

شناسائی آلل‌های خود ناسازگاری در زردآلو (*Prunus armeniaca* L.) با تلفیق روش‌های مطالعه این صفت

Identification of Self-Incompatibility Allels in Apricot (*Prunus armeniaca* L.) Using Multi-Level Approaches

رحیم قره‌شیخیات^۱، لوکا دندینی^۲ و سانساوینی^۳

۱- دانشجوی سابق دکتری باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه بولونیا، ایتالیا

۲ و ۳- به ترتیب استادیار و استاد، دانشکده کشاورزی دانشگاه بولونیا، ایتالیا

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۰/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۴/۲

چکیده

قره‌شیخیات، ر.، دندینی، ل.، و سانساوینی، س. ۱۳۹۰. شناسائی آلل‌های خود ناسازگاری در زردآلو (*Prunus armeniaca* L.) با تلفیق روش‌های مطالعه این صفت. مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۲۷: ۴۲۶-۴۱۱.

زردآلوهای ایرانی که در تقسیم‌بندی این محصول در گروه ایرانی- قفقازی قرار می‌گیرند همانند زردآلوهای آسیائی درجه بالائی از صفت خودناسازگاری از نوع گامتوفیتیک را نشان می‌دهند. به منظور شناسائی آلل‌های خود ناسازگاری در تعدادی از ارقام زردآلو، از روش‌های تلاقی‌های کنترل شده در باغ، تعقیب میکروسکوپی لوله کرده در گل‌های تلقیح شده و آزمایش‌های مبتنی بر انجام PCR به کمک آغازگرهای به کاررفته برای سایر اعضای جنس پرونوس (*Prunus*)، استفاده شد. کارآئی تعدادی از آغازگرها برای تعیین آلل‌های ناسازگاری در بین ارقام مورد آزمایش به اثبات رسید. پس از تلفیق نتایج به دست آمده از آزمایش‌های باغی، آزمایشگاهی (میکروسکوپی) و مولکولی، صحت و دقت اطلاعات به دست آمده مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت معلوم شد به کمک توالی‌یابی اسید نوکلئیکی آلل‌های شناسائی شده، تعیین ژنوتیپ S نمونه‌های آزمایشی با اطمینان بیشتری امکان پذیر است و با اتکای صرف به نتایج الکتروفورز محصولات PCR در مواردی نتایج کاملی به دست نمی‌آید.

واژه‌های کلیدی: زردآلو، خودناسازگاری، جایگاه ژنی S، *S-RNase*.

مقدمه

(Vilanova et al., 2005).

این ویژگی در خانواده گلسرخیان (Rosaceae) به صورت خودناسازگاری گامتوفیتیک، همومورفیک، تک عاملی چندآلی کنترل می‌شود (Sanzol and Herrero, 2002) و با بازپس زدن لوله کرده درون خامه اتفاق می‌افتد. به هر حال همان‌گونه که اشاره شد در بسیاری از درختان میوه این خانواده تولید کافی میوه منوط به تلاقی سازگار بین ارقام و نیز درختان درون یک رقم است و البته تمایل زیادی به داشتن ارقام خودسازگار یا خودتلقیح در بین درختان میوه و درختان آجیلی وجود دارد (Broothaerts et al., 2004). زردآلوه‌ای ایرانی که در تقسیم‌بندی این محصول در گروه ایرانی-قفقازی قرار می‌گیرند همانند زردآلوه‌ای آسیائی درجه بالائی از صفت خودناسازگاری از نوع گامتوفیتیک را نشان می‌دهند. تاکنون ژن‌های *S-RNase* و *SFB* یکی مسئول شناسائی مادگی و دیگری دانه‌گرده به عنوان ژن‌های مسئول در این ارتباط شناسائی شده‌اند و بر اساس این شناخت ژنوتایپینگ ارقام درختان میوه خصوصاً درختان میوه هسته دار برای صفت مذکور با سهولت انجام می‌شود. یکی از مکانیزم‌های ناسازگاری که به دقت مورد مطالعه قرار گرفته است مکانیزم ناسازگاری گامتوفیتیک بر مبنای *S-RNase* است. در این نوع ناسازگاری چنانچه S-haplotype لوله کرده در حال رشد درون

زردآلو (*Prunus armeniaca*) که بومی چین و آسیای مرکزی است به خاطر ویژگی‌های خاص از جمله تحمل شرایط کم‌آبی و نیز اهمیت تجارتي در سرتاسر دنیا گسترش دارد. تولید این میوه بنابر گزارش سازمان غذا و خواروبار جهانی در سال ۲۰۰۹ میلادی بالغ بر سه میلیون و هفتصد هزار تن بوده است (Anonymous, 2009). بنابر همین گزارش در این سال ترکیه با ۶۹۵۳۶۴ تن و ایران با ۳۹۷۷۴۹ تن تولید، به ترتیب در رتبه اول و دوم تولید این محصول در جهان بودند. جایگاه جهانی ایران در تولید این محصول و اهمیت اقتصادی آن برای باغداران ایرانی، تحقیقات در زمینه به‌نژادی این محصول را توجیه می‌کند.

زردآلو متعلق به خانواده Rosaceae و جنس *Prunus* است. همه گونه‌های زردآلوها دیپلوئید هستند و در آن‌ها $x = 8$ و $n = 16$ است (Janick et al., 1996). به نظر می‌رسد تولید و اصلاح تعداد زیادی از ارقام زردآلو (*P. armeniaca*) مانند سایر اعضای جنس پرونوس به استثنای هلو (*P. persica*) که یک گونه کاملاً خودسازگار است، به وسیله مکانیزم خودناسازگاری کنترل می‌شود. این مکانیزم از انجام تلاقی موفقیت‌آمیز بین ارقامی که دارای آلل‌های مشابه برای صفت مذکور هستند جلوگیری می‌کند و به این ترتیب بر میزان تولید میوه در باغ‌ها اثرگذار است

V1 است. پروتئین‌های *SFB4*، *SFB2* و *SFB1* دارای پلی‌مورفیسم بالائی بوده و تشابه توالی اسید آمینه‌ای آن‌ها به طور متوسط برابر ۷۹/۴٪ گزارش شده است (Romero *et al.*, 2004). با یافته‌های جدید در سال‌های اخیر، اطلاعات ارزشمندی در ارتباط با اساس مولکولی خودسازگاری در زردآلو به دست آمده است که شناسائی منشاء خودسازگاری را در این گونه ممکن می‌سازد.

هالاسز و همکاران (Halasz *et al.*, 2007) تعداد آلل‌های زردآلو را تا ۲۲ عدد گزارش کردند. وو و همکاران (Wu *et al.*, 2009) هشت *S-RNase* جدید را مشخص و به بانک ژن معرفی کردند که با اسامی Par-23 الی Par-30 ثبت شدند. به این ترتیب تعداد آلل‌های S در زردآلو به ۳۰ رسید. انتظار می‌رود با انجام آزمایش روی نمونه‌های جدید این تعداد بیشتر شود. اخیراً با توجه به دقت و سرعت عمل در تعیین آلل‌های S به کمک روش‌های مولکولی، استفاده از روش‌های جدید برای مطالعه جایگاه ژنی S نظیر RT-PCR، امکان مقایسه الگوهای مقطعی تظاهر ژن *S-RNase* در ارقام خودسازگار (SC) و خودناسازگار (SI) به وجود آمده است. کاربرد DNA-کروماتوگرافی (Denaturing high performance liquid chromatography-DHPLC)، به منظور تشخیص ژنوتیپ S بر اساس آلل‌های *SFB* برای تعدادی از زردآلوهای اروپائی توسط راز و همکاران (Raz *et al.*, 2009) گزارش شده

خامه با یکی از دو آلل مادگی همانند باشد، رشد آن متوقف می‌شود (McCubbin and Kao, 2000). دلیل این توقف، فعالیت آنزیم رایونوکلئاز است که منجر به اضمحلال RNA می‌شود و بنابراین پروتئین مورد نیاز برای رشد لوله گرده تامین نمی‌شود.

به منظور سهولت کشف ژن‌های مزبور در زردآلو، کتابخانه باکتریائی (Bac-library) در ارقام گلدریچ (Goldrich) و هارکوت (Harcot) توسط رومرو و همکاران (Romero *et al.*, 2004) ساخته و منجر به شناسائی ژن‌های *SFB* و *S-RNase* در زردآلو شد. نتیجه مطالعات نشان داد که ساختمان جایگاه ژنی در زردآلو شبیه سایر گونه‌های جنس پرونوس است که تا به حال گزارش شده، یعنی *S-RNase* دارای دو اینترون است و اندازه این دو اینترون برای هر هاپلو تایپ (Haplotype) تفاوت دارد. برای تعداد زیادی از آلل‌های S اندازه این اینترون‌ها مشخص شده‌اند. میزان تشابه توالی اسید آمینه‌ای سه آلل موجود در دو رقم فوق‌الذکر (S1, S2 و S4) به طور متوسط برابر با ۷۷/۵٪ بوده و به این ترتیب پلی‌مورفیسم موجود در توالی می‌تواند مبین این نکته باشد که این ژن (*S-RNase*) تعیین کننده ویژگی مادگی در زردآلو است. از طرف دیگر پروتئین‌های *SFB* زردآلو نیز شبیه این پروتئین در سایر اعضای *Prunus* بوده و دارای چهار منطقه متغیر به اسامی HVa، HVb، V2 و

کافی میوه نیاز به گرده‌افشانی ارقام دارند. در ارقام خودسازگار، دیگر عواملی نظیر پیدا کردن درختان گرده‌دهنده مناسب و همپوشانی دوره گلدهی ارقام برای باغداران مطرح نیست. در آن‌سو برای محققین نیز محدودیت‌های انتخاب والدین مناسب جهت انجام دگرگشتی‌ها و نیز انجام خودگشتی‌ها قابل طرح نیست. به همین دلایل به نظر می‌رسد مطالعات وابسته به فیزیولوژی گلدهی برای پی‌ریزی برنامه‌های دورگ‌گیری یک ضرورت است. تعیین نحوه توارث‌پذیری صفات مربوط به باروری، کارآیی برنامه‌های به‌نژادی را افزایش می‌دهد. در این ارتباط، به عنوان نمونه، نرعیمی (که به ندرت در مورد زردآلو گزارش می‌شود) به میزان ۲۵٪ در گیاهچه‌های بذری حاصل از تلاقی والدین ناخالص (Heterozygous) تولید می‌شوند (Burgos *et al.*, 2004). بنابراین انتخاب والدین مناسب می‌تواند یک راه حل برای پرهیز از انتقال صفات نامطلوب نظیر نرعیمی و خودناسازگاری باشد. همچنین استفاده از روش‌های جدید، این امکان را فراهم می‌کند که در مراحل اولیه رویشی نهال‌های بذری بتوان این صفت را در آن‌ها بررسی کرد و در صورت لزوم نسبت به حذف ژنوتیپ‌های ناسازگار مبادرت ورزید. به این ترتیب این تحقیق با هدف بررسی کارآیی تعدادی از روش‌های مرسوم و جدید در ارتباط با شناسایی آلل‌های خودناسازگاری در زردآلو به انجام شد.

است. بر مبنای این مطالعات آغازگرهای ویژه‌ای برای آلل‌های S زردآلو نیز طراحی شده‌اند. تعدادی از این آغازگرهای جدید اختصاصی به کار رفته برای شناسایی آلل‌های S در زردآلو عبارتند از: S-11SRF، S-17SRF، S-26SRF، S-9SRF و S-8SRF که به ترتیب ویژه شناسایی آلل‌های S17-RNase، S26-RNase، S11-RNase، S8-RNase و S9-RNase هستند (Wu *et al.*, 2009).

فاصله فیزیکی بین آلل‌های *S-RNase* و *SFB* در زردآلو تعیین شده تا پیوستگی شدید ژنتیکی این دو را که شرط لازم برای خودناسازگاری از نوع گامتوفیتیک است، نشان دهد. در این ارتباط می‌توان به کار و همکاران (Wu *et al.*, 2009) اشاره کرد که در آن اقدام به انجام PCR برای آلل‌های S8، S9، S11، S17 و S26 با استفاده از آغازگرهای فوق‌الذکر کرد. آن‌ها فاصله ژنتیکی بین ژن‌های *S-RNase* و *SFB* آلل را برای شماره‌های S9، S11، S17 و S26 به ترتیب برابر با: ۶۲۰bp، ۲۹۹bp و ۱۰۶۱bp و ۳۸۷bp به دست آوردند.

در فهرست برنامه‌های به‌نژادی زردآلو به موضوع خود(نا)سازگاری ارقام که تعداد آن‌ها در بین ارقام جدید در حال افزایش است، توجه می‌شود (Bassi and Audergon, 2006). این موضوع از آن جهت اهمیت دارد که وجود ارقام خودناسازگار مشکلاتی را از نظر مدیریت باغ‌ها و نیز برنامه‌های به‌نژادی پیش‌پای باغداران و به‌نژادگران می‌گذارد. باغداران برای تولید

مواد و روش‌ها

تعداد ۲۴ رقم زردآلو در یک باغ کلکسیون در استان امیلیا-رومانیا (Emilia-Romagna) در شمال ایتالیا برای انجام آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. درختان ۵ تا ۶ ساله بوده و عملیات باغبانی یکسانی روی آن‌ها انجام می‌شود.

کلیه تلاقی‌های متقابل (Reciprocal Crosses) بین پنج رقم ربادا (Robada)، برا (Bora)، پینک کت (Pinkcot)، مایا (Maya) و پرتیچی (Portici) انجام شد. برای انجام این تلاقی‌ها بیش از ۳۰۰۰ گل اخته شدند و تلقیح مصنوعی به منظور بررسی خودناسازگاری و سازگاری بین ارقام در مورد آن‌ها اجرا شد. در سال دوم آزمایش، علاوه بر تلاقی‌های فوق که به منظور اطمینان بیشتر از نتایج و نیز جبران تلفات ناشی از سرمازدگی گل‌ها تکرار شد، برای تعدادی از ارقام دیگر تلقیح دستی انجام شد. متناسب با برنامه تلاقی از پیش تعیین شده در باغ در زمان مناسب ایزولاسیون گل‌ها به کمک پوشش‌های مناسب انجام شد. گل‌ها اخته شدند و با دانه گرده خودی به منظور بررسی خودناسازگاری و با دانه گرده سایر ارقام مورد مطالعه به منظور بررسی ترکیب‌های سازگار/ناسازگار تلقیح مصنوعی انجام شد. پس از انجام تلاقی‌ها مجدداً شاخه‌های حاوی گل‌های گرده‌افشانی شده پوشانیده شدند تا از آلودگی گل‌ها به وسیله دانه گرده نامعلوم جلوگیری به عمل آید. پس از گذشت هشت هفته درصد تشکیل میوه (Fruit set) محاسبه شد.

با توجه به این که تعدادی از عوامل محیطی بر میزان تشکیل میوه در درختان میوه تاثیر می‌گذارند و به تبع آن بر استنتاجات به دست آمده از آزمایش‌های باغی در خصوص خود سازگاری/ناسازگاری و حتی سازگاری با دیگر ارقام موثرند، که از جمله آن‌ها می‌توان به وضعیت تکاملی گل‌ها در ارقام اشاره کرد یک پیش مطالعه‌ای در این ارتباط بر روی تعدادی از ارقام مورد تحقیق انجام شد و در آن با بررسی بیش از ۳۰۰ گل به ازای هر رقم درست قبل از انجام تلاقی‌ها وضعیت گل‌ها از نظر قابلیت تولید میوه مورد بررسی قرار گرفت. با احتساب این نظریه که در زردآلو گل‌های واجد مادگی به طول ۵ الی ۱۰ میلی‌متر پس از انجام گرده‌افشانی قادر به تشکیل میوه خواهند بود (Faust, 1989) و کوچک‌تر از این دامنه، گل‌های تکامل نیافته ای هستند، لذا انتخاب گل‌های مناسب جهت انجام تلاقی‌ها با دقت انجام شد.

مطالعه میکروسکوپی رشد لوله گرده درون خامه بر روی ارقام مذکور با استفاده از شاخه بریده و انتقال آن‌ها به آزمایشگاه انجام شد. در این روش شاخه‌های حاوی گل‌ها در مرحله بالنی (Ballon stage) بریده شدند و بلافاصله به آزمایشگاه با دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. محلول ۵٪ ساکارز تهیه شد و انتهای شاخه داخل سطل‌های کوچک محتوی محلول فوق قرار داده شد. بلافاصله اقدام به اخته کردن گل‌ها شد و روز بعد تلقیح مصنوعی مطابق جدول تلاقی‌ها انجام شد. هفتاد و دو ساعت

DNA پلاسمیدی به توالی یابی قطعات ژنی جدا شده انجام شد. میزان تشابه توالی‌ها با برنامه FAST و با مراجعه به بانک‌های اطلاعاتی از جمله EBI (European Bioinformatic Institute) بررسی و با برنامه Clustalw آنالیز شد (Sutherland *et al.*, 2004).

نتایج و بحث

اسامی ارقام زردآلو و پرایمرهای مورد استفاده در این بررسی به ترتیب در جدول‌های ۱ و ۲ نشان داده شده‌اند. قوه‌نامه و رشد دانه‌های گرده در مورد ارقام مورد مطالعه برای تلاقی‌های متقابل نتایج نشان داد که عموماً دارای درصد قابل قبولی از قوه‌نامه هستند لذا قابلیت استفاده آن‌ها در برنامه تلاقی‌ها محرز شد (شکل ۱). البته در مورد زردآلو نتایج بسیاری از تحقیقات در این خصوص نشان داده است که اکثر قریب به اتفاق ارقام به استثنای چند رقم نر عقیم از قدرت جوانه‌زنی و رشد لوله گرده خوبی برخوردارند (Vachun, 1981; Egea *et al.*, 1992). نتایج تشکیل میوه برای پنج رقم زردآلو در تلاقی‌های متقابل در جدول ۳ آمده است. همان‌طور که اشاره شد این بررسی در سال‌های ۲۰۰۸ برای پنج رقم و در سال ۲۰۰۹ ضمن تکرار پنج رقم سال اول، برای هفده رقم جهت مشارکت در تعیین ژنوتیپ S، در همان باغ انجام شد. تعدادی از این ارقام که امکان انجام تلاقی‌های خودی در باغ برای آن‌ها وجود داشت با ذکر

پس از تلاقی گل‌ها روی شاخه‌های بریده، مادگی گل‌ها جدا شده و درون محلول تثبیت‌کننده فرمالدئید استیک اسید و الکل (FAA) جهت آماده‌سازی بافت خامه و رنگ آمیزی آن قرار داده شدند. این نمونه‌ها ابتدا به کمک آب مقطر چند بار شستشو داده شدند تا محلول مذکور زدوده شود. سپس به کمک آنیلین بلو (Aniline Blue) رنگ آمیزی و با میکروسکوپ فلورسنت مطالعه شدند و از آن‌ها عکس تهیه شد. مطالعه به طور متوسط بر روی پنج مادگی تلقیح شده انجام شد و رشد لوله گرده از مرحله جوانه‌زدن روی کلالة تا نزدیک تخمدان و در مواردی داخل تخمدان تعقیب شد.

برای تمامی تلاقی‌های پیش‌بینی شده دانه گرده از همان ارقام در باغ تهیه شد و قبل از استفاده آزمون قوه‌نامه آن‌ها با استفاده از محیط کشت مایع استاندارد (pH=4.5-5) شامل: ۱۰۰ گرم ساکارز، ۰/۲ گرم اسید بوریک و ۰/۳ گرم نترات کلسیم در یک لیتر آب مقطر انجام شد.

برای انجام مطالعات مولکولی، پس از استخراج DNA ژنومی مطابق پروتکل CTAB و تعیین کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA با دستگاه Nanodrop، اقدام به انجام PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و عمومی شد تا قطعاتی از ژن‌های هدف تکثیر شوند. تفکیک قطعات تکثیری با استفاده از ژل آگارز ۲-۱/۵ درصد انجام شد و قطعات حاصل در ناقل pGEM-T همسانه شدند. پس از استخراج

جدول ۱- اسامی و شجره ارقام زردآلو مورد مطالعه

Table 1. Name and pedigree of apricot cultivars used in the experiment

Cultivar/genotype	رقم اژنوتیپ	Pedigree	Origin
ALTERA	آلترا	HARCOT × (SAN CASTRESE × REALE DI IMOLA)	Italy
BO92639095		HARCOT × REALE DI IMOLA	Italy
BO93622312		Petra selfing	Italy
BORA	برا	Early Blush × PA 7005-2	Italy
CORNIA	کورنیا	NJA1 × BELLA DI IMOLA	Italy
HARCOT	هارکوت	(Geneva Narmata) Morden 604 × NJA1 (PERFECTION × PHELPS)	Canada
GHEYSI*	قیسی*	Unknown	Iran
NADERI*	نادری*	Unknown	Iran
KIOTO	کیوتو	Unknown	France
LILLYCOT	لی لی کت	Unknown	Canada
MAIA	مایا	PORTICI × BORA	Italy
NINFA	نینفا	OUARDI × TYRINTHOS	Spain
PETRA	پترا	GOLDRICH × PELESE DI GIOVANNIELLO	Italy
PIEVE	پیه و	HARCOT × REALE D'IMOLA	Italy
PIEVE TARDIVA	پیه و تاردیوا	HARCOT × REALE D'IMOLA	Italy
PINKCOT	پینک کت	Unknown	Canada
PORTICI	پورتیچی	Unknown	Italy
REALE	رآله	Unknown	Italy
ROBADA	ربادا	ORANGE RED × K113-40	Italy
S.CASTRESE	سن کاسترز	Unknown	Italy
TARDIF DE VALENCE	تاردیف د والنسه	Unknown	Spain
YAMAGATA 3	یاماگانا ۳	Unknown	Japan
LITO	لیتو	STARK EARLY ORANGE × TIRYNTHOS	Greece
GOLDRICH	گلدریچ	SUNGLO × PERFECTION	USA

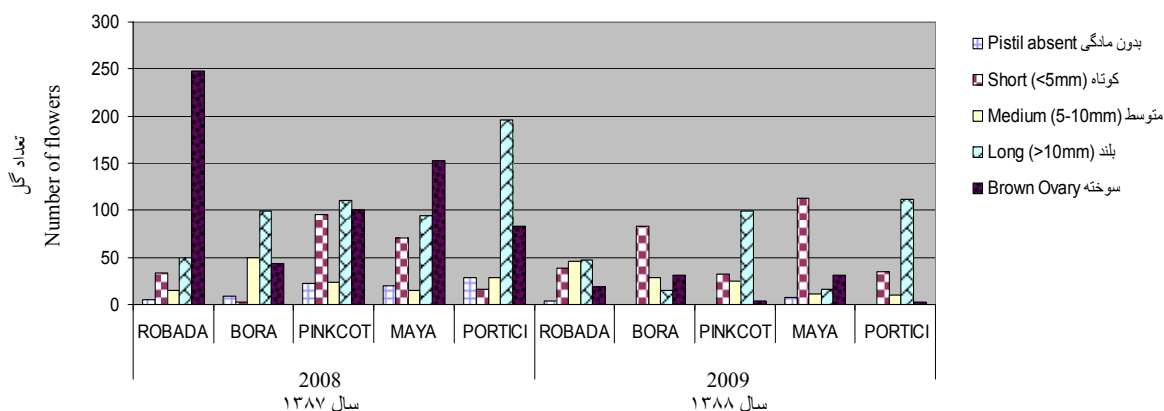
* رقم نادری و قیسی جزو ارقام ایرانی بود که در این باغ وجود نداشت و تنها نمونه DNA آنها در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت.

* Iranian cultivars not existed in the garden and their DNA samples were used.

جدول ۲- لیست آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر قطعاتی از ژن‌های کنترل کننده خودناسازگاری

Table 2. The primers used to amplify fragments of genes involved in self incompatibility

Primer	Sequence(5'-3')	Source
EM-PC2consFD	TCACMATYCATGGCCTATGG	Sutherland 2004
EM-PC3consRD	AWSTRCCRTGYTTGTTCCATTC	Sutherland 2004
EM-PC5consRD	CAAATACCACTTCATGTAACARC	Sutherland 2004
SRc-F	CTCGCTTTCCTTGTCTTGC	Romero 2004
SRc-R	GGCCATTGTTGCACAAATTG	Vilanova 2005
PaConsI-F	(C/A)CTTGTTCTTG(C/G)TTT(T/C)GCTTTCTTC	Sonneveld 2003
PaConsI-R	CATG(A/G)ATGGTGAA(A/G)T(T/A)TTGTAATGG	Sonneveld 2003
PaConsII-F	GGCCAAGTAATTATTCAAACC	Sonneveld 2003
PaConsII-R	CA(T/A)AACAAA(A/G)TACCACTTCATGTAAC	Sonneveld 2003
PaConsI-F	(C/A)CTTGTTCTTG(C/G)TTT(T/C)GCTTTCTTC	Sonneveld 2003
SFBc-F	TCGACATCCTAGTAAGACTACCTGC	Vilanova 2006
SFBc-R	ATTTCTTCACTGCCTGAATCG	Vilanova 2006
SFB-1R	TAAACCTCAACCGCCAAGAC	Romero 2004
SFB-5F	TAGGACCCCTCCAATGAGC	Romero 2004



شکل ۱- تنوع وضعیت تکامل و سلامت گل‌های ارقام زردآلو در سال‌های ۲۰۰۸ و ۲۰۰۹ در ایستگاه تحقیقاتی تبانو

Fig. 1. Developmental situation of flowers among apricot cultivars evaluated at Tebano Research Station during 2008-2009

تعداد متوسط گل در هر شاخه ایزوله شده داخل کیسه برابر ۱۵۰ بود. ارقام REALE DI IMOLA و LITO قبل از همان مزرعه در آزمایش‌های به عمل آمده خودسازگاری نشان داده بودند.

اوقات نتایج دور از ذهن نیز مشاهده شد که می‌تواند به آلودگی‌های کلانه به سایر دانه‌های گرده نسبت داده شود و در مواردی نیز نقص مادگی و عدم تکامل آن به دلیل بسیار جوان بودن گل‌ها یا پیر بودن آن‌ها عامل این تناقض در رفتار گزارش شده است.

در جدول ۵ میزان کارآئی آغازگرهای مورد استفاده جهت تکثیر قطعات کروموزومی هدف (جایگاه ژنی S) در نمونه‌های آزمایشی آورده شده است. علیرغم این که استفاده از آغازگر SRC موثرتر از سایر آغازگرها بود ولیکن سایر آغازگرها نیز در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند تا امکان مشخص کردن ترکیب ژنتیکی (ژنوتیپ) نمونه‌های مورد استفاده با اطمینان بیشتری فراهم شود. در حال حاضر کاربرد جفت آغازگر به عنوان نشانگر

درصد تشکیل میوه عبارت بودند از: کیوتو (۴۲/۵٪)، سن کاسترز (۳۰٪)، پیسه و (۱۰٪)، گلدریچ (۰٪)، تاردیف د والانس (۲۹٪)، BO92639095 (۱۰٪)، BO93623012 (۶/۵٪)، پترا (۸٪)، هارکوت (۰٪)، پیوه تاردیوا (۱۵٪). سایر ارقام شامل آلترا، کورنیا، قیسی، نادری، لیلی کوت، رئاله دی ایمولا، نینفا، لیتو و یاماگاتا ۳، در مطالعات مولکولی مورد استفاده قرار گرفتند.

نتایج مطالعه میکروسکوپی رشد لوله گرده درون خامه در جدول ۴ ارائه شده است. وجود حداقل یک لوله گرده رشد کرده درون تخمدان به منزله سازگار بودن تلاقی منظور شد (شکل ۲). با توجه به داده‌های جدول خودناسازگاری تعدادی از ارقام مشخص شد که با نتایج به دست آمده در باغ مطابقت می‌کند. البته گاهی

جدول ۳- نتایج تشکیل میوه برای پنج رقم زردآلو در تلاقی های متقابل
Table 3. Fruit set percentage obtained from reciprocal crosses of five apricot cultivars

رقم مادر (♀)Female	رقم گرده دهنده Male(♂)	درصد تشکیل میوه % Fruit set		توضیحات Notes	
		2008	2009		
ربادا Robada	Robada	ربادا	0.8	0.0	SI خودناسازگار
	Bora	بورا	21.4	8.9	CC تلاقی سازگار
	Pinkcot	پینک کت	19.2	8.5	CC تلاقی سازگار
	Maya	مایا	25.3	9.5	CC تلاقی سازگار
	Portici	پورتیچی	27.7	2.0	CC تلاقی سازگار
بورا Bora	Bora	بورا	13.0	8.8	SI خودناسازگار
	Robada	ربادا	19.1	18.0	CC تلاقی سازگار
	Pinkcot	پینک کت	19.5	10.6	CC تلاقی سازگار
	Maya	مایا	17.6	3.1	CC تلاقی سازگار
	Portici	پورتیچی	28.7	14.4	CC تلاقی سازگار
پینک کت Pinkcot	Pinkcot	پینک کت	6.0	0.0	SI خودناسازگار
	Robada	ربادا	6.0	1.5	؟ ؟
	Bora	بورا	10.5	3.0	CC تلاقی سازگار
	Maya	مایا	6.0	0.0	CC تلاقی سازگار
	Portici	پورتیچی	9.1	0.0	CC تلاقی سازگار
مایا Maya	Maya	مایا	Fruitful	0.0	SI خودناسازگار؟
	Robada	ربادا	No data	2.4	؟ ؟
	Bora	بورا	No data	7.0	CC تلاقی سازگار
	Pinkcot	پینک کت	No data	5.2	CC تلاقی سازگار
	Portici	پورتیچی	No data	0.5	؟ ؟
پورتیچی Portici	Portici	پورتیچی	20.0	12.2	SC خود سازگار
	Robada	ربادا	23.0	21.1	CC تلاقی سازگار
	Bora	بورا	23.1	19.3	CC تلاقی سازگار
	Pinkcot	پینک کت	27.8	20.4	CC تلاقی سازگار
	Maya	مایا	20.8	19.9	CC تلاقی سازگار

SI: Self-incompatible; CC: Cross compatible; SC: Self compatible

الکتروفورز به دست آمده روی ژل آگارز در شکل ۳ و ۴ نشان داده شده است. این الگوها با نتایج به دست آمده از کار سایر محققین (Hala'sz, 2007) مقایسه و پس از آن اقدام به کلون کردن آلل‌های ظاهر شده به وسیله

مولکولی که قادر به تعیین طیف وسیعی از آلل‌های ناسازگاری در زردآلو باشد، امکان‌پذیر نیست، لذا معمولاً لازم است ترکیبی از آنها مورد استفاده قرار گیرد تا S-ژنوتایپینگ با موفقیت بیشتری همراه باشد. الگوهای

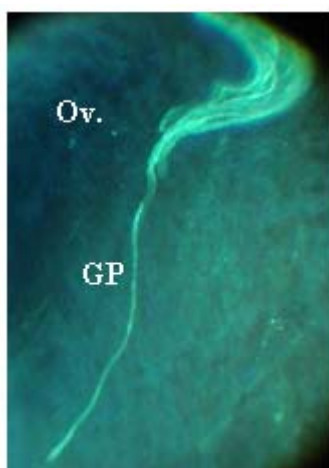
جدول ۴- تعقیب لوله گرده درون مادگی پس از انجام تلاقی ها در شرایط کنترل شده

Table 4. Following growing pollen tubes inside the ovary from stigma toward ovule under controlled conditions after hand pollination

مادگی های تلقیح شده بعد از ۷۲ ساعت Pollinated pistils after 72 hours	والد گرده دهنده Male parent (Pollen source)	تعداد مادگی مطالعه شده Evaluated pistils	دانه گرده روی کللاه Pollen grains on stigma	دانه گرده های جوانه زده Germinated pollens (N,L,M,H)•	لوله گرده در ابتدای خامه Pollen tube at the beginning of pistil	لوله گرده در نیمه مسیر Pollen tube in the midway	لوله گرده در نزدیکی تخمدان Pollen tube near to ovary	لوله گرده داخل تخمدان Pollen tube inside the ovary	وضعیت سازگاری
ROBADA (S8522)	ROBADA	3	X	H	X				Incompatible Cross تلاقی ناسازگار. تعداد زیادی از لوله های گرده متوقف شده اند
	BORA	4	X	M-H				X	Compatible Cross تلاقی کاملاً سازگار
	PINKCOT	3	X	L-M		X			Compatible Cross تلاقی سازگار
	MAYA	1	X	L			X	X	Defective Pistils مادگی های ناقص (خیلی کوتاه)
	PORTICI	3	X	L				X	Compatible Cross تلاقی سازگار
BORA (ScS9)	ROBADA	3	X	M-H				X	Compatible Cross تلاقی سازگار
	BORA	2	X	H				X	Compatible Cross تلاقی سازگار
	PINKCOT	2	X	M-H				X	Compatible Cross تلاقی سازگار
	MAYA	2	X	M			X	X	Damaged Stigma کللاه ها آسیب دیده هستند
Pinkcot (S8S9)	ROBADA	7	X	M	X	X		X	Compatible Cross تلاقی سازگار(مادگی کوتاه)
	BORA	5	X	M-H					Compatible Cross تلاقی سازگار
	PINKCOT	5	X	H	X			X	Incompatible Cross تلاقی ناسازگار(لوله های گرده در ۱/۳ مسیر متوقف شده اند)
	MAYA	6	X	H	X		X	X	Compatible Cross تلاقی سازگار
	PORTICI	6	X	H				X	Compatible Cross تلاقی سازگار
PORTICI (S25/7)	ROBADA	5	X	M-H				X	Compatible Cross تلاقی سازگار
	BORA	5	X	H				X	Compatible Cross تلاقی سازگار
	PINKCOT	5	X	H			X	X	Compatible Cross تلاقی سازگار
	MAYA	5	X	M-H				X	Compatible Cross تلاقی سازگار
	PORTICI	5	X	H				X	Compatible Cross تلاقی سازگار
MAYA (S2S9)	ROBADA	5	X	H				X	Compatible Cross تلاقی سازگار
	BORA	5	X	H	X			X	Compatible Cross تلاقی سازگار
	PINKCOT	5	X	H			X	X	Compatible Cross تلاقی سازگار
	MAYA	5	X	M			X	X	Compatible Cross تلاقی سازگار
	PORTICI	5	X	H				X	Compatible Cross تلاقی سازگار

* N: بدون جوانه زنی؛ L: جوانه زنی کم (۱۰-۵ درصد)؛ M: جوانه زنی متوسط (۴۰-۲۰ درصد)؛ H: جوانه زنی زیاد (بیشتر از ۵۰ درصد).

N: No germination; L: Low germination (5-10%); M: Medium germination (20-40%); H: High germination (>50%).



شکل ۲-نمای میکروسکوپی از لوله گرده در حال رشد داخل مادگی پس از رنگ آمیزی به وسیله آنیلین- بلو. ادامه رشد ناشی از سازگاری یا توقف آن به دلیل ناسازگاری به خوبی قابل تشخیص است. تخمدان:

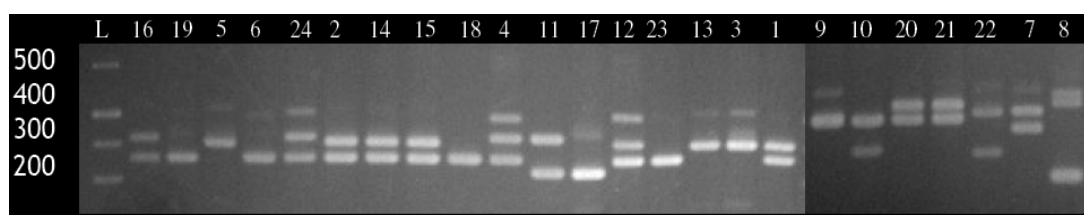
Ov، لوله گرده در حال رشد: GP

Fig. 2. Microscopic view of growing pollen tube inside the ovary after staining with aniline blue. The growing or arrested pollen tubes can be recognized clearly. Ov: Ovule and GP: Growing Pollen Tube

جدول ۵- میزان کارآئی آغازگرهای مورد استفاده در تکثیر قطعاتی از ایترون اول و دوم جایگاه ژنی *S*. باندهای ضعیف اما قابل تشخیص در تعیین کارآئی منظور شده اند

Table 5. The efficiency of applied primers to amplify fragments of two introns of *S-RNase* gene. The weak but visible bands have been counted

Cultivar	Primer				
	SRC (F+R)	EM-PC5consRD	EM-PC3consRD	Pacons II (F+R)	Pacons I (F+R)
ALTERA	++	-	++	++	++
BO92639095	++	-	+	++	++
BO93622312	++	-	+	++	++
BORA	++	+	+	+	++
CORNIA	+	-	+	++	++
HARCOT	+	-	+	+	++
GHEISI	++	+	++	+	+
NADERI	++	+	++	+	++
KYOTO	++	+	+	+	+
LILLYCOT	++	+	++	+	+
MAYA	++	+	++	++	+
NINFA	++	+	+	++	++
PETRA	++	-	+	++	+
PIEVE	++	-	-	++	++
P. TARDIVA	++	-	-	++	++
PINKCOT	++	+	++	+	++
PORTICI	++	-	++	++	++
REALE	+	-	-	+	+
ROBADA	++?	+	++	++	+
S.CASTRESE	++	-	-	++	++
TARDIF DE VALENCE	++	-	-	++	++
YAMAGATA 3	++	-	+	+	+
LITO	+	-	+	+	++
GOLDRICH	++	+	+	++	++
Efficiency%	44.48	10.48	27.48	38.48	40.48



شکل ۳- باندهای ظاهر شده با استفاده از آغازگر SRC روی ژل آگارز برای تعداد ۲۴ رقم زردآلو

Fig. 3. Electrophoresis pattern of SRc(F+R) primer on agarose gel obtained for 24 apricot cultivars

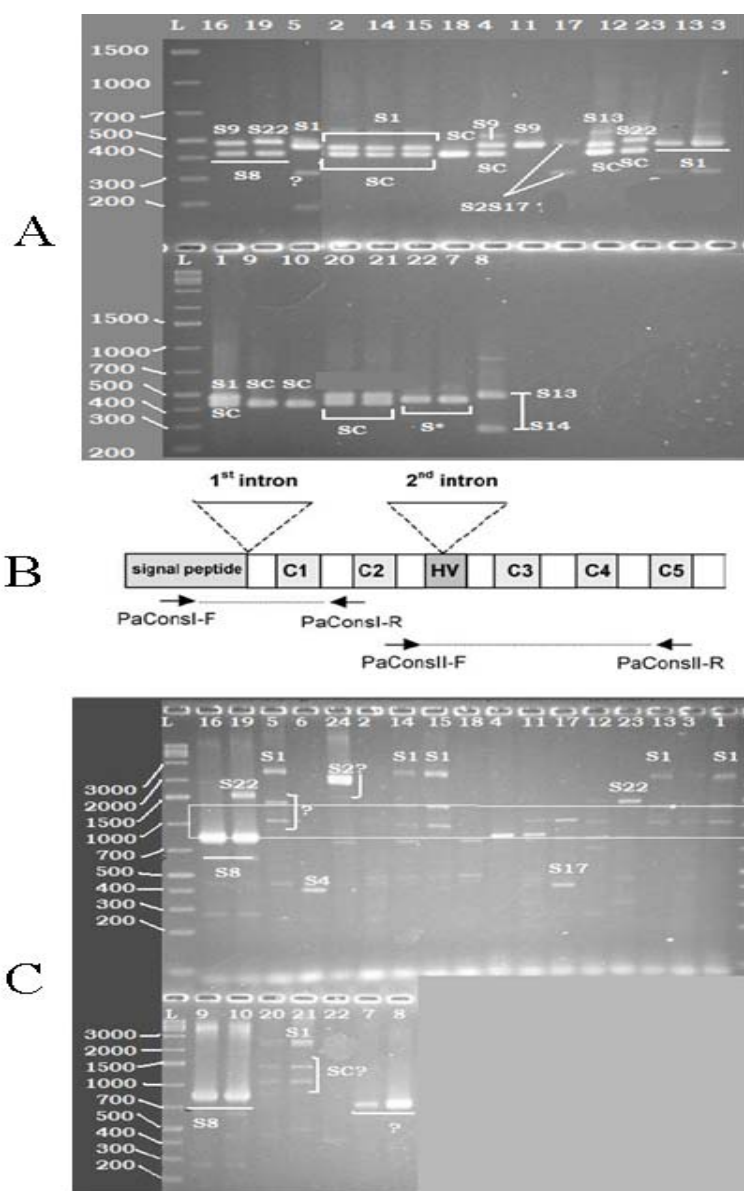
1. ALTERA, 2. BO92639095, 3. BO93622312, 4. BORA, 5. CORNIA, 6. HARCOT, 7. GHEYSI, 8. NADERI, 9. KIOTO (KYOTO), 10. LILLYCOT, 11. MAYA (MAYA), 12. NINFA, 13. PETRA, 14. PIEVE, 15. PIEVE TARDIVA, 16. PINKCOT, 17. PORTICI, 18. REALE DI IMOLA, 19. ROBADA, 20. SANCASTRESE, 21. TARDIF DE VALENCE, 22. YAMAGATA3, 23. LITO and 24. GOLDRICH.

قاطعیت بیشتری در این ارتباط می‌توان اظهار نظر کرد.

به نظر می‌رسد تنها اکتفا کردن به اندازه باندهای ظاهر شده بر روی ژل برای ژنوتایپینگ کافی نباشد. با توجه به این که ژن *S-RNase* دارای دو اینترون بوده و تفاوت در اندازه این دو، معیار تشخیص آلل‌های متفاوت است گاهی پیش می‌آید که دو آلل متفاوت در یک اینترون کاملاً شبیه از نقطه نظر اندازه (bp) هستند بنابراین اکتفا به نتایج الکتروفورز محصولات PCR به دست آمده برای تکثیر قطعاتی از یک اینترون در مواردی شبهه‌برانگیز است، ضمن این که باید در نظر داشت گاهی تفاوت‌ها در حد کمتر از ده bp بوده و عملاً تفکیک باندهای ظاهر شده بر روی ژل آگار معمولی غیر ممکن است که در چنین مواردی نیاز به استفاده از تکنیک‌های دیگری مانند الکتروفورز بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید (۴-۵ درصد)، SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) یا انجام

الکتروفورز ژل آگارز شد.

کلون‌های تهیه شده برای انجام آزمایش توالی‌یابی آماده شدند و پس از توالی‌یابی قطعات کلون شده با توالی‌های موجود در بانک ژن‌های EBI (European Bioinformatics Institute, Nucleotide Sequence Database و DNA Databank of Japan) مقایسه شدند. با در نظر گرفتن میزان تشابه قطعات ژنی شناسایی شده اقدام به اختصاص شماره به آلل‌های شناسایی شده شد که نتایج در جدول ۶ آمده است. در مواردی که هیچ‌گونه گزارشی در خصوص نمونه‌های ارسالی وجود نداشت یا میزان تشابه توالی ژنی قابل قبول نبود و بررسی Alignment Analysis نیز موید تفاوت‌های موثر در توالی نوکلئوتیدها بود، قطعه مورد نظر به عنوان بخشی از یک آلل جدید منظور شد. برای تعدادی از ارقام انتظار می‌رود که این آلل‌ها برای اولین بار گزارش می‌شوند و در صورتی که قطعات بزرگ‌تری قابل توالی‌یابی باشند با



شکل ۴- الگوهای به دست از الکتروفورز محصولات واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای تخصصی PaConsI و PaConsII به ترتیب ویژه اینترون اول و دوم ژن *S-RNase* در زردآلو. بالا (A): الگوی به دست آمده برای اینترون اول. وسط (B): مدل پیشنهادی برای ژن *S-RNase* و قطعات قابل تکثیر توسط آغازگرهای مزبور در برگیرنده اینترون اول و دوم (Sonneveld *et al.*, 2003). پایین (C): الگوی به دست آمده جهت شناسایی آلل‌های S بر مبنای قطعاتی از اینترون دوم در زردآلو. شماره و اسامی ارقام در جدول ۶ آمده است.

Fig. 4. Patterns obtained by PCR products electrophoresis on agarose gel (1.5%) using PaCons I and PaCons II primer pairs amplifying 1st and 2nd introns of *S-RNase*, respectively, in apricot. A: Bands related to first intron. B: The proposed model of *S-RNase* gene (Sonneveld *et al.*, 2003), and C: Bands related to 2nd intron. Number and name of genotypes in Table 6

جدول ۶- اندازه قطعات کروموزومی مربوط به اینترون اول ژن *S-RNase* پس از توالی‌یابی قطعات و درصد شباهت نوکلئوتیدی آن‌ها با آلل‌های *S* موجود در بانک داده‌ها

Table 6. The real size(bp) of amplified fragments of *S-RNase* first intron obtained by sequence analysis and their nucleotide homology

رقم	اندازه آلل ۱	درصد شباهت توالی نوکلئوتیدی	اندازه آلل ۲	درصد شباهت توالی نوکلئوتیدی	ژنوتیپ S
Cultivar	Size(bp)	(Homology)%	Size(bp)	(Homology)%	S-genotype
ALTERA	353	100.0	400	99.5	<i>SISC</i>
BO92639095	353	100.0	400	99.8	<i>SISC</i>
BO93622312	-	-	400	99.5	<i>SIS-</i>
BORA	353	100.0	-	-	<i>SCS9</i>
CORNIA	-	99.5	400	99.8	<i>SIS-</i>
HARCOT	-	-	-	-	<i>SIS4</i>
GHEISI	325	99.1	376	81.9	<i>S2Sa</i>
NADERI	202	95.2	400	96.0	<i>S1S14</i>
KYOTO	353	99.7	-	99.1	<i>SCS8</i>
LILLYCOT	353	78.2	267	76.6	<i>S8Sb</i>
MAYA	354	99.1	328	76.6	<i>S9S2/S8</i>
NINFA	353	99.2	400	100.0	<i>SCS13</i>
PETRA	180	98.2	400	-	<i>SIS-</i>
PIEVE	353	100.0	400	100.0	<i>SISC</i>
PIEVE TARDIVA	353	100.0	400	81.6	<i>SISC</i>
PINKCOT	327	100.0	-	100.0	<i>S8S9</i>
PORTICI	328	100.0	-	87.0	<i>S2(S17)</i>
REALE	353	100.0	353	100.0	<i>SCSC</i>
ROBADA	-	-	419	-	<i>S8S22</i>
SAN CASTRESE	353	73.2	419	73.2	<i>SCS-</i>
TARDIF DE VALENCE	353	100.0	419	73.2	<i>SCS-</i>
YAMAGATA 3	-	93.2	419	73.2	<i>S8S-</i>
LITO	353	100	-	-	<i>SCS22</i>
GOLDRICH	-	-	-	-	<i>SIS2</i>

قرار گرفته‌اند.

به نظر می‌رسد تعدادی از آغازگرها که به طور مشخص قطعاتی از آلل‌های خاص خودناسازگاری را تکثیر می‌کنند می‌توانند به عنوان نشانگرهای مولکولی با کارآئی بالا به کار گرفته شوند. در مورد زردآلو این آغازگرها تا قسمتی تهیه و استفاده شده‌اند ولی بنابر اطلاعات جمع‌آوری شده کافی نیستند. با این حال با توجه

توالی‌یابی ژن (Sequence analysis) ضروری است. با توجه به این که ژن دیگری به نام *SFB* نیز در کنترل صفت خودناسازگاری شناخته شده است، بنابراین می‌توان با تعیین این ژن به کمک *S* - ژنوتایپینگ آمد و نتایج مطمئن تری ارائه داد. در این ارتباط آغازگرهایی برای تکثیر قطعاتی از این ژن طراحی شده‌اند و در محصولاتی مانند زردآلو و گیلاس و آلو-گوجه مورد آزمایش

ژنوتیپ S ارقام و نمونه‌ها کار آتر خواهد بود. به نظر می‌رسد تنوع آلل‌های S بسیار زیاد است و گاهی چند شکلی در اندازه آلل‌ها برای تعیین یک آلل خاص کافی نیست. مطالعه ارقام جدید از منشاء مختلف آلل‌های جدیدی را معرفی می‌کند. تلاش‌هایی لازم است تا نسبت به حذف آلل‌های تکراری (همنام‌ها=Synonyms) از بانک‌های اطلاعاتی موجود که توسط محققین مختلف گزارش شده‌اند، اقدام شود.

به تحقیقاتی که در سال‌های اخیر در این ارتباط انجام شده و روش‌هایی که در گونه‌های وابسته به Prunus به کار گرفته شده همگی نشان می‌دهند که این اتفاق در مورد زردآلو نیز به زودی خواهد افتاد.

نتایج به دست آمده نشان می‌دهند که چند شکلی اندازه اینترون دوم بیشتر از اینترون اول در ژن *S-RNase* است (Gharesheikhhayat, 2010).

بنابراین طراحی و کاربرد آغازگرهایی برای تکثیر قطعاتی از اینترون دوم مطمئناً در تعیین

References

- Anderson, M. A., Cornish, E. C., Mau, S. L., Williams, E. G., Hoggart, R., Atkinson, A., Bonig, I., Grego, B., Simpson, R., Roche, P. J., Haley, J. D, Penschow, J. D, Niall, H. D, Tregear, G. W, Coghlan, J. P, Crawford, R. J, and Clarke, A. E. 1986.** Cloning of cDNA for a stelar glycoprotein associated with expression of selfincompatibility in *Nicotiana alata*. *Nature* 321: 38–44.
- Bassi, D., and Audergon, J. M. 2006.** Apricot breeding: update and perspectives. pp. 279-294. In: Audergon, J. M. (ed.) *Proceedings of the XIIth Symposium on Apricot*. *Acta Horticulturae ISHS*, vol. 2, No. 701.
- Broothaerts, W., Keulemans J., and Van Nerum I. 2004.** Self-fertile apple resulting from *S-RNase* gene silencing. *Plant Cell Rep.* 22: 497–501.
- Burgos, L., Alburquerque, N., and Egea, J. 2004.** Review. Flower biology in apricot and its implications for breeding. *Spanish Journal of Agricultural Research* 2 (2): 227-241.
- Egea J., Burgos, L., Zoroa, N., and Egea, L. 1992.** Influence of temperature on the *in vitro* germination of pollen of apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Journal of Horticultural Science* 67: 247–250.
- Faust, M. 1989.** *Physiology of Temperate Zone Fruit Trees*. Wiley and Sons Inc., New York, USA.
- Gharesheikhhayat, R. 2010.** Self-incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca*), new achievements and molecular aspects of S-locus allele segregation. *Tesi di dottorato in coltura arborea ed agrosistemi forestali, ornamentali e paesaggistici*, Università

degli Studi di Bologna.

- Halász, J., Pedryc, A., and Hegedus, A. 2007.** Origin and dissemination of the pollen-part mutated SC haplotype which confers self-compatibility in apricot (*Prunus armeniaca*). *New Phytologist* 176 (4): 792-803.
- Janick, J., and Moore, J. N. 1996.** *Fruit Breeding: Volume 1, Trees and Tropical Fruits*. John Wiley and Sons Inc., New York, USA.
- McCubbin, A. G., and Kao, T. H. 2000.** Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 16: 333–364.
- Raz, A., Stern, R. A., Shafir, S., Bercovich, D., and Goldway, M. 2009.** *SFB*-based S-haplotyping of apricot (*Prunus armeniaca*) with DHPLC. *Plant Breeding* 128: 707-711.
- Romero, C., Vilanova, S., Burgos, L., Martinez-Calvo, J., Vicente, M., Llacer, G., and Badenes, M. L. 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.
- Sanzol, J., and Herrero, M. 2002.** Identification of self-incompatibility alleles in pear cultivars (*Pyrus communis* L.). *Euphytica* 128: 325–331.
- Sonneveld, T., Tobutt, K. R., and Robbins, T. P. 2003.** Allelespecific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (S) alleles S1 to S16 using consensus and allele-specific primers. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 1059–1070.
- Sutherland, B. G., Robbins, T. P., and Tobutt, K. R. 2004.** Primers amplifying a range of *Prunus* S-alleles. *Plant Breeding* 123: 582–584.
- Vachun, Z. 1981.** Étude de quelques propriétés morphologiques et physiologiques du pollen d'abricotier. Germination et croissance des tubes polliniques a basses temperatures. *Acta Horticulturae* 85: 387–417.
- Vilanova, S., Romero, C., Llácer, G., Badenes, M. L., and Burgos, L. 2005.** Identification of self-(in)-compatibility alleles in apricot by PCR and sequence analysis. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences* 130 (6): 893–898.
- Wu, J., Gu, C., Zhang, S. L., Zhang, S. J., Wu, H. Q., and Heng, W. 2009.** Identification of S-haplotype-specific *S-RNase* and *SFB* alleles in native Chinese apricot (*Prunus armeniaca* L.). *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 48 (6): 645-652.