هفتمین کنگره علوم باغبانی ایران، ١٤ تا ١٧ شهریور ماه ١٣٩٠،دانشگاه صنعتی اصفهان

شناسائی آللهای ناسازگاری در زردآلو بر مبنای پروتئینهای اف–باکس(F-box)

قره شیخ بیات، رحیم (۱)، لوکا دندینی (۲)، سیلویرو سانساوینی (۳)

۱- محقق و عضو هیئت علمی بخش تحقیقات باغبانی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر-کرج

۲- محقق و ۳- استاد تمام گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه بولونیا، ایتالیا.

روشهای متعددی برای شناسائی آللهای خودناسازگاری در درختان میوه وجود دارند. یکی از این روشها انجام آزمایشهای واکنشهای زنجیره ای پلیمراز است که طی آن می توان با استفاده ازDNA هر کدام از ارقام و کاربرد آغازگرهای عمومی و اختصاصی اقدام به انتخاب قطعاتی از جایگاه ژنی مرتبط با خود(نا)سازگاری (S-locus) کرده و با الکتروفورز محصولات به دست آمده و مراجعه به الگوهای منتشر شده، آللهای S را شناسائی کرد و به این ترتیب ژنوتیپ ارقام درختان مورد نظر مشخص خواهد گردید. با توجه به اینکه دو ژن کاملا پیوسته در جایگاه ژنی یاد شده یکی به نام *S-Rnase* (مسئول شناسائی مادگی) و دیگری *SFB* (مسئول شناسائی دانه گرده) در کنترل این صفت نقش دارند، امکان استفاده از هر کدام از این دو در S-genotyping درختان میوه وجود دارد. با اینحال به نظر می رسد آللهای ژن *SFB* دارای پلی مورفیسم کافی در اندازه محصولات پی.سی.آرنیستند و به این ترتیب امکان تفکیک آنها به کمک الکتروفورز رایج دشوار است. تکنیک Single Strand Conformation Polymorphism(SSCP) با توجه با اینکه باعث تفکیک باندها بر اساس تفاوت سرعت حرکت آنها در ژل متناسب با توالی نوکلئوتیدی آنها می گرد این مزیت را دارد که چند شکلی موجود را برای انتخاب قطعات مناسب برای انجام کلونینگ ومتعاقب آن آزمایشهای توالی یابی فراهم می کند. در تحقیق حاضر که به منظور S-genotyping تعداد ۲۲ رقم زردآلو انجام شد، کارآئی تکنیک یاد شده برای اولین بار در این موضوع تجربه شده است.

کلمات کلیدی: زردآلو، خودناسازگاری، SFB، S-locus

مقدمه:

زردآلو به خانواده Rosaceae و جنس .*Prunus* L تعلق دارد و شامل شش گونه است. تمامی این گونه ها دیپلوئید بوده(2n=16, x=8) و تمامی آنهائی که تا بحال مورد مطالعه قرار گرفته اند سازگاری درون گونه ای دارند(Janick et al., 1996). با اینحال به نظر می رسد برنامه های بهنژادی در تعداد قابل توجهی از واریته های زردآلوی معمولی همانند سایر گونه های جنس *Prunus*، به غیر از هلو که اساسا خودسازگار است، تحت کنترل سیستم خودناسازگاری است. اکثر ارقام رایج در کشت و کار زردآلوی ایرانی خودناسازگار هستند. این سیستم از انجام تلاقی موفق بین ارقامی که دارای آللهای مشابه در جایگاه ژنی اس(S-locus) هستند جلوگیری می کند. به این ترتیب با وجود ارقام با ژنوتیپ یکسان در باغ انتظار تلقیح گل ها نمی رود و بنابر این میزان تشکیل میوه به شدت کاهش می یابد. لذا قبل از احداث باغهای زردآلو همانند سایر اعضای جنس *Prunus* داشتن اطلاعات از وضعیت سازگاری ارقام با یکدیگر ضروری است. امروزه روشهای ملکولی قابل کاربرد در این زمینه به راحتی در دسترس می باشند و بسیار دقیق و سریع پاسخ های لازم را ارائه می دهند. در حال حاضر تعیین ژنوتیپ ارقام می تواند به وسیله آنالیز محصولات واکنش زنجیره ای پلیمراز بر مبنای ژن *S-RNase* و نیز ژن *SFB* صورت پذیرد و سپس با انجام توالی یابی قطعات تکثیری کامل گردد. ترکیب ایندو روش می تواند منجر به نتایج مطمئن تری گردد. برای تشخیص گوناگونی آللها کاربرد تکنیک های مناسب تفکیک باندها بر روی ژل ضروری است. از آنجا که تفکیک باندها بر مبنای چندشکلی اندازه قطعات تکثیری در حین انجام اس-ژنوتایپینگ ارقام زردآلو برای پروتئینهای اف-باکس نتاج مشکوکی را ارائه می دهد، در این تحقیق سعی شد از تکنیک SSCP(Single Strand Conformation Polymorphism) استفاده شود. کاربرد این تکنیک باعث شد تا قطعات مورد نظر برای انجام کلونینگ و توالی یابی انتخاب شوند و این در حالی بود که با روش معمول الکتروفورز بر روی ژل آگار تفکیک باندها ممکن نبود. در تعریف این تکنیک می توان گفت که بعد از دناتوره شدن ملکول دو رشته ای دی ان ا، فرم تک رشته ای بر اساس ترکیب نوکلئوتیدها شکل ویژه ای به خود می گیرند و به این ترتیب هر ملکول تک رشته ای با ملکول دیگر با همان تعداد نوکلئوتید وقتی در محیط الکتروفورز قرار می گیرند با سرعتهای متفاوت به طرف قطب مخالف حرکت می کنند و این مبنای استفاده از این تکنیک در جداسازی ملکولهای هم اندازه است. به این ترتیب این تکنیک قادر خواهد بود تفاوت های تک نوکلئوتیدی را در

جریان جهش های ژنی تشخیص دهد. در واقع اولین مورد استفاده از این تکنیک برای تشخیص سریع موتاسیون ها بود(Orita et al., 1989). این تکنیک به طور گسترده ای در شاخه ژنتیک انسانی مورد استفاده قرار گرفته است و قادر بود تا جهش های نقطه ای را تشخیص دهد(Hayashi, 1992) و آنالیزهای مبتنی بر آن بسیار حساس، ارزان و سریع تفاوتهای توالی ها را نشان می داد(Sekiya, 1993; Slabaugh et al., 1997). از آنجا که بنابر گزارشهای تحقیقاتی موجود منشاء خودسازگاری در زردآلو به نظر می رسد جهش روی داده در ژن *SFB* می باشد، لذا در تحقیق اصلی به توانائی این تکنیک در تشخیص این موضوع نیز پرداخته شده است.

مواد و روش ها:

بیست و دو رقم زردآلو به نا مهای **قیسی، نادری، آلترا، BO92639095, BO93622312، بورا، کورنیا، کیوتو، لیلی کوت، مایا، نینفا، پترا، پییو، پییو تاردیوا، پینک کوت، پورتیچی، رئال دی ایمولا، روبادا، سن کاسترز، تاردیف دی والنچه و یاماگاتا-۳،** از منشاءهای مختلف مورد استفاده قرار گرفتند تا وضعیت آنها از نظر ترکیب آللهای ناسازگاری به درستی مورد آزمون قرار گیرد. دی. ان. ا ژنومی مطابق پروتکل CTAB از برگهای جوان استخراج شد و به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر مورد سنجش کیفیت قرار گرفت. واکنش های زنجیره ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای زیر به عمل آمد:

SFBc-F(5'-TCGACATCCTAGTAAGACTACCTGC-3'), [Vilanova,2006]

SFBc-R(5‘-ATTTCTTCACTGCCTGAATCG-3'), [Vilanova, 2006]

SFB-1R(5‘-TAAACCTCAACCGCCAAGAC-3'), [Romero 2004]

SFB-5F(5‘-TAGGACCCCTCCAATGAGC-3'), [Romero 2004]

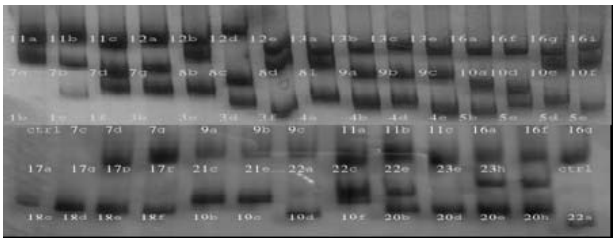
SFB-6F(5'-TGGGTTCTGCAAGAGAAACG-3'), [Romero 2004]

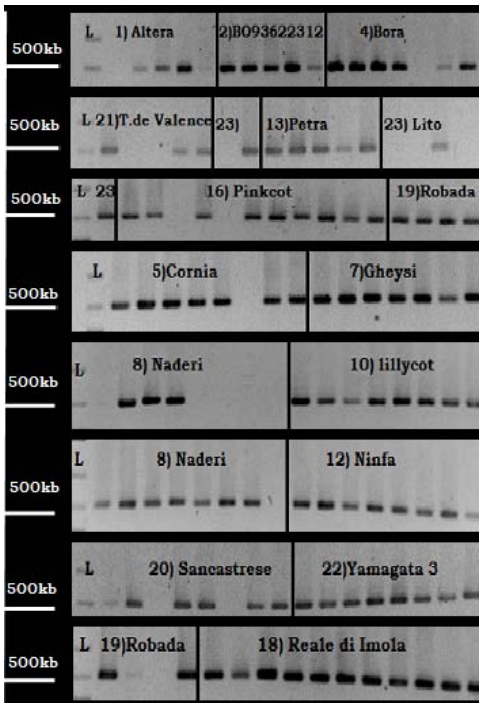
برنامه واکنش به صورت: ۲ دقیقه در دمای ٩٤ درجه سانتیگراد برای واسرشت سازی ابتدائی و به دنبال آن ۳۰ چرخه شامل: دمای ٩٤ درجه به مدت ۳۰ ثانیه، دمای ۵۵ درجه به مدت یک دقیقه ، دمای ۷۲ درجه به مدت ۹۰ ثانیه برای اتصال و در پایان برای ساخت نهائی زنجیره به مدت ۱۰ دقیقه دمای ۷۲ درجه سانتیگراد تنظیم گردید. ژل MDE معادل ژل ١٤٪ پلی اکریل آمید آماده گردید. ٤ میکرولیتر از محصولات پی. سی. آر. برای الکتروفورز داخل چاهک ها تزریق شد و با جریان ثابت ۲ وات به مدت ۱۵ ساعت الکتروفورز در دمای ثابت اطاق انجام شد. ژل با محلول نقره رنگ آمیزی شد و نوارها به وضوح قابل رویت شدند. به این ترتیب تعداد ٣٤ نوار قابل تفکیک جهت کلونینگ مورد انتخاب قرار گرفتند.محصولات انتخابی طی واکنش لیگاز درون ناقل pGEM-T(Promega)، منتقل شده و کلونی آنها تهیه گردید. آزمایش کلونی-پی.سی.آر جهت حصول اطمینان از موفقیت کلونینگ به عمل آمد. دی.ان.ا. پلاسمیدی استخراج گردید و نمونه ها پس از آماده سازی جهت توالی یابی به آزمایشگاه ارسال گردیدند. تجزیه و تحلیل توالی های به دست آمده به کمک نرم افزارهای برخط زیر انجام شد:

FASTA, Homology Analysis: http://www.ebi.ac.uk/Tools/fasta33/index.html,
CLUSTALW WWW System: http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-e.html,
Sequence Alignment: http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html,
Chromas LITE version 2.01: www.technelysium.com.au

نتایج و بحث:

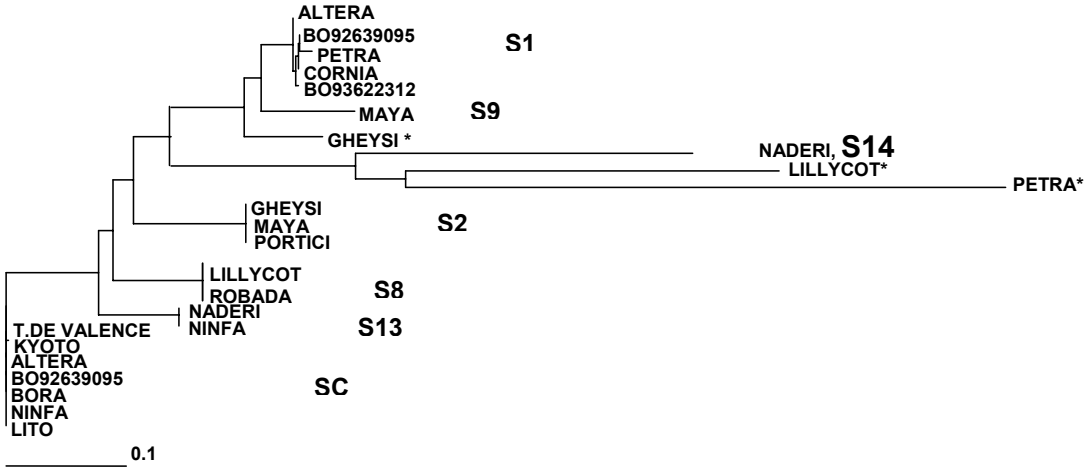
آزمایشی که بر روی ارقام زردآلوی مورد استفاده در این تحقیق به عمل آمد نشان داد که آغازگر رایج اشاره شده در منابع برای تکثیر قطعات مربوط به ژن *SFB* قادر به نشان دادن چندشکلی موجود بین آللهای این ژن نیست(شکل ۱). این محدودیت ناشی از اندازه مشابه قطعات تکثیری است و نشان داده شد که تکنیک SSCP قادر است تا این محدودیت را از میان بردارد(شکل۲). همانگونه که قبلا نیز اشاره شد مبنای این تفکیک تفاوت در توالی نوکلئوتیدهای قطعات تکثیری بود و نه در اندازه آنها که در شکل۱ یکسانی اندازه آنها دیده می شود. به این ترتیب به کمک این تکنیک می توان به رفع چنین محدودیت هائی امیدوار بود. البته در هر صورت نیاز به انجام آنالیزهای توالی اسیدنوکلئیکی وجود دارد. بر اساس میزان تشابه و یا عدم تشابه توالی های به دست آمده با آنچه قبلا در بانک داده های بین المللی نظیر EMBL منتشر شده است ، اقدام به تهیه ارقام مورد مطالعه در این تحقیقی گردید(شکل ۳).





شکل ۱(روبرو)- باندهای هم اندازه ظاهر شده بر روی ژل آگارنشاندهنده محدودیت در امکان تفکیک قطعات تکثیر شده با روشهای متداول.

شکل۲ (بالا)- چند شکلی ناشی از تفاوت در توالی بازهای قطعات تکثیر شده علیرغم اندازه یکسان قطعات.



شکل ۳- گروه بندی فیلوژنتیک آللهای *SFB* زردآلوکه با استفاده از روش neighbour-joining حاصل شده است.
نمونه هائی که با ستاره مشخص شده اند احتمال دارد آللهای جدید باشند که نیاز به بررسی بیشتر دارد.

منابع:

1. Gharesheikhbayat, R. (2010): Self-incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca*), new achievements and molecular aspects of s-locus allele segregation. PhD thesis, University of Bologna, Italy.
2. Hayashi, K. 1992. PCR-SSCP: A method for detection of mutations. Genet. Anal. Tech. Appl. 3:73–79.
3. Janick J. & James N. Moore. (1996): Fruit Breeding; volume 1., Trees and Tropical Fruits. John wiley & Sons, Inc. New York.
4. Orita, M., H. Iwahana, H. Kanazawa, K. Hayashi, and T. Sekiya. 1989a. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2766–2770.
5. Romero C, Vilanova S, Burgos L, Martınez-Calvo J, Vicente M, Llacer G, Badenes ML (2004): Analysis of the S-locus structure in *Prunus armeniaca* L. Identification of S-haplotype specific S-RNase and F-box genes. Plant Molecular Biology 56: 145–157.
6. Sekiya, T. 1993. Detection of mutant sequences by single-strand conformation polymorphism analysis. Mut. Res. 288:79–83.
7. Slabaugh, M.B., G.M. Huestis, J. Leonard, J.L. Holloway, C. Rosato, V. Hongtrakul, N. Martini, R. Toepfer, M. Voetz, J. Schell, and S.J. Knapp. 1997. Sequence-based genetic markers for genes and gene families: Single-strand conformational polymorphisms for the fatty acid synthesis genes of Cuphea. Theor. Appl. Genet. 94:400–408.
8. Vilanova, S., Marı´a Luisa Badenes, Lorenzo Burgos, Jose´ Martı´nez-Calvo, Gerardo Lla´cer, and Carlos Romero (2006): Self-Compatibility of Two Apricot Selections Is Associated with Two Pollen-Part Mutations of Different Naturer. Plant Physiol. Vol. 142.

Apricot (*Prunus armeniaca* L.) S-genotyping based on S-haplotype F-box proteins(*SFB*-typing).

Gharesheikhbayat, R.(1)*, Dondini, L.(2), and Sansavini, S.(2)

1 – Horticulture Research Department, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, Iran.
2 - Dipartimento Di Colture Arboree, Universita`di Bologna, Viale Fanin 46, 40127, Bologna, Italy.
*rahim2002bayat@yahoo.com

Abstract:
S-genotyping in self-incompatible fruit tree species is essential to plan crossing programs and design orchards. There are several approaches to determine the alleles contributed to control this trait. Molecular approaches are the best methods to determine the exact S-allele combination of varieties either by identifying *S-RNase* (the female determinant) or *SFB (*the male determinant*)*. In apricot, PCR amplification of *SFB* often produces DNA fragments similar in length therefore it is very difficult to identify polymorphisms on agar gels. To overcome this bottleneck the SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) technique was applied to discriminate the allelic variants of this gene and to select the different related fragments which led to clone and sequence them. Combining the use of PCR and single-strand conformation polymorphisms (SSCP), S-genotyping of 22 apricot cultivars were done and the efficiency of this technique was approved.