

تعیین خود و دگر(نا)سازگاری برخی از ارقام گلابی آسیایی (*Pyrus serotina* Rehd.) و ارقام گلابی بومی

ایران (*Pyrus communis* L.) با استفاده از میکروسکوپ فلئورسنس و تکثیر ژن S-RNase

عبدالطیف شیخی^۱، کاظم ارزانی^{۲*} و محمود کوشش صبا^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران. ۲- استاد گروه علوم باغبانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران. ۳- استادیار دانشگاه کردستان، سنندج.

* نویسنده مسئول: arzani_k@modares.ac.ir

چکیده

ارقام گلابی دارای خودناسازگاری گامتوفیتی (GSI) هستند که توسط یک لوکوس چند آلی کنترل می‌شود. بنابراین تعیین خود و دگر(نا)سازگاری ارقام برای انتخاب ارقام گرده‌زا و تولید میوه و موفقیت در برنامه‌های دورگ‌گیری، ضروری است. هدف از انجام این پژوهش تعیین خود و دگر(نا)سازگاری یازده رقم گلابی شامل نه رقم گلابی آسیایی (*Pyrus serotina* Rehd.) و دو رقم گلابی بومی ایران (*P. communis* L.) بود. در این مطالعه از روش‌های خود و دگرگرده افشانی کنترل شده و به دنبال آن بررسی رشد لوله‌ی گرده در طول خامه با میکروسکوپ فلئورسنس استفاده شد. همچنین ژن‌های S-RNase با استفاده از پرایمرهای 'FTQQYQ' و 'anti-IIWPNV' تکثیر شدند و محصولات PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز (AGE) و ژل پلی‌اکریل آمید (PAGE) جدا شدند. خودگرده افشانی‌ها و تلاقی‌ها، خود و دگرسازگار در نظر گرفته شدند زمانی که حداقل یک لوله‌ی گرده به بخش پایینی خامه در ۳۰-۲۵ درصد از مادگی‌ها رسیده باشد. نتایج حاصل از میکروسکوپ فلئورسنس نشان داد که در بین ارقام مورد بررسی رقم‌های 'KS8' و 'KS13' خودسازگار و نه رقم دیگر خودناسازگار بودند. تلاقی‌های KS6 × KS13 و KS12 × KS13 ناسازگار بودند. قطعات S-RNase از ژنوم تمام ارقام به جز رقم 'Shahmiveh' تکثیر شدند. تک باندهای مشاهده شده در 'KS8' و 'KS12' در AGE به دو باند مجزا در PAGE جدا شدند. بنابراین، روش میکروسکوپ فلئورسنس و تکنیک PCR به عنوان روش‌های مناسب و قابل اتکا برای تعیین خود و دگر(نا)سازگاری ارقام گلابی و همچنین سایر اعضای خانواده گل‌سرخیان می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند.

کلمات کلیدی: گلابی آسیایی (*Pyrus serotina* Rehd.)، خودناسازگاری، میکروسکوپ فلئورسنس، ژن S-RNase، رشد لوله گرده

مقدمه

میوه‌دهی در گلابی و بسیاری دیگر از اعضای خانواده گل‌سرخیان نظیر سیب، بادام، آلو، زردآلو و گیلاس متأثر از چندین فاکتور ژنتیکی و محیطی (Gu et al., 2009) به ویژه خودناسازگاری (Crane & Lewis, 1942) است. خودناسازگاری در گلابی همانند دیگر اعضای خانواده گل‌سرخیان (*Rosaceae*) از نوع گامتوفیتیک بوده و در آن رشد لوله گرده حامل آلل S- در خامه‌ی گیاه دیپلوئید دارنده آلل S- مشابه، ممانعت می‌شود (De Nettancourt, 2001; Zisovich et al., 2004). بنابراین خودناسازگاری یک راهبرد تکاملی در گیاهان گلدار است که از خویش‌آمیزی جلوگیری کرده و منجر به افزایش دگرآمیزی می‌شود (De Nettancourt, 1997). محل توقف رشد لوله‌ی گرده به وسیله‌ی تجمع بالای کالوز (1,3-glucan-) در نوک لوله‌ی گرده مشخص می‌شود (De nettancourt, 1997). بنابراین برای افزایش تولید میوه و کشت ارقام سازگار به هنگام احداث باغ‌های جدید و همچنین انجام تلاقی‌های مناسب در برنامه‌های به‌نژادی، شناسایی ارقام خودناسازگار و دگر ناسازگار ضروری است.

محققین زیادی از روش های مختلف نظیر گرده افشانی های کنترل شده و به دنبال آن محاسبه ی درصد تشکیل میوه و بررسی رشد لوله ی گرده در طول خامه به وسیله ی میکروسکوپ فلئورسنس برای بررسی خودناسازگاری استفاده کرده اند (Kaufmane & Rumpumen, 2002) امروزه با استفاده از روش های مولکولی و بیوشیمیایی نظیر روش های مبتنی بر PCR و تجزیه ی گلیکوپروتئین های خامه (S-RNase) می توان با دقت بالایی نوع آلل های S-ارقام مختلف را تعیین کرد (Mato et al., 2007; Sassa et al., 1992; Ishimizu et al., 1999; Tomimoto et al., 1996) هدف از انجام این پژوهش تعیین خود و دگر(نا)-سازگاری برخی از ارقام گلابی آسیایی و همچنین برخی گلابی های بومی پرورش یافته در ایران از طریق مشاهده رشد لوله ی گرده به کمک میکروسکوپ فلئورسنس و تکثیر آلل های ناسازگاری به کمک روش PCR بود.

مواد و روش ها

برای مطالعه ی خود و دگر(نا)سازگاری و انجام گرده افشانی های کنترل شده، از ۱۱ رقم گلابی، ۹ رقم گلابی آسیایی (*Pyrus serotina* Rehd)، 'KS6'، 'KS7'، 'KS8'، 'KS9'، 'KS10'، 'KS11'، 'KS12'، 'KS13'، 'KS14' و دو رقم گلابی بومی ایران، 'Shahmiveh' و 'Sebri' کشت شده در باغ تحقیقاتی گلابی آسیایی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، استفاده شد. خودگرده افشانی و دگرگرده افشانی کنترل شده به ترتیب برای ۱۱ رقم مورد بررسی و سه رقم 'KS6'، 'KS12' و 'KS13' در تمامی تلاقی های ممکن با روش اخته کردن گل ها انجام شد. جهت بررسی رشد لوله ی گرده در طول خامه، از هر تیمار گرده-افشانی در روزهای مختلف (۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت پس از گرده افشانی) تعداد ۱۰ عدد گل برداشت شده و به مدت ۲۴ ساعت در محلول FAA (فرمالدئید ۴۰٪، استیک اسید گلاسیال و اتانول ۷۰٪ به نسبت ۱:۱:۱۸) تثبیت شدند. برای رنگ آمیزی لوله ی گرده به منظور بررسی با میکروسکوپ فلئورسنس، گل های تثبیت شده، جهت نرم شدن به مدت ۲۴ ساعت در NaOH ۸ نرمال در دمای اتاق قرار گرفتند. سپس نمونه ها به مدت ۲ ساعت در محلول آنیلین بلو ۰/۱ درصد در فسفات بافر ۰/۱ مولار با pH=11 رنگ آمیزی شدند. نمونه ها پس از رنگ آمیزی، بین لام و لامل قرار گرفته به آرامی اسکواش شده و با میکروسکوپ فلئورسنس مدل Olympus Bx51 مورد بررسی قرار گرفتند. DNA ژنومی از برگ های جوان به روش CTAB با کمی تغییرات استخراج شد. کیفیت و کمیت نمونه های DNA با استفاده از دستگاه نانودراپ و همچنین الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد. PCR برای شناسایی آلل های S-RNase با استفاده از پرایمر های ('5'-TTTACGCAGCAATATCAG-3' و '5'-FTQYQ' و 'anti-IIWPNV' ('3'-AC(A/G)TTCGGCCAAATAATT-3') انجام شد. محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز ۱/۵٪ و ژل پلی اکریل آمید ۶٪ الکتروفورز شدند.

نتایج

نتایج استفاده از میکروسکوپ فلئورسنس نشان داد که در تمامی ترکیب های تیماری مورد بررسی، تندش دانه گرده در سطح کلاله به گونه ی مطلوبی صورت گرفته است. این پدیده بیانگر آن است که در هیچ یک از ارقام مورد بررسی مشکل تندش دانه گرده وجود نداشت. کلاله ها نیز در تمامی ارقام سالم و پذیرا بودند (شکل ۱). معمولاً وجود حداقل یک لوله ی گرده درون تخمدان در اکثر مادگی های مورد بررسی یک رقم به عنوان تلاقی سازگار در نظر گرفته می شود. در این مطالعه نیز بر اساس Lopez et al., (2001) ارقام سازگار در نظر گرفته شدند اگر لوله های گرده در ۳۰-۲۵ درصد مادگی ها به تخمک رسیده باشند. نتایج مطالعه میکروسکوپی رشد لوله گرده درون خامه در جدول ۱ ارائه شده است. در تیمارهای خودگرده افشانی ۱۱ رقم مورد مطالعه، تعداد مادگی هایی که در آن ها حداقل یک لوله ی گرده ۱۲۰ ساعت پس از گرده افشانی به انتهای خامه رسیده بود از ۲۸ درصد در رقم 'KS13' تا ۳۷/۵ درصد در رقم 'KS8' متغیر بود. بنابراین این دو رقم به عنوان ارقام خودسازگار در نظر گرفته شدند (جدول ۱). در سایر ارقام حتی ۱۲۰ ساعت پس از گرده افشانی نیز هیچ لوله ی گرده ای به انتهای خامه نرسید و همگی

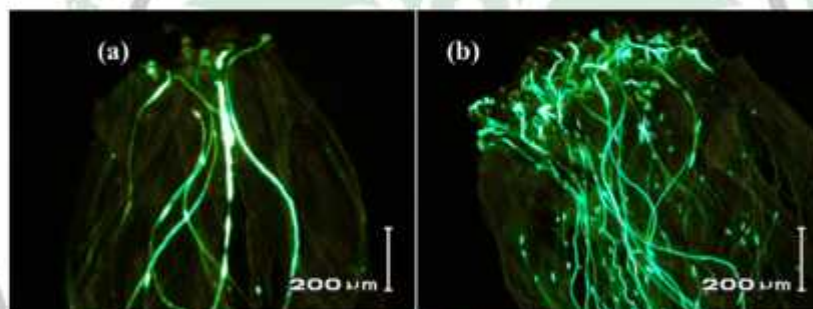
خودناسازگار در نظر گرفته شدند. در تیمارهای دگرگرده افشانی نیز تلاقی‌های KS13 × KS12 و KS6 × KS13 به عنوان تلاقی‌های ناسازگار در نظر گرفته شدند. چون در آن‌ها تعداد مادگی‌هایی که حداقل دارای یک لوله‌ی گرده در انتهای خامه بودند به ترتیب ۱۶/۵ و ۱۴/۵ و کمتر از ۲۵ درصد بودند. سایر تلاقی‌ها به عنوان تلاقی‌های سازگار در نظر گرفته شدند. که در آن‌ها در اغلب موارد (بیشتر از ۲۵ درصد از مادگی‌ها) لوله‌های گرده به انتهای خامه رسیدند. قطعات S-RNases از نه رقم گلابی آسیایی و دو رقم بومی مورد بررسی تکثیر شدند و به وسیله‌ی AGE و PAGE جداسازی شدند (شکل ۳) در AGE دو نوع باند برای ارقام مشخص شد یک باند کوتاه که احتمالاً مربوط به یکی از آلل‌های S1، S3، S4، S5، S6، S7 یا S8-RNase است و یک باند بلند که مربوط به یکی از آلل‌های S2 یا S9-RNase است، همانطور که قبلاً توصیف شده اند (Ishimizu *et al.*, 1999). رقم 'Shahmiveh' باندی تولید نکرد که این امر ممکن است به علت نامناسب بودن کیفیت DNA و یا عدم توانایی این دو آغازگر در تشخیص آلل خودناسازگاری آن باشد. از طرفی دیگر جداسازی قطعات S-RNase با PAGE جداسازی تک باند مشاهده شده در AGE در دو رقم 'KS8' و 'KS12' را به دو باند مجزا امکان پذیر ساخت (شکل ۳). به طور کلی آغازگرهای 'FTQQYQ' و 'anti-IIWPNV' توانستند ژن‌های S-RNase را در ارقام مورد نظر تکثیر کنند و نتایج نشان داد که ژن خودناسازگاری در ارقام مورد مطالعه وجود دارد.

جدول ۱- رشد لوله‌ی گرده در طول خامه ۱۲۰ ساعت پس از خود و دگرگرده افشانی‌های کنترل شده در ارقام مختلف گلابی

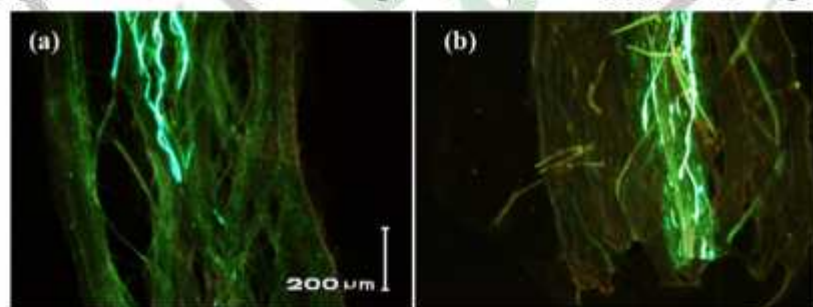
Cultivar name	Number of pistils examined	Percentage of pistils with 1 pollen tube				Compatibility
		At the upper third	At the middle third	At the lower third	At the base of the style	
Self-pollination						
KS6	7	43	57	0	0	Self-incompatible
KS7	8	37.5	62.5	0	0	Self-incompatible
KS8	8	0	25	37.5	37.5	Self-compatible
KS9	8	0	25	75	0	Self-incompatible
KS10	8	12.5	87.5	0	0	Self-incompatible
KS11	8	12.5	87.5	0	0	Self-incompatible
KS12	7	0	71	29	0	Self-incompatible
KS13	7	0	29	43	28	Self-compatible
KS14	8	0	62.5	37.5	0	Self-incompatible
Shahmiveh	4	100	0	0	0	Self-incompatible
Sebri	4	100	0	0	0	Self-incompatible
Cross-pollination						
KS6×KS12	7	14	0	57	29	Cross-compatible
KS6×KS13	6	17	50	16.5	16.5	Cross-incompatible
KS12×KS6	6	50	0	17	33	Cross-compatible
KS12×KS13	4	0	0	50	50	Cross-compatible
KS13×KS12	7	71	0	14.5	14.5	Cross-incompatible
KS13×KS6	7	43	0	28.5	28.5	Cross-compatible

در خودناسازگاری گامتوفیتی که از ویژگی‌های خانواده گل سرخیان است، عنوان می‌شود که رشد لوله‌های گرده معمولاً در یک سوم بالایی خامه متوقف می‌شود (De Nettancourt, 1997) با این حال ما در این پژوهش مشاهده نمودیم که در ارقام خود-ناسازگار 'KS6'، 'KS7'، 'KS10' و 'KS11' لوله‌های گرده در یک سوم میانی خامه متوقف شدند. و در ارقام 'KS9'، 'KS12'، 'KS14' لوله‌های گرده در یک سوم انتهایی خامه متوقف شدند. دو رقم بومی 'Shahmiveh' و 'Sebri' رفتار متفاوتی نسبت به سایرین داشتند و در این دو رقم لوله‌های گرده در یک سوم بالایی خامه متوقف شدند. این نتایج با نتایج Milatovic & Nicolic,

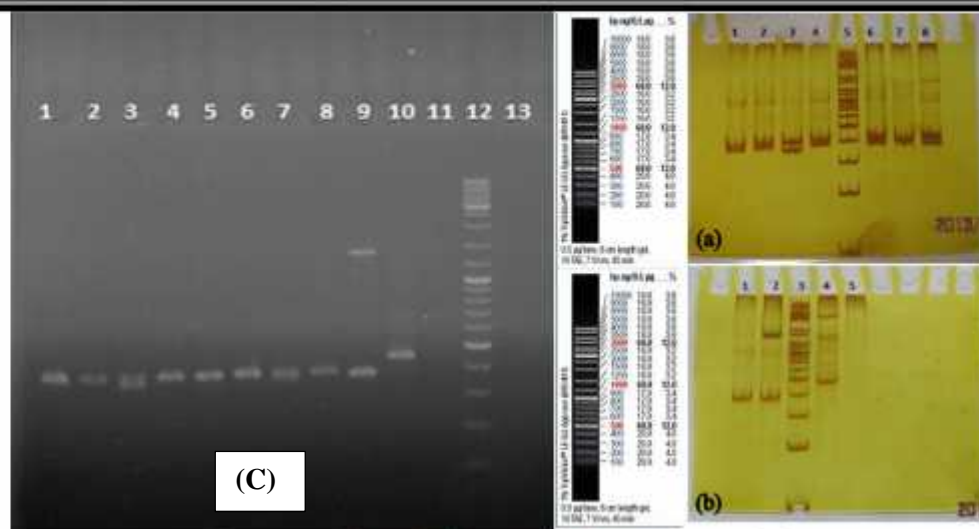
(2007) که گزارش نمودند رشد لوله‌ی گرده ناسازگار در زردآلو (رزاسه) اغلب در یک سوم پایینی خامه متوقف می‌شود، مطابقت دارد. با توجه به اینکه در تمامی گرده‌افشانی‌ها، جوانه زنی در سطح کلالة به نحو مطلوبی صورت گرفته بود، بنابراین توقف رشد لوله گرده در بخش‌های پایینی خامه و عدم نفوذ آن به درون تخمدان به دلیل خودناسازگاری ارقام مذکور است. روش PCR برای تعیین ناسازگاری سریع‌تر و راحت‌تر از سایر روش‌ها است و تحت تأثیر عوامل محیطی و شرایط آب و هوایی قرار نمی‌گیرد و علاوه بر این، برای شناسایی آلل‌های S-RNase نیازی نیست تا گیاهان به بلوغ برسند (Ishimizu *et al.*, 1999; Tamura *et al.*, 2000) با این حال به نظر می‌رسد تنها اکتفا نمودن به اندازه‌باند‌های ظاهر شده بر روی ژل آگارز برای ژنوتایپینگ کافی نباشد. اغلب آلل‌های S در گلابی‌های آسیایی بسیار شبیه یکدیگر بوده و گاهی تفاوت‌ها کمتر از 10 bp است و تفکیک باند‌های ظاهر شده بر روی ژل آگارز معمولی سخت است که در چنین مواردی نیاز به استفاده از تکنیک‌های دیگری مانند الکتروفورز بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید یا انجام توالی‌یابی ژن می‌باشد. نتایج حاصل از این مطالعه نیز نشان داد که آنالیز قطعات S-RNase با PAGE جداسازی و تفکیک تک باند کوتاه ظاهر شده در دو رقم 'KS8' و 'KS12' را به دو باند مجزا، بدون استفاده از آنزیم‌های محدود کننده (که اغلب گران قیمت هستند) امکان‌پذیر ساخت. این نتایج با نتایج Kato *et al.* (1999) و Ishimizu *et al.* (2012) مطابقت داشت. آن‌ها در مطالعات خود محصولات PCR آلل‌های S-گلابی آسیایی را با استفاده از PAGE آنالیز کردند و نشان دادند که برخی آلل‌های S را می‌توان بدون استفاده از آنزیم‌های محدود کننده، جداسازی و شناسایی کرد. بنابراین روش PCR و متعاقب آن آنالیز محصولات با PAGE یک روش ساده و مؤثر برای S-genotyping در گلابی آسیایی است. از این روش برای سایر اعضای خانواده رزاسه نظیر گیلاس، بادام، زردآلو و غیره می‌توان استفاده کرد.



شکل ۱- جوانه زنی دانه‌ی گرده بر روی کلالة ارقام مختلف گلابی (a) 'Sebri' و (b) 'KS13'، ۴۸ ساعت پس از گرده‌افشانی



شکل ۲- توقف رشد لوله‌ی گرده در یک سوم میانی در رقم (a) 'KS6' و رسیدن لوله‌ی گرده به انتهای خامه در رقم (b) 'KS8'، ۱۲۰ ساعت پس از گرده‌افشانی



شکل ۳- الکتروفورز محصولات PCR با استفاده از آغازگرهای FTQYYQ (بیشرو) و anti-IIWPNV (معکوس) بر روی ژل پلی اکریل آمید (a و b) و ژل آگارز (b) [(a) ۱- 'KS6*'، ۲- 'KS7*'، ۳- 'KS8*'، ۴- 'KS9*'، ۵- مارکر، ۶- 'KS10*'، ۷- 'KS11*'، ۸- 'KS12*'، (b) ۱- 'KS13*'، ۲- 'KS14*'، ۳- مارکر، ۴- 'Sebri*'، ۵- 'Shahmiveh*'، (c) ۱- 'KS6*'، ۲- 'KS7*'، ۳- 'KS8*'، ۴- 'KS9*'، ۵- 'KS10*'، ۶- 'KS11*'، ۷- 'KS12*'، ۸- 'KS13*'، ۹- 'KS14*'، ۱۰- 'Sebri*'، ۱۱- 'Shahmiveh*'، ۱۲- مارکر]

منابع

1. Arzani, K., Koushesh-Saba, M., and Ghanati, F. 2004. Study on compatibility and pollen tube growth of some Asian pear (*Pyrus serotina* Rehd.) cultivars. In "IX International Pear Symposium 671". pp. 159-163.
2. Gu, Q.-Q., Zhang, Q.-L., Hu, H.-J., Chen, Q.-L., and Luo, Z.-R. 2009. Identification of self-incompatibility genotypes in some sand pears (*Pyrus pyrifolia* Nakai) by PCR-RFLP analysis. *Agricultural Sciences in China*. 8: 154-160.
3. Crane, M., and Lewis, D. 1942. Genetical studies in pears. *Journal of Genetics*. 43: 31-43.
4. de Nettancourt, D. 2001. The Genetics of Self-Incompatibility. In "Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants", pp. 25-72, Springer.
5. Zisovich, A. H., Stern, R. A., Shafir, S., and Goldway, M. 2004. Identification of seven S-alleles from the European pear (*Pyrus communis* L.) and the determination of compatibility among cultivars. *Journal of horticultural science & biotechnology*. 79: 101-106.
6. de Nettancourt, D. 1997. Incompatibility in angiosperms. *Sexual Plant Reproduction*. 10: 185-199.
7. Kaufmane, E., and Rumpunen, K. 2002. Pollination, pollen tube growth and fertilization in *Chaenomeles japonica* (Japanese quince). *Scientia Horticulturae*. 94: 257-271.
8. Mota, M., Tavares, L., and Oliveira, C. 2007. Identification of S-alleles in the pear cv. Rocha and other European pear cultivars. In "X International Pear Symposium 800". pp. 431-438.
9. Sassa, H., Hirano, H., and Ikehashi, H. 1992. Self-incompatibility-related RNases in styles of Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd.). *Plant and cell physiology*. 33: 811-814.
10. Ishimizu, T., Inoue, K., Shimonaka, M., Saito, T., Terai, O., and Norioka, S. 1999. PCR-based method for identifying the S-genotypes of Japanese pear cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*. 98: 961-967.
11. Tomimoto, Y., Nakazaki, T., Ikehashi, H., Ueno, H., and Hayashi, R. 1996. Analysis of self-incompatibility-related ribonucleases (S-RNases) in two species of pears, *Pyrus communis* and *Pyrus ussuriensis*. *Scientia horticulturae*. 66: 159-167.
12. Lopez, M., Alonso, J. M., Martinez-Gomez, P., Socias I Company, R., Gradziel, T. M. and Batlle, I. 2001. Biological and molecular assessment of self-incompatibility in almond. *Nucis-Newsletter*. 10: 8-11.
13. Milatović, D., and Nikolić, D. 2007. Analysis of self-(in) compatibility in apricot cultivars using fluorescence microscopy. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 82: 170-174.
14. Tamura, M., Ushijima, K., Sassa, H., Hirano, H., Tao, R., Gradziel, T., and Dandekar, A. 2000. Identification of self-incompatibility genotypes of almond by allele-specific PCR analysis. *Theoretical and Applied Genetics*. 101: 344-349.
15. Kato, M., Kato, S., and Sassa, H. 2012. Polyacrylamide gel electrophoresis of S-RNase fragments for identification of S-genotypes of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). *Breeding science*. 62: 348.

Determination of self and cross-(In)compatibility of some Asian pear (*Pyrus serotina* Rehd.) and Iranian local pear (*Pyrus communis* L.) cultivars using fluorescence microscopy and amplification of S-RNase gene

A. Sheikhi¹, K. Arzani^{2*}, M. Koushesh saba³

1- M.Sc., Dep. Of Horticultural Science, Tarbiat Modares University, Tehran. 2- Professor, Dep. Of Horticultural Science, Tarbiat Modares University, Tehran. 3- Assistant Proffesor, Dep. Of Horticultural Science, University of Kurdistan.

* Corresponding author: arzani_k@modares.ac.ir

Abstract

Pear cultivars exhibit Gametophytic self-incompatibility (GSI) which is controlled by multiallelic S-locus. Therefore, determination of self and cross-(in)compatibility of cultivars is necessary to choose compatible pollinizers and to guarantee fruit production and success of hybridizations in breeding programs. The aim of this research was to determine the self and cross-(in)compatibility of eleven pear cultivars, including nine Asian pear (*Pyrus serotina* Rehd.) and two Iranian native (*P. communis* L.) cultivars. This study was performed using controlled self and cross-pollinations followed by fluorescence microscopy of pollen tube growth through the style. Also, S-RNase genes were amplified using primers 'FTQQYQ' and 'anti-IIWPNV' and PCR products were separated by Agarose gel electrophoresis (AGE) and Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). Pollinations and crosses were considered as self and cross-compatible if at least one pollen tube reached the base of style in more than 25-30 % of pistils. Results of fluorescence microscopy showed that, of the cultivars examined, 'KS8' and 'KS13' were self-compatible. Other nine cultivars were self-incompatible. Crosses KS6 × KS13 and KS13 × KS12 were incompatible. S-RNase fragments from eleven cultivars were amplified. The single bands observed in the 'KS8' and 'KS12' in the AGE were separated into two distinct bands in the PAGE. Therefore, Fluorescence microscopy and PCR technique can be used as low cost and reliable methods for identification of self and cross-(in)compatible genotypes of pear and other members of *Rosaceae* family.

Key words: Asian pear (*Pyrus serotina* Rehd.), Self-incompatibility, Fluorescence Microscopy, S-RNase gene, Pollen tube growth