مجله به‌نژادی نهال و بذر
جلد ۱-۲۷، شماره ۱، سال ۱۳۹۰

تعیین ژنوتیپ‌های خودسازگار بادام حاصل از یک برنامه اصلاحی و تشخیص آلل‌های S در برخی ارقام و ژنوتیپ‌های خارجی بادام با استفاده از روش PCR

Determination of Self-Compatible Almond Genotypes Obtained from Controlled Crosses and Identification of S-Alleles in some Foreign Cultivars and Genotypes by PCR

علی عبادی[۱]، کاظم کمالی[۲]، محمدرضا فتاحی‌مقدم[۳]، محمدرضا نقوی[۳]، علی ایمانی[۴] و حمیده افقی[۵]

۱، ۲ و ۳ - به ترتیب استاد، دانشجوی سابق دکتری باغبانی و دانشیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۴- استادیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج
۵- استادیار، پژوهشکده کشاورزی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی، تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۳/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۹/۱۸

چکیده

عبادی، ع.، کمالی، ک.، فتاحی‌مقدم، م. ر.، نقوی، م. ر.، ایمانی، ع.، و افقی، ح. ۱۳۹۰. تعیین ژنوتیپ‌های خودسازگار بادام حاصل از یک برنامه اصلاحی و تشخیص آلل‌های S در برخی ارقام و ژنوتیپ‌های خارجی بادام با استفاده از روش PCR. **مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۲۷:** ۶۷ - ۵۷.

یکی از مشکلات تولید بادام مساله خودناسازگاری ارقام بادام است. در این تحقیق ابتدا تعدادی از ژنوتیپ‌های برتر ایرانی و خارجی از نظر وضعیت خودسازگاری مورد بررسی قرار گرفتند و در ادامه دورگ‌گیری بین ارقام خودسازگار تونو و سوپر نوا با ده ژنوتیپ مرغوب خودناسازگار انجام شد. وضعیت آلل‌های نتاج با استفاده از روش‌های کلاسیک (پوشاندن با کیسه) و مولکولی (PCR) مورد بررسی قرار گرفتند. در روش PCR ساده از جفت آغازگر SfF-SfR استفاده شد که ژنوتیپ‌های خودسازگار نواری با طول ۴۵۰ جفت باز تولید کردند و در ژنوتیپ‌های خودناسازگار هیچگونه نواری مشاهده نشد. بر اساس نتایج به دست آمده از تعداد کل ۱۹۵ دانهال دورگ تولید شده، ۱۱۰ دانهال خودسازگار و ۸۵ دانهال خودناسازگار تشخیص داده شدند که نسبت‌های به دست آمده برای آلل‌های S در جمعیت‌های حاصله با نسبت‌های مورد انتظار (مندلی) مطابقت داشت و اختلاف معنی‌داری بین دو گروه مشاهده نشد. در تحقیق دیگر آلل‌های S هر کدام از ارقام و ژنوتیپ‌های خارجی مشکوک با استفاده از روش PCR ساده و مرکب بررسی شد. در این تحقیق آلل‌های S هر کدام ازارقام و ژنوتیپ‌های مورد بررسی مشخص و وضعیت آن‌ها از نظر خود سازگاری و یا خودناسازگاری تعیین شد.

واژه‌های کلیدی: بادام ، تونو، سوپرنوا، خود سازگاری ، خودناسازگاری ، PCR ساده و PCR مرکب.

نویسنده مسئول: aebadi@ut.ac.ir تلفن: ۰۹۱۲۵۶۷۷۵۲۱

مقدمه

بادام یکی از درختان مهم مناطق معتدله است که با توجه به ارزش غذایی آن در کشورهای مختلف به عنوان یک محصول مهم و اقتصادی کشت و کار می‌شود. افزایش کمی و کیفی محصول بادام از اهداف برنامه‌های تحقیقاتی بسیاری از کشورهای تولیدکننده آن است. یکی از مشکلات تولید بادام مسئله تضمین گرده‌افشانی مناسب به علت خودناسازگاری است که موجب کاهش شدید تشکیل میوه و نهایتاً ایجاد مشکل در مدیریت باغ‌های بادام می‌شود. در راستای رفع این مشکل تلاش‌های زیادی انجام شده است که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به ایجاد ارقام خودسازگار اشاره کرد. اولین گزارش مربوط به خودسازگاری توسط آلمدیا (Almedia, 1945) ارائه شد. با شناسایی رقم خودسازگار تونودر منطقه پوگلیا در ایتالیا توسط هریرو و فیلیپه (Herrero and Felipe, 1975) وگراسلی و اولیویر (Grasselly and Olivier, 1976). اصلاح بادام به منظور به دست آوردن ارقام خودسازگار آغاز شد. لازم به ذکر است طی سال‌های ۱۹۷۵ تا ۱۹۷۷ ارقام خودسازگار دیگری مانند Genco، Filipo Ceo و Supernova نیز شناخته شدند.

در سال‌های بعد در برنامه‌های اصلاحی متعدد در کشور های مختلف ارقام مطلوب و تجاری بادام که خودناسازگار بودند، با ارقام خودسازگار تلاقی داده شده و از این طریق ژنوتیب‌ها و متعاقباً ارقام خودسازگار و تجاری جدید به دست آمد (Chaichi and Dezhampour, 1999).

روش مبتنی بر تکنیک PCR به عنوان یکی از روش‌های تشخیص خودسازگاری در بادام است که با توجه به دقت بالا و سهولت کاربرد، نسبت به روش آنالیز ریبونوکلئازهای خامه بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد (Alonso and Socias i Company, 2005a; Lopez *et al* ., 2005).

چانون تاپی تات و همکاران (Chanuntapitate *et al* ., 2003) از انواع آغازگرهای اختصاصی برای تعیین آلل‌های S_{23}, S_2, S_5, S_7, S_8, S_9, S_{10}، S_1 و S_f در بادام استفاده کردند. آن ها موفق به تأیید برخی از آلل‌ها و شناسایی آلل‌های جدید شدند. امروزه آغازگرهای زیادی برای تشخیص آلل‌های بادام شناخته شده است که شامل حدود ۱۶ جفت آغازگر و یک تک آغازگر معکوس یعنی ۳۳ عدد آغازگر هستند (Alonso and Socias i Company, 2005b). از این دسته آغازگرها، آغازگر SfF-SfR به عنوان آغازگر اختصاصی برای تشخیص آلل S_f برای اولین بار توسط چانون تاپی تات و همکاران (۲۰۰۳) استفاده شد. همین‌طور جفت آغازگر S3F-S3R به عنوان یک جفت آغازگر اختصاصی برای تشخیص آلل ناسازگاری S_3 توسط آلونسو و سوسیاس آی کمپانی

(Alonso and Socias i Company, 2005a) با موفقیت مورد استفاده قرار گرفت. محققین دیگری هم از روش PCR برای تشخیص خودسازگاری و یا خودناسازگاری در بادام در زمان نونهالی استفاده کردند و این مسأله در برنامه‌های اصلاحی بسیار حایز اهمیت است (Martinez-Gomez *et al.*, 2003a؛ Ortega and Dicenta, 2008).

هدف از این تحقیق بررسی کارآیی روش PCR (ساده و مرکب) در تشخیص آلل‌های نتاج حاصل از دورگ‌گیری ارقام خودسازگار و خودناسازگار بادام بوده است.

مواد و روش‌ها

تعداد ده ژنوتیپ از بادام‌های مرغوب که دارای خصوصیاتی چون مغز تک قلو، اندازه بزرگ میوه، طعم مرغوب و دیرگلی بودند، انتخاب شدند. از ده ژنوتیپ که به عنوان والدین اصلی مادری بودند، سه ژنوتیپ از ایستگاه تحقیقاتی گروه باغبانی دانشکده کشاورزی ژنوتیپ ژنوتیپ از کلکسیون ایستگاه تحقیقات کمال‌آباد کرج وابسته به بخش تحقیقات باغبانی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر انتخاب شدند. از ده والد اصلی هفت ژنوتیپ باگرده رقم خود سازگار تونو و سه ژنوتیپ با گرده رقم خودسازگار سوپرنوآ به صورت دستی در سال ۱۳۸۵ گرده‌افشانی شدند. لازم به ذکر است روی سه ژنوتیپ موجود در ایستگاه گروه باغبانی نصف تعداد شاخه ها با گرده رقم تونو و تعدادی دیگر با گرده رقم سوپر نووا گرده‌افشانی شدند، بنابراین در پایان سیزده جمعیت دورگ از تلاقی‌های فوق در سال ۱۳۸۷ مورد مطالعه قرار گرفت.

برای گرده‌افشانی درابتدا گل‌های های دو رقم خودسازگار تونو و سوپرنوآ از درختان مادری در باغ کمال‌آباد جمع‌آوری و سپس بساک آن‌ها از گل جدا شد. بساک‌ها در درجه حرارت حدود ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲ ساعت خشک و در شیشه‌های کوچک ریخته شده و در یخچال نگهداری شدند. در روی درختان انتخابی که قرار بود گرده‌افشانی دستی روی آن‌ها انجام شود، بسته به اندازه درخت حدود ۴ تا ۶ شاخه انتخاب شد. گرده‌های جمع‌آوری شده در مرحله‌ای که گل‌ها به صورت بالن بودند، با استفاده از قلم مو به روی کلاله گل‌های اخته شده منتقل شدند. زمان گرده‌افشانی حدود ۲ تا ۳ ساعت پس ازاخته کردن گل‌ها بود. برای بررسی خودناسازگاری یا خودسازگاری در والدین چهار شاخه از هر درخت قبل از باز شدن گل‌ها به وسیله کیسه‌هایی از جنس ململ بزرگ به رنگ سفید پوشانده شدند و پس از پایان گلدهی در منطقه چنانچه میوه‌هایی تشکیل شده بودند، شمارش شدند.

پس از گرده‌افشانی درختان با ارقام خود سازگار تونو و سوپرنوآ، شاخه‌های حاوی گل‌های گرده‌افشانی شده با کیسه‌های ململ پوشانده شدند. برای کنترل بعدی شاخه‌های

گرده افشانی شده با نوارهای مختلف رنگی مشخص وخصوصیات مورد نظر در آن‌ها یادداشت‌برداری شدند. پس از حدود ۴۵ روز و همچنین در زمان رسیدن میوه، تعداد میوه‌های تشکیل شده حاصل ازگرده‌افشانی دستی شمارش شدند.

برای انجام بررسی‌های مولکولی، استخراج DNA در این ژنو تیپ‌ها به دو صورت ۱- روش گپت و کلگ (Gept and Celeg, 1989) و ۲- بر اساس دستورالعمل جدا سازیDNA مطابق روش دلاپورتا و همکاران (Delaporta *et al*., 1983) انجام شد که به لحاظ برتری روش اول در ادامه تحقیق از این روش استفاده شد.

برای انجام PCR از جفت آغازگر SfF-SfR استفاده شد. برای تکثیر DNA ژنومی، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۲۵ میکرو لیتر شامل ۱۰ میلی مولار Tris-HCl(pH 8.2)، ۵۰ میلی مولار$MgCl_2$ ، ۱/۵میلی مولارKCl، ۱۰۰ میکرو مولار از هر یک از نوکلئوتیدها (dNTPs)، یک واحد از آنزیم *Taq* DNA polymerase ، ۰/۲۵ میکرومولار از هر آغازگر به همراه ۵۰ نانوگرم از DNA تهیه شد. حجم نهایی مخلوط در هر اپندورف به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد (Chanuntapitate *et al* ., 2002, 2003).

شرایط PCR شامل ۵ دقیقه در۹۴ درجه سانتی‌گراد جهت واسرشت‌سازی اولیه و سپس ۳۵ چرخه شامل ۷۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد ، ۵۰ ثانیه در ۵۴ درجه سانتی‌گراد برای اتصال و سپس ۹۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در پایان ساخت نهایی زنجیره به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود (Alonso and Socias i Company, 2005a).

محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید تفکیک شدند.

بررسی وضعیت آلل‌های S دربرخی ارقام با ژنوتیپ S نامشخص یا مشکوک در موسسه CITA در شهر زاراگوزا کشور اسپانیا انجام شد. به این منظور برخی از ارقام خودسازگار، نظیر تونو، سوپر نوآ و فیلیپوچه او به عنوان شاهد در این آزمایش‌ها استفاده شدند (Socias i Company, 1990). ارقام مورد بررسی شامل گمبرا، استایلت، مارتا (آلمودنا)، آیلس، گوراویتی، ماریتا، بلانکرنا، فلیسیا، فرانکولی، مونکایو، آلمندرا، آاس‌وان، لگران، آیی، پیرلس، ترادی نان پاریل، تامپسون، گلوریتا، پدری، ماسبوورنا، مارکونا، تگزاس، پریمورسکای، توکیو، آوان و چهار رقم خودسازگار تونو، سوپر نوا، فلیپوچه او و توروئیتو (شاهد) بودند.

آغازگرهای مورد استفاده شامل SfF-SfR, AS1II-AmyC5 و ConF-ConR در واکنش PCR ساده و ترکیب چند آغازگر (AS1II-SfF-AmyC5R) و (ConF-SfF-ConR) در PCR مرکب بودند. توالی هریک از آغازگرها در جدول ۱ مشخص شده است.

جدول۱- آغازگرهای استفاده شده و آلل‌های تشخیص داده شده در روش PCR ساده
Table 1. Primers used and identified alleles by PCR

نام آغازگر Primer	توالی آغازگر Sequence	آلل‌های قابل تشخیص Identified alleles
AS1II AmyC5R	TATTTTCAATTTGTGCAACAATGG CAAAATACCACTTCATGTAACAAC	S_1, S_f, S_3, S_{12}, S_{11}
ConF ConR	GTGCAACAATGGCCACCGAC TACCACTTCATGTAACAACTGAG	S_1, S_f, S_3, S_{11}
SfF SfR	GTGCCCTATCTAATTTGTTGAC GACATTTTTTTAGAAAGAGTG	S_f
S3F S3R1	*CTTCTGCGCTTACGAGAGGTT* AAAACGTAAGGGATAGTTTCT	S_3
S3F S3R2	*CTTCTGCGCTTACGAGAGGTT* TGTGATTTCCACATGTCT	S_3

شرایط PCR شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه جهت واسرشت‌سازی ،سپس ۳۴ چرخه شامل یک دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، یک دقیقه در ۵۷ درجه و دو دقیقه در ۷۲ درجه و بعد از این چرخه دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ادامه ساخت زنجیره بود (Alonso and Socias i Company, 2005a).

نتایج و بحث

برای تعیین ژنوتیپ های خودسازگار و خودناسازگار، ۱۹۵ دانهال دورگ مورد مطالعه قرار گرفتند. بر اساس نتایج به دست آمده (جدول ۲)، در دو گروه اول کل نتاج دارای آلل S_f (عامل خودسازگاری) بودند و تعداد ژنوتیپ خودسازگار با علم به نامعلوم بودن آلل S ژنوتیپ مادری بیش از حد انتظار بود. بر اساس اصول مندلی انتظار می‌رفت که نیمی از نتاج خودسازگار و نیمی دیگر نتاج خودناسازگار باشند، در حالی‌که در نتایج مشخص شد که کل نتاج خودسازگار هستند. اولین نتیجه‌ای که از این تلاقی می‌توان گرفت این است که چون والد پدری دارای ژنوتیپ S_1S_f بوده، به طور یقین لااقل یکی از آلل‌های والد مادری با والد پدری مشابه و این آلل غیراز آلل S_f بوده است. در مورد گروه‌های یازده‌گانه بعدی پس از انجام آزمون کای اسکور($\chi 2$) مشخص شد نتایج به دست آمده مطابق انتظار بوده و در هر یک از گروه‌های مورد آزمایش بر اساس نتایج آماری نیمی از نتاج خودسازگار هستند. این نتایج با نسبت های مندلی مطابقت داشت، بنابر این می‌توان نتیجه

جدول۲- بررسی نسبت دانهال‌های خودسازگار به خودناسازگار در دو جمعیت حاصل ازتلاقی کنترل شده والدهای پدری تونو و سوپرنوآ هردو (S_1S_f) با والدهای مادری خودناسازگار بادام

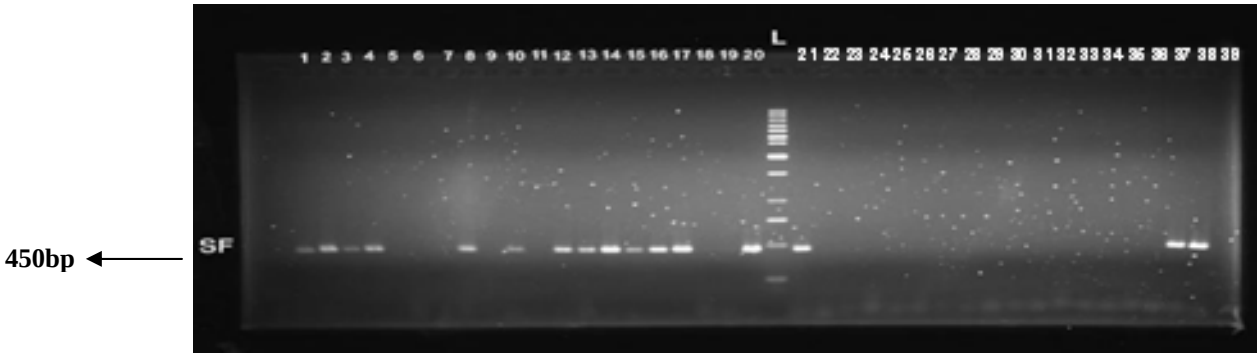
Table 2. Comparison of two populations for their ratio of self-compatible progenies to self-incompatible progenies obtaiened from crossing among self-compatible male parents (Tuono and Supernova) with some self-incompatible female parents

گروه های مورد بررسی		تعداد دانهال مورد بررسی	تعداد دانهال خودسازگار به دست آمده	تعداد دانهال خودناسازگار به دست آمده	$\chi 2$
Studied groups		Seedlings Number	Number of self-compatible seedling	Number of self-incompatible seedling	
1st group	گروه اول	15	15	0	15.00 Sig
2nd group	گروه دوم	15	15	0	15.00 Sig
3rd group	گروه سوم	15	6	9	0.60 ns
4th group	گروه چهارم	15	7	8	0.06 ns
5th group	گروه پنجم	15	8	7	0.06 ns
6th group	گروه ششم	15	6	9	0.60 ns
7th group	گروه هفتم	15	8	7	0.06 ns
8th group	گروه هشتم	15	7	8	0.06 ns
9th group	گروه نهم	15	8	7	0.06 ns
10th group	گروه دهم	15	10	5	1.66 ns
11th group	گروه یازدهم	15	6	9	0.60 ns
12th group	گروه دوازدهم	15	7	7	0.06 ns
13th group	گروه سیزدهم	15	7	8	0.06 ns
Total number	تعداد کل	195	110	85	0٠14 ns

گرفت که والد مادری در این یازده گروه دارای آلل‌های S_1 و S_f نبودند.

در انجام تلاقی‌های اولیه برای به دست آوردن ژنوتیپ‌ها یا ارقام دورگ هیبرید و به دست آوردن تعداد بیشتر نتاج خودسازگار در شرایط مساوی، بهتر است اولاً ژنوتیپ مادری دارای یک آلل مشابه با والد پدری باشد و چون معمولاً والد مادری در این قبیل آزمایش‌های از نوع ناسازگار، است این تشابه باید در آللی غیر از آلل (S_f) باشد..

نکته دوم این‌که بر اساس نتایج به دست آمده برای به دست آوردن درصد بیشتر نتاج خود سازگار بهتر هست در اکثر تلاقی‌ها والد خودسازگار به عنوان گرده‌دهنده انتخاب شود تا در نتاج حاصله نسبت بیشتری نتاج خودسازگار به دست آید. نتایج حاصل از این آزمایش همچنین نشان داد در بررسی کلی از ۱۹۵ ژنوتیپ دورگ ۱۱۰ نهال خودسازگار و ۸۵ نهال خودناسازگار به دست آمده و بین کل جمعیت‌ها از نظر تعداد ژنوتیپ‌های خودسازگار



شکل ۱- نتیجه PCR ژنوتیپ های حاصل ازدورگ گیری والد پدری تونو با ژنوتیپ مادری انتخابی از ایستگاه تحقیقاتی گروه باغبانی. نتاج خودسازگار دارای نوار به اندازه ۴۵۰bp(آلل S_f) ونتاج خودناسازگار بدون نوار بودند

Fig.1. Result of PCR obtained from hybridization of Touno and Supernova with selected mother plants from Horticultural Research Station. Self-compatible progenies had band of 450bp and self-incompatible progenies did not have any band

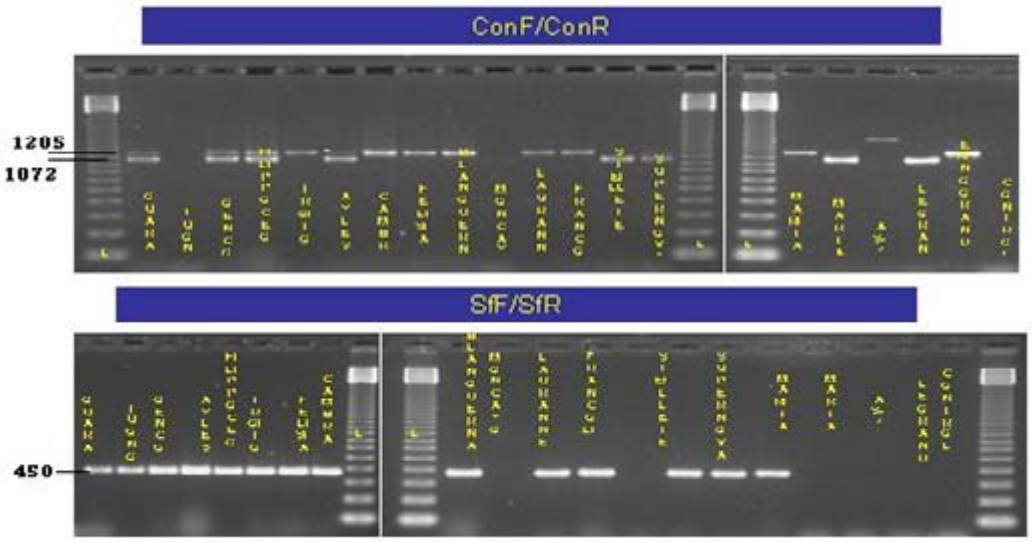
و خودناسازگار اختلاف معنی‌داری بر اساس آزمون کای اسکوئر ($\chi 2$) وجود نداشت. لازم به ذکر است ژنوتیپ‌ها از گروه اول تا گروه هفتم مربوط به ایستگاه تحقیقاتی کمال‌آباد و از گروه هشتم تا گروه سیزدهم مربوط به ایستگاه تحقیقاتی گروه علوم باغبانی بودند (جدول ۲)

نتیجه حاصل از انجام PCR در شکل ۱ نشان داده شده است. در این شکل ژنوتیپ‌های خودسازگار با استفاده از جفت آغازگر SfF-SfR دارای یک نواری به اندازه bp ۴۵۰ و ژنوتیپ‌های خودناسازگار بدون نوار بودند.

آزمایش‌های انجام شده با ۲۲ رقم به منظور تشخیص آلل‌ای برخی ارقام و ژنوتیپ‌ای مشکوک خارجی موجب تشخیص کل آلل‌های آن‌ها با استفاده ازPCR ساده با ترکیب آغازگرهای(ConF-ConR و SfF-S3R) و PCR مرکب با آغازگرهای (ConF-ConR-S3R1، ConF-ConR-S3R2، SfF-ConR- و ConF-SfF-ConR-S3R1، AS1II-SfF-AmyC5R) شد. نتایج حاصل از این آزمایش آلل‌ای هر یک از ارقام و ژنوتیپ‌ای مورد بررسی را مشخص کرد (شکل ۲).

در این آزمایش‌ها آلل‌ای تعیین شده برای هر رقم (شکل ۳) عبارت بودند از لوران (S_3S_f)، استیلا (S_3S_f)، مارتایاآلمودنا (S_3S_f)، آیلس (S_9S_f)، توروبتو (S_1S_f)، تونو (S_1S_f)، گوارا (S_1S_f)، فیلیپوچه او (S_1S_f)، ماریتا(S_3S_f)، فرانکولی(S_1S_f)، آلمنارا (S_3S_f)، سوپرنوآ (S_1S_f)، مارتا (S_1S_f)، آ ایی (S_3S_4)، پیرلس (S_1S_6)، تاردی نان پاریل (S_7S_8)، تامپسون (S_5S_7)، برتینا (S_6S_{11})، گلوری تیا (S_1S_5)، کاپاریل (S_8S_{13})، یوسمیتی (S_8S_{10})، توکیو (S_6S_7)، مارکونا ($S_{11}S_{12}$).

نتایج نشان داد که روش PCR مرکب به

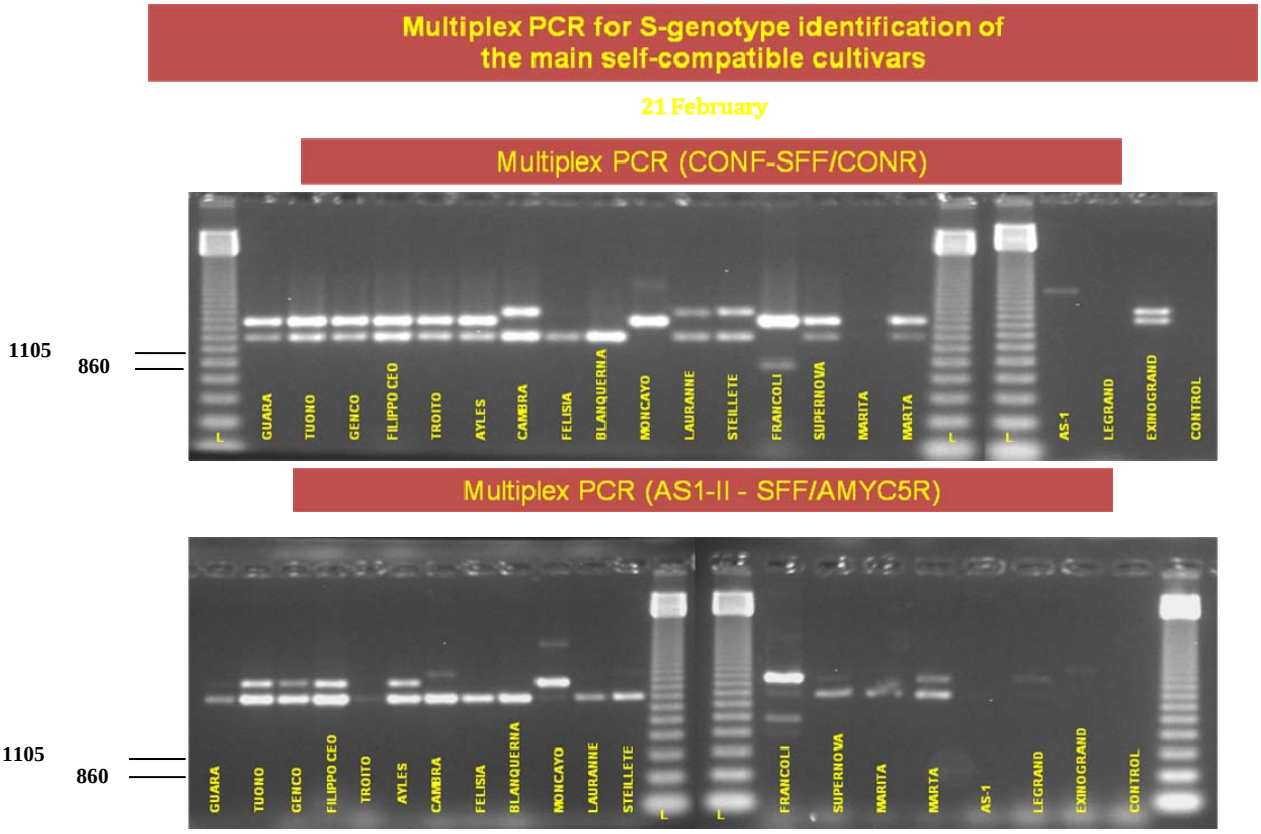


شکل ۲- آلل‌های S در برخی از ارقام بادام از نظر خودسازگاری بااستفاده از آغازگرهای ConF-ConR و SfF-SfR در PCR ساده و Ladder نوع ۱،۲،۳

Fig. 2. S alleles in some almost cultivars regarding compatibility by ConF- ConR and SFF-SFR in simple PCR and 1, 2, 3 ladder

خوبی قادر به تفکیک دقیق ارقام خودسازگار از ارقام خود ناسازگار بوده و می‌تواند آلل‌های S آن‌ها را نیز به طور دقیق تشخیص دهد. نتاج حاصله با نتایج دیگر محققین در شناسایی ارقام خودسازگار از خود ناسازگار و تعیین آلل‌های S با این روش مطابقت داشت (Martinez- Gomez *et al.*, 2003b).

به عنوان نتیجه‌گیری کلی، در آزمایش اول که هدف آن تولید ژنوتیپ‌های خودسازگار با استفاده از ژنوتیپ‌های مادری خودناسازگار و گرده دو رقم خودسازگار تونو و سوپرنوا بود، ابتدا والدین از نظر وضعیت خودسازگاری یا خودناسازگاری بررسی شدند. به این منظور روش پوشاندن گل‌ها با کیسه انجام شد که نشان داد والدین مادری ایرانی مورد استفاده همگی خودناسازگار بوده و هیچ گونه بذری تولید نکردند. در ادامه دورگ‌گیری انجام شد و پس از به دست آوردن بذر، کشت آن‌ها و به دست آوردن گیاه، نتاج از نظر وضعیت خودسازگاری یا خودناسازگاری با کمک روش PCR با آغازگرهای اختصاصی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که حدود ۵۰ درصد نتاج خودسازگار بودند. البته در دو مورد از تلاقی‌های انجام شده نسبت نتاج خودسازگار به دست آمده بیشتر از ۵۰ درصد بود که علت آن به احتمال زیاد تشابه یکی از آلل‌ها به غیر از آلل S_f بین والدین مادری و پدری بوده که موجب شده است تا در این دو تلاقی خاص صد درصد



شکل ۳- آلل‌های S در برخی از ارقام بادام از نظر خودسازگاری با استفاده ازآغازگرهای ConF-SfF-ConR و AS1II-SfF-AmyC5R در PCR مرکب (ستون‌ها به عنوان Ladder از نوع ۱و۲و۳)

Fig.3. S alleles in some almond cultivars regarding self-compatiblity by ConF-SfF-ConR and AS1II- SfF-AmyC5R primers in multiplex PCR with 123 ladder

نتاج به دست آمده خودسازگار شوند.

در آزمایش دوم بررسی وضعیت ارقام مشکوک خارجی از نظر وضعیت خودسازگاری با کمک روش‌های PCR ساده و مرکب انجام شد. در این بررسی روش PCR ساده نتوانست وضعیت تعدادی از ژنوتیپ‌ها و ارقام (لوران، آایی، مارتا، ماسبوورنا، آیلس، فرانکولی، استایلت، کریستومورتو، گواراوی تی، ماریتا، تگزاس) را از نظر ترکیب آللی مشخص کند، در حالی که روش PCR مرکب با استفاده از آغازگرهای , (ConF-ConR-S3R2) (ConF-ConR-S3R1) و-(SfF-ConR ConR1) توانست به خوبی تمامی ژنوتیپ‌ها و ارقام را از نظر ترکیب آللی در مکان S تعیین وضعیت کند. بنابر این می‌توان ادعا کرد که در پاره‌ای از موارد استفاده از روش PCR مرکب برای تشخیص آلل‌ها ضروری است.

در نهایت توصیه می‌شود که در کارهای به‌نژادی به منظور ایجاد ژنوتیپ‌ها و ارقام جدید خودسازگار در بادام از روش‌های مولکولی مبتنی بر PCR (اعم از ساده و مرکب) جهت کاهش زمان تشخیص ژنوتیپ‌های خودسازگار

و کاهش هزینه‌ها استفاده شود. همچنین این روش می‌تواند ژنوتیپ‌های S را از یکدیگر تفکیک و آلل‌های هر ژنوتیپ را مشخص کند که این مساله بسیار مهم بوده و در کارهای به‌نژادی بعدی حائز اهمیت خواهد بود.

References

Almedia, C. R. M. 1945. Acerca da incompatibilidade na amendoeira. An. Inst. Agron. Lisb. 15: 1–186

Alonso, J. M., and Socias i Company, R. 2005a. Identification of the S_3 self-incompatibility allele in almond by specific primers. Spanish Journal of Agricultural Research 3: 296-303.

Alonso, J. M., and Socias i Company, R. 2005b. Self–incompatibility expression in self-compatible almond genotypes may be due to inbreeding. Journal of American Society for Horticultural Science 130: 865-869.

Chaichi, S., and Dezhampour, J. 1999. Study on self-compatibility in native almond genotypes from East Azarbaijan regions. Proceedings of the First National Almond Conference, Shahr-e-kord, Iran.

Channuntapipat, C., Sedgley, M., and Collins, G. 2002. Sequences of the cDNAs and genomic DNAs encoding the S_I, S_7, S_8 and S_f alleles from almond *Prunus dulcis*. Theoretial and Applied Genetics 103:115-122.

Channuntapipat, C., Wirthensohn, M., Ramessh, S. A., Batlle, I., Arus, P., Sedgley, M., and Collins, G. 2003. Identification of incompatibility genotypes in almond (*Prunus dulcis* Mill.) using specific primers based on the introns of the S-alleles. Plant Breeding. 122: 164-168.

Dellaporta, S. L., Wood, J., and Hicks, J. B. 1983. A plant DNA minipreparation: Plant Molecular Biology Reporter 1:19-21.

Gept, P., and Clegg, M. 1989. Genetic diversity in pearl millet (*Pennisetum glaucum*) at the DNA sequence level. Journal of Heredity 80: 203-208.

Grasselly, C. H., and Olivier, G. 1976. Mise en évidence de quelques types autocompatibles parmi les cultivars d'amandier de la population des Pouilles. Ann Amélior Plant **26**: 107–113.

Herrero, M., and Felipe , A. 1975. Pollinisation de l'amandier. Incompatibilité pollen-style. II Colloque du GREMPA, Montepellier - Nimes (France).

Lopez, M., Mnejja, M., Romero, M. A., Vargas, F. J., and Batlle, I. 2005. Use of S_f specific PCR for early selection of self – compatible seedling in almond breeding. Option Mediterraneennes. Serie A. 63: 269-274.

Martinez - Gomez, P., Lopez, M., Alonso, J., M., Ortega, E., Batlle, I., and Socias i Company, R. 2003a. Identification of self–incompatibility alleles in almond and related prunus species using PCR. Acta Horticulture 622: 397-400.

Martínez-Gómez, P., Ortega, E., Sánchez-Pérez, R., Dicenta, F., Dandekar, A. M., Alonso, J. M., Socias i Company,. R., López, M., Batlle, I., and Gradziel, T. M. 2003b. Identification of self-incompatibility alleles in almond and related Prunus species using PCR. Acta Horticulture 622: 397-401.

Ortega, E., and Dicenta, F. 2008. Inheritance of self-compatibility in almond. Theoretical and Applied Genetics 106: 904-911.

Socias i Company, R. 1990. Breeding self–compatible almond. Plant Breeding Review 80: 313-338.