شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/IDAJ.2022.357148.363

کاربرد نشانگرهای مولکولی RAPD برای تائید هیبریداسیون در عدس

مژگان تبریزی‌وند طاهری*، محمد کوهستانی چوان

موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مراغه، ایران

چکیده

با توجه به نقش و اهمیت تنوع ژنتیکی در پیشبرد برنامه‌های اصلاحی، شناسایی و توسعه تنوع ژنتیکی از طریق دورگ‌گیری از گام‌های اساسی برای به نژادگران به شمار می‌آید. به‌دلیل مشکلات دورگ‌گیری عدس در ایران، برنامه‌های اصلاحی بیشتر از طریق شناسایی لاین‌هایی با خصوصیات مطلوب زراعی و عملکرد دانه بالا نسبت به ارقام موجود دنبال شده است. راه‌اندازی برنامه دورگ‌گیری برای عدس در ایجاد نسل F_1 مطلوب و کاربرد آن‌ها در معرفی لاین‌ها و ارقام، موثر واقع می‌شود. به‌منظور توسعه تنوع ژنتیکی و تجمع صفات مطلوب از جمله عملکرد بالا، درشتی بذر، تیپ بوته ایستاده و زودرسی، هشت ژنوتیپ عدس که از لحاظ مورفولوژیکی و ژنتیکی تفاوت داشتند به‌عنوان والد انتخاب شده و در بلوک‌های تلاقی با یکدیگر تلاقی داده شدند. از ۲۳۰ تلاقی انجام گرفته، ۴۹ تلاقی موفق با ۶۹ بذر F_1 به دست آمد. به منظور تایید صحت دورگ‌گیری در تعدادی از نتاج F_1، از ۱۴ نشانگر RAPD استفاده شد. بدین منظور ۳۰ بوته F_1 مربوط به این تلاقی‌ها مطالعه شدند. وجود حداقل یک باند مشترک با والد پدری نشان‌دهنده تایید و معیار انتخاب بوته‌ها به‌عنوان F_1 واقعی است. بر این اساس، در تلاقی‌های شماره چهار، پنج و شش صحت دورگ‌گیری در پنج بوته تایید شد در حالی‌که در تلاقی-های شماره یک، دو و سه صحت دورگ‌گیری چهار بوته تایید شد. نتایج این مطالعه، کاربرد موفق نشانگرهای مولکولی در پیش‌برد برنامه‌های دورگ‌گیری عدس را نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: دورگ‌گیری، عدس، نشانگرهای مولکولی

* نگارنده مسئول: *tabrizivand@gmail.com* تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۹/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۰۶

مقدمه

عدس (*Lens culinaris* Medik.) گیاهی دیپلوئید (2n= 2x=14) است. این گیاه به عنوان منبعی جایگزین برای تامین پروتئین ارزان قیمت شناخته شده است. دانه عدس به طور متوسط دارای ۲۶ درصد پروتئین است (Khazaei *et al*., 2019). متاسفانه ژرم پلاسم عدس زراعی تنوع ژنتیکی نسبتا کمی دارد و از طرفی بخش اعظم برنامه‌های به نژادی محدود به انتخاب و گزینش توده‌های بومی برتر است. دورگ گیری، شانسی برای افزایش تنوع ژنتیکی فراهم می‌کند. عدس به دلیل پدیده کلیستوگامی یک گیاه خودبارور است که به طور طبیعی کمتر از ۰/۸درصد دگرباروری دارد. گل‌های کوچک و ظریف این گیاه کامل است و اخته کردن و به دنبال آن دورگ گیری مصنوعی آن را پرزحمت و ناموفق می‌سازد. با تقویت برنامه دورگ‌گیری عدس و بهبود شرایط آن، ضمن افزایش محسوس در تعداد دورگ‌های جدید (افزایش تنوع در جمعیت اصلاحی)، میزان موفقیت در رسیدن به ارقام و لاین‌های مطلوب افزایش خواهد یافت (Suvorova, 2014). هیبریداسیون علاوه بر توسعه تنوع ژنتیکی، از طریق اینتروگرسیون الل-های مطلوب مقاومت و یا تحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی انتقال می‌دهد (Ocampo *et al*., 2000). نتایج موفقی از دورگ‌گیری بین لاین‌های انتخابی عدس زراعی و بررسی صحت دورگ‌گیری با استفاده از صفات مورفولوژیکی در داخل کشور گزارش شده است (جهانگیری، ۱۳۷۹؛ جهانگیری ۱۳۸۲). چندین مطالعه در زمینه دورگ گیری درون گونه‌ای عدس انجام گرفته است (Mera and Erskin, ; Solh *et al*., 1980 ;1982 ;Malaviya and Shukla, 1990 ;Kumar and Singh, 1998). با توجه به نتایج دورگ گیری‌های بین زیرگونه‌ای عدس مشاهده شده است که عدس زراعی *Lens culinaris* ssp. *culinaris* با *Lens culinaris* ssp. *Orientalis* قابل تلاقی می‌باشد (Villankaurt and Slinkard, 1992) هرچند باروری هیبریدها بستگی به آرایش کروموزومی والد وحشی دارد (Ladzinsky *et al*., 1985) بنابراین با توجه به امکان دورگ گیری برای این گیاه می‌توان هیبریدهایی را برای صفات مورد نظر تحت شرایط کنترل شده گلخانه‌ای تولید کرد. در تلاقی بین عدس زراعی و گونه‌های وحشی *L. tomentosus* دانه تشکیل می‌شود ولی به تدریج جنین‌ها از بین می‌روند و تکنیک نجات جنین برای آن‌ها مورد نیاز است. برای اولین بار هیبرید بین گونه‌ای با استفاده از تکنیک نجات جنین در تلاقی بین عدس زراعی و *L. erovides* در اسپانیا انجام گرفت (Ladzinsky *et al*., 1985) و پروتوکل موثری برای احیای جنین هیبریدهای *L. odemensis*، *L. erovides* و *L.nigricans* گزارش کردند (Frantini and Ruiz, 2004).

صفات مورفولوژیکی برای تمایز بین بوته‌ها کافی نیستند، بنابراین نشانگرهای مولکولی برای تایید صحت دورگ گیری ضروری می‌باشند. کابالو و همکاران (۲۰۱۸) با استفاده از نشانگرهای STMS بوته‌های F_1 را در گیاه نخود شناسایی کردند. در

مطالعه‌ای دیگر اوسی و همکاران (۲۰۲۰) صحت دورگ گیری را با استفاده از نشانگرهای SNP در گوجه فرنگی تایید کردند. سولانکی و همکاران (۲۰۱۰) به منظور تایید صحت دورگ گیری بوته‌های F_1 حاصل از تلاقی PRECOZ × PL02 و Sehore 7403 × IPL 406 ، ۲۴ بوته عدس را توسط نشانگرهای RAPD و SSR بررسی کردند. نتایج نشان داد که ۲۰/۸ درصد بوته‌ها در نتیجه دورگ گیری حاصل شده‌اند. شارما و همکاران (۲۰۱۸) با استفاده از نشانگرهای SSR صحت دورگ گیری را در گیاه خردل تایید کردند و از ۲۰ نشانگر مورد استفاده پنج نشانگر چند شکل بودند. در آن مطالعه، وجود هر دو باند والدینی در شش بوته از هفت بوته صحت دورگ گیری را تایید نمود.

تنوع طبیعی موجود در گیاهان خود بارور زمانی که در معرض انتخاب قرار می‌گیرند به شدت کاسته می‌شود. برای استمرار اصلاح و ایجاد لاین‌های برتر، ضروری است که همواره تنوع ژنتیکی جدیدی از طریق دورگ گیری ایجاد شود. دقت طراحی هیبریداسیون بسیار مهم است. بسته به اهداف به نژادگر، انتخاب والدین بر اساس ارزش ژنتیکی صورت می‌گیرد. دقت در اداره کردن نسل‌های در حال تفکیک بعد از هر تلاقی و تشکیل F_1 و خودباروری آن‌ها از اهمیت بالایی برخوردار است (Osei *et al*, 2020). هدف یا اهداف برنامه هیبریداسیون می‌تواند افزایش عملکرد، سازگاری، بهبود کیفیت، مقاومت به بیماری‌ها یا برخی صفات ارزشمند اقتصادی باشد. به طور کلی یکی از راه‌های گسترش تنوع ژنتیکی و تجمیع ژن‌های مطلوب در یک ژنوتیپ و در نهایت تولید یک رقم مناسب و مطلوب، دورگ-گیری بین والدین مناسب می‌باشد. بنابراین در این پروژه هدف، تلاقی بین والدین انتخابی و تولید دورگ‌های جدید جهت توسعه تنوع ژنتیکی و نیز بهینه‌سازی بهترین شرایط دورگ گیری جهت افزایش راندمان دورگ گیری برای عدس و در نهایت بررسی صحت دورگ‌گیری در نتاج F_1 حاصل از این تلاقی‌ها با استفاده از نشانگرهای مولکولی برای اولین بار در کشور می‌باشد.

مواد و روش‌ها

هشت لاین و رقم که از لحاظ خصوصیات ژنتیکی و مورفولوژیکی حداکثر تفاوت را با یکدیگر دارند، به‌منظور ایجاد تنوع ژنتیکی و انتخاب ارقام پرمحصول با صفات مطلوب از جمله عملکرد بالا، پا بلندی، رنگ دانه و وزن صد دانه بین والدین انتخابی، انتخاب شدند. این والدین در بلوک‌های تلاقی، تحت شرایط کنترل شده گلخانه (از جنس پلاستیک فشرده)، در دو زمان متفاوت (جهت طولانی بودن زمان گلدهی برای تلاقی) کشت شدند (جدول ۱) و در زمان گلدهی با شناسایی گل‌های آماده و مناسب، عملیات اخته کردن و گرده افشانی مصنوعی انجام گرفت. هر والد در خطوط ۲ متری کاشته شد. بین والد پدری و مادری ۳۰ سانتی‌متر و بین دورگ‌گیری بعدی ۵۰ سانتی‌متر فاصله در نظر گرفته شد تا این‌که عملیات با سهولت انجام شود (شکل ۱). گل‌ها زمانی برای اخته کردن انتخاب شدند که طول گلبرگ‌ها تقریبا ۳/۴ کاسبرگ‌ها باشند. زمان

انجام دورگ‌گیری در ساعات ابتدایی صبح بود. هنگام اخته کردن، گل بین انگشت شست و سبابه قرار گرفت. از پنس مخصوص و تیز برای حذف کاسبرگ استفاده شد. گل را باز کرده و ۱۰ پرچم آن را حذف کرده و بلافاصله بعد از اخته کردن، گرده افشانی دستی انجام گرفت. بعد از گرده افشانی مصنوعی، به وسیله نخ‌های رنگی علامت گذاری شدند. در طول فصل رشد و نمو مراقبت‌های لازم زراعی (آبیاری، مبارزه با آفات و بیماری‌ها) انجام گرفت.

تهیه مواد گیاهی، استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلی مراز: نمونه‌های برگی به منظور استخراج DNA ژنومی در مرحله شش برگی تهیه و در داخل ازت مایع به آزمایشگاه منتقل شد. برای استخراج DNA از روش دلاپورتا تغییر یافته (۱۹۸۳) استفاده شد. کمیت DNA با استفاده از روش اسپکتروفتومتری تعیین شد. همچنین، با استفاده از نسبت جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ و ۳۲۰ نانومتر به ترتیب آلودگی‌های پروتئینی، پلی‌ساکاریدی و پلی‌فنلی و ذرات معلق مورد بررسی قرار گرفتند. سپس نمونه‌های DNAی استخراج شده توسط الکتروفورز در ژل آگارز ۰/۸ درصد از لحاظ شکستگی و وجود RNA بررسی شدند.

جدول ۱- اسامی و مشخصات لاین‌های شرکت کننده در برنامه دورگ گیری عدس

ردیف	ژنوتیپ/ رقم	صفات
۱	kimia	دانه متوسط - پابلند- پرمحصول
۲	Bilesavar	دانه درشت- پرمحصول
۳	Sana	دانه متوسط- پرمحصول- پاکوتاه
۴	Precoz	دانه متوسط- پابلند
۵	ILL10728	پر محصول – پاکوتاه- دانه متوسط
۶	Qaz89-90-PR65	عملکرد متوسط- پاکوتاه
۷	Qaz89-90-PR67	پر محصول – پاکوتاه- دانه متوسط
۸	FLIP2013-13L	پر محصول- دانه درشت- پاکوتاه

شکل ۱- دورگ گیری بین والدین انتخابی عدس

در این پژوهش از نشانگرهای RAPD استفاده شد (جدول ۲). ابتدا نشانگرها بر روی والدین ارزیابی شده و نشانگرهای چند شکل انتخاب شدند. اجزای واکنش در جدول ۳ بیان شده است. Master mix مورد استفاده در این آزمایش محصول شرکت Ampliqon شامل ترکیبات زیر می‌باشد:

- Tris-HCl (pH=8.5), (NH4)2SO4, 3mM MgCl2, 0.2 % Tween 20
- 0.4 mM dNTP
- 0.2 units/µl Ampliqon Taq polymerase
- Red dye

چرخه‌های حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلی مراز به این صورت در نظر گرفته شد: مرحله اول: واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، مرحله دوم: شامل ۳۵ چرخه متشکل از مراحل زیر: واسرشته سازی ثانویه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱دقیقه، اتصال آغازگرها در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و مرحله سوم: بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد.

جداسازی و آشکارسازی قطعات تکثیری با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد در دستگاه الکتروفورز ساخت شرکت Biocom و منبع تغذیه الکتروفورز ساخت شرکت Consort با ولتاژ ۱۳۰ ولت به مدت ۲/۵ ساعت و با استفاده از بافر 1X TBE انجام گرفت. قطعات تکثیری توسط نور UV و دستگاه uvTrancilluminator ساخت شرکت Biocom آشکار سازی شدند.

جدول ۲- اسامی و مشخصات آغازگرهای RAPD

شماره	نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی	شماره	نام پرایمر	توالی نوکلئوتیدی
1	OPM14	AGGGTCGTTC	8	OPG10	AGGGCCGTCT
2	OPB13	TTCCCCCGCT	9	OPG12	CAGCTCACGA
3	OPJ18	TGGTCGCAGA	10	OPM12	GGGACGTTGG
4	OPG02	GGCATGAGC	11	OPM16	GTAACCAGCC
5	OPF10	GGAAGCTTGG	12	OPD20	ACCCGGTCAC
6	OPD10	GGTCTACACC	13	OPE14	TGCGGCTGAG
7	OPA06	GGTCCCTGAC	14	OPD18	GAGAGCCAAC

جدول ۳- اجزای واکنش PCR

اجزا	غلظت پایه	حجم لازم برای یک واکنش (µl)
Maseter Mix	۴ میکرولیتر	۴
Primer	۱۰ میکرومول بر میکرولیتر	۲
H_2O	۳ میکرولیتر	۲
DNA	۲۵ نانوگرم بر میکرولیتر	۲

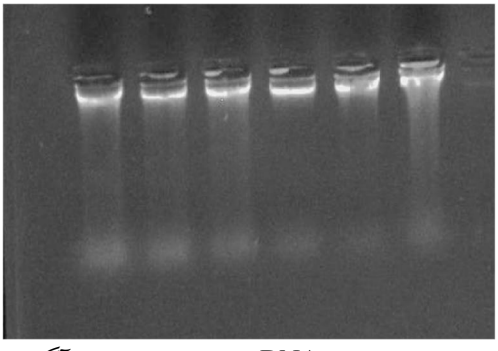
نتایج و بحث

استفاده از نشانگرهای مولکولی در عدس، در مقایسه با سایر گیاهان مانند گندم محدودتر می‌باشد. دلیل این موضوع مطالعات کمتر توالی یابی در این گیاه است، لذا امکان طراحی نشانگر برای تعیین چند شکلی در این گیاه محدودتر است. از جمله نشانگرهایی که در مطالعات تنوع ژنتیکی عدس بیشتر مورد استفاده قرار گرفته‌اند، نشانگرهای RAPD، SSR، AFLP و RFLP می‌باشند (Dikshit *et al*, 2015; Mansi *et al*, 2019; Reddy *et al*, 2010). بنابراین در این مطالعه از نشانگرهای RAPD برای مطالعه چند شکلی والدین و شناسایی F_1 صحیح استفاده شده است.

کمیت و کیفیت DNA: در نتیجه استخراج DNA، رسوب DNA با رنگ سفید تا شیری حاصل شد. کیفیت و کمیت بالای DNA یکی از معیارهای موفقیت در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز می‌باشد. نتایج اسپکتروفتومتری برای تعیین کمیت و کیفیت DNA در جدول ۴ نشان داده شده است که در آن برای تعیین کیفیت نمونه‌ها از نسبت جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ استفاده شد. از آنجائی که بیشترین جذب نور در اسیدهای نوکلئیک در طول موج ۲۶۰ نانومتر صورت می‌گیرد و چون بیشترین آلاینده‌های اسید نوکلئیک پروتئین‌ها هستند و نور را در طول موج ۲۸۰ نانومتر جذب می‌کنند، بنابراین این نسبت می‌تواند به عنوان معیار کیفیت DNA مطرح باشد. همچنین، با استفاده از نسبت جذب ۳۲۰ نانومتری آلودگی‌های پلی‌ساکاریدی و پلی فنولی و ذرات معلق نیز بررسی شد. الکتروفورز DNAهای حاصل توسط ژل آگارز ۰/۸ درصد، نوارهای فاقد کشیدگی و عدم توقف DNA در چاهک‌ها را نشان داد (شکل ۲). این نتایج حاکی از خلوص DNA و عاری بودن آن از آلودگی‌های RNA و پلی‌ساکاریدها بود.

جدول ۴- نتایج اسپکتروفتومتری برای تعیین کمیت و کیفیت DNAی نمونه‌های عدس

تعداد افراد	غلظت DNA (نانوگرم بر میکرولیتر)	نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰	جذب ۳۲۰ نانومتر
۴۶	۱۰۵۸/۵	۱/۸	۰/۰۰۴



شکل ۲- کیفیت نمونه‌هایی از DNA استخراج شده در ژل آگارز ۰/۸ درصد

نتایج دورگ گیری و چند شکلی بین والدین: دورگ‌گیری از نیمه دوم اردیبهشت در گلخانه آغاز شد. در مجموع از ۲۳۰ تلاقی انجام شده، تعداد ۴۹ تلاقی موفق و ۶۹ بذر حاصل شد (جدول ۵). ۱۴ عدد نشانگر RAPD برای بررسی چند شکلی بین والدین کیمیا، بیله سوار، پرکوز، سنا، ILL10728، Qaz89-90-PR65، Qaz89-90-PR67 و FLIP2013-13L استفاده شد که ۱۱ عدد از این نشانگرها بین والدین چند شکل بودند، لذا در بررسی نتاج مورد استفاده قرار گرفتند. در کل، ۶۳ الل RAPD از ۲۸۷ عدد چند شکل بود (جدول ۶). از این تعداد الل چند شکل، ۶۰ عدد مختص ژنوتیپ پدری بود. بیشترین الل اختصاصی والد پدری توسط نشانگرهای OPD-20، OPJ-18 و OPM-16 مشاهده شد. کمترین الل اختصاصی نیز مربوط به نشانگرهای OPD-10، OPB-13، OPM-12 و OPD-18 بود. الل‌های چند شکل شناسایی شده در این مطالعه برای اهداف مختلف از جمله برنامه‌های تایید دورگ گیری می‌تواند مفید باشد.

بررسی صحت دورگ گیری در نتاج F_1: در این پروژه پنج بوته F_1 حاصل از هر شش تلاقی توسط نشانگرهای RAPD مطالعه شدند. در بررسی‌های مولکولی از آنجائی‌که نتاج F_1 از بوته‌های مادری برداشت شده‌اند، وجود باند مشترک بین نتاج F_1 و والد پدری نشان دهنده تایید صحت دورگ گیری می‌باشد. همانطور که در جدول ۷ مشاهده می‌شود صحت دورگ‌گیری بوته‌های F_1 حاصل از تلاقی دوم یعنی Kimia × QAZ89-90-PR65 توسط ۷۲ ٪ نشانگرها (هشت نشانگر از ۱۱ نشانگر) تایید شد. بوته‌های حاصل از تلاقی Qaz89-90-PR67 × Bilesavar در رتبه بعدی بودند و ۶۳ ٪ از نشانگرها دورگ-گیری را در این تلاقی تایید کردند. نشانگر OPD-20 در تمام تلاقی‌های انجام گرفته، انجام دورگ‌گیری را در اغلب بوته‌ها تایید کرد. نشانگرهای OPM-16، OPJ-18 و OPG-02 با تشکیل باند پلی مورف در چهار تلاقی، در رتبه بعدی قرار داشتند.

جدول ۵- نتایج حاصل از برنامه دورگ گیری گلخانه عدس

ردیف	تلاقی	تعداد کل تلاقی	تعداد تلاقی موفق	تعداد بذر
۱	ILL10728 × kimia	۴۸	۱۳	۱۳
۲	QAZ89-90-PR65 × Kimia	۵۰	۱۵	۲۴
۳	Sana × Kimia	۴۸	۱۰	۱۰
۴	Precoz × Bilesavar	۳۵	۳	۶
۵	Qaz89-90-PR67 × Bilesavar	۳۰	۵	۱۰
۶	ILL10728 × FLIP2013-13L	۱۴	۳	۶
۷	Qaz89-90-PR65 × FLIP2013-13L	۵	۰	۰

جدول ۶- جزئیات باندهای تکثیری توسط نشانگرهای RAPD

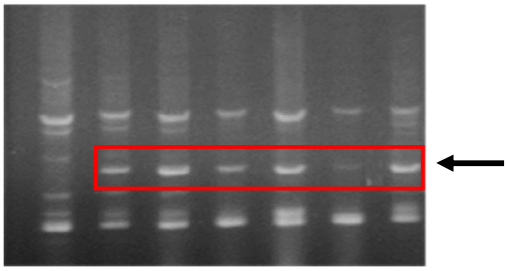
نشانگر	تعداد باند تکثیر شده	باند پلی مورف	باند منوموف	باند مختص ژنوتیپ
OPM-16	۲۹	۱۲	۱۷	۹
OPD-10	۳	۲	۱	۲
OPJ-18	۳۶	۹	۲۷	۹
OPB-13	۲۰	۲	۱۸	۲
OPG-12	۴۵	۶	۳۹	۷
OPM-12	۱۲	۲	۱۰	۲
OPD-18	۱۹	۲	۱۷	۲
OPG-10	۴۲	۱۰	۳۲	۷
OPD-20	۲۶	۸	۱۸	۱۰
OPG-02	۲۱	۶	۱۵	۶
OPM-14	۳۴	۴	۳۰	۴
مجموع	۲۸۷	۶۳	۲۲۴	۶۰

نشـــانگرهای OPB-13، OPD-18 و OPM-14 فقط در دو تلاقی، باند پلی مورف و مختص والـد پدری را تشکیل دادند. طبق اطلاعـات ارائـه شـده در جدول ۷، در نتایج حاصل از تلاقی‌های چهـار، پنج و شش صـحت دورگ‌گیـری بـرای هـر پـنج بوته تایید شد. در شـکل ۳، بانـدهای تکثیـر شـده توسط نشانگر OPG-12 برای تلاقی ششـم، نشـان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود بانـد اختصاصی والد پدری در تمام پـنج بوتـه مشـاهده می‌شود. در شکل ۴ وجود باند پدری در تمام پـنج بوتـــه توســـط نشـــانگر OPD-10 در تلاقـــی اول مشاهده می‌شود.

در شکل ۵ نیز نتایج حاصـل از نشـانگر OPD-18 بـر روی تلاقـی پـنج مشـاهده مـی‌شـود. کـاربرد نشـانگرها در شناسـایی صـحت هیبریداسـیون در سایر گیاهان نیز گزارش شده است (Paran *et al*, 1995; Muhammad *et al*, 2008).

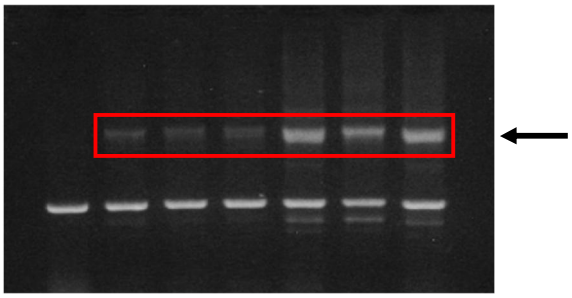
در تلاقی‌های یک، دو و سـه فقـط چهـار بوتـه بـه عنوان F_1 واقعـی شناسـایی شـدند. یـک نمونـه در شکل ۶ مشـاهده مـی‌شـود کـه مربـوط بـه نشـانگر OPJ-18 بر روی تلاقی دوم است. در این تلاقـی، صحت دورگ‌گیری در بوته شماره سه توسط این نشانگر تایید نشده است. دلیـل ایـن امـر مـی‌توانـد خودباروری و یا مخلـوط شـدن بـا سـایر بـذور در زمان کاشت باشد.

در تلاقی اول یعنی kimia × ILL10728، صحت دورگ‌گیری بوته‌های یک، سـه، چهـار و پـنج بـه ترتیـب توسـط سـه، پـنج، شـش و چهـار نشانگر تایید شد.



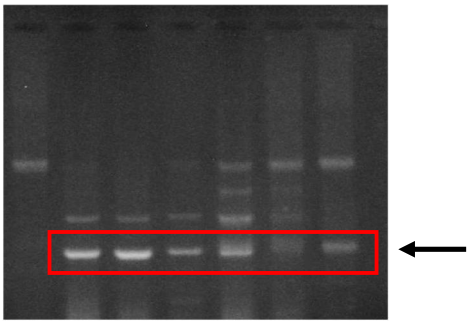
شکل ۳- نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توسط نشانگر OPG-12 بر روی تلاقی ششم

از چپ به راست: والد مادری، بوته‌های ۱ تا ۵ و والد پدری



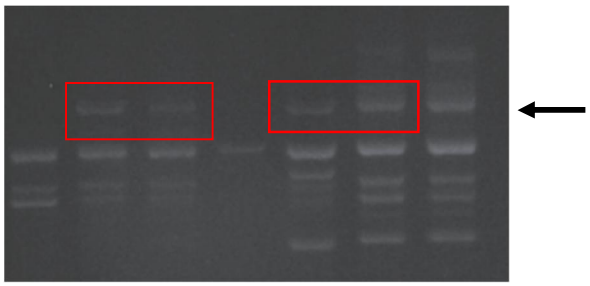
شکل ۴- نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توسط نشانگر OPD-10 بر روی تلاقی اول

از چپ به راست: والد مادری، بوته‌های ۱ تا ۵ و والد پدری



شکل ۵- نتایج حاصل از نشانگر OPD-18 بر روی تلاقی پنجم

از چپ به راست: والد مادری، بوته‌های ۱ تا ۵ و والد پدری



شکل ۶- نتایج حاصل از نشانگر OPJ-18 بر روی تلاقی دوم

از چپ به راست: والد مادری، بوته‌های ۱ تا ۵ و والد پدری

جدول ۷- مشخصات بوته‌های F_1 تایید شده توسط نشانگرهای RAPD

نشانگر	IDLCMAR-019-6	IDLCMAR-019-5	IDLCMAR-019-4	IDLCMAR-019-3	IDLCMAR-019-2	IDLCMAR-019-1
OPM-16	–	۵-۴-۳-۲-۱	۵-۴-۳	۵-۴	۵-۴	۵-۴-۳
OPD-10	–	–	–	–	–	۵-۴-۳-۲-۱
OPJ-18	۵-۴-۳	۵-۴-۳-۲	۵-۴-۳-۲-۱	۵-۴	۵-۴	–
OPB-13	۵-۴	–	–	۵-۴	–	–
OPG-12	۵-۴-۳-۲-۱	–	–	–	۵-۴-۲-۱	۵-۴-۳-۱
OPM-12	–	–	–	–	۲-۱	۴
OPD-18	–	۵-۴-۳-۲-۱	–	۵-۴-۳-۲	–	–
OPG-10	۵-۴-۳	۵-۴-۳	۵-۴-۱	–	۵-۴-۲-۱	–
OPD-20	۵-۴-۳-۲-۱	۵-۴-۳-۲-۱	۵-۴-۳-۲-۱	۵-۴-۳-۲	۵-۴-۲-۱	۵-۴-۳
OPG-02	–	۵	۴-۳	۲	۲-۱	۴-۳-۱
OPM-14	–	۵-۴-۳-۲-۱	–	–	۵-۴-۲-۱	–

جدول ۸- برخی از صفات لاین‌ها، ارقام و دورگ‌های حاصل

تلاقی	نام دورگ	روز تا گلدهی	زمان رسیدگی	ارتفاع بوته	تیپ بوته	سایز دانه	رنگ پوسته
ILL10728 × kimia	IDLCMAR-019-1	۶۷	۸۸	۲۴	E	درشت	سبز
QAZ89-90-PR65 × Kimia	IDLCMAR-019-2	۶۵	۸۳	۲۲	E	نسبتا درشت	سبز
Sana × Kimia	IDLCMAR-019-3	۶۳	۸۳	۲۵	E	متوسط	مخلوط
Precoz × Bilesavar	IDLCMAR-019-4	۶۷	۸۷	۲۳	E	درشت	سبز
Qaz89-90-PR67 × Bilesavar	IDLCMAR-019-5	۶۷	۸۷	۲۴	E	درشت	مخلوط
ILL10728 × FLIP2013-13L	IDLCMAR-019-6	۶۷	۸۷	۲۲	-	درشت	سبز
والد		روز تا گلدهی	زمان رسیدگی	ارتفاع بوته	تیپ بوته	سایز دانه	رنگ پوسته
ILL10728		۶۸	۸۹	۲۲	E	نسبتا ریز	مخلوط
Kimia		۶۵	۸۷	۲۴	E	متوسط	مخلوط
QAZ89-90-PR65		۶۵	۸۷	۲۱	E	نسبتا درشت	سبز
Sana		۶۳	۸۵	۲۱	E	درشت	قهوه‌ای
Precoz		۶۳	۸۵	۲۴	E	درشت	سبز
Bilesavar		۶۵	۸۶	۲۳	E	متوسط	مخلوط
Qaz89-90-PR67		۶۵	۸۷	۲۳	E	درشت	مخلوط
FLIP2013-13L		۶۷	۸۷	۲۲	E	درشت	مخلوط

در تلاقی دوم QAZ89-90-PR65 × Kimia صحت دورگ گیری بوته های یک، دو، چهار و پنج هر کدام توسط شش نشانگر تایید شد. این مقدار برای تلاقی سوم Sana × Kimia برای بوته-های دو، سه، چهار و پنج به ترتیب سه، دو، پنج و پنج نشانگر بود. در رابطه با تلاقی چهارم یعنی Precoz × Bilesavar بوته‌های یک، دو، سه، چهار و پنج توسط سه، دو، چهار، پنج و چهار نشانگر تایید شدند. تلاقی پنجم Bilesavar × Qaz89-90-PR67 به ترتیب چهار، پنج، شش، شش، هفت نشانگر بوته‌های F_1 صحیح را شناسایی کردند. نهایتا در آخرین تلاقی FLIP2013-13L × ILL10728 بوته‌های یک، دو، سه، چهار و پنج توسط دو، دو، چهار، پنج و پنج نشانگر تایید اعتبار شدند.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان بیان کرد که شناسایی F_1های صحیح توسط نشانگرهای مولکولی احتمال خطا را در برنامه‌های به نژادی و اداره نسل‌های در حال تفکیک بشدت کاهش می-دهد. با توجه به این‌که در اغلب موارد صفات مورد نظر برای انتقال، در نسل‌های اولیه مشاهده نمی‌شوند و گزینش برای این صفات به نسل‌های پیشرفته‌تر موکول می‌شود بنابراین، استفاده از روش مولکولی از نظر زمان و هزینه مقرون به صرفه بوده و از طرفی دقت بالاتری داشته و احتمال تشکیل جمعیت‌های نادرست را کاهش می‌دهد.

منابع

جهانگیری عادل. ۱۳۷۹. گزارش نهایی پروژه بررسی نسل‌های در حال تفکیک عدس در آزمایشات داخلی. موسسه تحقیقات دیم کشور. شماره ۱۳۰۸.

جهانگیری عادل. ۱۳۸۲. گزارش نهایی پروژه بررسی نسل‌های در حال تفکیک عدس در آزمایشات داخلی. موسسه تحقیقات کشاورزی دیم کشور. شماره ۱۷۵۹.

Caballo C, Castro P, Gil J, Izquierdo I, Millan T, Rubio J. 2018. STMS (sequence tagged microsatellite site) molecular markers as a valuable tool to confirm controlled crosses in chickpea (*Cicer arietinum* L.) breeding programs. Euphytica: 214-231.

Dellaporta SL, Wood J, Hicks, B. 1983. A plant DNA minipreparation: Version II. Plant Molecular Biology Reporter, 4: 19-21.

Dikshit HK, Singh A, Singh D, Aski MS, Prakash P, Jain N, Meena S, Kumar SH, Sarker A. 2015. Genetic diversity in *Lens* species revealed by EST and Genomic simple sequence repeat analysis. PloS One. 10: 1-15.

Frantini R, Ruiz ML. 2004. Intra- specific and inter-sub-specific crossing in lentil (*Lens culinaris* Medik). Canadian Journal of Plant Science 84: 981-986.

Khazaei H, Subedi M, Nickerson M, Martinez-Villaluenga c, Frias J, Vanderberg A. 2019. Seed protein of lentils: current status, progress, and food applications. Foods. 8: 1- 23.

Kumar A, Singh DP. 1998. Hybridization technique in lentil under field conditions. Lens Newslet 25: 1-5.

Ladzinsky G, Cohen D, Meuhlbauer FJ. 1985. Hybridization in the genus Lens by means of embryo culture. Theoretical and Applied Genetics 70: 97-101.

Malaviya DR, Shukla RS. 1990. Crossability among macrosperma and microsperma varieties of *Lens culinaris* Medik. Indian Journal of Genetics 50: 63–69.

Mansi JM, Ennami M, Brache FZ, Gaboun F, Benbrahim N, Triqui Z, Mentag R. 2019. Characterization of genetic diversity and population structure of Moroccan cultivars and landraces using molecular markers. Physiological Molecular Biology Plants. 25: 965-974.Mera M, Erskine W. 1982. Crossing techniques for lentil under field conditions. Lens Newslet 9: 11–15.

Muhammad AA, Muhammad TS, Shahid IA, Shahid N, Shiraz A, Amjad A. 2008. Hybrid authentication in upland cotton through RAPD analysis. Australian Journal of Crop Science. 2: 141-149.

Ocampo B, Conicella C, Moss JP. 2000. Wide crossing: opportunities and progress, Pages 411-419. In R. Knight, ed. Linking research and marketing opportunities for pulses in the 21st century, proceedings of the Third International Food Legumes Research Conference. Current Plant Science and Biotechnology in agriculture, 34. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.

Osei MK, Danquah E, Danquah A, Blay E, Dapaah HA. 2020. Hybridity testing of tomato F_1 progenies derived parents with varying fruit quality and shelf life using single nucleotide polymorphism. Scientific African. 8: 1-16.

Paran I, Horowitz M, Zamir D, Wolf S. 1995. Random amplified polymorphism DNA markers are useful for purity determination of tomato hybrids. Horticulture Science 30: 377-382.

Reddy MRK, Rathour R, Kumar N, Katoch P, Sharma TR. 2010. Cross genera legumes SSR markers for analysis of genetic diversity in *Lens Culinaris*. Plant Breeding. 5: 514-518

Sharma M, Dolkar D, Salgorta RK, Sharma D, Singh PA, Gupta SK. 2018. Molecular marker assisted confirmation of hybridity in Indian mustard (*Brassica junceae* L.). 7 (9): 1-7.

Solanki RK, Sweta S, Kumar J. 2010. Molecular marker assisted testing of hybridity of F_1 plants in Lentil. Journal of Food Legumes 23(1): 21-24.

Solh MB, Paredes OM, Tiwari AS. 1980. Crossing technique in lentil under field conditions. Lens Newslet. 7: 9–14.

Suvorova G. 2014. Hybridization of cultivated lentil (*Lens culinaris* Medik.) and wild species *Lens tomentosus* ladzinsky. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 50: 130-134.

Villancourt RE, Slinkard AE. 1992. Inheritance of new genetic markers in Lentil (*Lens Miller*). Euphytica 64: 227-236.

DOI: 10.22092/IDAJ.2022.357148.363

Application of RAPD molecular markers to confirm hybridization in Lentil

Mojgan Tabrizivand Taheri*; Mohammad Kouhestani Chevan

Dryland Agricultural Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Maragheh, Iran

Abstract

Due to the role of genetic diversity in breeding programs, identification and producing genetic diversity through crossing is one of the basic steps for breeders. Major lentil breeding programs in Iran are including the selection of lines among landraces with high yield and suitable agronomic characters as the lentils crossing challenges. So, setting up a crossing program for lentil will be effective in producing F_1 and using them for introducing new varieties. The aim of this project was to produce genetic diversity and gather suitable characteristics such as high yield, cold tolerance, erect type and etc. in a single genotype. So, 8 genotypes that were morphologically and genetically distinct, were used as parents and artificially crossed. 49 out of 230 crosses were successful and 69 F_1 seeds were collected. In order to verify the hybridity, 30 plants of the F_1 generation were screened with 14 RAPD primers. Respectively 5 plants of 4, 5, 6 crosses and 4 plants of 1, 2, 3 crosses were true hybrids because of the carried minimum of one male parent specific band. This research showed the successful deployment of molecular markers role in lentil crossing program advancement.

Key words: Crossing, Lentil, Molecular Markers

* Corresponding author: *tabrizivand@gmail.com* Submit date:2021/12/18 Accept date: 2022/08/28