تعیین آلل‌های خودناسازگاری برخی ارقام و ژنوتیپ‌های گوجه (*Prunus cerasifera* Ehrh.) موجود در کشور با روش PCR

محی الدین پیرخضری
استادیار پژوهش، پژوهشکده میوه های معتدله و سردسیری، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
نویسنده مسئول:pirkhezri_mohi@yahoo.com

چکیده

گوجه ها از مهمترین میوه های نوبرانه در کشور می باشند. گوجه ها (دیپلوییید) معمولا خودناسازگارند و خودسازگاری یک پدیده استثنایی در بین آنهاست. در این تحقیق تنوع و نوع آلل های ناسازگاری (SI)، 15 رقم بومی و ژنوتیپ امید بخش شامل: گوجه میروبالان ، گوجه سبز قمی، برقان، کاشان، تبریز، سیاه، محلات، قرمز آلوچه، *P. tomentosa*، سیف، رضائیه، دهنو، ملایر، سیف دیر رس و زرد شاهرود با روش واکنش زنجیره ای پلیمراز بررسی گردید.

در مجموع ۱۰۰ باند از آلل های نا سازگاری دو ژن S-RNase و SFB با سه جفت آغازگر عمومی تکثیر شدند. با جفت آغازگر EM PC2 consFD & EM PC3consRD، ۱۹ آلل با اندازه های ۳۰۳ تا ۱۸۴۶ جفت باز تکثیر گردید که ۱۲ آلل آن در منابع گزارش گردیده بود و ۷ باند که پس از توالی یابی می تواند کاندیدای آلل جدید با شند شنا سایی گردید. آغازگرهای SFBc FD&RD، در مجموع ۱۳ آلل در دامنه ۳۰۲ تا ۷۱۰ جفت باز تولید کردند. ارقامی که دارای آلل های متفاوت باشند را درصورت همپوشانی دوره گرده افشانی می توان بعنوان گرده زا برای همدیگر بکار برد. گوجه های سبز قمی، سیاه، محلات و رضائیه از ژنوتیپ های امید بخش می باشند که همگی دارای آلل های متفاوتی هستند و می توانند بعنوان گرده زا برای هم به کار برده شوند. نتایج این تحقیق ن شان داد که PCR رو شی سریع و کارا برای برای تعیین آلل های خودناسازگاری آلوی ژاپنی است.

کلمات کلیدی: آغازگرهای دجنره، اینترون دوم، گرده زا

مقدمه

گوجه ها از مهمترین میوه های نوبرانه در کشور می باشند. گوجه ها (*P. Cerasifera*) عمدتا بعنوان تازه خوری استفاده می شوند. میزان تولید جهانی آلو و گوجه ۱۲/۰۵ میلیون تن می‌باشد. ایران با تولید ۲۶۵ هزار تن رتبه های ششم تا هفتم تولید در جهان را داراست (FAO, 2016).

آلوهای دیپلوییید (آلو ژاپنی و گوجه) کاملا خودناسازگارند و خودسازگاری یک پدیده استثنایی در بین آنهاست (Szabo, 2003). ژن عامل خودناسازگاری S-RNase است که در خامه بیان می شود (Halasz *et al*., 2007).

خودناسازگاری از مهم ترین عوامل ژنتیکی تأثیرگذار بر موفقیت گرده افشانی و میزان میوه دهی محسوب می شود(Gu *et al*., 2009) و از عوامل مهم محدود کننده تولید میوه به شمار می آید (Ortega *et al*., 2005). تعیین اولین آلل S در رقم سوردوم آلو ژاپنی SaSb تو سط یامان و همکاران در ۱۹۹۹ بود (Yamane *et al*.,۲۰۰۳). بوپا و همکاران بوسیله کلون کردن و cDNA نشان دادند نوع S هاپلوتیپ ها S-RNase است و ۹ آلل (Sa-Sj) را از ۱۷ رقم یافتند(Beppu *et al*., 2005). هالاز و همکاران سیزده آلل S جدید در نوزده رقم را شنا سایی کردند (Halasz *et al*., 2007). تا سال ۲۰۰۶ محققان شش گروه ناسازگاری را برای ارقام آلو ژاپنی معرفی نمودند و در سال ۲۰۱۲ تعداد آلل به ۳۶ عدد و ۲۱ گروه خوناسازگاری در آلوهای ژاپنی گزارش کردند (Guerra *et al*., 2012). اولین مطالعه مرتبط با

IrHC2019

ژنتیک مولکولی خودناسازگاری روی میروبالان بوسیله ساترلند و همکاران در ۲۰۰۴ منتشر شد. چون میروبالان کمتر بعنوان محصول میوه مورد توجه است و دیپلوئید است بعنوان یک مدل ساده تر خودناسازگاری در آلو ها مطرح است.

پنج S-RNase از ۴ نمونه میروبالان جدا شد. پرایمرهای در هر میروبالان آزمایش شده یک یا دو باند در اینترون دوم تکثیر کردند که در دامنه ۰/۷ تا ۳ کیلو جفت باز بودند (Sutherland *et al.*, 2004).

مکانیزم خودناسازگاری بوسیله دانه گرده و مادگی در گیاهان اعمال می شود و پروتئین Sدانه گرده متفاوت با S-RNase مادگی است. ژن SLF (SFB) عامل ناسازگاری در دانه گرده، چند شکلی بالایی داشته و در دانه گرده بیان می شود و به S-RNase متصل است (Ikeda *et al.*, 2004). با تجزیه توالی ۱۳ الل ژن SLF در جنس پرونوس نشان داد که دارای دامنه های حفاظت شده و دامنه با تنوع بالا است (Ushijima *et al.*, 2004). پروتئین های SLF و S-RNase اساس سیستم خودنا سازگاری (SI) هستند (Ortega *et al.*, 2005). فاصله بین این دو ژن در جنس پرونوس ۳۸۰ جفت باز تا ۴۹ کیلو جفت باز است (Yamane *et al.*,۲۰۰۳).

واکنش زنجیره ای پلی¬مراز یک روش آزمایشگاهی سریع، اختصاصی و ساده برای شناسایی آلل¬های S است. تاکنون هیچ گزارشی در کشور مبنی بر ارزیابی آلل های خودناسازگاری در گوجه ها گزارش نگردیده است. هدف از این بررسی شناسایی آلل های خودناسازگاری و دسته بندی ارقام بومی از نظر وضعیت آللی جهت پیشنهاد گرده زا، انتخاب والدین در برنامه¬های اصلاحی در محصول گوجه سبز است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی ۱۵ رقم بومی و ژنوتیپ امید بخش گوجه شامل: گوجه میروبالان ، گوجه سبز قمی، برقان، کاشان، تبریز، سیاه، محلات، قرمز آلوچه، *P. tomentosa*، سیف، رضائیه، دهنو، ملایر، سیف دیر رس و زرد شاهرود موجود در کلکسیون پژوهشکده میوه های معتدله و سردسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی بود. استخراج DNA از نمونه های برگی با استفاده از روش مینی پرب موری و تامسون (۱۹۸۰) با اندکی تغییر و اضافه نمودن پلی وینیل پیرولیدون (PVP دو درصد) انجام گرفت. جهت تعیین کمیت و کیفیت از نانودراپ (مدل Thermo Scientific, 1000) استفاده شد.غلظت DNA به ۱۵ نانوگرم بر میکرو لیتر رسانده شد. در این تحقیق از سه جفت آغازگر عمومی اینترون دوم (EM PC2 consFD & EM PC3consRD)، جفت اینترون (PC5consRD PaCons1-FD & EM ژن S-RNase و جفت آغازگر SFBc FD&RD جهت تکثیر آلل¬های خود ناسازگاری ژن SFB استفاده گردید. چرخه حرارتی شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه و به مدت ۴ دقیقه، ۳۵ سیکل حرارتی که که برای برخی آغاز گرها ۱۰ چرخه اول سیکل حرارتی به صورت Touch Down برنامه ریزی گردید (Ethadpoor *et al.*, 2011). هر واکنش در حجم ۱۷ میکرولیتر حاوی ۳ میکرولیتر DNA ژنومی (۱۵ نانو گرم)، ۱/۵ میکرولیتر از هر آغازگر فوروارد و ریورس (غلظت ۱۰ پیکو مولی)، مستر میکس PCR (سیناژن- ایران) ۷/۵ ماکرولیتر، آب مقطر دیونیزه ۳/۵ میکرولیتر بود. باندهای تکثیری محصول PCRروی ژل ۱/۵ درصد آگارز با ولتاژ ۷۵ در مدت۳/۵ ساعت از هم تفکیک شدند. رنگ آمیزی با ماده ژل رد (Gel Red, Biotium, USA) استفاده گردید و باندها زیر نور ماورابنفش آشکار و تصویر برداری شدند. اندازه باندهای تکثیر شده با استفاده از نشانگر اندازه یک کیلو جفت بازی برآورد شد.

فواصل طی شده باندها با استفاده از نرم افزار Quantity one شرکت Bio-Rad بدست آمد و با استفاده از نرم افزار اکسل رگرسیون فاصله طی شده باندهای نشانگر (Y) بر اندازه باندهای نشانگر (X) برازش شد. اندازه آلل¬های S آلوژاپنی که توالی آنها در NCBI گزارش گردیده¬اند، بدست آمدند و با اندازه باندهای بدست آمده در این بررسی برای هر جفت آغازگر مقایسه شدند.

IrHC2019

نتایج و بحث

با ا ستفاده از این جفت آغازگر ۳۲ باند با اندازه های ۳۰۲ گوجه سیف و ملایر) تا ۱۸۴۶ (گوجه ر ضائیه) جفت باز در ژنوتیپ ها و ارقام بومی گوجه مشـاهده شـد. در تحقیقات دیگر با این آغازگرها در ژنوتیپ های آلو و گوجه بین ۳۲۰ تا ۱۸۳۰ جفت باز (Ethadpoor *et al*., 2011) در ارقام بادام ۲۴۳ تا ۲۰۶۶ جفت باز در گونه¬های بادام و برخی گونه های پرونوس گزارش نمود (Ortega *et al*., 2005).

با مقایسـه اندازه باندهای بدسـت آمده با اندازه آلل¬های S موجود در NCBI، تعدادی باند با اندازه¬های جدید نیز مشـاهده شـدند که آلل متناظر با آنها در بین آلل¬های شـناخته شـده یافت نشـد که پس از توالی یابی می تواند کاندیدای آلل جدید با شند. در ارقام مورد بررسی، در ۸ رقم دو باند تشکیل شد که نشان دهنده هتروزیگوت بودن در مکان آلل¬های S انها می باشد همچنین در ۳ رقم، سه باند، در ۳ رقم چهار باند، در ۱ رقم یک باند ایجاد شد. ژنوتیپ امیدبخش گوجه رضـائیه یک باند نشـان دادند که ممکن اسـت به دلیل هموزیگوت بودن مکان آلل¬های S آن یا عدم شنا سایی آلل دوم آن با شد. گزارش گردیده که تکثیر یک باند در رقم گوجه ر ضائیه ممکن ا ست به دلیل آلل های با اندازه اینترون مشابه باشد(Halasz *et al*., 2007).

ا ستفاده از جفت آغازگر دژنره PaCons1-FD & EM PC5consRD (جفت اینترون) در مجموع تعداد ۲۵ باند با اندازه بین ۵۱۵ جفت باز تا ۱۷۵۹ جفت باز در ۱۵ ژنوتیپ م شاهده شد جدول (۱) که ۱۴ باند با اندازه های بین ۸۷۵ تا ۲۴۹۵ جفت باز در ۴۰ ژنوتیپ آلو و گوجه قبلا گزارش گردیده اسـت (Ethadpoor *et al*., 2011). در ارقام مورد بررسی ۶ رقم دو باند، ۲ رقم چهار باند، ۵ رقم یک باند نشان دادند و دو رقم رضائیه و زرد شاهرود باندی تکثیر ننمودند (جدول ۱). با توجه به اینکه این جفت آغازگر از سیگنال پپتید تا دامنه حفاظت شده پنج از ژن S-RNase را تکثیر می کند طبعا اندازه باندهای بزرگتری حاصل می شود و نمای کامل تری از آلل مربوطه را نشان می دهد. به نظر می رسد ، اگر توالی یابی بر ا ساس باندهای حا صل از این آغازگرها با شد شمای کاملی از آلل مربوطه را در ژن S-RNase نشان خواهد داد.

با به کار بردن جفت آغازگر SFBc FD & RD در این تحقیق ۱۳ آلل با اندازه بین ۳۰۲ تا ۷۱۰ جفت باز شناسایی شد. آغازگرهایی که بر اساس بادام ، گیلاس و زردآلو ژاپنی (*P. mume*) طراحی شده است در ۲۵ نمونه گوجه میروبالان ۱۴ آلل SFB شناسایی شده ا ست (Sutherland *et al*., 2004). این جفت آغازگر در مجموع با ۳۸ عدد باند برابر تعداد آلل در اینترون دوم (جدول ۱)، تنوع قابل ملاحظه ای در بین ارقام و ژنوتیپ های گوجه مورد ارزیابی در این تحقیق نشان داد (جدول 1). با توجه به اختصاصی بودن S-RNase و SFB متناظر، به نظر می رسد تنوع آللی SFB بایستی همانند S-RNase باشد و تا ۳۶ آلل شناسایی شده تا کنون برسد (Ikeda *et al*., 2004).

ارقامی که دارای آلل های متفاوت با شند را در صورت همپو شانی دوره گرده افشانی می توان بعنوان گرده زا برای همدیگر بکار برد. گوجه های سبز قمی، سیاه، محلات و ر ضائیه از ژنوتیپ های امید بخش می با شند که همگی دارای آلل های متفاوتی هستند و می توانند بعنوان گرده زا برای هم به کار برده شوند.

IrHC2019

جدول ۱- نوع آلل خودناسازگاری و اندازه باند شناسایی شده در یه جفت آغازگر استفاده شده برای ارقام آلو ژاپنی این تحقیق

	ژنوتیپ	نوع آلل(اینترون دوم EM-PC2F& EM-PC3R)	آغازگر(bp)(اینترون دوم)-EM PC2F& EM-PC5R	آغازگر(bp) SFBc-F& R
۱	گوجه میروبالان	S_h S_{22}	۸۹۸-۸۲۷	۷۱۰-۶۴۱
۲	گوجه سبز قمی	S_h S_{22} S_{24} **SIV**	۱۷۵۹-۱۱۶۸	۵۹۴-۴۴۴-۳۷۸-۳۲۱
۳	گوجه برقان	S_{22} **SIII**	۹۶۴-۷۷۲	۵۹۴-۴۴۴-۳۷۸-۳۲۱
۴	گوجه کاشان	S_{22} **SVII**	۹۶۴	۶۴۱-۴۴۴
۵	گوجه تبریز	S_{22} S_i **SV**	۹۶۴-۶۵۰	۵۹۴-۳۷۸-۳۲۱
۶	گوجه سیاه	S_f S_m	۶۵۰	۵۹۴-۳۲۱
۷	گوجه محلات	S_i S_k	۱۲۶۸-۱۱۰۸-۶۸۹-۶۵۰	۵۹۴-۳۷۸
۸	قرمز آلوچه	**SVIII** S_c	۱۷۵۹	۵۹۴-۳۷۸
۹	*P. tomentosa*	S_h **SV**	۹۶۴	۵۴۸-۳۷۸
۱۰	سیف	S_{24} **SII** S_i	۷۷۲-۵۹۴	۵۹۴-۴۴۴-۳۷۸-۳۲۱-۳۰۲
۱۱	گوجه رضائیه	**SXIII**	-	۶۵۸-۶۰۹
۱۲	دهنو	S_{19} S_m S_k S_{23}	۱۰۵۳-۸۴۷-۶۲۲-۵۷۴	۶۰۹-۴۲۳
۱۳	ملایر	**SIX** **SII** S_c	۵۱۵	۷۱۰-۶۵۸
۱۴	سیف دیر رس	S_{19} S_i S_{23} **SIII**	۱۰۵۳-۶۲۲	۶۵۸
۱۵	زرد شاهرود	S_c S_f	-	۶۰۹-۴۶۱-۴۱۰

منابع

Beppu, K., Komatsu, N., Yamane, H., Yaegaki, H., Yamaguchi, M., Tao, R. and Kataoka, I. 2005. "Se-haplotype confers self-compatibility in Japanese plum (Prunus salicina Lindl.)". Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 80: 760–764

Ethadpoor, M., FatahiMoghadam, M.R., and Zamani Z. 2011. "Molecular characterization of wild and cultivated plum using SSRs markers and PCR-based S-allele determination". M.Sc. thesis, horticultural department, Tehran University, Tehran, Iran .

Gu, Q., Zhang, Q., Hu, H., Chen, Q., and Luo Z. 2009. "Identification of self-incompatibility genotypes in some sand pears (Pyrus pyrifolia Nakai) by PCR-RFLP analysis". Agricultural Sciences in China 8: 154-160

Guerra ME, Lo´pez-Corrales and Wu¨nsch. A. 2012. "Improved S-genotyping and new incompatibility groups in Japanese plum". Euphytica, 186:445–452.

Halasz J, Hegedus A, Szabo´ Z, Nye´ki J, Pedryc A 2007. "DNAbased S-genotyping of Japanese plum and pluot cultivars to clarify incompatibility relationships". Hortscience 42:46-50.

Ikeda, K., B. Igic, K. Ushijima, H. Yamane & Hauck N. R. 2004. "Primary tructure futures of the S haplotype- pecific F-box protein, SFB, in Prunus". Sex. Plant Reprod. 16: 235–243.

Ortega, E., B.G. Sutherland, F. Dicenta, R. Boskovic and K.R. Tobutt. 2005. "Determining of incompatibility genotypes in almond using first and second intron consensus primers, detection of new S-alleles and correction of reported S-genotypes". Plant Breed. 124:188-196.

Sutherland, B.G., Robbins, T.P. & Tobutt, K.R. 2004. "Primers amplifying a range of Prunus S-alleles". Plant Breed., 123: 582–584.

Szabo, Z. 2003. "Plum (Prunus domestica L.)". In: Kozma, P., Nyeki, J., Soltesz, M., Szabo, Z. (Eds.): Floral Biology, Pollination and Fertilisation in Temperate Zone Fruit Species and Grape. pp. 515–522. Akademiai Kiado, Budapest.

Ushijima, K., H. Yamane, A. Watari, E. Kakehi, K. Ikeda et al., 2004. "The S haplotype-specific F-box protein gene, SFB, is defective in self-compatible haplotypes of Prunus avium and P. mume". Plant J. 39: 573–586.

IrHC2019

Yamane, H., K. Ikeda, N. R. Hauck, A. F. Iezzoni and Tao, R. 2003. "Self-incompatibility (S) locus region of the mutated S6-haplotype of sour cherry (Prunus cerasus) contains a functional pollen S allele and a non-functional pistil S allele". J. Exp. Bot. 54: 2431–2434.

S-genotyping of some Japanese Plum cultivars and genotypes in Iran (*Prunus cerasifera* Ehrh) by PCR.

Mohiedin Pirkhezri

Temperate Fruits Research Center, Horticultural Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

Corresponding author: pirkhezri_mohi@yahoo.com

Abstract

Prunes are the most important firstling fruits in Iran. Diploid Prunes/plums are commonly self incompatible and self-compatibility is rare. In this study type of self-compatibility alleles (SI) of 15 Prunes native cultivars and promising genotypes (‘Mirobalan’, ‘Gomi’, ‘Baragan, ‘Kashan’, ‘Tabriz’, ‘Siah’, ‘Mahalat’, ‘Germez Aluche’ ‘*P. tomentosa*’, ‘Sife’, ‘Rezaieh’, ‘Dehno’, ‘Malayer’, ‘Late Sife’, and ‘Zard shahrood’) were evaluated. The PCR amplification of two gens (S-RNaes and SFB) done with three degenerate primers and a total of 100 bands were detected. A total of 19 bands, ranged 303-1846 bp, were amplified by EM PC2consFD& EM PC3consRD primer that 12 alleles were reported in database and 7 band candidates for new alleles (after sequencing). SFBc FD&RD primers produced 13 band ranged 302-710 bp in studied genotypes. Cultivars are that have different alleles can be recommended to pollinazer for each others. In this study promising prunes such as: ‘Gomi’, ‘Siah’, ‘Rezaieh’ and ‘Malayer’ are have a different alleles and can pollinated each others. The results of this study showed that PCR was rapid and effective method for determining of S genotypes in plum and prune.

Key words: degenerate primers, second intron, Polinazer.

IrHC2019