیان کرد که جیل و همکاران (۱۹۹۸) ظهور باند ۹۵۰ (bp) را در محصول PCR حاصل از تکثیر SmX در افراد ماده *A. chinensis* تأیید کرده‌اند (۸).

براساس نتایج پژوهشگران، دو نشانگر SCAR (توالی‌های مشخص شده مرتبط با جنسیت) SmX و SmY یک گروه مرتبط شده مشترک را نشان دادند (جدول ۲). ناحیه تعیین جنسیت[1] (SDR) در کیوی‌فروت با استفاده از نشانگرهای ویژه جنسیت SCAR در ناحیه سابتلومری[2] LG17 نمایش داده شدند، که به کرموزوم ۲۵ مرتبط بود (۱۸). توالی‌یابی هم‌زمان Smy و SmX هیچ هومولوگی را بین آن‌ها در هیچ توالی شناخته‌شده‌ای نشان نداد و شامل هیچ فرم باز شناخته‌شده‌ای نبود، بنابراین در ناحیه غیرکدکنندگی قرار دارند. اگر فرض شود که توالی تکثیرشده توسط SmY بر روی همولوگ Y جفت کروموزوم XY قرار دارد، انتظار می‌رود توالی بسیار مشابه آن بر روی همولوگ X ظاهر شود (۸). بااین‌حال امتیازدهنده نشانگرهای SmX و SmY در یک جمعیت حاصل از تلاقی *A. ctinidia rufa* × *A. chinensis* آشکار ساخت که این نشانگرها قوی نبوده و در تلاقی‌های بین گونه‌ها ضعیف عمل می‌کنند که این امر کاربرد آن‌ها در برنامه‌های به‌نژادی را محدود می‌کند (۱۸).

باندهای پلی‌مورفیسم به‌دست آمده از سه نشانگر SSR مورد بررسی، باندهای ویژه شناسایی افراد نر و ماده نبود، به‌جز نشانگر A00II با باند ویژه (۲۳۰ (bp)) در افراد نر و باند ویژه (۲۱۹ (bp)) در افراد ماده توانایی تفکیک دقیق افراد نر و ماده را داشته است (شکل ٤).



شکل ٤- الگوی باندی نشانگر A00II برای افراد نر (230bp) و افراد ماده (219bp) کیوی‌فروت.

(۱: فرد ماده ژنوتیپ نواب، ۲: فرد ماده ژنوتیپ خونی رد، ۳: فرد ماده ژنوتیپ خورشید، ٤: فرد نر ژنوتیپ نواب، ۵: فرد نر ژنوتیپ خونی رد، ٦: فرد نر ژنوتیپ خورشید، ۷ و ۸: افراد ماده در دانهال حاصل گرده‌افشانی باز ژنوتیپ‌ها، ۹: فرد نر در دانهال حاصل گرده‌افشانی باز ژنوتیپ‌ها).

Fig. 4. The band pattern of A00II for males (230(bp)) and females (219(bp)) kiwifruit plants.

(1: Female genotype Navab, 2: Female genotype Red, 3: Female genotype Sun, 4: Male genotype Navab, 5: Male genotype Red, 6: Male genotype Sun, 7 and 8: Female seedlings Free pollinating, 9: Male seedlings Free pollinating).

1- Sex-determination region
2- Subtelomeric

www.SID.ir

Archive of SID

ژانگ و همکاران(۲۰۱۵) در بررسی ۱۰۹۵ نشانگر SSR شناسایی شده در موقعیت ۰-۵ (Mb) با استفاده از MISA نشان دادند که تنها ۳ نشانگر SSR باندهای مشخصی را برای شناسایی جنسیت ارائه دادند (۱۸). سه نشانگر SSR در فاصله ۱-۲ (Mb) روی کرموزوم ۲۵ قرار داشتند، که ناحیه تعیین جنسیت (SDR) را به یک ناحیه یک میلیون جفت باز (Mb) تنزل داد. هم‌چنین آن‌ها نشان دادند که نشانگر A00I یک قطعه ۲۰۲ جفت بازی را در افراد ماده تکثیر می‌کند و در افراد نر محصولی تولید نمی‌شود و A002 و A003 باندهای متنوعی را بین افراد نر و ماده تولید می‌کنند. همان‌طور که بیان شد، در بررسی حاضر تنها پرایمر A00II قادر به تشخیص افراد ماده و نر جمعیت مورد بررسی بود. ناحیه تعیین جنسیت (SDR) در ناحیه سابتلومری قرار داشته و دارای تراکم ژنی بسیار پایین‌تری نسبت به متوسط گستره ژنوم با ۱۵۰ ژن با نواحی ۵(Mb) است (۱۸). هاروی و همکاران (۱۹۹۷) وجود یا عدم وجود باندهای مرتبط با نشانگر تعیین جنسیت در فرزندان را به‌علت وقوع نوترکیبی و کراسیینگ‌اور[1] در ناحیه کوچک تعیین جنسیت (SDR) دانسته‌اند (۱۰).

با توجه به این‌که تا حال نقشه‌برداری ژنومی Actinidia هنوز کامل نشده است، ژن‌های کنترل‌کننده تعیین جنسیت به‌طور کامل شناسایی نشده است و ما نمی‌دانیم که آیا این مارکرها به صفات کمی، کنترل‌کننده وظایفی مانند، توسعه و تمایز گل‌ها و تولید گرده بارور در ارتباط هستند. نقشه‌برداری کامل ژنومی برای در کامل مکانیسم‌های مربوط به‌منظور بهره‌برداری از ماده ژنتیکی جدیدی در اهداف اصلاحی مورد نیاز است (۱٤).

نتیجه‌گیری

حتی غربالگری غیر سنتی توسط نشانگرهای DNA مانند RAPD، AFLP و ISSR فرایندی فشرده، گران‌قیمت و با کارایی اندک هستند که جهت کمک به فرایند جداسازی از کل ژنوم بسیار نامناسب می‌باشند. در برنامه‌های به‌نژادی بسته به هدف، به‌نژادگر به‌منظور کاهش هزینه و کمبود فضا در باغ پژوهشی نیاز به حذف دانهال‌های ماده یا نر در مراحل اولیه روشد رویشی دارد. بر طبق نتایج این پژوهش، افراد تفکیک‌شده از نظر جنسیت توسط نشانگرهای SCAR SmY_1 و SmX یکسان بوده و می‌توان از این دو پرایمر جهت تسهیل تفکیک جنسیت در مرحله رویشی دانهال‌های کیوی در برنامه‌های به‌نژادی با کم‌ترین میزان خطا، در حذف منابع گیاهی بسته به هدف موردنظر استفاده کرد. پرایمر A00II با الگوی باندی ویژه (۲۳۰ (bp)) در افراد نر و الگوی باندی (۲۱۹ (bp)) در افراد ماده توانست به درستی تفکیک جنسیتی دانهال‌های مورد آزمایش را انجام دهد.

در مجموع، با توجه به وجود نتایج متغیر در مورد عملکرد نشانگرها و کوچک بودن ناحیه تعیین جنسیت در کرموزوم‌های کیوی موجب می‌شود هم‌چنین ژن‌های کنترل‌کننده تعیین جنسیت به‌طور کامل شناسایی نشده است و نمی‌توان اطمینان کامل داشت که این مارکرها به صفات کمی، کنترل‌کننده وظایفی مانند، توسعه و تمایز گل‌ها و تولید گرده بارور همبستگی کامل دارند. هم‌چنین باید بیان داشت که احتمال خطا در استخراج DNA و پی سی آر را نیز باید در نظر گرفته شود. بنابراین پیشنهاد می‌شود جمعیتی با تعداد افراد بیش‌تر نیز مورد مطالعه قرار بگیرد.

1- Crossing over

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1. Anker-Kofoed, E. 2015. A quantitative analysis of global kiwifruit trade. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences. No: 914 from http://stud.epsilon.slu.se.
2. Atak, A., Aydin, B. and Abdurrahim Kahraman, K. 2012. Sex determination of kiwifruit seedlings with molecular markers. In: Proceedings of Second International Symposium on Biotechnology of Fruit Species. 14-17 Oct., Akdeniz University, Antalya, Turkey, Pp: 197-203.
3. Bagheri, A. and Moshtaghi, N. 2005. Plant biotechnology: Achievements and future efforts. Fourth National Biotechnology Conference of Iran, Kerman, International Center for Advanced Science and Technology and Environmental Sciences, from https://www.civilica.com/Paper-NBCI04-NBCI04_004.html. (In Persian)
4. Doyle, J. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. 12: 13-15.
5. Ferguson, A. 2010. Kiwifruit: evolution of a crop. In: Proceedings of VII International Symposium on Kiwifruit. 12-17 Sep. Faenza (Italy). Pp: 31-42.
6. Food and Agriculture Organization. 2016. Data. Agricultural data in FAO. Retrieved November 6, 2018, from http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC.
7. Fraser, L.G., Tsang, G.K., Datson, P.M., De Silva, H.N., Harvey, C.F., Gill, G.P. and McNeilage, M.A. 2009. A gene-rich linkage map in the dioecious species *Actinidia chinensis* (kiwifruit) reveals putative X/Y sex-determining chromosomes. BMC genomics, 10: 1. 102.
8. Gill, G., Harvey, C., Gardner, R. and Fraser, L. 1998. Development of sex-linked PCR markers for gender identification in *Actinidia*. Theor. Appl. Gen. 97: 3. 439-445.
9. Harker, F., Jaeger, S., Gunson, A., Triggs, C., Roxburgh, M. and Amos, R. 2005. An experimental method for quantifying the value of taste: A case study with kiwifruit. Paper presented at the Abstract book for 6th Pangborn sensory science symposium. 7-11 August, Harrogate International Centre, North Yorkshire, UK. Abstract. 179p.
10. Harvey, C., Gill, G., Fraser, L. and McNeilage, M. 1997. Sex determination in *Actinidia*. Sex-linked markers and progeny sex ratio in diploid *A. chinensis*. Sex Plant Reprod. 10: 3. 149-154.
11. Lee-Jones, D. 2016. Kiwifruit Sector Report. Kiwifruit Sector Report. Wellington. New Zealand. NZ1601.
12. Milewicz, M. and Sawicki, J. 2013. Sex-linked markers in dioecious plants. Plant Omics. 6: 2. 144.
13. Richardson, A.C., Boldingh, HL., McAtee, P.A., Gunaseelan, K., Luo, Z., Atkinson, R.G. and Schaffer, R.J. 2011. Fruit development of the diploid kiwifruit, *Actinidia chinensis* 'Hort16A'. BMC Plant Biol. 11: 1. 182.
14. Sakellariou, M.A., Mavromatis, A.G., Adimargono, S., Nakabayashi, K. and Nakas, C. 2016. Agronomic, cytogenetic and molecular studies on hermaphroditism and self-compatibility in the Greek kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) cultivar 'Tsechelidis'. J. Hort. Sci. Biotech. 91: 1. 2-13.
15. Shirkot, P., Sharma, D.R. and Mohapatra, T. 2002. Molecular identification of sex in *Actinidia deliciosa var. deliciosa* by RAPD markers. Sci. Hort. 94: 1. 33-39.
16. Testolin, R., Messina, R., Lain, O. and Cipriani, G. 2004. A natural sex mutant in kiwifruit (*Actinidia deliciosa*). J. Crop Hort. 32: 2. 179-183.
17. Wang, Y.C., Zhang, L., Man, Y.P., Li, Z.Z. and Qin, R. 2012. Phenotypic characterization and simple sequence repeat identification of red-fleshed kiwifruit germplasm accessions. Hort. Sci. 47: 8. 992-999.
18. Zhang, Q., Liu, C., Liu, Y., VanBuren, R., Yao, X., Zhong, C. and Huang, H. 2015. High-density interspecific genetic maps of kiwifruit and the identification of sex-specific markers. DNA Res. 22: 5. 367-375.

www.SID.ir