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 ۱۱۶ تا ۱۵۸ (۱۱/۸۶)

شناسایی آلل‌های خودناسازگاری در چند رقم بادام (*Prunus dulcis* M.) ایرانـــی و خارجی با استفـــاده از PCR [1]

IDENTIFICATION OF SELF-INCOMPATIBILITY ALLELES IN SOME IRANIAN AND FOREIGN ALMOND (*PRUNUS DULCIS* M.) CULTIVARS USING PCR

بابک ولیزاده کاجی، احمد ارشادی و منصور غلامی[2]

چکیده

خودناسازگاری گامتوفیتیک در بادام توسط یک مکان ژنی با چندین شکل آللی کنترل مـی‌شـود. در ایـن مطالعه، آلل‌های خودناسازگاری ۱۶ رقم بادام ایرانی و ۶ رقم بادام خارجی به وسـیله تکنیـک پـی‌سـی‌آر سـاده و مرکب و با استفاده از ترکیب آغازگرهـای الیگونوکلئوتیـدی متفـاوت مـورد ارزیـابی قـرار گرفـت. بـا اسـتفاده از آغازگرهای AS1II و AmyC5R در پی‌سی‌آر ساده ۹ آلل خودناسـازگاری شـناخته شـده S_1، S_2، S_3، $S_{5/10}$، S_7، S_9، S_{11}، S_{12}، S_{13} در رقم های مورد بررسی، شناسایی گردید. همچنین چهار باند بـا انـدازه متفـاوت از محصـول پی سی‌آر مربوط بـه آلـل‌هـای خودناسـازگاری شـناخته شـده در رقـم هـای ایرانـی 'مامـایی'، 'ربیـع'، 'سـهند'، 'شیربادام'، 'حاج میرزایی' و 'خورشیدی' تکثیر شد که ممکن است مربوط به آلـل‌هـای جدیـد ناسـازگاری باشـد. نتایج به دست آمده از کاربرد سه آغـازگر AS1II، AmyC5R و CEBASf در پـی‌سـی‌آر مرکـب مشـابه نتـایج پی‌سی‌آر ساده بود. به علاوه این روش قادر بودآلل Sf رقم های خودسازگار 'توئونو'، 'جنکو' و 'فالسا بارس' را شناسایی کند. از ۳۲ آلل خودناسازگاری موجود در رقم های بـادام ایرانـی ۲۸ آلـل بـا اسـتفاده از ایـن دو روش مشخص گردید. در ۱۲ رقم هر دو آلل خودناسازگاری و در ۴ رقم تنها یک آلل شناسایی گردید. در بین رقم هـای بادام ایرانی آلل‌های خودناسازگاری S_2، S_3، S_7، S_{10} و S_{13} فراوانی بیشتری را نشان دادند. این تکنیـک یـک روش مکمل برای شناسایی آلل‌های خودناسازگاری با استفاده از دی‌ان‌ای ژنومی رقم های بادام فراهم می‌کند.

واژه های کلیدی: آلل‌های خودناسازگاری، بادام، پی‌سی‌آر.

مقدمه

در باغداری نوین درصد تشکیل میوه کافی اهمیت زیادی دارد. تنها زمانی که شرایط برای انجام گرده‌افشـانی و تشکیل میوه در درخت بهینه باشد، می‌توان عملکرد زیادی انتظار داشـت. شناسـایی آلـل‌هـای خودناسـازگاری جهت انتخاب صحیح درختان گرده‌زا و افزایش عملکرد در بـاغ‌هـای تجـاری و همچنـین در کارهـای اصـلاحی بـه منظور اطمینان از موفقیت در تلاقی‌های کنترل شده حائز اهمیت می‌باشد (۱۶).

۱- تاریخ دریافت: ۸۶/۵/۲۷ تاریخ پذیرش: ۸۶/۱۱/۲۴

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد ،استادیار و دانشیار گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا همدان، همدان، جمهوری اسلامی ایران.

۳- Cross-incompatible ۴- Gametophytic

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

بیشتر رقم های تجاری بادام خودناسازگار می‌باشند و برخی نیز دگرناسازگار[۳] هستند (۱۹). سیستم خودناسازگاری در بادام از نوع گامتوفیتیک[۴] بوده و توسط یک مکان ژنی با چندین شکل آللی کنترل می‌شود (۳). محصول مکان ژنی ناسازگاری در خامه گلیکوپروتئین‌هایی با فعالیت ریبونوکلئازی (S-RNases) هستند (۲، ۳).

مطالعات اولیه تعیین آلل‌های خودناسازگاری در بادام با استفاده از تلاقی‌های کنترل شده صورت گرفته است. با استفاده از این روش شش آلل خودناسازگاری S_1، S_2، S_3، S_4، S_7، S_8 و آلل خودسازگاری S_f شناسایی گردیده است (۱۵). در این روش حجم زیادی دانه گرده روی کلاله ریخته می‌شود و بنابراین تمایز دقیق بین ترکیب به طور کامل سازگار و نیمه سازگار مشکل و گاهی خطابرانگیز است. افزون بر این، برای انجام آزمایش‌های تلاقی کنترل شده، لازم است گیاهان وارد مرحله گلدهی شده باشند و نیز نتایج به دست آمده به مقدار زیادی تحت تأثیر عوامل محیطی و فیزیولوژیکی درخت قرار می‌گیرند. در دهه اخیر، با بررسی ایزوآنزیم ریبونوکلئازهای خامه گل ۲۳ آلل خودناسازگاری در رقم های بادام شناسایی شده است (۳، ۴ ، ۶). آنالیز ریبونوکلئازهای خامه گل، یک روش موثر و سودمند برای شناسایی آلل‌های خودناسازگاری در بادام و سایر درختان میوه تیره وردسانان می‌باشد. البته در این روش گیاه باید قدرت گلدهی داشته باشد و بنابراین روی نهال‌های جوان قابل اجرا نمی‌باشد (۱).به تازگی استفاده از روش‌های جدید مبتنی بر پی‌سی‌آر، در بررسی خودناسازگاری درختان میوه از موفقیت زیادی برخوردار بوده است. از روش پی‌سی‌آر برای شناسایی آلل‌های خودناسازگاری در سیب (۱، ۵ ، ۱۲)، گلابی (۱۱)، گیلاس (۲۱، ۲۲)، زردآلو (۱۳، ۱۴)، آلو (۲۵) و بادام (۹، ۱۸، ۱۹، ۲۰) استفاده شده است.

آغازگرهای اختصاصی و عمومی مختلف بر اساس توالی مکان ژنی ناسازگاری در بادام و دیگر گونه‌های جنس *Prunus* طراحی شده است (۷، ۸، ۱۷، ۲۳، ۲۴) که به طور موفقیت‌آمیزی باعث تکثیر آلل‌های خودناسازگاری در رقم های بادام می‌شوند. سانچز پرز و همکاران (۲۰) با استفاده از روش پی‌سی‌آر ساده و مرکب توانستند ۱۰ آلل خودناسازگاری (S_1، S_2، S_3، S_5، S_7، S_9، S_{10}، S_{11}، S_{12}، S_{13}) و آلل خودسازگاری S_f را در رقم های بادام مورد مطالعه و شناسایی قرار دهند. این روش قابل اجرا روی نهال‌های جوان بوده و یک شیوه سریع، ارزان و قابل اجرا جهت شناسایی نژادگان ناسازگاری درختان میوه مانند بادام است.

از آنجا که تا به حال کار پژوهشی در زمینه وضعیت ناسازگاری رقم های بادام ایرانی انجام نشده، این پژوهش با هدف تعیین نژادگان ناسازگاری رقم های بادام ایرانی با استفاده از تکثیر عمومی آلل‌ها به روش پی‌سی‌آر ساده و مرکب انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

رقم‌های مورد بررسی شامل ۱۶ رقم بادام ایرانی ('مامایی'، 'سفید'، 'ربیع'، 'آذر'، 'سهند'، 'شکوفه'، 'تاجری'، 'شیربادام'، 'حاج‌میرزایی'، 'پوست نازک نائین'، 'یلدا'، 'خورشیدی'، 'منقا'، 'A۵ شهرکرد'، 'ریزسنگی' و 'بادام هلویی') و ٦ رقم بادام خارجی ('توئونو'، 'جنکو'، 'فالسابارس'، 'فرانیس'، 'نانپاریل' و 'مارکونا') بودند که نمونه‌های برگ آن‌ها از مجموعه درختان میوه کمال آباد کرج وابسته به موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر و نیز باغ امامیه سامان وابسته به مرکز پژوهش‌های کشاورزی و منابع طبیعی چهار محال و بختیاری تهیه شد. در مرداد و شهریور ماه ۱۳۸۵ تعداد ۷-۵

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

عدد برگ از سرشاخه‌های جوان رقم های مختلف بادام جمع‌آوری و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد گردید. نمونه‌های برگی تا زمان استخراج دی‌ان‌ا در نیتروژن مایع نگهداری شدند.

استخراج دی‌ان‌ا

استخراج دی‌ان‌ا به روش دویل و دویل (۱۰) با کمی تغییرات انجام گرفت. بدین منظور از بافر استخراج شامل ۱۰۰ میلی‌مولار تریس pH:۸ ، ۲۰ میلی‌مولار EDTA، ۱/۴ مولار کلرید سدیم، ۲٪ هگزا دستیل تری متیل آمونیوم بروماید (CTAB)، ۲٪ پلی وینیل پیرولیدون (PVP) و ۱٪ ۲- بتامرکاپتواتانول استفاده شد. به منظور تعیین کمیت و کیفیت دی‌ان‌ا از روش اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز روی ژل آگارز استفاده گردید.

شرایط پی‌سی‌آر

واکنش پی‌سی‌آر در حجم ۲۵ میکرولیتر و به روش سانچز پرز و همکاران (۲۰) انجام شد که شامل ۹۰ نانوگرم دی‌ان‌ا ژنومی، ۱ برابر غلظت بافر پی‌سی‌آر، ۲ میلی‌مولار کلرید منیزیوم، ۰/۱ میلی‌مولار مخلوط نوکلئوتیدها، ۰/۲ میکرومولار از هر آغازگر و ۱ واحد آنزیم تک دی‌ان‌ا پلیمراز انجام گردید. برای تکثیر عمومی آلل‌ها به روش پی‌سی‌آر ساده از آغازگرهای رو به جلو AS1II و برگشت AmyC5R طراحی شده توسط تامورا و همکاران (۲۴) و برای تکثیر عمومی آلل‌ها به روش پی‌سی‌آر مرکب از آغازگرهای رو به جلو AS1II، برگشت AmyC5R طراحی شده توسط تامورا و همکاران (۲۴) و رو به جلو CEBASf طراحی شده توسط پرز و همکاران (۲۰) استفاده شد. توالی آغازگرهای عمومی مورد استفاده در پی‌سی‌آر ساده و مرکب به صورت زیر می‌باشد:

AS1II:5´- TAT TTT CAA TTT GTG CAA CAA TGG-3´
AmyC5R:5´-CAA AAT ACC ACT TCA TTG TAA CAA C-3´
CEBASf: 5´-AGA TCT ATC ATT ATC TTA AGT CTG-3´

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به روش سانچز پرز و همکاران (۲۰) و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر اپندورف ساخت آلمان انجام گرفت. تکثیر برای هر دو روش پی‌سی‌آر ساده و مرکب تحت شرایط واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه و ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی[۱] در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، اتصال آغازگر در دمای ۵۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، توسعه آغازگر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و به دنبال آن توسعه نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید (۲۰).

الکتروفورز محصول پی‌سی‌آر روی ژل آگارز ۱/۵٪ در تی‌ای‌ئی یک برابر غلظت به مدت ۵ ساعت در ۷۵ ولت انجام شد. رنگ‌آمیزی ژل در محلول اتیدیوم بروماید به غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر و به مدت ۳۰ دقیقه انجام شده و پس از آن باندها زیر نور ماوراء بنفش نمایان و عکس‌برداری از آن ها انجام گردید (۲۰). با استفاده از نشانگر اندازه یک کیلو جفت بازی و اندازه باندهای مرتبط با آلل‌های شناخته شده در رقم های خارجی، اندازه باندهای تکثیر شده توسط آغازگرهای عمومی در رقم های بادام ایرانی محاسبه شد.

۱- Denaturation

نتایج و بحث

شکل ۱ تکثیر عمومی آلل‌های خودناسازگاری را در رقم های مختلف بادام مورد مطالعه به روش پی‌سی‌آر ساده نشان می‌دهد. با استفاده از آغازگرهای AS1II و AmyC5R در ۱۲ رقم بادام ایرانی هر دو آلل خودناسازگاری و در ۴ رقم فقط یک آلل تکثیر گردید. از ۶ رقم بادام خارجی مورد بررسی نیز در رقم‌های 'فرانیس' و' مارکونا' هر دو آلل و در ۴ رقم 'نانپاریل'، 'توئونو'، 'جنکو' و 'فالسابارس' تنها یک آلل تکثیر و شناسایی شد. در جدول یک اندازه محصول پی‌سی‌آر تکثیر شده به روش پی‌سی‌آر ساده و مرکب آمده است. تنوع زیاد در اندازه باندهای تکثیر شده (از ۰/۶ تا ۲ کیلو جفت باز) شناسایی آلل‌های مختلف را امکان پذیر می‌سازد. اندازه باندهای تکثیر شده به روش پی‌سی‌آر ساده با استفاده از آغازگرهای AS1II و AmyC5R مشابه با اندازه باندهای تکثیر شده با استفاده از آغازگرهای عمومی AS1II ، AmyC5R و CEBASf در روش پی‌سی‌آر مرکب است با این تفاوت که در واکنش پی‌سی‌آر ساده و مرکب اندازه باند تکثیر شده برای آلل Sf به ترتیب ۱۲۰۰ و ۴۵۰ جفت باز می‌باشد (جدول ۱). با محاسبه اندازه باندهای تکثیر شده در رقم های بادام مورد بررسی و مقایسه آن ها با اندازه باندهای مرتبط با آلل‌های ناسازگاری از قبل شناسایی شده (۱۶) نژادگان خودناسازگاری رقم‌های تعیین شد (جدول ۲).

جدول۱- اندازه محصول های تکثیر شده با استفاده از پی‌سی‌آر ساده (AS1II and AmyC5R) و مرکب (AS1II, AmyC5R and CEBASf)[†].

Table 1. Size of PCR products identified using single (AS1II and AmyC5R) and multiplex (AS1II, AmyC5R and CEBASf) PCR.

آلل‌های خودناسازگاری S-alleles	اندازه قطعات تکثیر شده (جفت باز) با استفاده از آغازگرهای AS1II و AMYC5R Fragments size amplified (bp) using primers AS1II and AmyC5R	اندازه قطعه تکثیر شده (جفت باز) با استفاده از آغازگرهای AS1II و AMYC5R و CEBASf Fragments size amplified (bp) using primers AS1II, AmyC5R and CEBASf
S_1	1100	1100
S_2	800	800
S_3	1200	1200
S_5	600	600
S_7	2000	2000
S_9	1800	1800
S_{10}	600	600
S_{11}	700	700
S_{12}	1600	1600
S_{13}	1400	1400
S_f	1200	450

† منبع: سانچزپرز و همکاران (۲۰)

با استفاده از تکثیر عمومی آلل‌ها به روش پی‌سی‌آر ساده در رقم 'مامایی' یک باند با اندازه ۱۲۰۰ جفت باز مربوط به آلل S_3 و باندی به اندازه تقریبی ۱۷۸۰ جفت باز که تا به حال گزارش نشده است، مشاهده شد. در رقم 'ربیع' یک باند با اندازه ۲۰۰۰ جفت باز مربوط به آلل خودناسازگاری S_7 و یک باند جدید با اندازه حدود ۱۷۲۰

جفت باز تکثیر شد که تا به حال گزارش نشده است. در رقم های ‘سفید’ و ‘منقای نجف‌آباد’ دو باند با اندازه‌های ۲۰۰۰ و ۱۴۰۰ جفت باز تکثیر گردید که به ترتیب مربوط به آلل‌های خودناسازگاری S_7 و S_{13} می‌باشند. در رقم ‘سهند’ یک باند با اندازه ۸۰۰ جفت باز مربوط به آلل S_2 و یک باند جدید با اندازه حدود ۱۷۲۰ جفت باز تکثیر شد که تا به حال گزارش نشده است. در رقم ‘آذر’ دو باند با اندازه‌های ۱۱۰۰ و ۱۲۰۰ جفت باز تکثیر شد، که به ترتیب مربوط به آلل‌های خودناسازگاری S_1 و S_3 می‌باشند. در رقم ‘شکوفه’ فقط یک باند با اندازه ۱۲۰۰ جفت باز مربوط به آلل خودناسازگاری S_3 تکثیر شد. در رقم های ‘تاجری’ و ‘بادام هلویی’ فقط یک باند با اندازه ۶۰۰ جفت باز تکثیر شد که مربوط به یکی از آلل‌های خودناسازگاری S_5 یا S_{10} می‌باشد. در رقم ‘شیربادام’ یک باند با اندازه ۱۴۰۰ جفت باز مربوط به آلل خودناسازگاری S_{13} و یک باند جدید با اندازه حدود ۸۲۰ جفت باز تکثیر شد که تا به حال گزارش نشده است. در رقم ‘حاج‌میرزایی’ یک باند با اندازه ۱۸۰۰ جفت باز مربوط به آلل خودناسازگاری S_9 و یک باند جدید با اندازه حدود ۱۰۰۰ جفت باز که تا به حال گزارش نشده است، مشاهده شد. در رقم ‘پوست نازک نائین’ دو باند با اندازه‌های ۸۰۰ و ۶۰۰ جفت باز تکثیر گردید که به ترتیب مربوط به آلل‌های S_2 و S_{10} می باشند. دو باند با اندازه‌های ۱۱۰۰ و ۲۰۰۰ جفت باز در رقم ‘یلدا’ تکثیر شد که به ترتیب مربوط به آلل‌های S_1 و S_7 می‌باشند. در رقم ‘خورشیدی’ فقط یک باند تکثیر شد که اندازه آن حدود ۱۰۰۰ جفت باز بوده و تا به حال نیز گزارش نشده است. در رقم ‘A5 شهرکرد’ دو باند با اندازه‌های ۸۰۰ و ۱۶۰۰ جفت باز که به ترتیب مربوط به آلل های S_2 و S_{12} می‌باشند، تکثیر شد. در رقم ‘ریز سنگی’ دو باند با اندازه‌های ۸۰۰ و ۱۴۰۰ جفت باز که به ترتیب مربوط به آلل‌های S_2 و S_{13} می‌باشند، تکثیر و شناسایی گردید (جدول ۲).

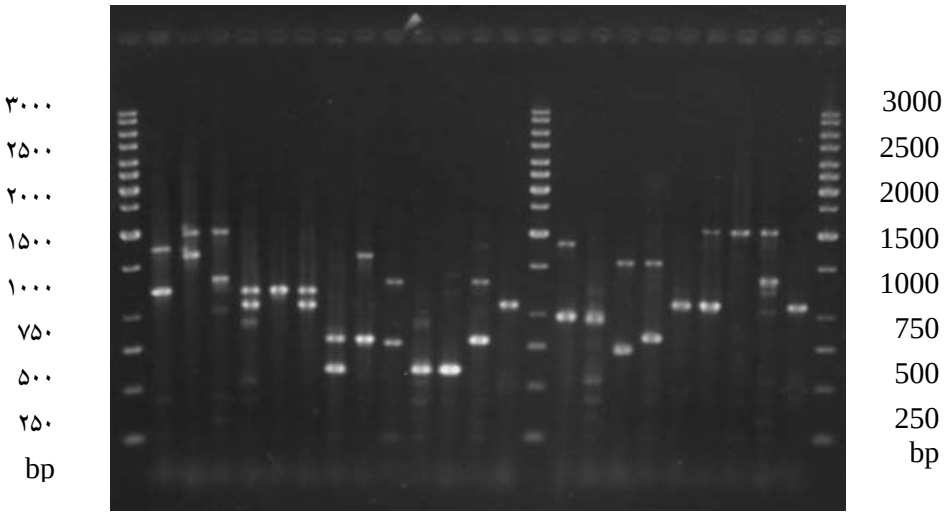

Fig. 1. Single PCR amplification of S-alleles in almond cultivars using primers AS1II and AmyC5R. Samples from left to right: DNA ladder, cultivars: ‘Mamaei’, ‘Raby’, ‘Sefid’, ‘Azar’, ‘Shokoufeh’, ‘Ferragnes’, ‘Poost Nazok Naeen’, ‘Sahand’, ‘Rizesangi’, ‘Tajeri’, ‘Badam Holoei’, ‘Shirbadam’, ‘Tuono’, ‘DNA ladder’, ‘Hajmirzaei’, ‘Khorshidi’, ‘Marcona’, ‘A5 Shahrekord’, ‘Falsa Barese’, ‘Yalda’, ‘Nonpareil’, ‘Monaghay-e-Najafabad’, ‘Genco’, ‘DNA ladder’.

شکل ۱- تکثیر آلل‌های خودناسازگاری رقم های مختلف بادام با استفاده از آغازگرهای AS1II و AMYC5R و به روش پی‌سی‌آر ساده. نمونه‌ها از چپ به راست شامل: نشانگر DNA، رقم‌های: ‘مامایی’، ‘ربیع’، ‘سفید’، ‘آذر’، ‘شکوفه’، ‘فرانیس’، ‘پوست نازک نائین’، ‘سهند’، ‘ریزسنگی’، ‘تاجری’، ‘بادام هلویی’، ‘شیربادام’، ‘توئونو’، ‘نشانگر DNA’، ‘حاج

میرزایی’، ‘خورشیدی’، ‘مارکونا’، ‘A۵ شهرکرد’، ‘فالسابارس’، ‘یلدا، نانپاریل’، ‘منقای نجف‌آباد’، ‘جنکو’، ‘نشانگر DNA’.

جدول ۲- آلل‌های خودناسازگاری شناسایی شده در رقم های بادام با استفاده از پی‌سی‌آر ساده (AS1II and AmyC5R) و از پی‌سی‌آر مرکب (AS1II, AmyC5R and CEBASf).

Table 2. S-alleles identified in almond cultivars using single (AS1II and AmyC5R) and multiplex (AS1II, AmyC5R and CEBASf) PCR.

رقم ها Cultivars	آلل‌های خودناسازگاری S-alleles
‘Mamaei’ ‘مامایی’	S_3 و یک باند جدید با اندازه تقریبی ۱۷۸۰ جفت باز S3 and one new band with size around 1780 bp
‘Raby’ ‘ربیع’	S_7 و یک باندجدید با اندازه تقریبی ۱۷۲۰جفت باز S7 and one new band with size around 1720 bp
‘Sefid’ ‘سفید’	S7S13
‘Monaghay-e-Najafababd’ ‘منقای نجف‌آباد’	S7S13
‘Sahand’ ‘سهند’	S_2 و یک باند جدید با اندازه تقریبی ۱۷۲۰ جفت باز S2 and one new band with size around 1720 bp
‘Azar’ ‘آذر’	S1S3
‘Shokoufeh’ ‘شکوفه’	S3
‘Tajeri’ ‘تاجری’	S5/10
‘Badam holoei’ ‘بادام هلویی’	S5/10
‘Shirbadam’ ‘شیربادام’	S_{13} و یک باند جدید با اندازه تقریبی ۸۲۰ جفت باز S13 and one new band with size around 820 bp
‘Hajmirzaei’ ‘حاج‌میرزایی’	S_9 و یک باند جدید با اندازه تقریبی ۱۰۰۰ جفت باز S9 and one new band with size around 1000 bp
‘پوست نازک نائین’ ‘Poost nazok Naeen’	S2S5/10
‘Yaldal’ ‘یلد ’	S1S7
‘Khorshidi’ ‘خورشیدی’	یک باند جدید با اندازه تقریبی ۱۰۰۰ جفت باز one new band with size around 1000 bp
‘A5 Shahrekord’ ‘شهرکرد A۵’	S2S12
‘Rizsangi’ ‘ریزسنگی’	S2S13
‘Marcona’ ‘مارکونا’	S11S12
‘Ferragnes’ ‘فرانیس’	S1S3
‘Falsa Barese’[1] ‘فالسابارس’†	S1Sf
‘Genco’ ‘جنکو’	S1Sf
‘Tuono’ ‘توئونو’	S1Sf
‘Nonpareil’ ‘نانپاریل’	S7

† S_f allele in ‘Falsa Barese’, ‘Genco’ and ‘Tuono’ was only identified by multiplex PCR and did not amplified using single PCR.

† آلل S_f در رقم های 'فالسابارس'، 'جنکو' و 'توئونو' فقط به روش پی‌سی‌آر مرکب شناسایی شد و به روش پی سی‌آر ساده این آلل تکثیر نگردید.

با مقایسه اندازه باندهای تکثیر شده در رقم های خارجی 'فرانیس' و 'مارکونا' نژادگان ناسازگاری این رقم‌های به ترتیب S_1S_3 و $S_{11}S_{12}$ تعیین شد که منطبق با گزارش‌های قبلی می‌باشد (۱۶). در رقم‌های 'توئونو'، 'فالسابارس' و 'جنکو' فقط یک باند مربوط به آلل S_1 تکثیر شد و باند مربوط به آلل Sf در این رقم‌ها تکثیر نشد. همچنین در رقم 'نانپاریل' با نژادگان S_7S_8 (۱۶) یک باند با اندازه ۲۰۰۰ جفت باز مربوط به آلل S_7 تکثیر شد و هیچ باندی برای آلل S_8 مشاهده نشد. در رقم های ایرانی 'شکوفه'، 'تاجری'، 'بادام هلویی' و 'خورشیدی' نیز فقط یک باند تکثیر و شناسایی گردید.

شکل ۲ تکثیر عمومی آلل‌های خودناسازگاری و آلل خودسازگاری S_f را با استفاده از آغازگرهای AS1II ، AMYC5R و CEBASf و به روش پی‌سی‌آر مرکب نشان می‌دهد. با توجه به تشابه اندازه محصول پی‌سی‌آر تکثیر شده با استفاده از روش پی‌سی‌آر ساده و مرکب (جدول ۱) نتایج به دست آمده به روش پی‌سی‌آر مرکب در رقم های ایرانی به طور کامل منطبق با نتایج به دست آمده از پی‌سی‌آر ساده بود. اندازه باندهای جدید مشاهده شده با روش پی سی‌آر مرکب در رقم های 'مامایی'، 'ربیع'، 'سهند'، 'شیربادام'، 'حاج میرزایی' و 'خورشیدی' مشابه با نتایج پی‌سی‌آر ساده بود.

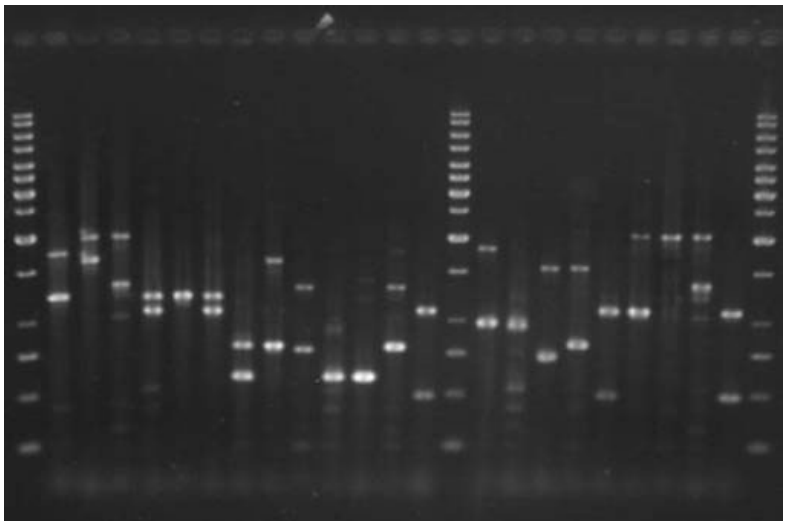

Fig. 2. Multiplex PCR amplification of S-alleles in almond cultivars using primers AS1II, AmyC5R and CEBASf. Samples from left to right: 'DNA ladder', 'Mamaei', 'Raby', 'Sefid', 'Azar', 'Shokoufeh', 'Ferragnes', 'Poost Nazok Naeen', 'Sahand', 'Rizesangi', 'Tajeri', 'Badam Holoei', 'Shirbadam', 'Tuono', 'DNA ladder', 'Hajmirzaei', 'Khorshidi', 'Marcona', 'A5 Shahrekord', 'Falsa Barese', 'Yalda', 'Nonpareil', 'Monaghay-e-Najafabad', 'Genco', 'DNA ladder'.

شکل۲- تکثیر آلل‌های خودناسازگاری در رقم های بادام با استفاده از آغازگرهای AS1II ، AmyC5R و CEBASf و به روش پی‌سی‌آر مرکب. نمونه‌ها از چپ به راست شامل: 'نشانگر DNA'، 'مامایی'، 'ربیع'، 'سفید'، 'آذر'، 'شکوفه'، 'فرانیس'، 'پوست نازک نائین'، 'سهند'، 'ریزسنگی'، 'تاجری'، 'بادام هلویی'، 'شیربادام'، 'توئونو'، 'نشانگر DNA'، 'حاج‌میرزایی'، 'خورشیدی'، 'مارکونا'، 'A۵ شهرکرد'، 'فالسابارس'، 'یلدا'، 'نانپاریل'، 'منقای نجف‌آباد'، 'جنکو'، 'نشانگر DNA'.

تفاوت اصلی پی‌سی‌آر ساده و مرکب در اندازه باند تکثیر برای آلل خودباروری S_f می‌باشد. در پی‌سی‌آر ساده اندازه باند تکثیر شده برای آلل خودباروری S_f ۱۲۰۰ جفت باز می‌باشد که مشابه با اندازه باند تکثیر شده

برای آلل خودناسازگاری S_3 است. بنابراین آلل‌های S_3 و S_f به این طریق از هم قابل تفکیک نمی‌باشند. در حالی که واکنش پی‌سی‌آر مرکب باعث تکثیر آلل خودباروری S_f با اندازه ۴۵۳ جفت باز می‌شود.

با استفاده از تکثیر عمومی آلل‌ها به روش پی‌سی‌آر مرکب آلل خودباروری S_f در رقم‌های 'توئونو'، 'جنکو' و 'فالسابارس' تکثیر شد ولی همانند پی‌سی‌آر ساده آلل S_8 در رقم 'نانپاریل' تکثیر نگردید (جدول ۲).

با استفاده از تکثیر عمومی آلل‌ها به روش پی‌سی‌آر ساده و مرکب ۸۷٪ از آلل‌های خودناسازگاری موجود در رقم های ایرانی مورد بررسی مشخص شد. عدم امکان شناسایی تمام آلل‌های خودناسازگاری گزارش شده با استفاده از آغازگرهای عمومی و به روش پی‌سی‌آر ساده و مرکب توسط سانچزپرز و همکاران (۲۰) اعلام شده است. این پژوهشگران با استفاده از آغازگرهای ذکر شده توانستند ۱۰ آلل خودناسازگاری (S_{13}، S_{12}، S_{11}، S_{10}، S_9، S_7، S_5، S_3، S_2، S_1) و آلل خودسازگاری S_f را در رقم های بادام مورد مطالعه شناسایی کنند. همچنین این پژوهشگران اعلام کردند که جفت آغازگرهای AS1II و AmyC5R توانایی تکثیر آلل‌های خودناسازگاری جدیدی را دارند که تا به حال شناسایی و گزارش نشده‌اند (۲۰). در این مطالعه چهار باند با اندازه متفاوت با اندازه محصول پی‌سی‌آر آلل‌های خودناسازگاری شناخته شده در رقم های 'مامایی'، 'حاج‌میرزایی'، 'خورشیدی'، 'ربیع'، 'سهند' و 'شیربادام' تکثیر شد که تا به حال گزارش نشده‌اند و به احتمال مربوط به چهار آلل جدید باشند.

با مجموع روش‌های تلاقی دستی، ایزوآنزیم و نشانگرهای دی‌ان‌ای تا به حال ۲۹ آلل خودناسازگاری در رقم‌های بادام گزارش شده است (۱۶، ۱۹). در رقم های 'بادام ایرانی شکوفه'، 'بادام هلویی'، 'تاجری' و 'خورشیدی' فقط یک آلل تکثیر شد. آلل دوم در این رقم های ممکن است قابل شناسایی با استفاده از این دو روش نبوده و یا آلل‌های خودناسازگاری جدیدی باشد. در این پژوهش آلل خودباروری S_f در رقم های بادام ایرانی مشاهده نشد. منشاء این آلل گونه وحشی *P. webbii* در جنوب ایتالیا می‌باشد که طی تلاقی‌های طبیعی و کنترل شده به برخی رقم های بادام تجاری مانند 'توئونو' منتقل شده است (۴، ۱۶).

بر اساس نتایج به دست آمده با استفاده از روش پی‌سی‌آر ساده و مرکب آلل‌های S_2، S_7 ، S_{13}، S_3، S_{10}، به ترتیب با ۲۵، ۲۵، ۲۵، ۱۸/۶ و ۱۸/۶٪ دارای بیشترین فراوانی در بین رقم های بادام ایرانی می‌باشند. لوپز و همکاران (۱٦) با بررسی ۱۱۵ رقمی که نژادگان آن ها به‌طور کامل شناسایی شده بود، نشان دادند که آلل‌های خودناسازگاری S_1، S_8، S_7، S_5 و S_3 به ترتیب با ، ۲۳/۳، ۱۲/۳، ۱۱/۲ ۷/۸ و ۷/۸٪ دارای بیشترین فراوانی در بین آلل‌های خودناسازگاری شناخته شده بادام هستند.

سه آلل S_2، S_7 و S_{13} که دارای فراوانی بالایی در رقم های بادام ایرانی هستند، در رقم های بادام اروپایی و آمریکایی فراوانی کم تا متوسطی دارند. بررسی آلل‌های ناسازگاری می‌تواند به عنوان یک نشانگر خوب بیان کننده تفاوت‌های ژنتیکی بین بادام‌های محلی ایرانی و رقم های خارجی باشد.

لوپز و همکاران (۱۶) با بررسی نژادگان‌های خودناسازگاری ۱۱۵ رقم تجارتی بادام، ۱۹ گروه دگرناسازگاری (۱۹-۱) و گروه دهنده عمومی (گروه O)[1] را تعیین کردند. رقم های یک گروه دگرناسازگاری نژادگان ناسازگاری مشابه داشته و نمی‌توانند همدیگر را تلقیح و بارور نمایند. بر اساس نتایج به دست آمده با استفاده از روش پی سی‌آر ساده و مرکب رقم آذر با نژادگان خودناسازگاری S_1S_3 در گروه دگرناسازگاری شماره ۸ و در کنار

۱- Universal donner ۲- 'Ferragnes' ۳- 'Ferralise' ٤- 'Merced' ٥- 'Ne Plus Ultra' ٦- 'Price'

رقم هایی مانند ‘فرانیس’[۲] و ‘فرالیس’[۳] و رقم ‘یلدا’ با نژادگان خودناسازگاری S_1S_7 همراه با رقم هایی مانند ‘مرسد’[۴]، ‘نیپلاس‌الترا’[۵]، ‘پرایس’[۶] در گروه دگرناسازگاری شماره ۴ قرار می‌گیرد (۱۶). نژادگان خودناسازگاری رقم های ‘سفید’ و ‘منقای نجف آباد’ S_7S_{13} تعیین شد. این رقم های دارای نژادگان ناسازگاری مشابه هستند و در گروه دگرناسازگاری شماره ۱۹ قرار می‌گیرند (۱۶). رقم های ‘مامایی’، ‘ربیع’، ‘سهند’، ‘حاج‌میرزایی’، ‘A۵ شهرکرد’، ‘شیربادام’ و ‘ریزسنگی’ همگی در گروه دهنده عمومی قرار می‌گیرند. این رقم های دارای نژادگان‌هایی هستند که تا به حال گزارش نشده است. گروه دهنده عمومی شامل رقم هایی است که می‌توانند رقم های موجود در سایر گروه‌های دگرناسازگاری را به طور موفقیت‌آمیزی گرده‌افشانی و تلقیح نمایند و به صورت متقابل توسط رقم های آن گروه‌ها گرده‌افشانی و تلقیح شوند.

استفاده از روش پی‌سی‌آر ساده و مرکب برای شناسایی آلل‌های خودناسازگاری علاوه بر کاهش تعداد دفعات پی‌سی‌آر امکان شناسایی آلل‌های خودناسازگاری جدید را نیز فراهم می‌کند. با استفاده از این دو روش ۲۸ آلل از مجموع ۳۲ آلل خودناسازگاری موجود در رقم های بادام ایرانی (یعنی ۸۷٪ از کل آلل‌ها) تکثیر و شناسایی گردید. اگرچه با استفاده از این روش کلیه آلل‌های خودناسازگاری موجود در رقم های مورد بررسی شناسایی نشد ولی می‌تواند روش سریع و موثر در شناسایی آلل‌های خودناسازگاری رقم های بادام به شمار آید.

اگرچه آنالیز ریبونوکلئازهای خامه گل قادر به شناسایی کلیه آلل‌های ناسازگاری در بادام نیست (۱۶) ولی می‌تواند برای تأیید اکثر آلل‌های شناسایی شده، استفاده گردد. همچنین می‌توان از تلاقی‌های کنترل شده به منظور تأیید نهایی نژادگان‌های ناسازگاری تعیین شده استفاده نمود.

منابع
REFERENCES

۱. ارشادی، الف. ۱۳۸۱. بررسی گرده افشانی و تشکیل میوه و ارزیابی رقم های سیب ایرانی با استفاده از نشانگرهای مولکولی، پایان‌نامه دکتری دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.

۲. ارشادی، الف. ع. طلایی و ع. وزوایی، ۱۳۸۰. بررسی آلل‌های خودناسازگار در ۳۲ رقم سیب ایرانی (*Malus* × *domestica* B.) با استفاده از ایزوآنزیم‌های ریبونوکلئازهای خامه گل. مجله نهال و بذر ۱۷: ۴۷۲-۴۶۱.

3. Boskovic, R., K.R. Tobutt, I. Battle and H. Duval. 1997. Correlation of ribonuclease zymograms and genotypes in almond. Euphytica 97:167-176.
4. Boskovic, R., K.R. Tobutt, I. Batlle, H. Duval, P. Mart´ınez-G´omez and T.M. Gradziel. 2003. Stylar ribonucleases in almond: correlation with and prediction of incompatibility genotypes. Plant Breed. 122:70–76.
5. Broothaerts W., G.A. Janssens, P. Proost and F. Broekaert. 1995. cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. Plant Mol. Biol. 27:499–511.
6. Certal, A.C., R.B. Almeida, R. Boskovic, M.M. Oliveira and J.A. Feijo. 2002. Structural and molecular analysis of self-incompatibility in almond (*Prunus dulcis*). Sex Plant Reprod. 15:13–20.
7. Channuntapipat, C., M. Sedgley and G. Collins. 2001. Sequences of cDNAs and genomic DNAs encoding the *S1*, *S7*, *S8* and *Sf* alleles from almond, *Prunus dulcis*. Theor. Appl. Genet. 103:1115–1122.

8. Channuntapipat, C., M. Sedgley, I. Batlle, P. Arus and G. Collins. 2002. Sequences of the genomic DNAs encoding the *S2*, *S9*, *S10* and *S23* alleles from almond, *Prunus dulcis*. J. Hort. Sci. Biotechnol. 77:387–392.
9. Channuntapipat, C., M. Wirthensohn, S.A. Ramesh, I. Batlle, P. Arus, M. Sedgley and G. Collinus. 2003. Identification of incompatibility genotypes in almond (*Prunus dulcis* Mill) using specific primer based on the intron the S-alleles. Plant Breed. 122:164-168.
10. Doyle, J.J. and J.L. Doyle 1987. Rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 19:11-15.
11. Ishimizu, T., K. Inoue, M. Shimonaka, T. Satio, A. Terai and S. Noriok. 1999. PCR-based method for identifying the S-genotypes of Japanese pear cultivars. Theor. Appl. Genet. 98:961-967.
12. Jansens, G.A., I.J. Godris and W.F. Broekaert. 1995. A molecular method for S-allele identification in apple based on allele specific PCR. Theor. Appl. Genet. 91:691-698.
13. Jie, Q., G. Shupeng, Z. Jixiang, C. Manru and S. Huairui. 2005. Identification of self-incompatibility genotypes of apricot (*Prunus armeniaca* L.) by S-alleles-specific PCR analysis. Biotechnol. Lett. 27:1205-1209.
14. Julia, H., H. Attila, H. Rita, S.B. Eva and P. Andezej. 2005. New self-incompatibility alleles in apricot (*Prunus armeniaca* L.) reveald by styler ribounuclease assay and S-PCR analysis. Euphytica 145:57-66.
15. Kester, D.E., T.M. Gradziel and W.C. Micke. 1994. Identifying pollen incompatibility groups in California almond cultivars. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 119:106–109.
16. Lopez, M., F.J. Vargas and I. Batlle. 2006. Self-incompatibility almond genotypes: A review. Euphytica 150:1-16.
17. Ma, R.C. and M.M. Olivier. 2001. Molecular cloning of the self-incompatibility genes S_1 and S_3 from almond (*Prunus dulcis* cv. Ferragnes). Sex Plant Reprod. 14:163-167.
18. Martınez-Gomez, P., M. Lopez, J.M. Alonso, E. Ortega, I. Batlle, R. Socıas i Company, F. Dicenta, A.M. Dandekar and T.M. Gradziel. 2003. Identification of self-incompatibility alleles in almond and related *Prunus* species using PCR. Acta Hort. 622:397–401.
19. 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.
20. Sanchez-Perez, R., F. Dicenta and P. Martinez Gomez. 2003. Identification of S-alleles in almond using multiplex PCR. Euphytica 138:263–269.
21. Sonneveld, T., T.P. Robbins, R. Boskovic and K. Toboutt. 2001. Cloning of six cherry self-incompatibility allele and development of allel specific PCR detection. Thoer. Appl. Genet. 102:1046-1055.
22. Sonneveld, T., K.R. Tobuut and T.P. Robbins. 2003. Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (S) allele S1-S16 using consensus and allele- specific primers. Theor. Appl. Genet. 107:1059-1070.
23. Sutherland, B.G. T.P. Robbins, and K.R. Tobutt. 2004. Primers amplifying a range of *Prunus S*-alleles. Plant Breed. 123:582–584.
24. Tamura, M., M.K. Ushijima, H. Sassa, H. Hirano, R. Tao, T.M. Gradziel and A.M. Dandeka. 2000. Identification of self-incompatibility genotype of almond by allele-specific PCR analysis. Theor. Appl. Genet. 101:344-349.
25. Yaman, H., R. Tao and A. Sugiura. 1998. PCR cloning of cDNA encoding S-RNases in two species of *Prunus*, *Prunus mume* and *Prunus salicina*. Breed Sci. 48:216.