بررسی وجود آلل S_3 در مکان ژنی *S-RNase* در ژنوتیپ‌های بومی سیب (*Malus* spp.) و ارتباط آن با گوشت قرمزی میوه

معصومه وکیلی قرطاول[۱] و ناصر مهنا[۲*]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد و [۲]دانشیار گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

*نویسنده مسئول:mahna@tabrizu.ac.ir

سیب دارای سیستم خودناسازگاری گامتوفیتی است که بوسیله یک لوکوس S چند آللی کنترل می‌شود. اخیرا مشخص شده است که یک مکان ژنی پیوسته با آلل S_3-*RNase* وجود دارد که باعث فنوتیپ قرمز گوشت میوه در برخی ژنوتیپ‌های سیب بوده است. برای تعیین آللوتیپ مکان ژنی *S-RNase* و ارتباط آن با قرمز بودن رنگ گوشت میوه در برخی ژنوتیپ‌های سیب بومی ایران و استفاده کاربردی از این اطلاعات در تحقیقات بعدی، نمونه‌های برگی از نه ژنوتیپ بومی و تجاری سیب گوشت قرمز و گوشت سفید تهیه شدند و پس از استخراج DNA، آللوتیپ آنها از نظر وجود آلل S_3-*RNase* با استفاده از تکنیک PCR و پرایمرهای اختصاصی نواحی ژنومی مورد نظر و نهایتا الکتروفورز قطعات تکثیر شده مورد ارزیابی قرار گرفت. همگی سیب های گوشت قرمز دارای آلل S_3 بودند.

کلمات کلیدی: سیب گوشت قرمز، آنتوسیانین، *S-RNase*.

مقدمه

آنتوسیانین‌ها به عنوان گروه بسیار مهمی از فلاونوئیدها عامل ایجاد رنگ قرمز در میوه‌ی سیب هستند. تجمع آنتوسیانین در گوشت میوه سیب بعنوان ویژگی جدیدی در برنامه‌های اصلاح ژنتیکی سیب محسوب شده و بازارپسندی زیادی را موجب می شود (Mahmoudi et al., 2012). هم چنین، فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و فواید سلامتی ناشی از وجود آنتوسیانین‌ها در میوه‌های مختلف و سبزیجات باعث شده‌است که آنتوسیانین‌ها به عنوان دارو در بسیاری از کشورها مورد استفاده قرار گیرند (Huang et al., 2004; Iversen, 1999).

قبلا گزارش شده بود که صفت قرمزی گوشت میوه سیب به دلیل بیان بالای آلل R6 در ناحیه پروموتری ژن *MdMYB10* است (Espley et al., 2009). بعضی از محققین مشاهده کردند که در رقم گوشت قرمز Pink Pearl (رقم 'Surprise' با والد گرده ناشناخته) در ناحیه پروموتری ژن *MdMYB10*، پروموتر R6 وجود ندارد. نتاج این رقم در تلاقی با رقم JPP35 ('Jonathan'×'Pink Pearl') صفت گوشت قرمزی را نشان می‌دهند (Sekido et al., 2010). مکانیسم مولکولی رنگ قرمز آنها تا حد زیادی ناشناخته است، ولی گزارش شده است که صفت گوشت قرمزی در Pink Pearl به شدت به آلل S_3-*RNase* وابسته است (Sekido et al., 2010). از آنجا که ژن های کنترل کننده صفات رنگ گوشت و پوست (*MdMYB1, MdMYB10*) در لوکوس *Rni* در گروه لینکاژی نهم نقشه ژنومی سیب قرار دارد که لوکوس *S* نامیده می‌شود (Chagné et al., 2007; Maliepaard et al., 1998)، ممکن است صفت گوشت قرمزی در Pink Pearl بوسیله نوع متفاوتی از فاکتور رونویسی MYB در نزدیکی آلل S_3-*RNase* کنترل می‌شود.

تجمع رنگدانه در گوشت میوه ممکن است با کیفیت پایین میوه و گسی بالا و اندازه کوچک میوه و بافت نرم مانند آنچه که در کرب اپل‌ها (سیب های زینتی) (*Malus* spp.) مشاهده می‌شود، توام باشد. با این حال بدلیل خواص سلامت آوری آن، یکی از

اهداف برنامه های اصلاحی سیب معرفی سیب‌های گوشت قرمز در ارقام تجاری با کیفیت بالا است. برای این هدف، داشتن فهم درستی از اساس ژنتیکی رنگدانه قرمز در گوشت میوه بویژه در ارقام محلی لازم و ضروری است.

مواد و روش‌ها

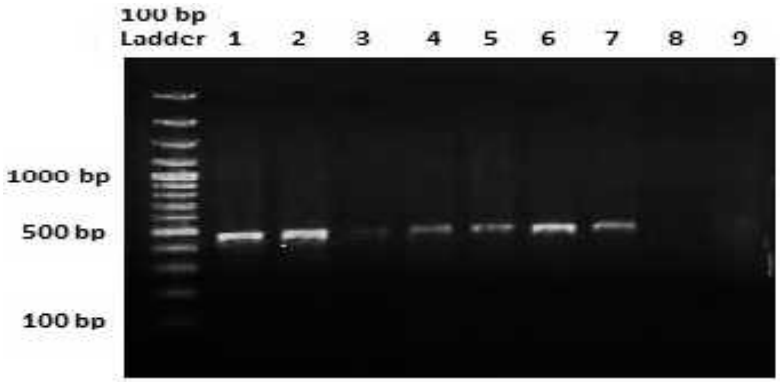
مواد گیاهی: نمونه‌های برگی جوان کاملا توسعه یافته از ژنوتیپ‌های گوشت سفید Granny Smith، Red Delicious، Golden Delicious، گوشت قرمز Bud9 و سیب‌های گوشت قرمز بومی میاندوآب، ورزقان، خلعت پوشان و یک نمونه کشت بافتی از درخت دیگری از سیب محلی میاندوآب و یک سیب محلی با شاخه و برگ قرمز از ایوند تهیه و در نیتروژن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

تکثیر آلل S_3-RNase 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 آلل S_3-Rnase با استفاده از پرایمر الیگونوکلئوتیدی مستقیم 5′-CAAACGATAACAAATCTTAC-3′ و پرایمر معکوس 5′-TATATGGAAATCACCATTCG-3′ و شرایط PCR مشروح توسط بروثرت (Broothaerts, 2003) و تایید شده توسط سکیده و همکاران (Sekido *et al.*, 2010) اقدام گردید.

شناسایی آلل *S_3-RNase*: بر اساس نتایج بدست آمده از گزارش‌های قبلی، طول قطعه ژن *S_3-RNase* حدود ۵۰۰ جفت باز (Broothaerts, 2003) است که با استفاده از روش الکتروفورز، نتایج مورد نظر ارزیابی شد.

نتایج و بحث

الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با پرایمرهای مخصوص آلل S_3-RNase در ژنوتیپ‌های مورد آزمون (شکل ۱)، برای ژنوتیپ‌های خلعت پوشان، ورزقان، میاندوآب، Golden Delicious، Granny Smith، Bud9 و نمونه کشت بافتی موجود در آزمایشگاه بیوتکنولوژی یک باند در محدوده‌ی ۵۰۰ جفت بازی نشان داد و در نمونه‌های برگی درختان سیب محلی ایوند و رقم Red Delicious هیچ باندی در محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مشاهده نشد.



شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR آلل S_3 مکان ژنی *S-RNase* بر روی ژل آگارز ۱٪. (۱؛ Ladder (O'GeneRuler^{TM} 100 plus) ۲) Granny Smith (کنترل مثبت)؛ ۳) Golden Delicious (کنترل مثبت)؛ ۴) خلعت پوشان؛ ۵) میاندوآب؛ ۶) ورزقان؛ ۷) Bud9؛ ۸) نمونه کشت بافتی؛ ۹) ایوند؛ ۱۰) Red Delicious (کنترل منفی).

قبلا گزارش شده است که ژنوتیپ مکان ژنی S- در ارقام Golden Delicious، Granny Smith و Red Delicious به ترتیب، S_2S_3، S_3S_{23} و S_9S_{19} می‌باشد (Janssens et al., 1995). به همین علت، دو کولتیوار اول به عنوان کنترل مثبت و سومی به عنوان کنترل منفی در این آزمایش وارد شدند. همچنین پس از آنها، سکورای و همکاران (Sakurai *et al*., 1997) رقم Golden Delicious را با استفاده از تکنیک تکثیر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ژنوتیپ مکان ژنی S بررسی کردند و همین نتیجه تایید شد. پژوهش حاضر نیز نشان داد که یکی از آلل‌های خودناسازگاری در ارقام Golden Delicious، Granny Smith، Bud9، سیب‌های محلی ورزقان، خلعت پوشان، میاندوآب و نمونه کشت بافتی موجود در آزمایشگاه از نوع S_3-*RNase* می‌باشد. بنابراین نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج قبلی مطابق بود.

با توجه به اینکه گوشت قرمزی در میوه رقم 'Pink Pearl' که دارای آلل *MdMYB10* R1 است، به یک آلل غالب پیوسته به لوکوس *S*-خودناسازگاری (آلل S_3-*RNase*) وابسته است (Sekido *et al*., 2010)، بنابراین پیشنهاد می‌شود که نوع آلل خودناسازگاری در سیب محلی ایوند شناسایی و توالی‌یابی شود، هر چند که یک باند بسیار ضعیف در محل باند S_3 مشاهده گردید. در تحقیق سکیدو و همکاران (Sekido *et al*., 2010) میوه های گوشت قرمز و سفید تواما مورد بررسی قرار گرفتند و پیوستگی بین آلل S_3 و قرمز بودن گوشت در 'Pink Pearl' تایید شد. در تحقیق حاضر نیز سیب‌های گوشت قرمز و سفید مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند. نمونه کشت بافتی که از یک درخت سیب با شاخ و برگ و میوه قرمز بدست آمده است، در مکان ژنی *S-RNase* دارای آلل S_3 بود و احتمال داده می‌شود قرمز بودن میوه آن در ارتباط با مکان ژنی پیوسته با آلل S_3 باشد. تایید این امر نیازمند مطالعات ژنتیکی بیشتری است.

منابع

1. Broothaerts, W. 2003. New findings in apple S-genotype analysis resolve previous confusion and request the re-numbering of some S-alleles. Theoretical and Applied Genetics. 106:703–714.
2. 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.
3. 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.
4. Huang, D. j., LIN, C. D., Chen HG and LIN YH. 2004. Antioxidant and antiproliferative activities of sweet potato (Ipomoea batatas [L.] Lam 'Tainong 57') constituents. Botanical Bulletin of Academia Sinica. 45: 179-186.
5. Iversen CK. 1999. Black current nectar: effect of processing and storage on anthocyanin and ascorbic acid content. Food Science. 64(1): 37-41.
6. Janssens, G.A., I.J. Goderis, W.F. Broekaert, and W. Broothaerts. 1995. A molecular method for S-allele identification in apple based on allele-specific PCR. Theoretical Applied Genetics. 91:691–698.
7. 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.
8. 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.

9. Maliepaard, C., F.H. Alston, G. van Arkel, L.M. Brown, E. Chevreau, F. Dunemann, K.M. Evans, S. Gardiner, P. Guilford, A.W. van Heusden, J. Janse, F. Laurens, J.R. Lynn, A.G. Manganaris, A.P.M. den Nijs, N. Periam, E. Rikkerink, P. Roche, C. Ryder, S. Sansavini, H. Schmidt, S. Tartarini, J.J. Verhaegh, M. Vrielink-van Ginkel, and G.J. King. 1998. Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mill.) using multi-allelic markers. Theortical Applied Genetics. 97: 60–73.

10. Sakurai, K., S.K. Brown, and N.F. Weeden. 1997. Determining the self-incompatibility alleles of Japanese apple cultivars. HortScience. 32:1258– 1259.

11. Sekido K, Hayashi Y, Yamada K, Shiratake K and Matsumoto S. 2010. Efficient Breeding System for Red-fleshed Apple Based on Linkage with S3-RNase Allele in 'Pink Pearl'. Hortscience. 45(4):534–537.

***S_3* allele mining in *S-RNase* locus in some local genotypes of apple (*Malus* spp.) and its relationship with red color of fruit flesh**

M. Vakili-ghartavol[1] and N. Mahna[2*]

1- MSc. Student and Associate Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran.

*Corresponding author: mahna@tabrizu.ac.ir

Abstract

Apple has a gametophytic self-incompatibility system controlled by a multi-allelic S locus. It has been recently elucidated that a S_3-RNase related locus is responsible for red-flesh characteristic in some apple genotypes. In order to determine the allelotype of S-RNase locus and its relationship with red color of fruit flesh in some endemic apple genotypes in Iran and open up consequent applications of this information, leaf samples of nine local and commercial red- and white-fleshed apple genotypes were prepared. After DNA extraction, their allelotype in S-RNase locus was evaluated for S_3 allele using PCR technique and electrophoresis. All red-fleshed genotypes had an S3 allele in their S-RNase locus.

Key words: Red-fleshed apple, Anthocyanin, S-RNase