بررسی ساختار ناحیه پروموتری ژن *MdMYB10* در چند ژنوتیپ بومی سیب گوشت قرمز (*Malus* spp.)

معصومه وکیلی قرطاول[۱]، ناصر مهنا[۲*]، فریبرز زارع نهندی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز. ۲- دانشیار، گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز.۳- استادیار گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، کد پستی: ۵۱۶۶۶۱۶۴۷۱، تبریز، ایران.

*نویسنده مسئول: mahna@tabrizu.ac.ir

چکیده

آنتوسیانین‌ها مهم‌ترین رنگدانه‌های فلاونوئیدی که باعث رنگ قرمز، آبی یا بنفش در میوه‌ها، گل‌ها، شاخه و برگ گیاهان می‌شوند. این ترکیبات آنتی اکسیدانی از نظر تغذیه حایز اهمیت هستند. رنگ قرمز پوست میوه سیب بدلیل تجمع آنتوسیانین در پوست میوه است. با این حال، ژنوتیپ‌های متعددی از سیب (*Malus spp.*) شناسایی شده‌اند که آنتوسیانین را در گوشت میوه نیز تجمع می‌دهند. تجمع آنتوسیانین در بسیاری از موارد به دلیل بیان بالای ژن *MdMYB10* در بسیاری از بافت‌ها از جمله گوشت میوه سیب است که ناشی از ساختار خاص پروموتر آن است. برای تعیین ساختار پروموتر این ژن و مکانیسم قرمز بودن رنگ گوشت میوه در برخی ژنوتیپ‌های محلی و استفاده کاربردی از این اطلاعات در تحقیقات بعدی، نمونه‌های برگی از نه ژنوتیپ سیب گوشت قرمز و گوشت سفید تهیه شدند و پس از استخراج DNA، آللوتیپ آنها از نظر ناحیه پروموتری ژن *MdMYB10* با استفاده از تکنیک PCR و پرایمرهای اختصاصی نواحی ژنومی مورد نظر و نهایتا الکتروفورز قطعات تکثیر شده مورد ارزیابی قرار گرفت. اغلب ارقام سیب گوشت قرمز در ناحیه پروموتری ژن *MdMYB10* دارای ژنوتیپ R1R6 بودند. بنابراین، می‌توان نمونه‌های مذکور را هیبریدی از 'Niedzwetzkyana' دانست.

کلمات کلیدی: سیب گوشت قرمز (*Malus spp.*)، آنتوسیانین، پروموتر، *MdMYB10*.

مقدمه

آنتوسیانین، رنگدانه قرمز در پوست و گوشت میوه سیب، منبع عمده‌ی آنتی اکسیدان است (Boyer and Liu, 2004). اخیرا تحقیقات روی آنتوسیانین ها بدلیل مزایای بالقوه‌ی آنها در بهبود سلامت انسان، شدت یافته است (Butelli et al., 2008; Rasmussen et al., 2005).

فاکتور رونویسی R2R3MYB نقش مهمی در تنظیم رونویسی آنزیم‌های مسیر بیوسنتز آنتوسیانین در سیب ایفا می‌کند (Tsao *et al.*, 2003; Allan *et al.*, 2007). تا به امروز، آلل‌های *MdMYB1*، *MdMYBA* و *MdMYB10* که به ترتیب مسئول رنگ قرمز پوست و گوشت میوه سیب هستند، شناسایی شده‌اند (Takos *et al.*, 2006; Ban *et al.*, 2007; Chagné *et al.*, 2007; Espley *et al.*, 2007). محققین دیگر متوجه تغییرات نواحی فرادست[۲] در ناحیه پروموتری ژن *MdMYB10* شدند. در پروموتر این ژن در سیب های گوشت قرمز (R6)، پنج واحد تکراری پشت سرهم از یک توالی ۲۳ جفت بازی وجود دارد؛ در حالیکه در سیب‌های گوشت سفید (پروموتر R1) هیچ واحد تکراری دیده نمی‌شود. این پنج واحد تکراری (مینی‌ستلایت) در ناحیه تنظیمی فرادست DNA ژن رمز کننده‌ی فاکتور رونویسی سیب *MdMYB10*، یک موتیف خودتنظیمی[۳] ایجاد می‌کند که موجب افزایش آنتوسیانین

[2] Upstream region

[3] Autoregulation

در گیاه می‌شود (Espley *et al*., 2009). تقریبا تمام سیب های گوشت قرمز مورد آزمایش می‌توانند هیبریدی از 'Niedzwetzkyana' باشند که یک فرم فرضی طبیعی از *M. sieversii* بومی آسیای مرکزی است (Van Nocker *et al*., 2011).

یکی از اهداف برنامه اصلاحی سیب معرفی سیب‌های گوشت قرمز در ارقام تجاری با کیفیت بالا است. توسعه ارقام با پتانسیل تجاری می‌تواند با استفاده از نشانگر تسریع یابد. با توجه به اهمیت ناحیه پروموتری ژن *MdMYB10* در تنظیم مسیر بیوسنتز آنتوسیانین، این مطالعه به منظور شناسایی و تعیین آللوتیپ ناحیه پروموتری ژن *MdMYB10* در نه ژنوتیپ سیب و برای اولین بار برای گیاهان بومی ورزقان، میاندوآب، خلعت پوشان، ایوند و یک نمونه کشت بافتی از درخت دیگری از سیب محلی میاندوآب انجام گردید.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: نمونه‌های برگی جوان کاملا توسعه یافته از ژنوتیپ‌های گوشت سفید Granny Smith، Red Delicious، Golden Delicious، گوشت قرمز Bud9 و سیب‌های گوشت قرمز بومی میاندوآب، ورزقان، خلعت پوشان (ماکامیک) و یک نمونه کشت بافتی از درخت دیگری از سیب محلی میاندوآب و یک سیب محلی با شاخه و برگ قرمز از ایوند تهیه و در نیتروژن مایع منجمد و تا زمان استفاده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

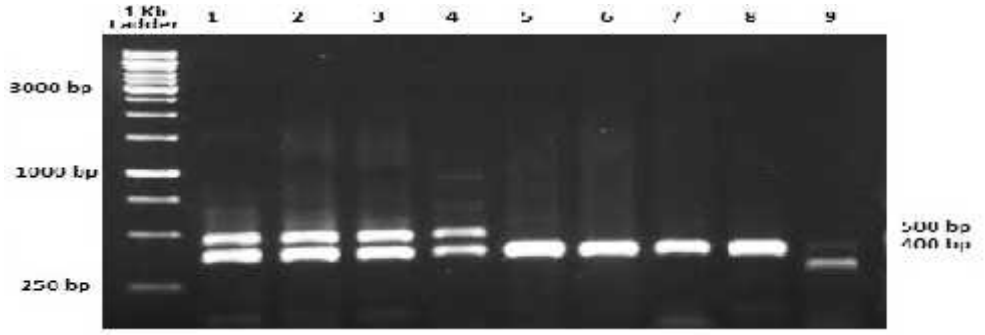
تکثیر ناحیه پروموتری ژن *MdMYB10* بوسیله واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز: برای استخراج DNA ژنومی از بافر CTAB دو درصد و از نمونه‌های برگی جوان کاملا توسعه یافته و براساس روش لودهی و همکاران (Lodhi *et al*., 1994) استفاده شد. برای تکثیر ناحیه پروموتری ژن *MdMYB10* از پرایمر مستقیم '5'-GGAGGGGAATGAAGAAGAGG-3 و پرایمر معکوس '5'-TCCACAGAAGCAAACACTGAC-3' و شرایط PCR مشروح توسط اسپلی و همکاران (Espley et al 2009) و فان نوکر و همکاران (Van Nocker *et al*., 2011) استفاده شد و با استفاده از ابزار Blast در سایت NCBI و نرم افزار Oligo 7.0 صحت آنها تایید گردید.

شناسایی آلل‌های ناحیه پروموتری فرادست ژن *MdMYB10*: بر اساس نتایج بدست آمده از گزارش‌های قبلی، طول ناحیه پروموتری R6 در ژن *MdMYB10*حدود ۴۹۶ جفت باز، ناحیه پروموتری R1 در همان ژن حدود ۳۹۲ جفت باز (Espley *et al*., 2009) است. با استفاده از روش الکتروفورز، نتایج مورد نظر ارزیابی شد.

نتایج و بحث

الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای نه ژنوتیپ از گیاهان بومی و تجاری با پرایمرهای مخصوص ناحیه پروموتری ژن *MdMYB10* (شکل ۱)، برای نمونه‌های Bud9، خلعت پوشان، ورزقان و میاندوآب دو باند که یکی در محدوده ۵۰۰ و دیگری در محدوده‌ی ۴۰۰ جفت بازی و برای نمونه‌های Golden Delicious، Granny Smith، Red Delicious و گیاهچه‌های کشت بافتی موجود در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گیاهی فقط یک باند در محدوده ۴۰۰ جفت بازی را نشان داد با این‌که نمونه ایوند هم دو باند نشان داد ولی این باندها، یکی در محدوده ۴۰۰ و دیگری با طول کوچکتری مشاهده شد. مراحل فوق در هفت تکرار همین باندها را نشان دادند. با توجه به نتیجه الکتروفورز این محصولات پی‌سی‌آر، ژنوتیپ‌های Bud9، خلعت پوشان، ورزقان و میاندوآب هتروزیگوت و ژنوتیپ‌های Golden Delicious، Granny Smith، Red Delicious و گیاهچه‌های کشت بافتی ژنوتیپ دیگری از میاندوآب (موجود در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گیاهی) هموزیگوت بودند. بدین وسیله مشاهده گردید که اغلب سیب-های با آنتوسیانین بالا در میوه دارای حداقل یک آلل R6 در ناحیه پروموتری ژن *MdMYB10* بودند. این نتیجه با مشاهدات فان

ناکر و همکاران (Van Nocker *et al*., 2011) مطابقت داشت. تنها ژنوتیپ گوشت قرمزی که R1R1 بود نمونه کشت بافتی بود. در حالیکه انتظار می رفت این ژنوتیپ نیز دارای حداقل یک آلل R6 باشد.



شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR ناحیه پروموتوری ژن *MdMYB10* در ژنوتیپ های سیب بر روی ژل آگارز یک درصد: Ladder (O'Gene Ruler™ 1 Kb DNA Ladder. ۱) Bud9 (کنترل مثبت برای R6)؛ ۲) ورزقان؛ ۳) میاندوآب؛ ۴) خلعت پوشان؛ ۵) Golden Delicious؛ ۶) Granny Smith (کنترل برای R1R1)؛ ۷) کشت بافت؛ ۸) Red Delicious؛ ۹) ایوند.

الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ناحیه پروموتری ژن MdMYB10 در مطالعه اسپلی و همکاران و لین وانگ و همکاران(Espley et al.,2009; Lin-wang et al., 2010) برای Granny Smith یک باند در محدوده ۴۰۰ جفت بازی نشان داد که با نتایج حاصل از این تحقیق تطبیق داشت و مطالعه‌ای که توسط محمودی و همکاران (Mahmodi et al., 2012) در این ناحیه صورت گرفت، برای ارقام Golden Delicious، Granny Smith و Red Delicious یک باند در محدوده ۳۱۲ جفت بازی و برای Bud9 سه باند نشان داد که این گروه تحقیقی باندی که در محدوده ۴۱۲ جفت بازی تشکیل شده بود را علت اصلی قرمز بودن میوه معرفی کرده بودند که این نتایج، با نتایج حاصل از تحقیق حاضر مطابقت نداشت. از آنجایی که کنترل مثبت این تحقیق (گیاهانی که قبلا از نظر داشتن نوع آلل ناحیه پروموتری ژن *MdMYB10* بررسی شده‌اند)، نتایج قبلی را تایید کردند.

در نهایت، می‌توان نتیجه گرفت که ژنوتیپ ناحیه پروموتری ژن *MdMYB10* در نمونه‌های برگی درختان سیب محلی ورزقان، میاندوآب، خلعت پوشان حاوی آلل R1R6 و نمونه کشت بافتی موجود در آزمایشگاه بیوتکنولوژی حاوی آلل R1R1 می‌باشد. برای نمونه‌های برگی سیب محلی ایوند یکی از آلل‌ها R1 بود ولی آلل دیگری نیز مشاهده شد که در هیچ یک از مطالعات قبلی گزارش نشده است.

احتمالا در تمام واریته‌های گوشت قرمز مورد آزمایش دارای آلل R6 در ناحیه‌ی پروموتری ژن *MdMYB10* از یک جد مشترک به ارث رسیده است که در نتیجه بازآرایی قدیمی در واریته‌های مختلف سیب مانند *Malus Pumila* var. Niedzwetzkyana وجود دارد بنابراین ارقام حاوی آلل R6 در این تحقیق نیز احتمالا هیبریدی از 'Niedzwetzkyana' می‌باشند.

منابع

1. Allan, A.C., R.P., Hellens, and W.A., Laing. 2007. MYB transcription factors that colour our fruit. Trends in Plant Science. 13: 99–102.

2. Ban, Y., Honda, C., Hatsuyama, Y., Igarashi, M., Bessho, H., Moriguchi, T. 2007. Isolation and functional analysis of a *MYB* transcription factor gene that is a key regulator for the development of red coloration in apple skin. Plant and Cell Physiology. 48(7): 958-970.

3. Boyer J. and Liu R.H. 2004. Apple phytochemicals and their health benefits. Nutrition Journal. 3:5.

4. Butelli, E., Titta, L., Giorgio, M., Mock, H.-P., Matros, A., Peterek, S., Schijlen, E.G.W.M., Hall, R.D., Bovy, A.G., Luo, J., and Martin, C. 2008. Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. Nature Biotechnology. 26: 1301–1308.

5. Chagne D, Carlile CM, Blond C, Volz R, Whitworth CJ, Oraguzie NC, Crowhurst RN, Allan AC, Espley RV, Hellens RP, Gardiner SE. 2007. Mapping a candidate gene (*MdMYB10*) for red flesh and foliage colour in apple. BMC Genomics. 8:212-222.

6. Espley RV, Brendolise C, Chagne D, Kutty-Amma S, Green S, Volz R, Putterill J, Schouten HJ, Gardiner SE, Hellens RP, Allan AC. 2009. Multiple repeats of a promoter segment causescause transcription factor autoregulation in red apples. The Plant Cell. 21: 168-183.

7. Espley RV, Hellens RP, Putterill J, Stevenson DE, Kutty-Amma S, Allan AC. 2007. Red colouration in apple fruit is due to the activity of the *MYB* transcription factor MdMYB10. The Plant Journal. 49: 414-427.

8. Lin-Wang, K., Bolitho, K., Grafton, K., Kortstee, A., Karunairetnam, S., McGhie, T K., Espley, R V., Hellens, R P., Allan, A C. 2010. An R2R3 *MYB* transcription factor associated with regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway in Rosaceae. BMC Plant Biology. 10-50.

9. Lodhi, M. A., Guang- Ning, Ye., Norman, f., Weeden and Bruce, I., Reisch. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and Vitis species. Plant Molecular Biology Reporter. 12(1): 6- 13.

10. Mahmoudi, E., Soltani, B.M., Yadollahi, A., Hosseini, E. 2012. Independence of color intensity variation in red flesh apples from the number of repeat units in promoter region of the *MdMYB10* gene as an allele to *MdMYB1* and *MdMYBA*. Iranian Journal of Biotechnology. 10 (3): 153-160. in Persian.

11. Rasmussen SE, Frederiksen H, Struntze Krogholm K, Poulsen L. 2005. Dietary proanthocyanidins: occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. Molecular Nutrition and Food Research. 49(2):159-174.

12. Takos AM, Jaffe FW, Jacob SR, Bogs J, Robinson SP, Walker AR. 2006. Light-induced expression of a *MYB* gene regulates anthocyanin biosynthesis in red apples. Plant Physiology. 142(3):1216-1232.

13. Tsao, R., Yang, R., Young, J.C. and Zhu, H. 2003. Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). Agricultural and Food chemistry. 51(21), 6347–6353.

14. Van Nocker, S., Berry, G., Najdowski, J., Michelutti, R., Luffman, M., Forsline, Ph., Alsmairat, N., Beaudry, R., Nair, M G., Ordidge, M. 2011. Genetic diversity of red-fleshed apples (Malus). Springer Science: (doi: 10.1007/s10681-011-0579-7).

Determining the structure of promoter region of *MdMYB10* gene in some red-fleshed genotypes of apple (*Malus* spp.)

M. Vakili-Ghartavol[1], N. Mahna[2*], F. Zare Nahandi[3]

1- M.Sc. student. 2- Associate Professor. 3- Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, 5166616471 Tabriz, Iran. respectively.

*Corresponding author: mahna@tabrizu.ac.ir

Abstract

Anthocyanins are flavonoid pigments imparting red, blue, or purple pigmentation to fruits, flowers and foliage. These antioxidant compounds are important sources of nutrients. The pigmentation of typical red apple fruits results from accumulation of anthocyanin in the skin. However, numerous genotypes of *Malus* are known that synthesize anthocyanin in additional fruit tissues including core and cortex. Anthocyanin accumulation is often due to the overexpression of *MdMYB10* gene in many

tissues, including fruit flesh. To investigate the structure of the promoter of *MdMYB10* gene and the mechanism of red color in fruit flesh in some local genotypes, genomic DNA extracted from leaf samples of nine red- and white-fleshed apple genotypes and the promoter region of *MdMYB10* gene was amplified using PCR technique and specific primers for the target genomic region. Amplified fragments were analysed through electrophoresis. Two bands were recognized in most of red-fleshed varieties indicating that all were heterozygous for *MdMYB10* alleles (R1R6). Therefore, nearly all tested red-fleshed apples could be traced back to 'Niedzwetzkyana' variety.

Keywords*:* Red fleshed apple (*Malus* spp.)- anthocyanin- promoter- MdMYB10