DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.2.8
مقاله پژوهشی

# استفاده از توده‌های خودرو *Asparagus officinalis* در برنامه‌های اصلاحی مارچوبه

**محمدابراهیم رنجبر[۱]، زهرا قهرمانی[۱*]، سید جواد موسوی‌زاده[۲]، طاهر برزگر[۱] و خوان خیل[۳]**

[۱] ایران، زنجان، دانشگاه زنجان، دانشکده علوم کشاورزی، گروه علوم باغبانی

[۲] ایران، گرگان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، دانشکده علوم کشاورزی، گروه تولیدات گیاهی

[۳] اسپانیا، کوردوبا، دانشگاه کوردوبا، دانشکده ژنتیک، گروه ژنتیک

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۲۵

## چکیده

مهم‌ترین گونه تجاری مارچوبه *Asparagus officinalis* است. برخی از توده‌های خودرو این گونه در ایران پراکنش دارند که در شرایط مختلف محیطی مانند خاک‌های شور و خشک و بازه وسیعی از ارتفاع و شرایط آب و هوایی رشد می‌کنند. تلاقی بین و درون‌گونه‌ای تکنیکی پرکاربرد در جهت معرفی صفات از گونه‌ها و توده‌های خودرو به ارقام تجاریست. اهداف کلی پژوهش حاضر بررسی امکان استفاده از توده‌های خودرو گونه *A. officinalis* در برنامه‌های اصلاحی محصول مارچوبه و همچنین استفاده از نشانگرهای ملکولی بعنوان ابزاری ارزشمند و پرکاربرد در جهت تشخیص گیاهان هیبرید بودند. در این پژوهش هیبریداسیون بین‌گونه‌ای موفق برای تلاقی *A. officinalis* (*2x*) × *A. persicus* (2x) بکمک گرده‌افشانی دستی صورت پذیرفت. AG7 می‌تواند نشانگر ملکولی مناسبی در جهت تشخیص گیاهان هیبرید بین‌گونه‌ای برای گونه *A. officinalis* (توده خودرو متعلق به استان کرمان) در روش گرده‌افشانی آزاد و تلاقی‌های کنترل‌شده باشد. آلل اختصاصی به طول ۱۸۷ bp بوسیله نشانگر AG8 در توده-های خودرو *A. officinalis* شناسایی شد.

**واژه های کلیدی**: توده‌های خودرو، مارچوبه ایرانی، نشانگرهای SSR، هیبریداسیون بین‌گونه‌ای

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۵۴۱۶۹۶۰، پست الکترونیکی: z.ghahremani@znu.ac.ir

## مقدمه

مهمترین گونه تجاری مارچوبه *Asparagus officinalis* است که ارقام مختلف آن در عین برخورداری از صفات زراعی مطلوب به بسیاری از تنش‌های زنده و غیرزنده حساس هستند (۹). پژوهش‌هایی که در سال‌های اخیر در داخل کشور صورت پذیرفت نشان داد که توده‌های خودرویی از این گونه در مناطق مختلف کشور رشد و پراکنش دارند که به برخی از رایج‌ترین تنش‌ها در کشت و پرورش مارچوبه مقاومند و در شرایط مختلف محیطی مانند خاک‌های شور و بازه وسیعی از ارتفاع و شرایط آب و هوایی رشد می‌کنند (۹ و ۱۳). تلاقی بین و درون‌گونه‌ای تکنیکی پرکاربرد برای انتقال صفات از گونه‌ها و توده‌های خودرو به ارقام تجاری مارچوبه است (۱۵). بر اساس نتایج حاصل از پژوهش انجام شده در سال ۲۰۱۸ میلادی، امکان بکارگیری رقم مورادو دهتور (Morado de Huétor) که یک رقم مارچوبه متعلق به کشور اسپانیا است و دارای تنوع سطح پلوئیدی بوده بعنوان والد حدواسط جهت انتقال صفات از گونه‌های وحشی مارچوبه با سطوح پلوئیدی مختلف به ارقام تجاری وجود دارد (۴ و ۱۲). از مزایای استفاده از نشانگرهای ملکولی در کنار نشانگرهای مورفولوژیکی در برنامه‌های اصلاحی مارچوبه می‌توان به تعداد نامحدود، تشخیص آسان، تولید چندشکلی بالا و تأثیرناپذیری از عوامل محیطی، اثرات اپیستازی و

مقاله پژوهشی
DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.2.8

پلیوتروپی اشاره کرد (۱ و ۲). نشانگرهای مورفولوژیکی به علت محدود بودن و تأثیرپذیری زیادشان از عوامل محیطی، فاکتورهای چندان قابل اعتمادی در جهت تشخیص گیاهان هیبرید و تعیین ماهیت ژنتیکی آن‌ها محسوب نمی‌شوند (۶ و ۱۷). کاربرد موفق ۲۳ نشانگر RAPD، در جهت شناسایی هیبریدهای بین‌گونه‌ای حاصل از تلاقی گونه‌های خودرو *A. acutifolius* و *A. maritimus* با رقم تجاری مارچوبه گزارش شده است (۱۷). اهداف کلی پژوهش حاضر، بررسی امکان تلاقی بین توده‌های خودرو ایرانی *A. officinalis* با رقم تجاری مارچوبه بمنظور انتقال ژن‌های مهم از توده‌های خودرو به رقم تجاری، شناسایی نشانگرهای ملکولی مناسب جهت تشخیص و تعیین اصالت گیاهان هیبرید شکل گرفته و شناسایی نشانگرهای ملکولی مناسب با توانایی تشخیص آلل اختصاصی در گونه *A. officinalis* بود.

## مواد و روشها

پژوهش حاضر در دو بخش مجزا شامل بخش اول، تلاقی بین و درون‌گونه‌ای بصورت دستی و بخش دوم، گرده-افشانی آزاد بین توده‌های خودرو و ارقام تجاری مارچوبه در طی سال‌های ۱۳۹۴ تا ۱۳۹۸ در دانشگاه زنجان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، دانشگاه کوردوبا اسپانیا و مرکز تحقیقات ایفاپا (واقع در شهر کوردوبا اسپانیا) صورت پذیرفت.

**تلاقی دستی:** مواد گیاهی و برنامه تلاقی بینشان در جدول ۱ قابل مشاهده است.

جدول ۱- مواد گیاهی مورد استفاده و برنامه تلاقی بین و درون گونه‌ای به صورت دستی

| ردیف | مواد گیاهی | کد گیاه والد | سطح پلوئیدی | نوع | منشأ و شرایط آب و هوایی | ویژگی‌های اصلاحی | برنامه تلاقی | کد گیاه هیبرید حاصل از تلاقی |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | *A. officinalis 1* | AO6 | 2n=2x | توده اهلی شده | ایران، البرز – مدیترانه‌ای سرد | صفات زراعی مطلوب | AO6×Ape | Ao-Ap |
| ۲ | *A. officinalis 2* | Ao4 | 2n=2x | توده خودرو | ایران، کرمان، جیرفت – بیابانی | ۱. مقاومت به خاک شور<br>۲. مقاومت به خاک قلیایی<br>۳. مقاومت به خشکی خاک<br>۴. مقاومت به دمای بالا | Ht815×Ao4 | Ht-Ao84 |
| ۳ | *A. officinalis 3* | Ao1 | 2n=4x | توده خودرو | ایران، البرز، طالقان – مدیترانه‌ای سرد | ۱. مقاومت به خاک شور<br>۲. مقاومت به خاک قلیایی | Ht262×Ao1 | Ht-Ao21 |
| ۴ | Morado de Huetor 1 | Ht815 | 2n=2x | رقم تجاری | اسپانیا، آندالوسیا، گرانادا – مدیترانه‌ای گرم | صفات زراعی مطلوب | | |
| ۵ | Morado de Huetor 2 | Ht262 | 2n=4x | رقم تجاری | اسپانیا، آندالوسیا، گرانادا – مدیترانه‌ای گرم | صفات زراعی مطلوب | | |
| ۶ | *A. persicus* | Ape | 2n=2x | گونه خودرو | ایران، گیلان، منجیل – مدیترانه‌ای | ۱. مقاومت به خاک قلیایی<br>۲. مقاومت به بیماری قارچی فوزاریومی | | |

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.2.8
مقاله پژوهشی

گیاهان مادری از طریق کشت بذر در گلدان‌های پلاستیکی در شرایط گلخانه پرورش داده شدند تا به سن بلوغ جهت انجام تلاقی بین و درون‌گونه‌ای برسند. تلاقی‌ها در سطح پلوئیدی یکسان و بصورت دستی در شرایط کنترل شده در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه کوردوبا صورت پذیرفت. بذور پس از جداسازی از میوه‌ها بخوبی با محلول ۵ درصد هیپوکلریدسدیم ضدعفونی شدند. سپس اقدام به کشت آن‌ها در بستری مخلوط از پیت‌ماس و پرلیت در اتاقک رشد (دمای ۲۷ درجه) گردید. به‌منظور تعیین و تأیید اصالت ژنتیکی نتاج، از روش ردیابی آلل‌های اختصاصی والدین در نتاج استفاده شد.

**تشخیص و ردیابی آلل‌های اختصاصی:** برای تشخیص آلل‌های اختصاصی در گیاهان والدینی، ۲۰ جفت نشانگر EST-SSR طراحی‌شده برای گونه تجاری مارچوبه (۷) و ۱۶ جفت نشانگر SSR طراحی‌شده برای گونه تجاری مارچوبه (۱۰) بکار گرفته شدند و پس از آن ردیابی آلل‌های اختصاصی والدین در نتاج و تأیید ماهیت هیبریدی آن‌ها انجام شد. استخراج DNA از یک گرم از انتهای برگ‌های جوان با استفاده از روش تغییریافته دویل و دویل صورت پذیرفت (۸). کمیت و کیفیت DNA بوسیله نانودراپ اسپکتوفتومتری (Denovix-Ds-11-Fx) ارزیابی شد. واکنش PCR بر مبنای پژوهش کروسو و همکاران (۷) صورت پذیرفت. الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲/۵ درصد در بافر TBE صورت پذیرفت و بوسیله محلول رد سیف ( Red Safe nucleic acid staining solution 20000x) باندهای تولید شده مورد رنگ‌آمیزی قرار گرفت. الگوهای چندشکلی تولیدشده بکمک اشعه فرابنفش و روش عکسبرداری قابل مشاهده و ارزیابی شدند. محصول PCRبا کاربرد یک توالی‌سنج مویین اُتوماتیک (ABI 3130 Genetic Analyzer; Applied Biosystems/Hitachi, Madrid, Spain) جداسازی گردید. اندازه باندهای تشکیل‌شده بر اساس DNA استاندارد با نرم‌افزار GeneScan محاسبه شده و نتایج بوسیله نرم‌افزار Genotyper ترجمه گردید.

**گرده‌افشانی آزاد:** مواد گیاهی بکار گرفته شده در این بخش و برخی از مهم‌ترین ویژگی‌های آن‌ها در جدول ۲ قابل مشاهده است.

در این روش در فصل بهار در مزرعه تحقیقاتی موسسه ایفاپا (تمامی توده‌های ذکر شده در جدول ۲، در یک منطقه وسیع تحقیقاتی در این موسسه نگهداری می‌شدند و توده‌های ایرانی در طی سال ۱۳۹۴ برای اولین بار در این مجموعه کشت شدند)، گل‌های پایه‌های نر توده خودرو ایرانی (گونه *A. officinalis* توده متعلق به استان کرمان، AO4) در چندین مرحله حذف و به پایه‌های ماده این گونه اجازه دریافت دانه‌گرده از پایه‌های نر سایر توده‌ها (جدول ۲) توسط گرده‌افشان‌های طبیعی (گرده‌افشانی طبیعی در مارچوبه بطور عمده توسط حشرات صورت می‌گیرد و حشره زنبور مهم‌ترین گرده‌افشان طبیعی گیاه مارچوبه است (۹)) داده شد. پس از پایان دوره گرده‌افشانی اقدام به جمع‌آوری میوه‌ها از پایه‌های ماده توده خودرو ایرانی و کشت بذورگردید.

**تفکیک نتاج:** با توجه به وجود پدیده چندجنینی، شکل‌گیری جنین‌های غیرجنسی و همچنین امکان گرده‌افشانی شدن پایه‌های ماده توده ایرانی با پایه‌های نر خودی (با وجود اینکه گل‌ها در پایه‌های نر توده ایرانی با دقت و در چندین مرحله حذف شد اما با این وجود امکان بروز خطا و عدم حذف بموقع گل‌های نر و همچنین امکان گرده‌افشانی شدن با پایه‌های نر موجود در سایر کرت‌های آزمایشی وجود داشت)، در گام بعد اقدام به تفکیک نتاج هیبرید از نتاج غیرهیبرید بکمک نشانگرهای ملکولی گردید. بدین منظور نیز از ۱۰ گیاه مختلف با جنسیت‌های متفاوت برای هر گونه، DNA ژنومی استخراج گردید و از ترکیب آن‌ها بعنوان نمونه ژنومی برای هر گونه در واکنش PCR استفاده شد. واکنش PCR و الکتروفورز محصول PCR مشابه بخش تلاقی دستی صورت پذیرفت و الگوهای چندشکلی تولید شده به کمک اشعه فرابنفش و روش

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.2.8
مقاله پژوهشی

عکسبرداری قابل مشاهده شدند.

سه نوع از الگوهای چندشکلی تولیدشده مطلوب و پرکاربرد در نظر گرفته شدند: **۱)** الگوهایی که در آن‌ها بین باند تولیدشده برای توده AO4 و سایر گونه‌ها تفاوت اندازه واضح وجود داشته باشد. ۲) الگوهایی که در آن‌ها برای تمامی توده‌های مورد مطالعه به استثنای توده AO4 تولید باند شده باشد. ۳) الگوهایی که در آن‌ها فقط در توده AO4 تولید باند شده باشد و برای سایر توده‌های مورد مطالعه باندی شکل نگرفته باشد.

جدول ۲- برخی از ویژگی‌های گونه‌ها و توده‌های مختلف مارچوبه مورد استفاده در گرده‌افشانی آزاد

| ردیف | گونه | کد | سطح پلوئیدی | نوع | منشاء | منطقه و شرایط آب و هوایی |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ۱ | *A. officinalis* L. | WR | 2x | رقم تجاری | روسیه | ولگا- سرد و مرطوب |
| ۲ | *A. verticillatus* L. | AV1 | 2x | توده خودرو | ایران | اردبیل- سرد و نیمه خشک |
| ۳ | *A. verticillatus* L. | AV2 | 2x | توده خودرو | ایران | سمنان (شاهرود)- مدیترانه‌ای |
| ۴ | *A. verticillatus* L. | AV3 | 2x | توده خودرو | ایران | گیلان (لاهیجان)- سرد و مرطوب |
| ۵ | *A. officinalis* L. | AO4 | 2x | توده خودرو | ایران | کرمان- بیابانی |
| ۶ | *A. officinalis* L. | AO6 | 2x | توده اهلی شده | ایران | البرز - مدیترانه‌ای سرد |
| ۷ | *A. persicus* Baker. | Ape | 2x | گونه خودرو | ایران | گیلان (منجیل)- مدیترانه‌ای |
| ۸ | *A. officinalis* L. | AU | 2x | رقم تجاری | آمریکا | رقم مری واشنگتن |
| ۹ | *A. prostratus* Dumort. | APB | 4x | گونه خودرو | اسپانیا | لاکرونیا- مدیترانه‌ای معتدل |
| ۱۰ | *A. officinalis* L. | AO2 | 4x | توده خودرو | ایران | مازندران (محمودآباد) - گرم و مرطوب |
| ۱۱ | *A. officinalis* L. | AO1 | 4x | توده خودرو | ایران | البرز (طالقان) – مدیترانه‌ای سرد |
| ۱۲ | *A. acutifolius* L. | AC | 4x | گونه خودرو | اسپانیا | کوردوبا- مدیترانه‌ای گرم |
| ۱۳ | Morado , *officinalis A.* de Huétor | HT | 4x | رقم تجاری | اسپانیا | گرانادا- مدیترانه‌ای گرم |
| ۱۴ | *A. brachyphyllus* Turz. | AB | 6x | گونه خودرو | روسیه | ولگا- سرد و مرطوب |
| ۱۵ | *A. pseudoscaber* Grec. | APS | 6x | گونه خودرو | چک | موراویای- اقیانوسی مرطوب |
| ۱۶ | *A. maritimus* L. Mill. | MA | 6x | گونه خودرو | آلبانی | ولوره– معتدل و مرطوب |
| ۱۷ | *A. officinalis* L. | AO3 | 8x | توده خودرو | ایران | مازندران (نور)- سرد و مرطوب |
| ۱۸ | *A. officinalis* L. | AO7 | 8x | توده خودرو | ایران | مازندران (آمل)-مدیترانه‌ای نیمه مرطوب |
| ۱۹ | *A. breslerianus* Schult. | Abr | 8x | گونه خودرو | ایران | سمنان (یزدو)- گرم و خشک |
| ۲۰ | *A. officinalis* L. | AO5 | 10x | توده خودرو | ایران | کردستان- سرد و خشک |
| ۲۱ | *A. macrorrhizus* Pedrol | MC | 12x | گونه خودرو | اسپانیا | کارتاگنا- گرم مدیترانه‌ای |

**درصد هیبریداسیون:** پس از شناسایی نتاج هیبرید، درصد هیبریداسیون برای توده AO4 به‌کمک معادله زیر محاسبه شد:

(۵ و ۱۱) ۱۰۰ × (تعداد کل گیاهان مورد بررسی / تعداد گیاهان هیبرید) = درصد هیبریداسیون

**تشخیص والد نر در نتاج هیبرید:** تشخیص والد نر برای نتاج هیبرید حاصل از گرده‌افشانی آزاد در طی دو مرحله صورت پذیرفت: ۱) برآورد سطح پلوئیدی والد نر: در این مرحله با بکارگیری از تکنیک فلوسیتومتری بر اساس پژوهش مورنو و همکاران (۱۲)، اقدام به تعیین سطح

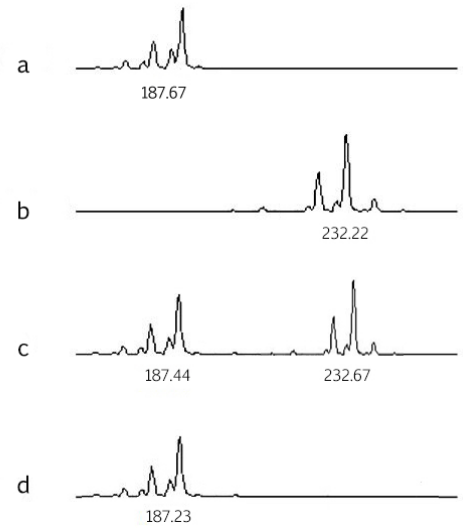
DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.2.8

پلوئیدی نتاج هیبرید گردید. در این شرایط با دانستن سطح پلوئیدی والد ماده (توده AO4) و نتاج هیبرید، سطح پلوئیدی والد نر تعیین شد و توده‌هایی که در سطح پلوئیدی مشخص شده نبودند از روند بررسی بعنوان والد نر حذف شدند. ۲) تعیین دقیق والد نر بکمک نشانگرهای ملکولی با توانایی تشخیص آلل اختصاصی: در این مرحله با توجه به مشخص شدن سطح پلوئیدی والد نر از نشانگرهای مناسب در جهت تشخیص آلل‌های اختصاصی والدین در هیبریدها استفاده شد و با تشخیص آلل‌های اختصاصی والدهای نر در نتاج هیبرید، منشأ ژنتیکی دقیق نتاج هیبرید مشخص گردید.

## نتایج

**تلاقی دستی:** در بخش اول پژوهش، نتایج حاصل از انجام تلاقی دستی نشان از آن داشت که امکان انجام تلاقی موفق درون‌گونه‌ای:

Morado de Huetor (Ht815) × *A. officinalis* (Ao4) و Morado de Huetor (Ht262) × *A. officinalis* (Ao1) و همچنین تلاقی موفق بین‌گونه‌ای: *A. officinalis* (AO6) × *A. persicus* (Ape) در سطح پلوئیدی یکسان بمنظور انتقال صفات مرتبط به مقاومت (ذکر شده در جدول ۱) از گونه و توده‌های خودرو به ارقام تجاری مارچوبه وجود دارد. همچنین نتایج حاصل از بررسی الگوهای چندشکلی و توالی‌یابی نشان داد که نشانگر TC1 توانایی تشخیص آلل اختصاصی به طول ۱۱۲۴ bp را در رقم تجاری موراد دهتور (HT)، نشانگر AG8 توانایی تشخیص آلل اختصاصی به طول ۱۸۷ bp را در توده‌های خودرو Ao4 وAo1 و همچنین توانایی تشخیص آلل‌های اختصاصی به طول bp ۱۸۷ و bp ۱۲۳ را در توده اهلی‌شده AO6 و نشانگرهای AG8، AGA1 و TC6 توانایی تشخیص آلل اختصاصی در گونه خودرو *A. persicus* به طول‌های bp ۲۳۲، bp ۷۸۰ و ۱۰۸۶bp را دارند. بکمک نشانگرهای ذکرشده اقدام به ردیابی آلل‌های اختصاصی والدین در نتاج گردید و بدین شکل از اصالت ژنتیکی نتاج هیبرید اطمینان حاصل شد. جدول ۳ نتایج بدست آمده مربوط به تشخیص آلل اختصاصی برای توده‌ها و گونه‌های مورد بررسی و شکل ۱ نحوه ردیابی آلل‌های اختصاصی والدین در نتاج هیبرید برای تلاقی *A. officinalis* (AO6) × *A. persicus* (Ape) را نشان می‌دهد.




شکل ۱- نتایج حاصل از بکارگیری نشانگر AG8 برای تلاقی *A. officinalis* × *A. persicus* a) والد ماده هموزیگوت *A. officinalis* b)والد نر هموزیگوت *A. persicus* c) تأیید ماهیت هیبریدی گیاه $F_1$ حاوی هر دو آلل والدینی (هتروزیگوت) d) ماهیت غیرهیبریدی گیاه $F_1$ فقط حاوی آلل والد ماده (هموزیگوت).

مقاله پژوهشی
DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.2.8

جدول ۳- نتایج مربوط به تشخیص آلل اختصاصی برای توده‌ها و گونه‌های مورد بررسی

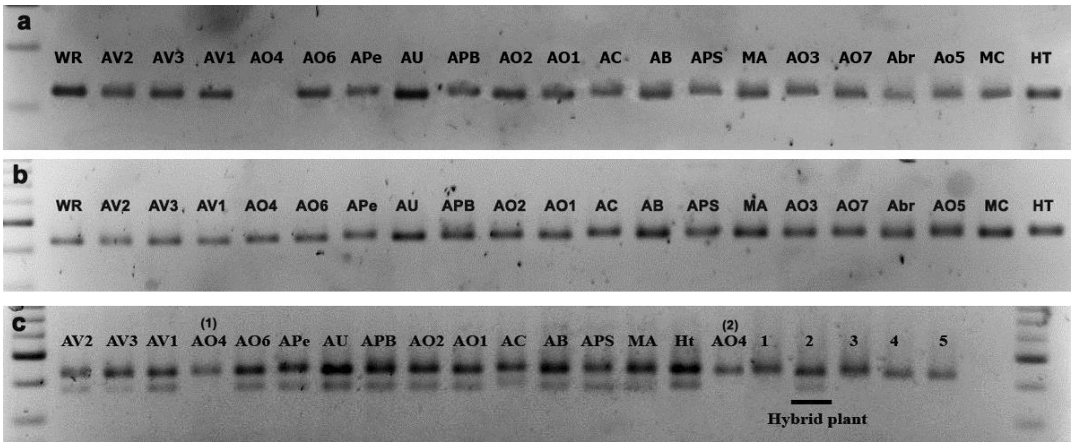
| ردیف | مواد گیاهی | کد | نشانگر | طول آلل اختصاصی (bp) |
|---|---|---|---|---|
| ۱ | *A. persicus* | APe2 | AG8 | ۲۳۲ |
| ۲ | *A. persicus* | APe2 | AGA1 | ۷۸۰ |
| ۳ | *A. persicus* | APe2 | TC6 | ۱۰۸۶ |
| ۴ | *A. officinalis* | AO1 AO2 AO3 AO5 AO7 AO4 | AG8 | ۱۸۷ |
| ۵ | *A. officinalis* | AO6 | AG8 | ۱۸۷ و ۱۲۳ |
| ۶ | *A. officinalis* | AU | AG8 | ۱۳۶ |
| ۷ | *A. officinalis* | WR | AG8 | ۱۴۷ |
| ۸ | *A. officinalis* Morado de Huétor | Ht262 Ht167 Ht815 | TC1 | ۱۱۲۴ |
| ۹ | *A. breslerianus* | Abr-1 | AG7 | ۷۴۰ |
| ۱۰ | *A.acutifolius* L. | AC | AG5 | ۶۹۰ |
| ۱۱ | *A.acutifolius* L. | AC | asp_c10809 | ۱۳۴ |
| ۱۲ | *A.acutifolius* L. | AC | asp_c22357 | ۹۶ |
| ۱۳ | *A.acutifolius* L. | AC | asp_c1401 | ۱۱۲ |
| ۱۴ | *A.acutifolius* L. | AC | asp_c17476 | ۲۷۰ |
| ۱۵ | *A. verticillatus* L. | AV2 AV3 AV1 | asp_c12534 | ۱۶۶ |
| ۱۶ | *A. pseudoscaber* | APS | AG8 | ۱۵۰ |
| ۱۷ | *A. macrorrhizus* | MC | asp_c2370 | ۲۶۳ |
| ۱۸ | *A. prostratus* | APB | asp_c1401 | ۲۸۵ |

**گرده‌افشانی آزاد**

**بررسی الگوهای چندشکلی و تفکیک نتاج هیبرید از سایر نتاج:** در بین نشانگرهای EST-SSR بکارگرفته شده بمنظور بررسی الگوهای چندشکلی تولیدشده، نشانگر AG7 الگوی چندشکلی مطلوبی تولید کرد. در مورد این نشانگر الگوی نوع دوم مشاهده شد. در این الگو، برای تمامی توده‌های مورد مطالعه به‌استثنای توده خودرو ایرانی AO4 تولید باند شد (شکل ۲a). در این حالت با استفاده از انجام PCR توسط دو نشانگر (نشانگری که در تمامی توده-ها تولید باند کند و نشانگری که در تمامی توده‌ها به-استثنای توده AO4 تولید باند کند و بین باندهای تولید شده توسط نشانگر اول و دوم اختلاف اندازه واضح وجود داشته باشد) می‌توان به ماهیت هیبریدی نتاج پی برد، بصورتی که نتاجی که تولید دو باند کنند هیبرید و آن‌هایی که تولید یک باند کنند نتاج غیرهیبرید خواهند بود. همچنین لازم بذکر است که نتایج بررسی الگوهای چندشکلی نشان داد که نشانگر asp_c6470 توانایی تولید باند در تمامی توده‌ها و گونه‌های مورد بررسی را داشت (شکل ۲b). شکل ۲c، نتایج حاصل از بکارگیری دو نشانگر ذکرشده در جهت تشخیص و تفکیک نتاج هیبرید از غیرهیبرید برای توده خودرو ایرانی AO4 را نشان می‌دهد. از اولین نمونه که مربوط به یکی از توده‌های گونه خودرو *A. verticillatus* است تا نمونه مربوط به رقم موراد دهتور (HT)، نمونه ژنومی حاصل از ترکیب ۱۰ گیاه با جنسیت-های متفاوت برای هر توده و گونه بوده که طبق شکل برای تمامی توده‌ها و گونه‌ها به استثنای توده خودرو ایرانی AO4 تولید دو باند شده است که باند بالایی مربوط به

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.2.8

نشانگر asp_c6470 بوده که در تمامی توده‌ها توانایی تولید باند را داشته و باند پایینی مربوط به نشانگر AG7 بوده که در تمامی توده‌ها به‌استثنای توده AO4 تولید باند می‌کرد. نمونه AO4(2) مربوط به ژنوم تک گیاه بوده که مانند نمونه AO4(1) که مربوط به ترکیب ژنوم ۱۰ گیاه است تنها تولید یک باند کرده است. نمونه‌های 5-1 نیز مربوط به پنج گیاه حاصل از گرده‌افشانی آزاد با والد مادری AO4 بوده که براساس نتایج، نمونه شماره 2 یک گیاه هیبرید (دو باند) بوده و سایر نمونه‌ها مربوط به گیاهان غیرهیبرید (یک باند) است.




شکل ۲- نتایج مربوط به تشخیص نتاج هیبرید حاصل از گرده‌افشانی آزاد برای توده AO4

a) الگوی چندشکلی حاصل از بکارگیری نشانگر AG7 b) الگوی چندشکلی حاصل از بکارگیری نشانگر asp_c6470 c) بکارگیری نشانگرهای AG7 و asp_c6470 در جهت تشخیص نتاج هیبرید برای توده AO4

**درصد هیبریداسیون:** در مجموع تعداد ۳۰۹ گیاه، حاصل از گرده‌افشانی آزاد با پایه مادری AO4 مورد بررسی قرار گرفت که از این تعداد، ۹ گیاه بعنوان نتاج هیبرید تشخیص داده شد. با توجه به تعداد کل گیاهان مورد بررسی و تعداد گیاهانی که هیبرید بین‌گونه‌ای تشخیص داده شدند، درصد هیبریداسیون برای توده خودرو ایرانی AO4 میزان ۲/۹۱ درصد ارزیابی گردید.

**تعیین والد گرده‌دهنده در نتاج هیبرید:** نتایج حاصل از بررسی سطح پلوئیدی نتاج هیبرید نشان داد که تمامی هیبریدها دیپلوئید هستند و این موضوع به این معنا است که با توجه به دیپلوئید بودن والد ماده (توده خودرو AO4)، سطح پلوئیدی والد نر نیز دیپلوئید است. بر اساس این دست‌یافته از نشانگرهایی که توانایی تشخیص آلل اختصاصی در توده‌ها و گونه‌های دیپلوئید بکارگرفته شده در این پژوهش را داشتند بمنظور ردیابی آلل اختصاصی والد نر در نتاج و تعیین دقیق والد گرده‌دهنده استفاده شد. نتایج نشان داد که در تمامی ۹ گیاه هیبرید نشانگر AG8 آلل اختصاصی رقم تجاری مری واشنگتن متعلق به کشور آمریکا را شناسایی کرد. بدین ترتیب تلاقی (AU) *A. officinalis* ×(AO4) *A. officinalis* بعنوان تلاقی تولیدکننده تمامی ۹ گیاه هیبرید مشخص گردید، که یک تلاقی درون-گونه‌ای (گونه *A. officinalis*) در سطح پلوئیدی یکسان (دیپلوئید - *2x*) بین یک توده خودرو (توده متعلق به کرمان که دارای صفات مرتبط با مقاومت است) و یک رقم تجاری (رقم مری واشنگتن که دارای صفات زراعی مطلوب است) بود.

## بحث و نتیجه گیری

تلاقی بین و درون‌گونه‌ای از جمله تکنیک‌های رایج در اصلاح محصول مارچوبه بوده که برای اولین بار در سال

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.2.8

۱۹۱۳ میلادی اقدام به انجام آن شده است (۹). استفاده از نشانگرهای ملکولی در جهت تعیین ماهیت نتاج حاصل از تلاقی‌های بین و درون‌گونه‌ای در مارچوبه در پژوهش‌های متعددی مورد توجه قرار گرفته است. برای مثال پنج نشانگر AG2، AG3، AG7، AG10 و TC1 برای بررسی نتاج حاصل از تلاقی دو گونه دیپلوئید *A. officinalis* بکار برده شدند که نتایج نشان از کارآمد بودن آن‌ها در تعیین منشاء ژنتیکی نتاج داشت (۱۶). در پژوهشی دیگر اقدام به ایجاد تلاقی بین گونه‌های *A. officinalis* و *A. verticillatus* و همچنین گونه‌های *A. amarus* و *A. verticillatus* (همگی در سطح تتراپلوئید) شد. پس از انجام تلاقی و کشت نتاج اقدام به بررسی فاصله ژنتیکی والدین و نتاج هیبرید تولید-شده بوسیله نشانگرهای RAPD گردید (۱۴). از جمله اشکالاتی که به نتایج حاصل از این پژوهش می‌توان وارد دانست اینکه پس از انجام تلاقی و شکل‌گیری نتاج اقدامی در جهت بررسی اصالت ژنتیکی نتاج صورت نپذیرفت و احتمالاً ماهیت هیبریدی نتاج بکمک نشانگرهای مورفولوژیکی تعیین گردید. با توجه به احتمال شکل‌گیری جنین‌های غیرجنسی در مارچوبه، احتمال بروز خطا در گرده‌افشانی دستی، احتمال گرده‌افشانی شدن پایه ماده با گرده‌افشان‌های طبیعی و در نهایت تأثیرپذیری زیاد نشانگرهای مورفولوژیکی از شرایط محیطی (۱، ۲ و ۹)، تعیین ماهیت ژنتیکی نتاج بکمک نشانگرهای مولکولی مناسب در این پژوهش الزامی بنظر می‌رسید و عدم انجام این مرحله را می‌توان از نواقص جدی در ارائه نتایج چنین پژوهش‌هایی دانست. تاکنون گزارشی از بررسی و معرفی الگوهای چندشکلی مناسب در جهت تشخیص و تفکیک نتاج هیبرید حاصل از تلاقی‌های بین و درون‌گونه‌ای در گیاه مارچوبه گزارش نشده است و پژوهش حاضر را می-توان اولین گزارش جامع در مورد تشخیص اصالت نتاج حاصل از تلاقی‌های بین و درون‌گونه‌ای در مارچوبه با محوریت مارچوبه‌های ایرانی بکمک بررسی الگوهای چندشکلی حاصل از بکارگیری نشانگرهای ملکولی دانست، اما پژوهش‌هایی در همین زمینه در طی سال‌های اخیر بر روی سایر محصولات صورت پذیرفت که از نظر ساختار آزمایش و نتایج بدست‌آمده با پژوهش حاضر در یک راستا قرار دارند. برای مثال از نشانگرهای RAPD و SSR بمنظور بررسی الگوهای چندشکلی تولیدشده از تلاقی بین سه لاین اینبرد ذرت استفاده شد. نتایج نشان داد که از بین پنج نشانگر RAPD مورد استفاده سه نشانگر تولید الگوهای چندشکلی مناسب نموده که از آن‌ها در تشخیص نتاج هیبرید استفاده شد (۳). همچنین در نتایج حاصل از پژوهشی دیگر اظهار شده است که نشانگرهای STMS ابزاری کم‌هزینه و قابل اطمینان در جهت تعیین اصالت ژنتیکی نتاج حاصل از تلاقی بین‌گونه‌ای گیاه نخود هستند و استفاده از این نشانگرها در مراحل اولیه برنامه اصلاحی نخود می‌تواند از اتلاف وقت و پیشبرد برنامه اصلاحی در مسیری نامناسب و اشتباه جلوگیری کند (۶).

نتایج کلی حاصل از پژوهش حاضر نشان داد:

۱) امکان انجام تلاقی موفق درون‌گونه‌ای:

Morado de Huetor (Ht815) × *A. officinalis* (Ao4)
Morado de Huetor (Ht262) × *A. officinalis* (Ao1)

و همچنین تلاقی موفق بین‌گونه‌ای:

*A. officinalis* (AO6) × *A. persicus* (Ape)

در سطح پلوئیدی یکسان بمنظور انتقال صفات مرتبط با مقاومت از گونه و توده‌های خودرو به ارقام تجاری مارچوبه وجود دارد. ۲) نشانگر AG8 توانایی شناسایی آلل اختصاصی در توده‌های خودرو گونه *A. officinalis* را دارا است. ۳) از ترکیب نشانگرهای AG7 و asp_c6470 می-توان در جهت تشخیص نتاج هیبرید حاصل از گرده‌افشانی آزاد با والد مادری Ao4 استفاده کرد.

لازم بذکر است که نتاج هیبرید حاصل از تلاقی دستی و گرده‌افشانی آزاد در ادامه از نظر صفات مرتبط با مقاومت (موجود در والد خودرو) و صفات زراعی (موجود در والد

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.2.8
مقاله پژوهشی

تجاری) مورد ارزیابی قرار گرفته و نتاج برتر مشخص و تفکیک شده و در ادامه روند اصلاحی قرار خواهند گرفت.

## سپاسگزاری

بدین وسیله از حمایت‌های مالی معاونت پژوهشی دانشگاه زنجان و همچنین از مساعدت‌ها و حمایت‌های علمی و عملی اساتید و مسئولین گروه ژنتیک دانشگاه کوردوبا تقدیر و سپاسگزاری بعمل می‌آید.

## منابع

۱ – سیه چهره، م.، کیانی، غ.، و کاظمی‌تبار، ک.، ۱۳۹۹. القاء تنوع ژنتیکی در ارقام برنج طارم محلی و هاشمی با استفاده از اتیل متان سولفونات و بررسی تنوع ایجاد شده از طریق نشانگرهای SSR. پژوهش‌های گیاهی (زیست‌شناسی ایران)، ۳، صفحات ۵۹۲–۵۷۹.

۲ – طلوعی، ز.، عارفی ترک‌آبادی، م.، و حسینی تفرشی، ع.، ۱۳۹۹. بررسی تنوع ریخت‌شناسی جمعیت‌های مختلف گل محمدی در شهرستان کاشان و ارتباط آن با بازده اسانس، پژوهش‌های گیاهی (زیست‌شناسی ایران)، ۱، صفحات ۱۷۸–۱۶۷.

3- Abdel-Mawgood, A., Ahmed, M. and Ali, B. A. 2006. Application of molecular markers for hybrid maize (*Zea mays* L.) identification. Journal of Food, Agriculture and Environment. 4(2): 176-8.

4- Amian, L., Rubio, J., Castro, P., Gil, j. and Moreno, R. 2018. Introgression of wild relative asparagus spp. germplasm into the Spanish landrace ‘ Morado de Huetor’. XIV$^{th}$ international asparagus symposium. Acta Horticulture. 1223: 33-38.

5- Asif, M., Rahman, M. U., Mirza, J. I. and Yusuf, Z. 2009. Parentage confirmation of cotton hybrids using molecular markers. Pakistan Journal of Botany. 41: 695-701.

6- Caballo, C., Castro, C., Gil, J., Izquierdo, I., Millan, T., and Rubio, J. 2018. STMS molecular markers as a valuable tool to confirm controlled crosses in chickpea (*Cicer arietinum* L.) breeding programs. Euphytica. 214: 231-237.

7- Caruso, M., Federici, C. T. and Roose, M. L. 2008. EST-SSR markers for asparagus genetic diversity evaluation and cultivar identification. Molecular Breeding. 21:195-204.

8- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. 12: 13-15.

9- Kanno, A. and Yokoyama, J. 2011. Asparagus. In Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, K. Chittaranjan, 1ed. (Berlin, Germany: Springer Berlin Heidelberg). p.23-42.

10- Mercati, F., Riccardi, P., Leebens-Mack, J., Abenavoli, R., Falavigna, A. and Sunseri, F. 2013. Single nucleotide polymorphism isolated from a novel EST dataset in garden asparagus (*Asparagus officinalis* L.). Plant Science, 115(23): 203-204.

11- Morais, S., Vieira, A., Almeida, L., Rodrigues, L., Melo, P., Faria, L., Melo, L., Pereira, H. and Souza, T. 2016. Application of microsatellite markers to confirm controlled crosses and assess genetic identity in common bean. Crop Breeding and Applied Biotechnology, 16: 234-239.

12- Moreno, R., Espejo, J, A., Cabrera, A., Millan, T. and Gil, J. 2006. Ploidic and molecular analysis of ‘Morado de Huetor’ asparagus (*Asparagus officinalis* L.) population; a Spanish tetraploid landrace. Genetic Resources and Crop Evolution, 53(4): 729-736.

13- Mousavizadeh, S. J., Hassandokht, M. R. and Kashi, A. 2015. Multivariate analysis of edible Asparagus species in Iran by morphological characters. Euphytica, 206: 445-457.

14- Nothnagel, T., Kramer, R., Budahn, H., Schrader, O., Ulrich, D., Rabenstein, F. and Schreyer, L. 2012. Enlargement of the genetic variability of garden Asparagus (*Asparagus officinalis* L.) to improve resistance to biotic and abiotic stresses and quality associated compounds. XII$^{th}$ international asparagus symposium. Acta Horticulture, 950.

15- Ochiai, T., Sonoda, T., Kanno, A. and Kameya, T. 2002. Interspecific hybrids between Asparagus schoberioides Kunth and *A. officinalis* L. Acta Horticulture, 589: 225-229.

16- Ozaki, Y., Takeuchi, Y., Iwato, M., Sakazono, S. and Okubo, H. 2014. Occurrence of a Spontaneous Triploid Progeny from Crosses between Diploid Asparagus (*Asparagus officinalis* L.) Plants and Its Origin Determined by SSR Markers. Journal of Japanese Society for Horticultural Science, 2: 1-5.

17- Valente, M. T., Sabatini, E., Casali, P. E. and Falavigna, A. 2009. Molecular markerassisted introgression of wild Asparagus species genome into the cultivated *Asparagus officinalis*. In: Proceedings of the 53rd Italian Society of Agricultural Genetics Annual Congress, Torino, Italy 16-19 September, ISBN 978-88-900622.

مقاله پژوهشی
DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.2.2.8

# Using of wild accessions of *Asparagus officinalis* in asparagus breeding programs

**Ranjbar M.E.[1], Ghahremani Z.[*1], Mousavizadeh S.J.[2], Barzegar T.[1] and Gil J.[3]**

**[1] Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, I. R. of Iran**

**[2] Faculty of Agriculture, University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, I. R. of Iran**

**[3]Faculty of Genetic, University of Cordoba, Cordoba, Spain**

## Abstract

*Asparagus officinalis* is the most economically important species of asparagus. There are some wild accessions of this species from Iran that they are growing under different environmental conditions such as saline and dry soils and wide range of altitude and climate. Inter and intraspecific hybridization is a useful technique to introduce characteristics from wild species and accessions into crops. The overall purposes of the current study were to evaluate the possibility of using of wild accessions of *A. officinalis* in asparagus crop breeding programs and also using of molecular markers as a valuable and useful tool to detect hybrid plants. In this study, successful interspecific hybridization was obtained for *A. officinalis* (*2x*) × *A. persicus* (*2x*) cross, by hand pollination. AG7 can be suitable molecular marker to detect interspecific plants for *A. officinalis* species (wild accession from Kerman province) in open pollination method and controlled crosses. Specific allele in 187 bp length was identified by AG8 marker in *A. officinalis* wild accessions.

**Key words:** Interspecific hybridization, Iranian asparagus, SSR markers, Wild accessions