بررسی آلل‌های S خود ناسازگاری در سیب رقم گلاب کهنز با استفاده از تکثیر اختصاصی آلل‌ها به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

روح اله علی[1*]، ذبیح اله زمانی[2]، محمد رضا فتاحی مقدم[3]

1-دانشجوی کارشناسی ارشد فیزیولوژی و اصلاح درختان میوه دانشگاه تهران 2و 3 استاد و دانشیار گروه علوم باغبانی دانشگاه تهران

کرج پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

چکیده

خود ناسازگاری گامتوفیتیک یک مکانیسم طبیعی است که در سیب و سایر درختان میوه خانواده رزاسه وجود دارد و به وسیله یک مکان ژنی با چندین فرم آللی کنترل می شود. در این مطالعه آغازگرهای ویژه آلل‌های(S_1، S_7، S_{18} S_{23}، S_{24}) با توجه به مطالعات قبلی انتخاب شدند تا آلل ناسازگاری دوم سیب گلاب کهنز پیداشود. با این روش آلل S_1 در سیب رقم گلاب کهنز شناسایی شد ولی ۴ آغازگر دیگر هیچ باندی تشکیل ندادند. . گرچه با استفاده از تکثیر اختصاصی آلل‌ها به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آلل خود ناسازگاری مشخص نشد ولی این یک روش سریع و موثر برای تعیین ژنوتیپ ناسازگاری در ارقام سیب می‌باشد.

کلامات کلیدی: گلاب کهنز، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، خود ناسازگاری

مقدمه

خودناسازگاری در سیب از نوع گامتوفیتیک می‌باشد که توسط یک مکان چند آللی که به نام S-alle معروف است کنترل می‌شود (بروت ارتز[1]، 2003). این نوع خود ناسازگاری گسترده‌ترین سیستم خود ناسازگاری بوده و در خانواده‌های زیادی مانند: Rosaceae، Solanaceae و Papaveraceae وجود دارد (هارینگ[2] و همکاران، 1990). نصر آبادی و همکاران (1390) در مطالعه‌ای آلل‌های خودناسازگاری در نه رقم سیب را بوسیله واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و با استفاده از 12 آغازگر ویژه آلل‌های S_{26} ، S_{24}، S_{20} S_{23}، S_{19}، S_{18}، S_9، S_5، S_4، S_3، S_2، S_1 مطالعه نمودند. در پنج رقم هر دو آلل شناسایی شدکه شامل گلاب اصفهان (S24، S18)، گلاب نوری مراغه (S23، S4)، قاسم شاهی (S_{23}، S_1)، گلمکانی (S_{23}، S_3)، و ملکه لبنان (S_{24}، S_{23}) بود ولی در چهار رقم فقط یک آلل شناسایی شد. ارشادی (1381)، با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز و با استفاده از آغاز گرهای (S_2، S_3، S_4، S_5، S_9، S_{10}، S_{24}، S_{26}، S_{27}، S_F، S_d، S_e) طراحی شده برای آلل های خودناسازگاری سیب، اقدام به بررسی آلل‌های ناسازگاری در 32 رقم سیب ایرانی نمود،که با استفاده از این روش در 11 رقم هر دو آلل خودناسازگاری و در 16 رقم فقط یک آلل خود ناسازگاری را شناسایی کرد. کیم[3] و همکاران (2006) با استفاده از 23 آلل S رایج سیب، با استفاده از روش PCR S-RNase اقدام به شناسایی آلل های S در 14 رقم سیب و والدین آنها با استفاده از آغازگرهای جدید (ASPR3+ASPF3) نمودند و نتایج به صورت زیر بدست آمد.('Hongro' (S_1S_3), 'Gamhong' (S_1S_9), 'Saenara' (S_1S_3), 'Hwahong' (S_3S_9), Seokwang' (S_3S_5) ، 'Chukwang' (S_3S_9) و ... آنها همچنین S ژنوتیپ 8 رقم سیب کره ای را هم به روش PCR شناسایی کردند. کنجی[4] و همکاران (1997) از تکثیر اختصاصی آل‌ها به روش PCR برای تعیین آلل‌های S در 15 واریته سیب ژاپنی مهم از نظر تجاری و یا برای استفاده در برنامه‌های اصلاحی استفاده کردند. با این سیستم توانست 5 آلل S مختلف سیب راتعیین نماید (S_9, S_3, S_5, S_7, S_2).

[1] Broothaerts
[2] Haring
[3] Kim
[4] Kengi

کنجی و همکاران توانستند دو آلل S را در 8 واریته دیپلوئید و دو آلل S را در 3 واریته تریپلوئید و یک آلل S را در 4 واریته تریپلوئید باقیمانده شناسایی کنند. 4 واریته هم آلل‌های S متفاوت با آنچه در والدین آنها پیش‌بینی می‌شد، داشتند.

مواد و روش‌ها

برگ‌های جوان سیب رقم گلاب کهنز در بهار سال 1391 جمع آوری شد و به آزمایشگاه منتقل و تا شروع آزمایشات در فریزر و در دمای 80- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. استخراج DNA با استفاده از روش موری تامسون[5](1980) با کمی تغییر انجام شد. سپس برای تعیین غلظت DNA استخراج شده، نمونه‌ها به وسیله دستگاه نانودراپ غلظت سنجی شدند و در صورت لزوم استخراج تکرار گردید و سپس با آب 2 بار تقطیر شده به غلظت نهایی 10 نانو گرم در میکرولیتر رقیق گردیدند، و آماده برای پی سی آر شدند. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم 18 میکرولیتر انجام شد، که حاوی 8 میکرولیتر از محلول بافر آماده (Master PCR (Mix (شرکت سینا ژن ایران)، 0/1 میکرومولار از هر کدام از آغازگرهای رو به جلو و رو به عقب، 5 میکرولیتر از DNA الگو (10 نانوگرم در میکرولیتر)، و 3 میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر بود. سپس نمونه‌ها در دستگاه PCR قرار داده شدند و تکثیر DNA بر اساس دمای اختصاصی اتصال آغازگرها برای تفکیک محصول PCR از ژل آگارز 2 درصد استفاده شد، سپس ژل در بافر TBE تحت ولتاژ 85 به مدت 70 دقیقه الکتروفورز شد. رنگ آمیزی ژل توسط اتیدیم بروماید به غلظت 5 میکروگرم در لیتر به مدت 20 دقیقه صورت گرفت و پس از شستشو با آب مقطر به مدت 10 دقیقه، باندها در دستگاه ژل داک در شرایط نور UV مشاهده و از آنها عکس برداری شد. طی این ارزیابی از 5 جفت پرایمر استفاده شد (جدول 1).

جدول 1- خصوصیات پرایمرهای آلل‌های ناسگاری سیب

S-allele	primer	Sequence 5-3	Size of PCR product (bp)	Annealing temperature (c)
S_1	MdS_1SpF MdS_1SpR	TGTAAGGCACCGCCATATCATAC CAACCTCAACCAATTCAGTCAATGA	734	62
S_7	MdS_7SpF MdS_7SpR	AGTAAATCAACCGTGGATGCTCAG TTACAATATCTACCTGTTTCCTGGG	397	63
S_{18}	DS_2 DA_1	ATCGAACTGATCATGTAGGC TATCGTGAACCTTGTGGTGG	355	62
S_{23}	$MdS_{23}SpF$ $MdS_{23}SpR$	AAGAATACAACCATTACGCCTCAGC ATTGTTGGTACTAATGCTTATGGCG	450	63
S_{24}	$MdS_{24}SpF$ $MdS_{24}SpR$	ATGGCTCCTGTGCGTCTTCCC CGTCATCCGTGTATAGGGCAACT	421	61

نتایج و بحث

با این روش آلل S_1 در سیب رقم گلاب کهنز شناسایی شد ولی 4 آغازگر دیگر هیچ باندی تشکیل ندادند. با توجه به مطالعات انجام شده توسط ارشادی (1381) از طریق بررسی ایزو آنزیم ریبونوکلناز ها هر دو آلل ناسازگاری سیب رقم گلاب کهنز (S_1، S_{3a}) و گلاب اصفهان (S_{3a}،S_{9a}) شناسایی شد.ولی آلل دوم سیب گلاب کهنز قابل شناسایی از طریق تکثیر اختصاصی آلل‌ها نبود. نصر آبادی و همکاران (1390) به وسیله واکنش زنجیره ای پلیمراز آلل‌های سیب گلاب اصفهان (S_{24}، S_{18})معرفی کردند

5 Murray and Thompson

که با توجه به نتایج ارشادی نشان می‌دهد که ممکن است که آلل ناشناخته گلاب کهنزS24 یا S18 باشد. در نتیجه این آزمایش برای پیدا کردن آلل دوم سیب گلاب طراحی شد. گرچه با استفاده از تکثیر اختصاصی آلل‌ها به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آلل خود ناسازگاری مشخص نشد ولی این یک روش سریع و موثر برای تعیین ژنوتیپ ناسازگاری در ارقام سیب می‌باشد.

منابع

1. ارشادی، ا. (1381). بررسی گرده افشانی و تشکیل میوه و ارزیابی ارقام سیب ایرانی با استفاده از نشانگرهای مولکولی. رساله دکتری علوم باغبانی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه تهران.
2. نصر آبادی، م. سیفی، ا. رمضانپور، س. س. و شریفانی، م. (1390). تعیین آلل‌های خود ناسازگاری در برخی ارقام سیب ایرانی و خارجی. خلاصه مقالات هفتمین کنگره علوم باغبانی ایران. ص: 17-16

1. Broothaerts, W. (2003). New finding in Apple S-genotype analysis resolve previous confusion and request the re-numbering of some S-alleles. Theor Appl Genet106: 703-714.
2. Haring, V. Gray, J. E. McClure, B. A. Anderson, M. A. and Clarke, A. E. (1990). Self-incompatibility a self recognition system in plant. Science. 250: 930-937
3. Kenji, S. Brown, S.K. and Weeden, N.F. (1997). Determining the S incompatibility alleles of Japanes apple cultivars. Conference, International plant and animal genome 12-16 Januany. Town and country Hotel. San Diego. Canada. P270.
4. Kim, H., T Hattori, G Hirata, Y Kim, D,A Hwang, H, K Shin, Y, U and Nou, I (2006). Determination of Self-incompatibility Genotypes of Korean Apple Cultivars Based onS-RNase PCR. Journal of Plant Biology ,49(6):448-454.

I**nvestigation Self-incompatibility S-alleles in appler Golab Kohanz cultivars using allele-specific amplification using polymerase chain reaction**

R, ali[1], Z. Zamani[2], M. Fattah[3]

1- M,Sc student of pomology, Tehran university. 2,3 Dept. of Horticultural Sciences, Tehran university

*rohollah ali

Abstract

Gametophytic self-incompatibility is a normal mechanism in apple and other fruit trees Rosacea family there and is controlled by a single locus with multiple alleles form. In this study, the allele specific primers (S1, S7, S18, S23, and S24) were selected according to previous studies, the incompatibility alleles Golab Kohanz apple be found . With this method, S1 allele was detected in cultivars Golab kohans apple 4 starter, but no other bands were formed. However, by using allele-specific amplification of self-incompatibility alleles were detected by polymerase chain reaction, but this is a quick and effective way to determine the genotype of apple cultivars are incompatible.

Key word: Golab kohanz, Polymerase Chain Reaction, Self-incompatibility