

مطالعه خودناسازگاری در برخی ژنوتیپ‌های زردآلو (*Prunus armeniaca* L.) با استفاده از روش‌های کلاسیک و مولکولی

Study of Self-Incompatibility in some Apricot (*Prunus armeniaca* L.) Genotypes Using Classic and Molecular Methods

ساناز مولائی^۱، علی سلیمانی^۲، مهرشاد زین‌العابدینی^۳ و بهرام ملکی^۴

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

۳- استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، کرج

۴- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۴/۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۰/۱۷

چکیده

مولائی، س.، سلیمانی، ع.، زین‌العابدینی، م. و ملکی، ب. ۱۳۹۳. مطالعه خودناسازگاری در برخی ژنوتیپ‌های زردآلو (*Prunus armeniaca* L.) با استفاده از روش‌های کلاسیک و مولکولی. مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۳۰: ۷۹۰-۷۷۷.

زردآلو که یکی از درختان میوه مهم در ایران است، به علت داشتن صفت خودناسازگاری گامتوفیتیک معمولاً دارای عملکرد پایینی است. به منظور تعیین خودناسازگاری در چهار رقم بادامی، شاهرودی، شکرپاره، دانشکده و دو ژنوتیپ C و D زردآلو از روش‌های تلاقی‌های کنترل شده در باغ و آزمایش‌های مولکولی به کمک آغازگرهای اختصاصی استفاده شد. صفات طول مادگی، قطر تخمدان و درصد جوانه‌زنی دانه‌گرده در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه اندازه‌گیری شد. نتایج مربوط به درصد جوانه‌زنی دانه‌گرده نشان داد که نر عقیمی در ارقام و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه وجود ندارد. ژنوتیپ C و رقم شاهرودی دارای بیشترین درصد تشکیل میوه (به ترتیب ۱۸/۰۷ و ۱۷/۷۲ درصد)، طول مادگی (به ترتیب ۱۴/۲۷ و ۱۴/۸۷ میلی‌متر) و قطر تخمدان (به ترتیب ۲/۱۲ و ۲/۲۲ میلی‌متر) بودند. ارزیابی داده‌های حاصل از گرده‌افشانی کنترل شده و نتایج آزمایش‌های مولکولی نشان داد ارقام بادامی، شاهرودی، شکرپاره، دانشکده و ژنوتیپ C خودناسازگار بودند و فقط ژنوتیپ D خودسازگار بود. بین ارقام بادامی، دانشکده و ژنوتیپ C دگرناسازگاری مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: زردآلو، خودناسازگاری، آلل‌های S، آزمایش‌های مولکولی.

مقدمه

تولید محصول اقتصادی در اکثر درختان میوه وابسته به گرده افشانی موفق و درصد تشکیل میوه در حد قابل قبول است. زردآلو با نام علمی *Prunus armeniaca* L. بومی چین و آسیای مرکزی بوده و متعلق به خانواده Rosaceae و جنس *Prunus* است (Janick and Moore, 1996). تولید و اصلاح تعداد زیادی از ارقام زردآلو مانند اکثر اعضای جنس *Prunus* بوسیله مکانیزم خوناسازگاری کنترل می‌شود (Gharesheikhyat *et al.*, 2011).

خودناسازگاری در خانواده Rosaceae به صورت خودناسازگاری گامتوفیتیک (Gametophytic self-incompatibility) GIS، همومورفیک، تک عاملی چند آلی کنترل می‌شود (Sanzol and Herrero, 2002) و با پس زدن لوله گرده درون خامه اتفاق می‌افتد. در سیستم خودناسازگاری گامتوفیتیک، ممانعت از رشد دانه گرده و باروری در داخل خامه انجام می‌شود (Franklin-Tong, 2008). در این سیستم، فنوتیپ دانه گرده توسط ژنوم هاپلوئید گرده تعیین و ظهور آلل‌های S به صورت هم- غالبیت (هم - بارز) در مادگی انجام می‌شود. یکی از مکانیزم‌های خودناسازگاری که به دقت مورد مطالعه قرار گرفته است مکانیزم ناسازگاری گامتوفیتیک بر مبنای S-RNase است. در این نوع ناسازگاری چنانچه S-haplotype لوله

گرده در حال رشد درون خامه با یکی از دو آلل مادگی همانند باشد، رشد آن متوقف می‌شود. دلیل این توقف فعالیت آنزیم ریبونوکلئاز است که منجر به تجزیه RNA می‌شود. بنابراین پروتئین مورد نیاز برای رشد لوله گرده تامین نمی‌شود (McClure and Franklin-Tong, 2006). آلل‌های S در جنس *Prunus* دارای دو نوع ایترون بوده و اندازه این ایترون برای هر هاپلو تایپ متفاوت است و برای هر ایترون آغازگرهای خاصی طراحی شده‌اند (Gharesheikhyat *et al.*, 2011). (Hajilu *et al.*, 2005).

گرده افشانی کنترل شده در باغ و محاسبه درصد میوه‌بندی چند هفته پس از گرده افشانی به عنوان یک روش متداول برای ارزیابی روابط سازگاری گرده مطرح است. به طور کلی سه نوع ریزش گل و میوه در زردآلو وجود دارد. اولین ریزش حدود یک هفته بعد از گرده افشانی اتفاق می‌افتد که در حقیقت ریزش اولیه و مربوط به گل‌های ناقص و عقیم بوده و این مسئله یا ژنتیکی است و یا مربوط به شرایط محیطی نامناسب است. ریزش دوم مربوط به میوه‌چه‌های اولیه است که پس از ۳۰-۱۷ روز در صورت ناسازگاری دانه گرده اتفاق می‌افتد و سومین ریزش حدود ۶۰ روز بعد از گرده افشانی اتفاق می‌افتد و دلیل عمده آن نقص مادگی است (Layne *et al.*, 1996). (Monselise, 1986).

بیشتر درختان میوه هسته‌دار می‌توانند

گل‌های نر بارور با مادگی ناقص ایجاد کنند که این پدیده تا حد زیادی در بی‌نظمی تشکیل میوه آن‌ها موثر است (Faust, 1998). در زردآلو وجود دو حالت نرزیایی و ماده‌زایی گل‌ها گزارش شده است، به این ترتیب که در مقایسه با ارقام کاملاً بارور در ارقام عقیم حضور تخمک‌های کوچک و ناقص یا پرچم‌های حاوی میکروسپورهای تخریب شده مشاهده شده است (Halasz *et al.*, 2006؛ Lilleccrapp *et al.*, 1999). نایکی (Nyeki, 1980) بیان کرده که بیشترین درصد تشکیل میوه در زردآلو مربوط به گل‌هایی با مادگی‌هایی به طول ۱۴ میلی‌متر و بیشتر است. با توجه به محدودیت حاصل از کوتاهی طول مادگی در زردآلو به نظر می‌رسد این گیاه بیشتر خاصیت نرزیایی داشته و ماده عقیمی مشکل جدی آن تلقی می‌شود (Faust, 1989).

نجاتی‌ان و ارزانی (Nejati and Arzani, 2004) برای جهت تعیین خودناسازگاری و دوره گرده‌افشانی موثر در چهار رقم زردآلوی بومی ایران از روش گرده‌افشانی کنترل شده استفاده کردند. بر اساس نتایج آن‌ها تمام ارقام خودناسازگار بوده و حداکثر میزان پذیرش مادگی گل‌ها برای دانه‌گرده دو تا چهار روز بعد از مرحله بالونی گل‌ها بود. نکونام و همکاران (Nekonam *et al.*, 2010) وضعیت ناسازگاری و عقیمی را در چهار رقم تجاری ایران با روش گرده‌افشانی کنترل شده و بررسی درصد تشکیل

میوه و همچنین ارزیابی طول و قطر مادگی و بررسی جوانه‌زنی دانه‌گرده، مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که تمام ارقام مورد مطالعه خودناسازگار بودند اما بین آن‌ها دگرناسازگاری کامل مشاهده نشد. عقیمی مادگی در ارقام نصیری و شاهرودی بیشتر از دو رقم دیگر و رقم جهانگیری فاقد عقیمی مادگی بود ولی نرعیمی در هیچ کدام از ارقام مشاهده نشد. حاجی‌لو و همکاران (Hajilu *et al.*, 2006) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مربوط به اینترون اول و دوم اقدام به شناسایی آلل‌های خودناسازگاری در نه رقم مختلف زردآلو کردند. قره‌شیخ بیات و همکاران (۱۳۹۰) به منظور شناسایی آلل‌های خودناسازگاری در تعدادی از ارقام زردآلو، از روش‌های تلاقی کنترل شده در باغ، مطالعه میکروسکوپی لوله‌گرده در گل‌های تلقیح شده و آزمایش مبتنی بر انجام PCR (Polymerase Chain Reaction) به کمک آغازگرهای به کاررفته برای جنس پرونوس استفاده کردند. در نتایج آن‌ها کارایی تعدادی از آغازگرها برای تعیین آلل‌های ناسازگاری به اثبات رسید. زوو و همکاران (Xu *et al.*, 2010) برای تعیین خودناسازگاری و شناسایی آلل‌های S در ۲۴ رقم زردآلوی ژاپنی بومی چین (*Prunus mume*) از گرده‌افشانی کنترل شده در باغ و آزمایش‌های مبتنی بر PCR با استفاده از آغازگرهای طراحی شده برای اینترون دوم استفاده کردند و موفق به شناسایی ده آلل S جدید در این ارقام شدند.

بررسی تاثیر این عوامل در درصد تشکیل میوه بود. به منظور افزایش دقت آزمایش تلاقی در باغ، از تلاقی دو طرفه به عنوان تکراری از تلاقی استفاده شد. برای تهیه دانه گرده، شاخه‌های دارای جوانه گل از درختان ارقام و ژنوتیپ‌های موردنظر در مرحله غنچه جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند و در ظرف آب حاوی چهار درصد ساکارز قرار گرفتند. بساک‌ها در آستانه باز شدن گل‌ها (مرحله بالونی) جمع‌آوری و روی کاغذ روغنی به مدت ۲۴ ساعت خشک شدند، پس از آن دانه‌های گرده آزاد شده و داخل ظروف کوچک در دمای ۴-۳ درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند. آزمون جوانه‌زنی دانه‌های گرده در محیط کشت حاوی ۱۰ درصد ساکارز، ۲ درصد آگار و ۱۰۰ ppm اسیدبوریک انجام شد و پس از ۲۴ ساعت درصد تندش دانه گرده با میکروسکوپ نوری برآورد شد. برای جلوگیری از اثر توده‌ای (تحریک تندش و رشد لوله گرده وقتی تعداد گرده دانه در واحد سطح زیاد باشد) شمارش دانه گرده از میدان دیدهایی انجام شد که دانه‌های گرده به صورت یکنواخت توزیع شده بودند (Dejampour and Gerigurian, 2004). برای اخته کردن گل‌ها به منظور انجام گرده‌افشانی کنترل شده در مزرعه، پرچم‌های حدود ۱۵۰-۵۰ گل در هر شاخه به همراه جام گل برداشته شده و گل‌های اخته شده در دو مرحله با فاصله ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از اخته شدن به

هدف از این مطالعه، شناسایی آلل‌های خودناسازگاری در چهار رقم و دو ژنوتیپ زردآلو با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای ناحیه اینترون دوم مکان ژنی S-RNase، به دلیل چندشکلی بالای اینترون دوم نسبت به اینترون اول در ژن S-RNase و کارایی بالای این اینترون در شناسایی آلل‌های S در جنس پرونوس (Gharesheikhsbayat et al., 2010)؛ (Vilanova et al., 2005)، و بررسی خودناسازگاری ارقام و ژنوتیپ‌ها با انجام گرده‌افشانی کنترل شده در باغ بود.

مواد و روش‌ها

این پژوهش روی چهار رقم بادامی، شاهرودی، شکرپاره، دانشکده و دو ژنوتیپ ناشناخته زردآلو C و D در شهر زنجان با شرایط آب و هوایی نیمه خشک سردسیری در باغ محلی مستقر در حوزه دانشگاه زنجان با عرض جغرافیایی 36 41 N و طول جغرافیایی 48 23 E انجام شد. از خصوصیات بارز ژنوتیپ C می‌توان به فرم کشیده درخت، درصد آب میوه بالا و وزن خشک گوشت پایین و از خصوصیات ژنوتیپ D می‌توان به رشد قوی شاخه، اسیدیته بالای آب میوه و تلخی مغز هسته اشاره کرد. قسمت اول آزمایش شامل گرده‌افشانی کنترل شده و بررسی درصد تشکیل میوه در ارقام و ژنوتیپ‌ها به روش مزرعه‌ای و اندازه‌گیری طول مادگی و قطر تخمدان و

صورت دستی و توسط قلم موی کوچک گرده‌افشانی شدند و درون کیسه‌های پارچه‌ای قرار گرفتند. لازم به ذکر است که پیش از اخته‌سازی، گل‌های باز شده و گل‌هایی که در مرحله غنچه بسته بودند، برداشته شدند. در نهایت درصد تشکیل میوه ۱۰، ۳۰ و ۶۰ روز بعد از گرده‌افشانی ثبت شد. در این پژوهش به دلیل بروز سرمازدگی در اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۲ و از بین رفتن تمامی میوه‌ها، فقط مرحله اول و دوم شمارش انجام شد. برای گروه‌بندی و محاسبه ناسازگاری در ارقام و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بعد از انجام گرده‌افشانی، درصد تشکیل میوه زیر پنج درصد در مرحله ۳۰ روز بعد از گلدهی به‌عنوان وجود ناسازگاری کامل بین دانه گرده و مادگی منظور شد (Xu et al., 2010). برای ارزیابی طول مادگی و قطر تخمدان نیز در مرحله‌ی بالونی، گل‌های ارقام و ژنوتیپ‌های مورد نظر نمونه‌برداری و اندازه‌گیری شدند. در نهایت برای تجزیه آماری داده‌ها که شامل تجزیه واریانس، مقایسه میانگین‌ها، همبستگی پیرسون بین صفات از نرم‌افزارهای SPSS و Excel استفاده شد.

قسمت دوم شامل آزمایش‌های مبتنی بر PCR بود. DNA ژنومی مواد گیاهی مورد استفاده بر اساس روش CTAB تغییر یافته (VorhBi et al., 1996) استخراج و کمیت و کیفیت DNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و هم‌چنین دستگاه نانودراپ و جذب هر نمونه در ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر تعیین شد. واکنش

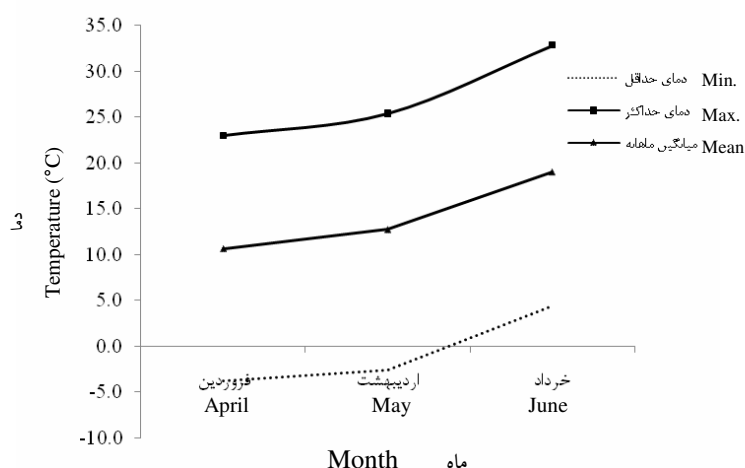
PCR در حجم ۲۵µl شامل ۹۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۱ برابرغلظت بافر PCR، ۲ میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۰/۱ میلی‌مولار مخلوط نوکلئوتیدها، ۰/۲ میکرومولار ازهر آغازگر و ۱ واحد آنزیم Taq پلی‌مرز انجام شد. چرخه دمایی مورد استفاده برای آغازگرهای Pru-c₂ و Pru-c₄ شامل یک چرخه ۳ دقیقه‌ای در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ چرخه با ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در پایان ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود (Sonnevald et al., 2003). الگوی دمایی مورد استفاده برای آغازگرهای Pru-c₂ و PCER شامل یک چرخه ۳ دقیقه‌ای در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ چرخه با ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در دمای ۵۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ دقیقه سانتی‌گراد بود (Tao, 2002). الکتروفورز محصول PCR در بافر TAE (1X) (Tris/Acetic acid/EDTA) در تانک الکتروفورز انجام و برای جداسازی فراورده‌های افزوده شده از ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد. درون هر چاهک ۱۰ میکرولیتر محصول PCR به اضافه ۷ میکرولیتر رنگ و ۵ میکرولیتر ژل‌رد (Gel red) بارگذاری شد. اندازه (جفت باز) نوارهای به دست آمده با استفاده از

اول سال ۱۳۹۲ بر اساس آمار هواشناسی ایستگاه سینوپتیک زنجان ارائه شده است (شکل ۱). بر اساس همین آمار، تعداد روزهای یخبندان در اردیبهشت ماه ۱۳۹۲ دو روز بود. لیست آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش در جدول ۲ آورده شده است.

سایزمارکر استاندارد تعیین شد. عکس برداری از ژل آگارز بعد از اتمام الکتروفورز با دستگاه ژل داک و زیر نور ماوراء بنفش انجام شد.

نتایج و بحث

میانگین، حداکثر و حداقل دمای سه ماهه



شکل ۱- دمای حداکثر، حداقل و میانگین سه ماهه اول سال ۱۳۹۲ (اداره هواشناسی شهرستان زنجان)

Fig.1. Maximum, minimum and mean temperature in 2013 (Meteorology Office of Zanjan)

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر قطعاتی از ژن‌های کنترل کننده خودناسازگاری

Table 1. The primers used to amplify fragments of genes involved in self-incompatibility

آغازگرها	توالی	منبع
Primers	Sequence (5'-3')	Reference
Pru-c ₂ /Pru-c ₄	TGG CCA AGT CTT AAT TAT TCA AAC C/ GGA TGT GGT ACG ATT GAA GGG	Sonnevald <i>et al.</i> (2003)
Pru-c ₂ /PCER	TGG CCA AGT CTT ATT TAT TCA AAC C/ TGT TTG TTC CAT TCG CYT TCC C	Tao <i>et al.</i> (2002)

۹۱/۸۳ درصد بیشترین و رقم شاهرودی با میانگین ۷۳/۴۱ درصد کمترین درصد تندش دانه گرده را داشتند. (جدول ۲). مقایسه میانگین صفات اندازه گیری شده نشان داد که رقم شاهرودی و ژنوتیپ C دارای بیشترین طول

بر اساس نتایج مقایسه میانگین صفات اندازه گیری شده مشخص شد که درصد تندش دانه گرده در بین ارقام و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به صورت میانگین حدود ۷۳ تا ۹۲ درصد بود، که رقم بادامی با میانگین

جدول ۲- مقایسه میانگین صفات اندازه گیری شده در شش رقم و ژنوتیپ زردآلو
Table 2. Mean comparison of measured traits in six apricot cultivars and genotypes

Cultivar	رقم	طول مادگی	قطر تخمدان	درصد تشکیل میوه اولیه	درصد تشکیل میوه ثانویه	جوانه زنی دانه گرده
		Pistil length (mm)	Ovary thickness (mm)	Initial fruit set (%)	Secondary fruit Set(%)	Pollen germination (%)
Badami	بادامی	12.70d	1.98a	16.53c	6.61c	91.83a
Shahroodi	شاهرودی	14.87a	2.22a	53.08a	17.72a	73.41b
Sekarpereh	شکرپاره	13.53c	1.47c	47.37b	12.28b	73.90b
Daneshkadeh	دانشکده	12.77d	1.72b	51.62ab	17.14a	82.46ab
Genotype C	ژنوتیپ C	14.27b	2.12a	55.92a	18.07a	81.03ab
Genotype D	ژنوتیپ D	12.17e	1.37c	3.24d	0.34d	76.80b

میانگین‌ها با حروف مشابه در هر ستون فاقد اختلاف معنی دار هستند.

Means with similar letters in each column are not significantly different.

تشکیل میوه نیز در مواردی مشاهده شد که در آن‌ها ژنوتیپ D به عنوان والد پدری (گرده‌دهنده) مطرح بود.

در شکل‌های ۲ و ۳ میزان کارایی آغازگرهای مورد استفاده جهت تکثیر قطعات کروموزومی جایگاه ژنی S در نمونه‌های مورد آزمایش نشان داده شده است. بررسی آلل‌های S با استفاده از آغازگرهای Pru-c₂ و Pru-c₄ توانست در تمامی ارقام و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه دو آلل را شناسایی کند. در ارقام بادامی، شکرپاره و ژنوتیپ C نوارهای تکثیر شده مشابه بودند، رقم شاهرودی دارای یک آلل مشابه با ارقام بادامی، شکرپاره، دانشکده و ژنوتیپ C بود (شکل ۲). الگوهای نواری حاصل از آغازگرهای Pru-c₂ و PCER نشان داد که در ارقام بادامی، دانشکده و ژنوتیپ C دو آلل و در ارقام شاهرودی، شکرپاره و ژنوتیپ D فقط یک نوار تکثیر شد. بر اساس الگوهای نواری

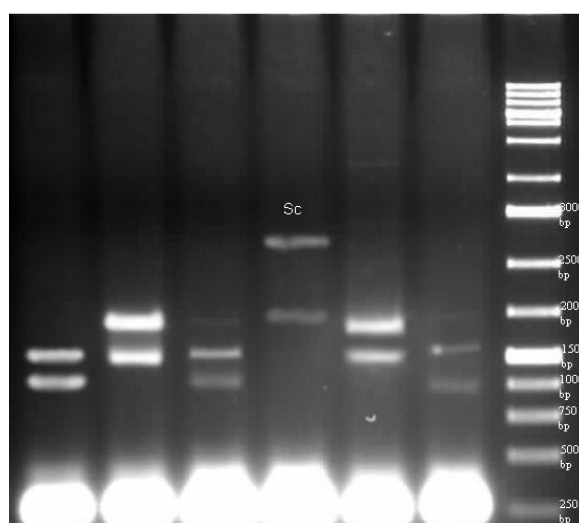
مادگی با میانگین (به ترتیب ۱۴/۸۷ و ۱۴/۲۷ میلی‌متر) و بیشترین قطر تخمدان با میانگین (۲/۲۲ و ۲/۱۲ میلی‌متر) و ژنوتیپ C و رقم شاهرودی به ترتیب با ۵۵/۹۲ و ۵۳/۰۸ درصد دارای بالاترین درصد تشکیل میوه بودند (جدول ۲). نتایج همبستگی پیرسون بین داده‌ها نشان داد که روابط مثبت و معنی داری بین طول مادگی و قطر تخمدان (۰/۶۹۷)، طول مادگی و درصد تشکیل میوه در مرحله اول و دوم (به ترتیب ۰/۷۵۶ و ۰/۷۳۴) وجود داشت (جدول ۳). نتایج درصد تشکیل میوه حاصل از تلاقی‌های مختلف در جدول ۴ ارائه شده است. با توجه به نتایج حاصل از شمارش میوه‌ها در مرحله دوم (۳۰ روز پس از گرده‌افشانی) مشخص شد که در چهار رقم بادامی، شاهرودی، شکرپاره، دانشکده و ژنوتیپ C، درصد تشکیل میوه حاصل از خودگرده‌افشانی بسیار ناچیز بود. بیشترین درصد

جدول ۳- نتایج همبستگی پیرسون صفات اندازه‌گیری شده در شش رقم و ژنوتیپ زردآلو
Table 3. The Pearson correlations results of determined traits in six apricot cultivars and genotypes

Traits	صفات	طول مادگی Pistil length	قطر تخمدان Ovary thickness	درصد تشکیل میوه اولیه Initial fruit set	درصد تشکیل میوه ثانویه Secondary fruit set
Ovary thickness	قطر تخمدان	0.69**			
Initial fruit set	درصد تشکیل میوه اولیه	0.75**	0.47*		
Secondary fruit set	درصد تشکیل میوه ثانویه	0.73**	0.57*	0.94**	
Pollen germination	جوانه‌زنی دانه گرده	-0.37	0.19	-0.21	-0.91

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪.

* and **: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively.



شکل ۲- الگوی نواری آلل‌های S در چند ژنوتیپ زردآلو با استفاده از آغازگرهای Pru-c₂/Pru-c₄

نمونه‌ها از چپ به راست: بادامی، شاهرودی، ژنوتیپ C، ژنوتیپ D، دانشکده، شکرپاره و نشانگر DNA.

Fig. 2. PCR amplification of S-alleles in apricot genotypes using primers Pru-c₂/Pru-c₄.
Samples from left to right : Badami, Shahroodi, Genotype C, Genotype D, Daneshkadeh, Shekarpareh and DNA ladder.

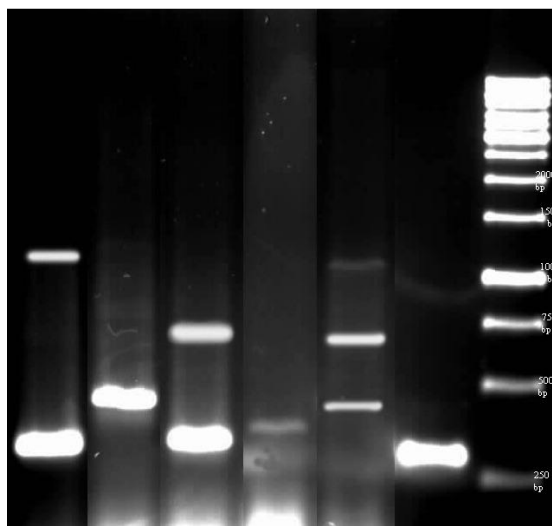
استفاده آن‌ها در برنامه تلاقی‌ها محرز شد. با توجه به میزان درصد تندش دانه گرده می‌توان گفت که هیچ کدام از ارقام دارای نر عقیمی نبودند. البته در مورد زردآلو نتایج بسیاری از تحقیقات در این زمینه نشان داده که اکثر ارقام به استثنای چند رقم نر عقیم از قدرت جوانه‌زنی و رشد لوله گرده خوبی

حاصل، رقم بادامی و ژنوتیپ C، رقم دانشکده و ژنوتیپ C و رقم شاهرودی با رقم دانشکده دارای یک آلل مشابه بودند (شکل ۳).

قوه نامیه و رشد لوله گرده در ارقام و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه برای تلاقی‌های متقابل نشان داد که عموماً دانه گرده ژنوتیپ‌ها دارای درصد قابل قبولی از قوه نامیه بودند، لذا قابلیت

جدول ۴- نتایج تشکیل میوه در شش رقم و ژنوتیپ زردآلو در تلاقی‌های متقابل
 Table 4. Fruit set percentage obtained from reciprocal crosses of six apricot cultivars and genotypes

والد مادری Mother plant	والد پدری Pollinizer	درصد تشکیل میوه پس از ۳۰ روز (%) Fruit set after 30 days	توضیحات Explanations	
بادامی Badami (B)	B	بادامی	1.03 Self- Incompatible	خودناسازگار
	Shah.	شاهرودی	9.50 Compatible	تلاقی سازگار
	Shek.	شکرپاره	4.23 Compatible	تلاقی ناسازگار
	D	دانشکده	7.60 Compatible	تلاقی سازگار
	G C	ژنوتیپ C	2.58 Compatible	تلاقی ناسازگار
	G D	ژنوتیپ D	19.10 Compatible	تلاقی سازگار
شاهرودی Shahroodi (Shah.)	Shah.	شاهرودی	1.42 Self- Incompatible	خودناسازگار
	B	بادامی	7.05 Compatible	تلاقی سازگار
	Shek.	شکرپاره	9.10 Compatible	تلاقی سازگار
	D	دانشکده	7.10 Compatible	تلاقی سازگار
	G C	ژنوتیپ C	9.43 Compatible	تلاقی سازگار
	G D	ژنوتیپ D	13.40 Compatible	تلاقی سازگار
شکرپاره Shekarpareh (Shek.)	Shek.	شکرپاره	2.09 Self- Incompatible	خودناسازگار
	B	بادامی	2.90 Compatible	تلاقی ناسازگار
	Shah.	شاهرودی	9.22 Compatible	تلاقی سازگار
	D	دانشکده	9.82 Compatible	تلاقی سازگار
	G C	ژنوتیپ C	3.06 Compatible	تلاقی ناسازگار
	G D	ژنوتیپ D	20.19 Compatible	تلاقی سازگار
دانشکده Daneshkadeh (D)	D	دانشکده	2.87 Self- Incompatible	خودناسازگار
	B	بادامی	8.73 Compatible	تلاقی سازگار
	Shah.	شاهرودی	8.56 Compatible	تلاقی سازگار
	Shek.	شکرپاره	7.10 Compatible	تلاقی سازگار
	G C	ژنوتیپ C	9.20 Compatible	تلاقی سازگار
	G D	ژنوتیپ D	23.00 Compatible	تلاقی سازگار
ژنوتیپ C Genotype C (G C)	G C	ژنوتیپ C	2.90 Self- Incompatible	خودناسازگار
	B	بادامی	2.28 Compatible	تلاقی ناسازگار
	Shah.	شاهرودی	8.60 Compatible	تلاقی سازگار
	Shek.	شکرپاره	3.42 Compatible	تلاقی ناسازگار
	D	دانشکده	7.70 Compatible	تلاقی سازگار
	G D	ژنوتیپ D	23.10 Compatible	تلاقی سازگار
ژنوتیپ D Genotype D (G D)	G D	ژنوتیپ D	10.33 Self- Incompatible	خودسازگار
	B	بادامی	9.04 Compatible	تلاقی سازگار
	Shah.	شاهرودی	12.79 Compatible	تلاقی سازگار
	Shek.	شکرپاره	10.44 Compatible	تلاقی سازگار
	D	دانشکده	13.77 Compatible	تلاقی سازگار
	G C	ژنوتیپ C	10.02 Compatible	تلاقی سازگار



شکل ۳- الگوی نواری آلل‌های S در چند رقم زردآلو با استفاده از آغازگرهای Pru-c₂/PCER

نمونه‌ها از چپ به راست: بادامی، شاهرودی، ژنوتیپ C، ژنوتیپ D، دانشکده، شکرپاره و نشانگر DNA.
Fig. 3. PCR amplification of S-alleles in apricot cultivars using primers Pru-c₂/PCER.
Samples from left to right : Badami, Shahroodi, Genotype C, Genotype D, Daneshkadeh, Shekarpareh and DNA ladder.

یافت (جدول ۳). این نتایج با یافته‌های نایکی (Nyeki, 1980) همخوانی داشت.

نتایج درصد تشکیل میوه حاصل از کرده‌افشانی کنترل شده در باغ و آزمایش‌های مبتنی بر PCR با استفاده از هر دو جفت آغازگرها نشان داد که تمام ارقام و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به جز ژنوتیپ D خودناسازگار هستند. زیرا درصد تشکیل میوه در آن کم‌تر از سه درصد نشانه خودناسازگاری بود و مشاهده نواری آلل S موجود در الگوهای نواری حاصل از استفاده هر دو نوع آغازگر نیز نشان‌دهنده این امر بود. این نتایج با گزارش‌های موجود در مورد رقم شاهرودی همخوانی دارد (Neknam *et al.*, 2010)؛ Nejatian and Arzani, 2004

برخوردارند (Egea *et al.*, 1992)؛ Gharesheikhsbayat *et al.*, 2011).

با توجه به نتایج مقایسه میانگین صفات اندازه‌گیری شده، مشخص شد که رقم شاهرودی و ژنوتیپ C دارای بیشترین طول مادگی، قطر تخمدان و بالاترین درصد تشکیل میوه بودند. با این نتایج به نظر می‌رسد این ارقام فاقد ماده‌عقیمی هستند. نتایج همبستگی پیرسون نشان‌دهنده همبستگی مثبت معنی‌دار بین صفات طول مادگی با قطر تخمدان و طول مادگی با درصد تشکیل میوه بود، بنابراین ارقام و ژنوتیپ‌هایی که دارای قطر تخمدان بزرگ‌تری بودند، مادگی‌های سالم‌تر با طول بیشتری داشتند و همچنین با افزایش طول مادگی، درصد تشکیل میوه در این ارقام و ژنوتیپ‌ها افزایش

از گرده‌افشانی موفق‌تر در باغ استفاده شود. برای اولین بار آگه و همکاران (Egea *et al.*, 1992) دگرناسازگاری را در بین دو رقم زردآلوی اسپانیایی "مونیک‌فینو" و "مونیک‌بورد" گزارش کردند. در بررسی دیگر آگه و برگوس (Egea and Burgos, 1996) به این نتیجه رسیدند که ارقام "هارگرنند"، "گلدریچ" و "لامبرتین‌یک" دگرناسازگار هستند.

با توجه به الگوی نواری حاصل از آغازگرهای Pru-c₂ و Pru-c₄، رقم شاهرودی دارای یک آلل مشترک با ارقام بادامی، شکرپاره، دانشکده و ژنوتیپ C است، که بر این اساس این ارقام و ژنوتیپ‌ها کاملاً با یکدیگر سازگار نیستند. درصد تشکیل میوه حاصل از تلاقی متقابل بین این ارقام و ژنوتیپ‌ها نیز کم‌تر از ۱۰ درصد بود که این موجب تایید نتایج حاصل از آزمایش‌های مبتنی بر PCR است. بر اساس الگوهای نواری تکثیر شده توسط هر دو جفت آغازگر، ژنوتیپ D دارای آلل‌های کاملاً متفاوت با سایر ارقام و ژنوتیپ‌ها بود، همچنین درصد بالای تشکیل میوه حاصل از تلاقی‌های متقابل بین این ژنوتیپ و سایر ارقام و ژنوتیپ‌ها نشان‌دهنده این امر بود. به همین جهت این ژنوتیپ می‌تواند گرده‌دهنده مناسبی برای این ارقام و ژنوتیپ‌ها باشد. انجام تلاقی دو طرفه در صورتی که به همراه تجزیه و تحلیل نتایج حاصل برای صفت مورد ارزیابی باشد، برای تعیین روابط بین آلل‌های مکان ژنی و تعیین والد کنترل‌کننده صفت مورد نظر است. ولی در

(Hajilu *et al.*, 2006). تشکیل میوه بیش از ۱۰ درصد حاصل از خودگرده‌افشانی و تکثیر آلل Sc (Self-compatible) در ژنوتیپ D دلیل خودسازگار بودن این ژنوتیپ است، زیرا آغازگرهای Pru-c₂ و Pru-c₄ قادر به شناسایی آلل Sc بودند. در ژنوتیپ D آغازگرهای Pru-c₂ و Pru-c₄ توانستند دو آلل را تکثیر کنند، که یکی از این آلل‌ها با اندازه تقریباً ۲۸۰۰ (bp) آلل Sc بود (Hajilu *et al.*, 2005)، در صورتی که با استفاده از آغازگرهای Pru-c₂ و PCER تنها یک آلل تکثیر شد. بنابراین چنین نتیجه‌گیری می‌شود که این ژنوتیپ برای آلل‌های خودسازگار هموزیگوت نیست، بلکه به عنوان یک رقم خودسازگار هتروزیگوت مطرح است. حاجیلو و همکاران (۲۰۰۶) رقم قربان مراغه را به عنوان رقم خودسازگار هتروزیگوت معرفی کردند، زیرا با استفاده از آغازگرهای SRC-F و SRC-R در این رقم تنها یک آلل، اما با استفاده از آغازگرهای Pru-c₂ و Pru-c₄ دو آلل تکثیر شد.

با توجه به این که در ارقام بادامی، شکرپاره و ژنوتیپ C به عنوان ارقام خودناسازگار در الگوی نواری حاصل از آغازگرهای Pru-c₂ و Pru-c₄، دارای آلل‌های S یکسان بودند و همچنین درصد تشکیل میوه حاصل از تلاقی متقابل بین آن‌ها پایین بود، بنابراین احتمال وجود دگرناسازگاری در بین این ارقام و ژنوتیپ‌ها بالا بوده و در صورت کاشت همراه با هم، بهتر است از ارقام دیگر به عنوان اطمینان

براساس فنوتیپ ارقام، درصد تشکیل میوه در شرایط باغ و همچنین آزمایش‌های مبتنی بر PCR با استفاده از آغازگرهای طراحی شده برای اینترون دوم به دست آمد. پیشنهاد می‌شود که برای تعیین دقیق‌تر ژنوتیپ‌های ناسازگار ضمن استفاده از رقم شاهد خودسازگار، از مطالعات میکروسکوپی، رشد لوله‌گرده درون خامه و بررسی مولکولی با استفاده از هر دو نوع آغازگرهای طراحی شده برای اینترون اول و دوم استفاده شود. همچنین توالی‌یابی قطعات نوکلئوتیدی برای شناسایی آلل‌های خودناسازگاری احتمالی جدید در بین ژنوتیپ‌های ایرانی انجام شود.

سپاسگزاری

از مسئولین پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII) برای فراهم کردن امکانات انجام آزمایش‌های مولکولی، سپاسگزاری می‌شود.

مطالعه حاضر هدف از تلاقی دو طرفه بیشتر برای افزایش دقت آزمایش مزرعه‌ای به‌عنوان تکراری از تلاقی و نیز حذف اثر احتمالی تاثیر ژن‌های سیتوپلاسمی در نتایج تلاقی بود. بر اساس مطالعه حاضر تفاوتی از نظر دگرناسازگاری بین ارقام در تلاقی‌های دوطرفه مشاهده نشد. برای مثال بین رقم شکره پاره و بادامی صرف نظر از این که کدام یک والد بذری و گرده باشد دگرناسازگاری وجود داشت.

در این پژوهش سعی شد با استفاده از روش گرده‌افشانی کنترل شده و بررسی درصد تشکیل میوه و همچنین آزمایش‌های مبتنی بر PCR در بین شش رقم و ژنوتیپ، ارقام خودناسازگار شناسایی شود. این هدف تقریباً، محقق شد به طوری که ارقام بادامی، شاهرودی، شکرپاره، دانشکده و ژنوتیپ C خودناسازگار و تنها ژنوتیپ D خودسازگار بود. همچنین ژنوتیپ D بهترین والد گرده‌دهنده برای ارقام و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بود. نتایج این پژوهش

References

- Dejampour, J., and Gerigurian, V. 2004. Effects of pollen type on some quantitative and qualitative characteristics of apricot fruit. Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 5: 1-10 (in Persian).
- Egea, J., and Burgos, L. 1996. Detecting cross-incompatibility of three North-American apricot cultivars and establishing the first incompatibility group in apricot. Horticultural Science 121: 1002-1005

- Egea, J., Garcia, E., Egea, L., and Berengure, T. 1992.** Self-incompatibility in apricot cultivars. *Acta Horticulturae* 293: 285-293.
- Faust, M. 1989.** *Physiology of Temperate-zone Fruit Trees*. John Wiley and Sons, New York, USA. 388pp.
- Franklin-Tong, V. E. 2008.** *Self-Incompatibility in Flowering Plants: Evolution, Diversity, and Mechanisms*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. 309pp.
- Gharesheikhyat, R., Dondini, L., and Sansavini, S. 2011.** Identification of self-incompatibility alleles in apricot (*Prunus armeniaca* L.) using multi-level approaches. *Seed and Plant Improvement Journal* 27-1: 411-426 (in Persian).
- Hajilu, J., Gerigurian, V., Mohammadi, S. A., Nazemie, A., and Borgus, L. 2006.** Pollen tube growth and fruit set percentage in two apricot cultivars under self and cross pollination conditions. *Iranian Journal of Horticultural Science and Technology* 7: 147-156 (in Persian).
- Hajilu, J., Mohammadi, S. A., Gerigurian, V., Nazemiye, A., and Burgos, L. 2005.** Identification of S-alleles in some apricot cultivars and their segregations in some genotypes using specific primers. *Iranian Journal of Horticultural Science and Technology* 6: 103-114 (in Persian).
- Halasz, J., Hededus, A., and Pedryc, A. 2006.** Review of the molecular background of selfincompatibility in rosaceous fruit trees. *International Journal of Horticultural Science* 12: 7-18.
- Janick, J., and Moore, J. N. 1996.** *Fruit Breeding: Volume 1, Trees and Tropical Fruits*. John Wiley and Sons, New York, USA. 297pp.
- Lillecrapp, A. M., Wallwork, M. A., and Sedgley, M. 1999.** Female and male sterility cause low fruit set in a clone of the Trevatt variety of apricot. *Scientia Horticulturae* 82: 255-263.
- Layne, R. E. G., Bailey, C. H., and Hough, L. F. 1996.** Apricots. pp. 79-111. In: Janick, J., and Moore, J. N. (eds.) *Fruit Breeding*. John Wiley and Sons, New York, USA.
- Mcclure, B.A., and Franklin-Tong, V. E. 2006.** Gametophytic self-incompatibility: Understanding the cellular mechanisms involved in self pollen tube inhibition. *Planta* 224: 233-254.

- Monselise, P. S. 1986.** CRC Handbook of Fruit Set and Development. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.
- Nejatian, M. A., and Arzani, K. 2004.** Determination of self-incompatibility and effective pollination period in four local Iranian apricot (*Prunus armeniaca*) cultivars. Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 5: 147-156 (in Persian).
- Nekoum, F., Fattahimoghadam, M., and Ebadi, A. 2010.** Investigation of incompatibility and infertility in four Iranian commercial cultivars of apricot. Iranian Journal of Horticultural Science 42: 1-9 (in Persian).
- Nyéki, J. 1980.** Gyümölcs fajtakvír agzasbiológijájé stermékenyülése. Mezogazdasági Kiado, Budapest. 433pp.
- 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., and Robbins, T. P. 2003.** Allele specific PCR detection of sweet cherry self-compatibility S alleles S1 to S16 using consequences and allele specific primers. Theoretical and Applied Genetics 107: 1059-1070.
- Tao, R., Habu T., Yamane, H., and Sugiura, A. 2000.** Molecular markers for self-compatibility in Japanese apricot (*Prunus mume*). HortScience 35: 1121-1123.
- Vilanova, S., Romero, C., Burgos, L., Liacer, G., and Badense, M. L. 2005.** Identification of self in-compatibility alleles in apricot (*Prunus armenicana* L.) by PCR and sequencing analysis. Journal of American Horticultural Science 130: 893-898.
- VorhBi, I., Hravetg, L., Chandelier, A., Mergiai, G., and Dujardin, P. 1996.** Improved RAPD amplification of recal citrant plant DNA by use of activated charcoal during DNA extraction. Plant Breeding 115: 205-206.
- Xu, J., Gao, Z., and Zhang, Z. 2010.** Identification of S-genotypes and novel S-RNase alleles in Japanese apricot cultivars native to China. Scientia Horticulturae 123: 459-463.

