جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد
مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۸ شماره ۱ صفحه های ۱۷۳ تا ۱۸۱ (۱۳۸۶)

شناسایی آلل‌های خودناسازگاری در ارقام گیلاس ایرانی با استفاده از افزایش ویژه آلل‌ها به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[1]

IDENTIFICATION OF SELF-INCOMPATIBILITY ALLELES IN IRANIAN SWEET CHERRY CULTIVARS USING ALLELE-SPECIFIC AMPLIFICATION BY POLYMERASE CHAIN REACTION

اسفندیار حسنی مقدم، احمد ارشادی و منصور غلامی[2]

چکیده

خودناسازگاری و دگرناسازگاری بین ارقام گیلاس به یک مکان ژنی چند آللی نسبت داده می‌شود که به صورت گامتوفیتیک کنترل می‌شود. در این پژوهش نژادگان (ژنوتیپ) خودناسازگاری ۲۴ رقم گیلاس ایرانی و خارجی و یک رقم آلبالوگیلاس به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بررسی شد. بدین منظور از ۱۳ جفت آغازگر ویژه که سبب شناسایی آلل‌های خودناسازگاری $S_1, S_2, S_3, S_4, S_5, S_6, S_7, S_9, S_{10}, S_{12}, S_{13}, S_{14}$, S_{16} در گیلاس می‌شوند، استفاده شد. با استفاده از این جفت آغازگرها ۳۵ آلل از مجموع ۵۰ آلل خودناسازگاری موجود در ارقام مورد بررسی شناسایی شد. در ۱۳ رقم هر دو آلل ناسازگاری و در نه رقم فقط یک آلل شناسایی شد. همچنین در سه رقم هیچ آلل ناسازگاری مشخص نشد. از مجموع ۱۳ آلل مورد بررسی تنها سه آلل S_4 ، S_3 و S_{14} در ۲۰ رقم گیلاس ایرانی افزوده شد. فراوان ترین گروه دگرناسازگاری در ارقام گیلاس ایرانی گروهS_3S_4 بود. همچنین یک گروه دگرناسازگاری جدید با نژادگان S_4S_{14} در ارقام گیلاس صورتی همدان و سیاه قزوین شناسایی شد. اگرچه تمامی آلل‌های خودناسازگاری با استفاده از افزایش ویژه آلل‌ها به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مشخص نشدند ولی نتایج این بررسی نشان می‌دهد که این یک روش سریع و موثر برای تعیین نژادگان‌های خودناسازگاری در ارقام گیلاس می‌باشد.

واژه های کلیدی: خودناسازگاری، دگرناسازگاری، گیلاس، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز.

مقدمه

ناتوانی یک گیاه دوجنسی بارور در تولید تخم پس از خودگرده‌افشانی را خودناسازگاری گویند. در این حالت هر دو اندام جنسی نر و ماده کارآمد بوده ولی گیاه توانایی باروری و تشکیل بذر پس از خودگرده‌افشانی را ندارد (۷). گیلاس دارای خودناسازگاری گامتوفیتی[3] است که توسط یک مکان ژنی[4] با چندین شکل آللی کنترل می‌شود (۴، ۶، ۱۸). این ژن گلیکوپروتئین‌هایی را رمز می‌کند که دارای فعالیت

۱- تاریخ دریافت: ۸۵/۱۲/۱۳ تاریخ پذیرش: ۸۶/۸/۲

۲- دانشجوی پیشین کارشناسی ارشد (اکنون مربی جهاد دانشگاهی واحد لرستان)، استادیار و دانشیار گروه باغبانی دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان، همدان، جمهوری اسلامی ایران.

۳- Gametophytic self-incompatibility ۴- Locus

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

ریبونوکلئازی هستند. تصور بر این است که ریبونوکلئازهای ناسازگاری از مادگی به درون لوله گرده ناسازگار رفته و آر ان آ ریبوزومی لوله گرده را تخریب می کنند که به مرگ یاخته گرده می‌شود (۱۶).

برای اولین بار (ذکر شده در ۱۷) با استفاده از تلاقی‌های کنترل شده شش آلل خودناسازگاری S_1 تا S_6 را در ارقام گیلاس گزارش نمود. در روش تلاقی‌های کنترل شده برای شناسایی آلل‌های خودناسازگاری و تعیین گروه‌های دگرناسازگاری، درخت باید وارد مرحله گلدهی شود که روی نهال جوان قابل انجام نمی‌باشد. همچنین استفاده از این روش بسیار وقتگیر و هزینه بر است و با این روش جداسازی دقیق بین تلاقی‌های سازگار و نیمه‌سازگار به طور کامل مشخص نمی‌باشد (۱، ۲). بوسکویچ و همکاران[۱] (۵) با مطالعه و بررسی ریبونوکلئازهای خامه گل در ارقام گیلاس، ۱۰ آلل جدید خودناسازگاری S_7, S_8, S_{14}, S_9, S_{10}, S_{11}, S_{12}, S_{13}, S_{15}, و S_{16} را گزارش دادند. سونوولد و همکاران[۲] (۱۲، ۱۳) بیان کردند آلل‌های خودناسازگاری S_8, S_{11} و S_{15} که توسط آزمون ریبونوکلئازهای خامه گل شناسایی و معرفی شدند به ترتیب با آلل‌های خودناسازگاری S_3، S_7 و S_5 مشابه می‌باشند.

بررسی ریبونوکلئازهای خامه گل یک روش سودمند برای شناسایی آلل‌های جدید خودناسازگاری و همچنین تعیین نژادگان خودناسازگاری در ارقام گیلاس می‌باشد. برای انجام این آزمایش‌ها باید ارقام وارد مرحله گلدهی شوند و قابل انجام روی دان نهال‌های جوان نمی‌باشد که عیب آن محسوب می‌گردد (۱۲). سونوولد و همکاران (۱۲) c-DNA آلل‌های خودناسازگاری S_1 تا S_6 را جداسازی و توالی‌یابی کردند و بر اساس نواحی بسیار گوناگون توالی‌های این آلل‌ها شش جفت آغازگر طراحی نمودند که به طور ویژه سبب افزایش و شناسایی این آلل‌ها می‌شوند. همچنین سونوولد و همکاران (۱۳) برای آلل‌های خودناسازگاری S_7, S_9, S_{10} S_{12}, S_{13}, S_{14}, S_{16} هفت جفت آغازگر ویژه طراحی کردند.

جفت آغازگرهای ویژه برای شناسایی و جداسازی بین آلل‌هایی که دارای اندازه مشابه هستند و همچنین برای تأیید نژادگان‌های تعیین شده توسط جفت آغازگرهای عمومی مفید می‌باشند. جفت آغازگرهای ویژه قادر به تکثیر و شناسایی ۱۳ آلل خودناسازگاری که برای آن ها آغازگر طراحی شده، می‌باشند (۱۳). ارقامی که دارای نژادگان خودناسازگاری مشابه هستند، تشکیل یک گروه دگرناسازگاری می‌دهند وتوانایی گرده‌افشانی و باروری یکدیگر را ندارند در باغ های تجاری گیلاس برای اطمینان از تشکیل میوه کافی باید ارقامی که دارای نژادگان خودناسازگاری متفاوت و همپوشانی گلدهی کافی هستند، با هم کاشته شوند (۱۷). تا کنون با استفاده از بررسی های تلاقی‌های کنترل شده و بررسی ایزوآنزیم ریبونوکلئازهای خامه گل ۱۹ گروه دگرناسازگاری مختلف و یک گروه دهنده عمومی[۳] (شامل ارقامی است که می‌توانند همه ارقام گروهای دگرناسازگاری دیگر را به طور موفقیت‌آمیزی گرده‌افشانی و تلقیح کنند و همچنین توسط ارقام آن گروها گرده‌افشانی و تلقیح شوند) گزارش شده است (۱۵). همچنین سونوولد و همکاران (۱۲. ۱۳) با استفاده از افزایش ویژه آلل‌های خودناسازگاری به روش پی‌سی‌آر چهار گروه جدید دگرناسازگاری شماره ۲۱ تا ۲۴ را گزارش کردند. در این پژوهش نژادگان خودناسازگاری ۲۴ رقم گیلاس ایرانی و خارجی و یک رقم آلبالوگیلاس موجود در کلکسیون درختان میوه کمال‌آباد وابسته به موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج با استفاده از افزایش ویژه آلل‌ها به

۱- Boskovic *et al.* ۲- Sonneveld *et al.* ۳- Universal donor

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد بررسی قرار گرفت و بر اساس نژادگان‌های ناسازگاری تعیین شده گروه‌های دگرناسازگار ارقام گیلاس ایرانی تعیین شد.

مواد و روش‌ها

موادگیاهی

ارقام مورد آزمایش شامل ۲۰ رقم گیلاس ایرانی ('مجتهدی'، 'حاجیوسفی'، 'شعاع السلطنه'، 'قرمز رضائیه'، 'ابرده'، 'زرد دانشکده'، 'همدان'، 'صورتی همدان'، 'سفید رضائیه'، 'سیاه دانشگاه'، 'صورتی لواسان'، 'اراک'، 'سیاه زودرس'، 'سیاه مشهد'، 'شبستر'، 'قزوین'، 'سیاه قزوین'، 'روشن'، ' شاملو' و 'مشکین‌شهر')، چهار رقم خارجی ('بینگ'، 'لامبرت'، 'هدیلفینجن' و 'اس‌کا۱') و یک رقم آلبالوگیلاس ('آلبالوگیلاس دانشکده') موجود در کلکسیون درختان میوه کمال‌آباد وابسته به موسسه اصلاح و تهیه نهال بذر بود. در شهریور ماه سال ۱۳۸۴ تعداد ۵ عدد برگ از سرشاخه‌های جوان ارقام مختلف گیلاس جمع‌آوری شده و بی درنگ در نیتروژن مایع منجمد و تا زمان استخراج DNA در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

استخراج DNA

استخراج DNA با تغییرهایی نسبت به روش دویل و دویل (۸) انجام شد. بدین منظور از بافر استخراج حاوی ۲٪ هگزا دسیل تری متیل آمونیوم بروماید (CTAB) ۱/۴ مولار کلرید سدیم، ۲۰میلی‌مولار EDTA، ۱۰۰ میلی مولار تریس pH=۸، ۲٪ پلی وینیل پیرولیدون (PVP) و۱٪ ۲- مرکاپتواتانول استفاده گردید. کیفیت و کمیت DNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ساخت شرکت اپندورف آلمان در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

افزایش ویژه آلل‌های خودناسازگاری به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت اپندورف آلمان انجام گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد که حاوی یک برابر غلظت بافر پی‌سی‌آر، ۲/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs، ۰/۱ میکرومولار از جفت آغازگرهای ویژه تهیه شده از شرکت T.I.B. Mol. Biol. آلمان (جدول۱)، ۰/۶۲۵ واحد *Taq* پلیمراز و ۲۵ نانوگرم DNA الگو بود (آنزیم*Taq* پلیمراز، آمیخته dNTPs، $MgCl_2$ و بافر پی‌سی‌آر از شرکت سیناژن تهیه گردید.) پیش از انجام واکنش‌های پی‌سی‌آر، DNA ژنومی به مدت ۲ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد واسرشته شد و پس از تهیه مخلوط اصلی واکنش حدود۲۰ میکرولیتر روغن معدنی به نمونه‌ها افزوده شد. افزایش در ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای مناسب اتصال برای هر جفت آغازگر (جدول۱) به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش توسط *Taq* پلیمراز در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و گسترش پایانی در دمایی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. الکترفورز روی ژل آگارز ۱/۴٪ در بافر TAE به مدت ۲ تا ۴ ساعت در ولتاژ ۶۰ تا۷۰ ولت انجام شد. رنگ آمیزی ژل‌ها توسط محلول اتیدیوم بروماید به غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر و به مدت ۳۰ دقیقه انجام گردید. پس از رنگ آمیزی، نوارهای افزایش یافته زیر نور فرابنفش مشاهده و عکسبرداری از آن ها انجام شد.

کنترل داخلی پی سی آر برای آغازگرهای ویژه

برای شناسایی مشکل منفی‌های کاذب حالتی که آغازگرهای ویژه توانایی افزایش نوار مربوط به آلل ناسازگاری در ارقام حاوی آن آلل نمی‌باشند. از یک جفت آغازگر با توالی:

IC-F (5´-C AAA TTG AAG CTG CAG CAA TTA TGG A-3´)
IC-R (5´-GG TAA GAC CTG CAT TCC CTA ATC CTG TT-3´)

که براساس توالی یابی ژن هسته‌ای فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) در گیلاس طراحی شده است، به غلظت ۰/۱میکرومولار در واکنش‌های پی‌سی‌آر در کنار جفت آغازگرهای ویژه استفاده شد. وقتی که از پی سی آر با شرایط کنترل داخلی استفاده می‌شود، برای افزایش بهتر جفت آغازگرهای ویژه دمای اتصال حداقل توصیه می‌شود (جدول۱). تمامی مراحل این پژوهش در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه باغبانی دانشگاه بوعلی سینا انجام شد.

نتایج و بحث

افزایش ویژه آلل‌های خودناسازگاری به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

با استفاده از ۱۳ جفت آغازگر ویژه تنها سه آلل S_3 , S_4 و S_{14} در ارقام گیلاس ایرانی، افزوده شد و ۱۰ آلل دیگر در هیچ کدام از ارقام ایرانی دیده نشدند. آلل خودناسازگاری S_3 در۶۰٪ ارقام (‘بینگ’، ‘مجتهدی’، ‘حاج-یوسفی’، ‘شعاع السلطنه’، ‘قرمز رضائیه’، ‘ابرده’، ‘زرد دانشکده’، ‘همدان’، ‘سفید رضائیه’، ‘سیاه مشهد’، ‘شبستر’، ‘سیاه دانشگاه’، ‘شاملو’، ‘هدیلفینجن’ و ‘اس‌کا۱’)، آلل خودناسازگاری S_4 در٦٤٪ ارقام (‘بینگ’، ‘مجتهدی’، ‘حاج‌یوسفی’، ‘شعاع السلطنه’، ‘قرمزرضائیه’، ‘ابرده’، ‘زرددانشکده’، ‘همدان’، ‘سفید-رضائیه’.‘صورتی‌لواسان’، ‘اراک’، ‘سیاه‌زودرس’، ‘هدیلفینجن’، ‘لامبرت’، ‘صورتی همدان’ و ‘سیاه قزوین’) شناسایی شدند (شکل های۱ و۲). همچنین آلل خودناسازگاری S_{14} در ۱۶٪ ارقام (‘لامبرت’، ‘صورتی - همدان’،‘سیاه قزوین’ و ‘آلبالوگیلاس دانشکده’) تشخیص داده شد (شکل۲).

نژادگان خودناسازگاری ارقام گیلاس ایرانی، تعیین شده توسط افزایش ویژه آلل‌ها به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در جدول ۲ آورده شده است. با استفاده از جفت آغازگرهای ویژه در ۱۳ رقم هر دو آلل خودناسازگاری و در نه رقم تنها یک آلل خودناسازگاری شناسایی شد و در سه رقم هیچ آلل خودناسازگاری دیده نشد. براساس نژادگان خودناسازگاری تعیین شده با استفاده از جفت آغازگرهای ویژه دو گروه دگرناسازگاری S_3S_4 و S_4S_{14} تشخیص داده شد. گروه دگرناسازگاری S_3S_4 در۴۰٪ ارقام (۱۰ رقم) و گروه دگرناسازگاری S_4S_{14} در ۱۲٪ ارقام (۳ رقم) دیده شد. در ارقام ‘صورتی لواسان’، ‘اراک’ و ‘سیاه زودرس’ فقط آلل خودناسازگاری S_4 و در ارقام ‘سیاه مشهد’، ‘شبستر’، ‘شاملو’، ‘سیاه دانشگاه’ و ‘اس‌کا۱’ فقط آلل خودناسازگاری S_3 افزایش یافت. در ‘آلبالوگیلاس‌دانشکده’ تنها آلل خودناسازگاری S_{14} افزوده شد. در سه رقم ‘قزوین’، ‘رورشون’ و ‘مشکین‌شهر’ هیچ آلل خودناسازگاری افزوده نشد. در تمام ارقام مورد آزمایش به جز رقم ‘مشکین شهر’ نوار مربوط به جفت آغازگر فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) افزوده شد.

جدول۱- توالی نوکلئوتیدهای جفت آغازگرهای ویژه، دمای اتصال و اندازه نوار ایجاد شده.

Table 1. Nucleotide sequences of allele-specific primers, optimal annealing temperature for PCR and size of the PCR amplification product.

آغازگر Primer	توالی Sequence 5' → 3'	دمای اتصال Annealing temperature (ºC)	اندازه فرآورده پی‌سی‌آر (جفت باز) Estimated size of PCR product (bp)
S_1	F(GTA ATT GCA ACG GGT CAA AAT ATG AG) R(ACA ACT CAG TAT TAG TTG CTG GAT CA)	61-65	820
S_2	F(CC TGC TTA CTT TGT CAC GCA) R(AAG TGC AAT CGT TCA TTT G)	57-61	640
S_3	F(GGG TCG CGA TTT AAG AAA GAG C) R(AAC AAT CGT ACT TTG TGA TGA CTT CG)	63-67	960
S_4	F(CAC TGG GTC GCT GTT TAA CTT TAG G) R(TTG CAT TTG ATT AAG TGA GGC TTC A)	60-63	820
S_5	F(ACA TGG TAC ATG TTC CCA ACG GAT C) R(CTG CTG TTC GAT GAT TAC AGT CAA TAT GTA C)	50-53	300
S_6	F(ACT GGA CCG CAA TTT AAG CG) R(AGT TGC TGC TTT AAT GGG TGC A)	62-66	460
S_7	F(AGC TTC TTT AGC GAC GTT AGA TG) R(TGC ATT TGG TTT AGT TTC TCT ACA)	55-60	584
S_9	F(TT TGT TAC GTT ATG AGC AGC AG) R(ATG AAA CAA TAC ATA CCA CTT TGC TA)	58-66	495
S_{10}	F(GTT TGA CGA TGC TCA GTA TCA C) R(GT ACT TCC ATC TTT GTC TTG CAC)	58-66	505
S_{12}	F(ATT CTG ATG CTG GTC CTA TAG) R(AAC TCA GGC TTA TTAGGG TG)	59-63	562
S_{13}	F(CA ATG GGT CGC ATT TTG ACG A) R(GGA GGA GGT GGA TTC GAA CAC TTG)	62-66	306
S_{14}	F(G CAG AAT TTG GTA TGT GTT GGA) R(GG ATC GCT GGA AGT ATT GCA TTA T)	61-65	468
S_{16}	F(T CAT CAA TTG CGT GAT TAG CAG R(TGT ACC ATG TTT GTT CCA TTC CAT)	57-61	429

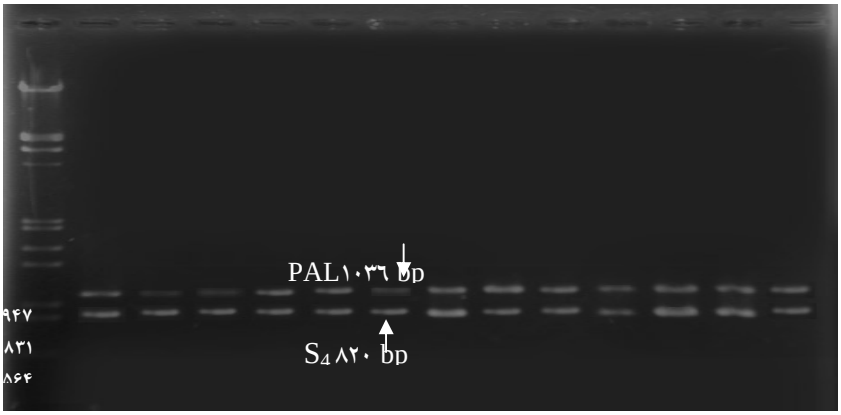

Fig. 1. PCR amplification of genomic DNA with specific primers of S_4 allele and Phenylalanine Ammonialyase (PLA). Samples from left to right: 1- DNA ladder 2-'Bing' 3-'Mojtahedi' 4-'HajYosefi' 5-'Shoa alsaltanah' 6-'Ghermez-e-Rezayieh' 7-'Abardeh' 8-'Zard-e-Daneshkadah' 9-'Hamadan ' 10-'Safid-e-rezayieh ' 11-'Sorati-e-Lavasan' 12-'Arak ' 13-'Siah-e-Zodres' and 14- 'Hedilfingen.

شکل ۱- افزایش ویژه آلل خودناسازگاری S_4 و ژن هسته‌ای فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL). نمونه‌ها از چپ به راست: ۱- نشانگر اندازه DNA ۲- 'بینگ' ۳- 'مجتهدی' ٤- 'حاج‌یوسفی' ٥- 'شعاع السلطنه' ٦- 'قرمز رضائیه' ۷- 'ابرده' ۸- 'زرد دانشکده' ۹- 'همدان' ۱۰-'سفید رضائیه' ۱۱-'صورتی لواسان' ۱۲-' اراک' ۱۳- 'سیاه زودرس' و ١٤- 'هدیلفینجن' می‌باشند.

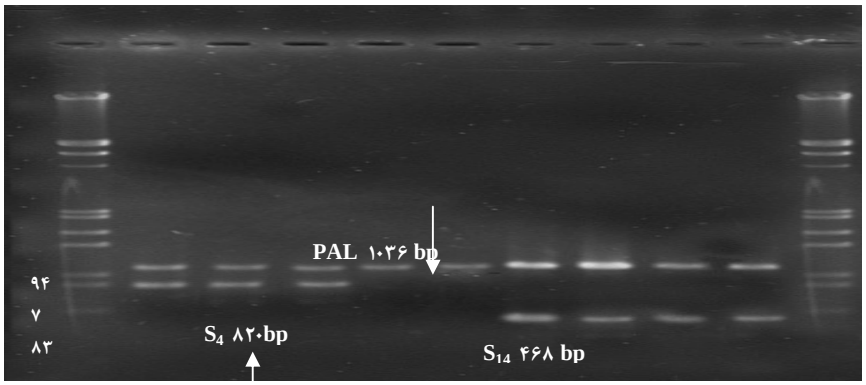

Fig. 2. PCR amplification of genomic DNA with specific primers of S_4, S_{14} alleles and Phenylalanine Ammonialyase (PLA) samples from left to right: 1- DNA ladder 2-'Lambert' 3-'Sorati-e-Hamadan' 4-'Siah-e-Qazvin' 5-'AlbalaoGilass-e-Daneshkadah' 6- 'Siah-e-Mashha'd 7- 'Lambert' 8- 'Sorati-e-Hamadan' 9- 'Siah-e-Qazvin' 10- 'Albalao GilasS-e-Daneshkadah' and 11- DNA ladder.

شکل۲- افزایش ویژه آلل‌های خودناسازگاری S_4 و S_{14} و ژن هسته‌ای فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL).
نمونه‌ها از چپ به راست: ۱- نشانگر اندازه DNA ۲- 'لامبرت' ۳- 'صورتی همدان' ٤- 'سیاه قزوین' ٥- 'آلبالوگیلاس دانشکده' ٦- 'سیاه مشهد' ۷- 'لامبرت' ۸- 'صورتی همدان' ۹- 'سیاه قزوین' ۱۰- ' آلبالوگیلاس دانشکده' ۱۱- نشانگر اندازه DNA.

جدول ۲- نژادگان خودناسازگاری ارقام گیلاس با استفاده از افزایش ویژه آلل‌ها به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز.

Table.2. Self-incompatibility genotypes of sweet cherry cultivars using allele-specific amplification by Polymerase Chain Reaction.

No شماره	Cultivars ارقام	Genotype نژادگان
1	’ Mojtahedi‘	S_3S_4
2	’ Haj Yosefi‘	S_3S_4
3	’ Shoa alsaltanah‘	S_3S_4
4	’ Abardeh Shoa alsaltanah‘	S_3S_4
5	’ Ghermez-e-Rezayieh‘	S_3S_4
6	’ Zard-e-Daneshkadeh‘	S_3S_4
7	’ Sefid-e-Rezayieh‘	S_3S_4
8	’ Hamadan‘	S_3S_4
9	’ Bing ‘	S_3S_4
10	’ Hedelfingen‘	S_3S_4
11	’ Soratie-e-Hamadan‘	S_4S_{14}
12	’ Lambert‘	S_4S_{14}
13	’Siah-e-Qazvin‘	S_4S_{14}
14	’ Soratie-e-Lavasan‘	S_4S-
15	’ Arak‘	S_4S-
16	’ Siah-e-Zodras‘	S_4S-
17	’ Siah-e-Mashhad‘	S_3S-
18	’ Shabestar‘	S_3S-
19	’ Shamlo‘	S_3S-
20	’ Siah-e-Daneshkadah‘	S_3S-
21	’ SK1‘	S_3S-
22	’ Albalo-Gilass-e- Daneshkadah‘	$S_{14}S$-
23	’ Qazvin‘	S-S-
24	’ Rorshon‘	S-S-
25	’ Meshkinshar‘	S-S-

در این پژوهش از ارقام ‘بینگ’، ‘لامبرت’ و ‘هدیلفینجن’ به عنوان شاهد مثبت حاوی آلل خودناسازگاری S_3 استفاده شد. آلل خودناسازگاری S_3 در ارقام ‘بینگ’ و ‘هدیلفینجن’ افزوده شد ولی در رقم ‘لامبرت’ افزوده نشد. به نظر می‌رسد افزایش نیافتن آلل خودناسازگاری S_3 در رقم ‘لامبرت’ به علت نشانه گذاری اشتباه رقم گیلاس دیگر با نام ‘لامبرت’ در کلکسیون درختان میوه کمال‌آباد باشد. سیفی و ارزانی (۳) سازگاری ارقام ‘بینگ’،

'لامبرت'، 'زرد دانشکده'، 'سفید ارومیه'، 'پروتیوا' را با رقم گیلاس 'سیاه مشهد' توسط گرده‌افشانی کنترل شده بررسی نمودند و بیان کردند که ارقام 'بینگ' و 'زرد دانشکده' به عنوان بهترین ارقام گرده‌زا برای رقم 'سیاه مشهد' می‌باشند ولی رقم 'لامبرت' با گیلاس 'سیاه مشهد' ناسازگار می‌باشد. با توجه به اینکه نژادگان ناسازگاری دو رقم 'بینگ' و 'لامبرت' یکسان و S_3S_4 می‌باشد بنابراین تفاوتی بین این دو رقم به عنوان گرده‌زا برای رقم سیاه مشهد نباید وجود داشته باشد. در این بررسی نژادگان خودناسازگاری درخت رقم 'لامبرت' موجود در کلکسیون درختان میوه S_4S_{14} تعیین گردید. با توجه به اینکه نژادگان ناسازگاری S_4S_{14} تا به حال در هیچ گونه رقم خارجی دیده و گزارش نشده است به نظر می‌رسد که رقم نگهداری شده با نام 'لامبرت'، یک رقم ایرانی باشد. از رقم 'هدیلفینجن' با نژادگان ناسازگاری S_3S_5 (۱۵) به عنوان شاهد مثبت حاوی آلل خودناسازگاری S_5 استفاده شد. آلل ناسازگاری S_5 افزایش نیافت و در مقابل آلل S_4 افزایش یافت. از آنجایی که نژادگان ناسازگاری این رقم S_3S_4 و متفاوت با نژادگان داده شده می‌باشد، به نظر می‌رسد که درخت نگهداری شده با نام 'هدیلفینجن' در کلکسیون یک رقم دیگر باشد. آلل خودناسازگاری S_{14} اولین بار در بررسی ایزوآنزیم ریبونوکلئازهای خامه گل گزارش گردید. این آلل کمترین فراوانی را در بین آلل‌های خودناسازگاری شناخته شده دارد و تا کنون تنها در رقم 'دیکلئون' با نژادگان ناسازگاری S_3S_{14} گزارش شده است (۱۵). آلل ناسازگاری S_{14} دارای فراوانی به نسبت بالایی (۱۶٪) در ارقام ایرانی در مقایسه با ارقام خارجی می باشد. افزایش نیافتن یک نوار در ارقام 'صورتی لواسان'، 'اراک'، 'سیاه زودرس'، 'سیاه مشهد'، 'شبستر'، 'شاملو'، 'سیاه دانشگاه'، 'اس‌کا۱' و 'آلبالوگیلاس' دانشکده و هیچ نواری در ارقام 'قزوین ' و 'رورشون' توسط جفت آغازگرهای ویژه به احتمال به علت وجود آلل‌های جدید خودناسازگاری و متفاوت از ۱۳ آلل بررسی شده می‌باشد. افزایش نیافتن نوار مربوط به آغازگر فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL) و جفت آغازگرهای ویژه در رقم گیلاس 'مشکین‌شهر' به احتمال به علت از دست رفتن DNA ژنومی مربوط به این رقم باشد.

نژادگان خودناسازگاری ارقام 'مجتهدی'، 'حاج‌یوسفی'، 'شعاع السلطنه'، 'ابرده'، 'قرمز رضائیه'، 'سفید رضائیه'، 'زرد دانشکده'، 'همدان'، 'بینگ' و 'هدیلفینجن' S_3S_4 تعیین شد. این ارقام دارای نژادگان خودناسازگاری مشابه هستند و تشکیل یک گروه دگرناسازگاری را می‌دهند. تمامی ارقام یک گروه دگرناسازگاری با هم دگرناسازگار می‌باشند و نمی‌توان از آن ها به عنوان گرده‌زای مناسب و سازگار برای یکدیگر استفاده کرد (۱۷). این نژادگان متعلق به گروه دگرناسازگاری شماره ۳ می‌باشد که با استفاده از تلاقی‌های کنترل شده گزارش و سپس توسط ایزوآنزیم ریبونوکلئازهای خامه گل و افزایش ویژه آلل‌های خودناسازگاری به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تائید گردید (۱۳، ۱۵). نژادگان خودناسازگاری ارقام 'صورتی‌همدان'، رقم 'لامبرت' و 'سیاه قزوین' S_4S_{14} تعیین شد. با توجه به اینکه نژادگان خودناسازگاری S_4S_{14} تا کنون در ارقام گیلاس گزارش نشده است به عنوان یک گروه دگرناسازگاری جدید با شماره ۲۵ معرفی می‌گردد. از سال ۲۰۰۱ تا کنون چهار گروه دگرناسازگاری جدید ضمن شناسایی آلل‌های ناسازگاری در ارقام گیلاس با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز گزارش شده است (۱۳،۱۲).

در صورت همزمان بودن تاریخ گلدهی می‌توان از ارقام 'صورتی لواسان'، 'اراک'، 'سیاه زودرس'، 'سیاه مشهد'، 'شبستر'، ' شاملو'، 'سیاه دانشگاه'، 'اس‌کا۱'، 'آلبالو گیلاس دانشکده'، 'قزوین' و 'رورشون' که دارای یک یا دو آلل ناسازگاری جدید و متفاوت از ۱۳ آلل مورد بررسی هستند به عنوان گرده‌زای سازگار برای سایر ارقام که هر دو آلل ناسازگاری آن ها مشخص شده استفاده کرد.

با استفاده از افزایش ویژه آلل‌ها به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۳۵ آلل از مجموع ۵۰ آلل موجود در ارقام یعنی ۷۰ ٪ آلل‌ها شناسایی شد. اگر چه این روش قادر به شناسایی تمامی آلل‌های ناسازگاری در ارقام مورد مطالعه نگردید ولی می‌تواند در نهال‌های جوان و حتی بذور درختان نیز مورد استفاده قرار گیرد، که این یک برتری نسبت به روش‌های تلاقی‌های کنترل شده وبررسی ایزوآنزیم ریبونوکلئازهای خامه گل محسوب می‌شود (۱، ۲). نتایج این بررسی نشان می‌دهد که افزایش ویژه آلل‌ها به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز یک روش سریع و موثر برای شناسایی آلل‌های خودناسازگاری و تعیین گروه‌های دگرناسازگاری در ارقام گیلاس نسبت به سایر روش‌های موجود می‌باشد.

REFERENCES منابع

۱- ارشادی، ا. ۱۳۸۲. بررسی گرده‌افشانی و تشکیل میوه و ارزیابی ارقام سیب ایرانی با استفاده از نشانگرهای مولکولی، پایان نامه دکتری دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

۲- ارشادی، ا.، ع. طلایی، و ع. وزوایی، ۱۳۸۱. بررسی آل های خودناسازگار در ۳۲ رقم سیب ایرانی (*Malu*× *domestica* B.) با استفاده از ایزوآنزیم‌های ریبونوکلئازهای خامه گل. مجله نهال و بذر ۴۷۲-۴۶۱ : ۱۷.

۳- سیفی، ا. و ک. ارزانی، ۱۳۷۷. مطالعه سازگاری و ناسازگاری برخی از ارقام گیلاس در تلقیح و تشکیل میوه گیلاس سیاه مشهد. مجله نهال و بذر ۳۸-۳۰:۱٤.

4. Boskovic, R. and K.R. Tobutt. 1996. Correlation of stylar ribounuclease zymogram with incompatibility alleles in sweet cherry. Euphytica 9:245-250.
5. Boskovic, R., K.R. Tobutt and F.J. Nicol. 1997. Inheritance of isoenzyme and their inkage relationships in two inter specific cherry progenies. Euphytica 99:129-143.
6. Boskovic, R. and K.R. Tobutt. 2001. Analyzing stylar ribonucleases to genotype of cherry cultivar assigned to incompatibility groups. Theor. Appl. Genet. 103:475-485.
7. de Nettancourt, D. 2001. Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plant. Springer-Verlang, Heidelderg, Germany.
8. Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. Rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phtichemecal Bull. 19:11-15.
9. Franklin-Tong, N.V.E. and F.C.H. Franklin. 2003. Gametophytic self-incompatibility inhibits pollen tube growth using different mechanisms. Plant Sci. 12:598-605.
10. Nasrallah, J.B. and M.E. Nasrallah. 1978. The molecular genetics of self-incompatibility in *Brassica*. Annu. Rev. Genet. 23:121-139.
11. Sassa, H., W. Mase, H. Hirano, and H. Ikehashi. 1994. Identification of self- compatibility related glycoprotein's in styles of apple (*Malus* × *domestica* B.). Theor. Appl. Genet. 89:201-205.
12. Sonneveld, T., T.P. Robbins, R. Boskovic and K.R. Tobbut. 2001. Cloning of six cherry self- incompatibility alleles and development of alleles specific PCR detection. Thoer. Appl. Genet.102:1046-1055.
13. Sonneveld, T., K.R. Tobbut and T.P. Robbins. 2003. Alleles-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (S) allele S_1-S_{16} using consensus and alleles-specific primers. Theor. Appl. Genet. 107:1059-1070.
14. Stone, S.L. and D.R. Goring. 2001. The molecular biology of self-incompatibility system in flowering plant. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 67:93-114.
15. Tobutt, K.R., R. Boskovic and T. Sonneveld. 2001. Cherry incompatibility genotypes harmonization for recent result from UK, Canada, Germany, Japan and USA. Eucarpia Fruit Breed. Sect. New sletter.

16. Thomas, R.D. and H.H. Kirch. 1992. The S-locus of flowering plant when self rejection is of self-interest. Trend. Genet. 8:381-387.
17. Verma, I.F. and, K.K. Jindal 1996- Fruit Crop Pollination. Kalyiani Publishers, New Delhi, India. 405 p.
18. Wunsch, A. and J. I. Hormaza. 2004. Cloning and characterization of genomic DNA sequences of four self-incompatibility alleles in sweet cherry (*Prunus avium* L.) Theor. Appl. Genet.108:299-305.