به‌نژادی گیاهان زراعی و باغی
دوره ۱ ■ شماره ۲ ■ پاییز و زمستان ۱۳۹۲
صفحه‌های ۱۱۱-۱۲۲

شناسایی و انتخاب اولیهٔ نتاج خودسازگار در تلاقی‌های کنترل‌شدهٔ بادام با استفاده از آغازگر اختصاصی SFF-SFR

مسعود شاه‌مرادی[۱]، موسی رسولی*[۲]، یوسف حمید اوغلی[۳]، علی ایمانی[۴]، رضا فتوحی قزوینی[۳]

۱. کارشناس ارشد علوم باغبانی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه گیلان
۲. استادیار گروه مهندسی فضای سبز، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه ملایر (نویسنده مسئول مکاتبات*)
۳. هیئت علمی گروه باغبانی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه گیلان
۴. دانشیار بخش باغبانی، مؤسسهٔ تحقیقات اصلاح و تهیهٔ نهال و بذر کرج

تاریخ وصول مقاله: ۹۲/۳/۱۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۹۲/۱۰/۷

چکیده

خودناسازگاری در بادام و گونه‌های جنس آلوسانان یک مکانیسم مهم ژنتیکی است که به این گیاهان اجازه می‌دهد گردهٔ خودی یا گرده‌های مشابه را تشخیص دهند و سبب جلوگیری از خودباروری می‌شود. خودناسازگاری در بادام از نوع گامتوفیتیک است و توسط یک مکان ژنی چندآللی کنترل می‌شود. مطالعهٔ حاضر به‌منظور شناسایی و انتخاب اولیهٔ نتاج خودسازگار در تلاقی‌های کنترل‌شدهٔ بادام با استفاده از آغازگر اختصاصی SFF-SFR انجام شد. برخی صفات مهم مورفولوژیکی والدین تلاقی‌ها با استفاده از توصیفگر UPOV و IBPGR بادام ارزیابی شدند. همچنین نتاج F_1 حاصل از پنج ترکیب تلاقی شامل تلاقی‌های A (تونو× ژنوتیپ ۱۰۱)، B (سوپرنووآ× ژنوتیپ ۱۰۱)، C (ژینکو× شاهرود ۲۱)، D (تونو× ژنوتیپ ۱۲) و E (تونو× شاهرود ۱۷) با استفاده از روش PCR جهت تکثیر DNA و بررسی خودسازگاری، آزمایش شدند. نتایج حاصل از روش PCR با استفاده از آغازگر SFF-SFR نشان داد که نتاج خودسازگار نواری به اندازهٔ ٤٤٩ جفت باز نشان دادند که نتاج خودناسازگار فاقد این نوار بودند. علاوه بر این، تمامی ارقام خودناسازگار داخلی فاقد آلل S_1 بود و این آلل تحت هیچ شرایطی در والدین مادری (ارقام خودناسازگار داخلی) وجود نداشت.

کلیدواژه‌ها: آغازگر SFF-SFR، آلل Sf، آلل S1، بادام، خودناسازگاری، PCR.

* نویسنده مسئول
Email: m.rasouli@malayeru.ac.ir

مقدمه

بادام با نام علمی (*Prunusdulcis* (Mill.) D.A.Webb; syn. *P. amygdalus* Batsch) یکی از گونه‌های جنس آلوسانان و زیرجنس آمیگدالوس (خانوادهٔ رزاسه و زیرخانوادهٔ پرونوئیده) است که به‌طور تجاری در مناطق وسیعی از جهان کشت می‌شود. گونه‌های وحشی مختلفی در مناطق کوهستانی از کوه‌های « تیان شان» در غرب چین و در امتداد آن در مناطق کوهستانی تا بیابان‌های ترکمنستان و افغانستان در فلات ایران و عراق رویش می‌یابند (۹). خودناسازگاری در بادام یکی از مشکلات اساسی در تولید این محصول باارزش است و از سال‌های قبل در جهت حل آن تلاش‌های زیادی به‌عمل آمده است. اصولاً در گیاهان دو نوع خودناسازگاری دیده می‌شود که خودناسازگاری گامتوفیتیک و اسپورفیتیک نام دارند (۸). خودناسازگاری گامتوفیتی مشخصهٔ بسیاری ازگیاهان خانوادهٔ رزاسه ازجمله گیلاس، گلابی، سیب و بادام است. این ویژگی در مورد بادام به‌دلیل فراهم‌شدن اجرای سیستم تک‌کشت ارقام برتر در باغ حائز اهمیت است (۱۳). مطالعات اولیه برای تعیین آل‌های خودناسازگاری و تعیین گروه‌های خودناسازگار در بادام با استفاده از تلاقی‌های کنترل‌شده در شرایط مزرعه یا در شرایط آزمایشگاه انجام و نتایج حاصل از جوانه‌زنی و رشد لوله‌گرده و تلقیح توسط روش میکروسکوپ فلورسنس مطالعه می‌شود (۲ و ۱٤). بنابراین، استفاده از ژنوتیپ‌های وحشی و ارقام خودسازگار در گونه‌های جنس آلوسانان از مهم‌ترین روش‌های رفع مشکل خودناسازگاری در برنامه‌های دورگ‌گیری است (۱۳). در گیاهان خودناسازگار، در درون خامه، ریبونوکلئازهای خاصی از جنس گلیکوپروتئین که تحت عنوان S-RNase نامیده می‌شوند مانع از رشد لوله‌گرده در خامه می‌شوند (۲ و ۱٤). خودناسازگاری گامتوفیتیک در بادام از نوع تک‌ژنی است و در این حالت یک مکان ژنی به نام S ایجاد ناسازگاری می‌کند که این مکان ژنی چندین آلل دارد که ممکن است به‌صورت S_1، S_2،.....و S_n باشد. در این حالت شرط اساسی این است که آلل موجود در دانه‌گرده مشابه آلل موجود در خامه باشد (۱۳). اگر در یک فرد دیپلوئید به فرض آل‌های S_1 و S_2 موجود باشد و با یک فرد دارای آل‌های S_1 و S_3 تلاقی یابد دانه‌گرده S_1 ناسازگار با خامهٔ مورد نظر است و دانه‌گردهٔ حامل آن نمی‌تواند از خامه عبور کند و به تخمک‌ها برسد و آن‌ها را بارور کند ولی برای دانه‌گرده‌ای که آلل S_3 دارد مانعی وجود نخواهد داشت. براساس آخرین اطلاعات موجود، تا کنون ۳۲ آلل خودناسازگاری شناخته شده است که با شماره‌های S_1، S_2، S_3،..... و S_{32} مشخص شده‌اند (۷). آلل S_f به‌منزلهٔ تنها آلل خودسازگاری است که در این مورد آلل خودسازگار، فاقد فعالیت ریبونوکلئازی است و اجازهٔ رشد لوله‌گرده درون خامه را می‌دهد که نهایتاً لوله‌گرده به تخمدان می رسد و تخمک را بارور می کند، درصورتی‌که در ارقام خودناسازگار، وجود آلل مشابه در دانه‌گرده و خامه‌مادگی، سبب تولید ریبونوکلئاز شده و مانع رشد لوله‌گرده و رسیدن به تخمدان می‌شود (۲). خودناسازگاری در بادام اولین‌بار در سال ۱۹٤۵ توسط Almedia کشف شد (۲). هنگامی که در برنامه‌های اصلاحی بادام متوجه مسئلهٔ خودناسازگاری به‌منزلهٔ یک مشکل اساسی شدند، به رقم تونو[1] به‌منزلهٔ یک رقم خودسازگار در برنامه‌های دورگ‌گیری توجه شد. این رقم اولین‌بار در سال ۱۹۷۵ در منطقهٔ پوگلیا[2] واقع در کشور ایتالیا توسط گراسلی و اولیویر[3] معرفی شد (۵). به‌منظور شناسایی ژنوتیپ‌ها و ارقام خودسازگار از خودناسازگار و همچنین تعیین آل‌های S در بادام تا کنون روش‌های مختلفی ابداع شده

1. Tuono
2. Puglia
3. Grassely & Olivier

است که می‌توان به روش‌های زیر اشاره کرد (۳ و ۱۰):

۱. پوشاندن شاخه‌ها[1] و بررسی تشکیل شدن یا تشکیل‌نشدن میوه؛

۲. بررسی رشد لوله‌گرده به کمک میکروسکوپ فلورسنس؛

۳. آنالیز ریبونوکلئازهای خامه‌گل‌ها با روش NEPHGE[2]؛

٤. استفاده از روش PCR[3].

بین روش‌های ذکرشده جهت تشخیص ژنوتیپ‌های خودسازگار در مرحلهٔ نونهالی تنها می‌توان از روشPCR استفاده کرد و دیگر روش‌ها نیازمند بالغشدن گیاه و رسیدن به مرحلهٔ گلدهی است. استفاده از روش PCR برای تشخیص ژنوتیپ‌های خودسازگار توسط پژوهشگران مختلف (۱، ۳، ٤، ۸ و ١٦)انجام گرفته و در اکثر مناطق دنیا ژنوتیپ‌های خودسازگار بسیاری تولید شده است. توارث‌پذیری آلل خودسازگاری در نتاج بادام با استفاده از روش PCR و از طریق جفت آغازگر اختصاصی SF_F-SF_R نتاج حاصل از تلاقی رقم خودسازگار تونو با ارقام خودناسازگار فرانیس[4] و سوپرنووآ[5] ارزیابی شده است که نتایج حاصل، غربالگری مناسب از این طریق را نشان داده است (۸).

این پژوهش با هدف غربالگری ژنوتیپ‌های خودسازگار بادام جهت استفاده در برنامه‌های اصلاحی به‌منظور صرفه‌جویی در زمان و هزینه، با استفاده از روش PCR روی نتاج حاصل از دورگ‌گیری بین ارقام داخلی و خارجی انجام شده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

مواد گیاهی شامل والدین جمعیت‌ها یعنی ارقام ژینکو[6]، سوپرنووآ، تونو، شاهرود ۱۲، شاهرود ۱۷ و شاهرود ۲۱ و ژنوتیپ امیدبخش یعنی ژنوتیپ ۱۰۱' و نتاج حاصل از تلاقی آن‌ها بود که در نهالستان بخش باغبانی مؤسسهٔ تحقیقات اصلاح و تهیهٔ نهال و بذر کرج کشت شده‌اند. برخی اطلاعات مربوط به والدین و نتاج مطالعه‌شده حاصل از تلاقی آن‌ها در جدول۱ ذکر شده است. اندازه‌گیری صفات کمّی و کیفی برای صفات مختلف به‌روش‌های متفاوت و مناسب هر یک انجام شد. نمره‌دهی برخی صفات (جدول۲) براساس توصیفگر UPOV[7] و IBPGR[8] بادام (٦) انجام شد.

استخراج DNA

استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های برگی جوان توسعه‌یافته با استفاده از روش بهینه‌شده برای این گیاه (١٦) انجام شد. با این تفاوت که مقدار دو میکرولیتر بتا-مرکاپتواتانول بلافاصله بعد از کاربرد بافر استخراج اضافه شد. تعیین کمّیت و کیفیت DNA با استفاده از روش الکتروفورز DNA در ژل آگاروز تهیه‌شده به غلظت ۰/۸درصد در بافر TBE[9] و نیز روش اسپکتروفتومتری در طول موج‌های ٢٦٠ و ٢٨٠ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومترPerkin-Elmer، مدل EZ-201 انجام شد و غلظت یکسان از آن‌ها (۵ نانوگرم در میکرولیتر) تهیه شد. در پایان، DNA نمونه‌ها در دمای ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد تا زمان انجام PCR نگهداری شدند.

1. Bagging
2. Non Equilibrium PH Gradient Electro focusing
3. Polymerase Chain Reaction
4. Ferragnes
5. Supernova
6. Genco
7. International union for the Protection of new Varieties of plants
8. International Board for plant Genetic Resources
9. Tris Boric Acid EDTA

جدول۱. اسامی ترکیب‌های تلاقی ارقام و ژنوتیپ‌های بادام و برخی اطلاعات مربوط به آن‌ها

نام تلاقی	والد مادری (♀)	والد پدری (♂)	تعداد نتاج بررسی‌شده	ژنوتیپ‌های مورد انتظار
ژنوتیپ ۱۰۱× تونو (A)	ژنوتیپ ۱۰۱(S_xS_x)	تونو (S_1S_f)	۱۸	S_1S_X, S_fS_X
ژنوتیپ ۱۰۱ × سوپرنووآ (B)	ژنوتیپ ۱۰۱(S_xS_x)	سوپرنووآ (S_1S_f)	۱۲	S_1S_X, S_fS_X
شاهرود ۱۷ × تونو (C)	شاهرود ۱۷(S_xS_x)	تونو (S_1S_f)	۱۶	S_1S_X, S_fS_X
شاهرود ۲۱ × ژینکو (D)	شاهرود ۲۱(S_xS_3)	ژینکو (S_xS_f)	۱۶	$S_1S_X, S_fS_X, S_1S_3, S_fS_3$
شاهرود۱۲ × تونو (E)	شاهرود ۱۲(S_xS_3)	تونو (S_1S_f)	۱۲	$S_1S_X, S_fS_X, S_1S_3, S_fS_3$

جدول۲. لیست صفات ارزیابی‌شده و نحوهٔ اندازه‌گیری آن‌ها در نمونه‌های بادام بررسی‌شده براساس توصیفگر بادام (Gulcan, 1985)

شماره	صفت	واحد	روش اندازه‌گیری
۱	تراکم شاخه و برگ	کد	۳= تنک، ۵= متوسط، ۷= متراکم
۲	قدرت رشدی درخت	کد	۳= ضعیف، ۵= متوسط، ۷= قوی
۳	زمان گلدهی	کد	۱= بیش‌ازحد زود، ۲= خیلی‌زود، ۳= زود، ۴=زود تا متوسط، ۵= متوسط، ۶= متوسط تا دیر، ۷=دیر، ۸= خیلی‌دیر، ۹= بیش‌ازحد دیر
۴	سطح برگ	میلی‌مترمربع	دستگاه اندازه‌گیری سطح برگ
۵	زمان رسیدن میوه	کد	۱= بیش‌ازحد زود، ۳= زود، ۵= متوسط، ۷= دیر، ۹= بیش‌ازحد دیر
۶	طول خشک میوه	سانتی‌متر	کولیس
۷	عرض خشک میوه	سانتی‌متر	کولیس
۸	وزن خشک میوه	گرم	ترازوی دیجیتال
۹	سختی یا نرمی پوست چوبی	کد	۱= خیلی‌سخت، ۳= سخت، ۵= نیمه‌سخت، ۷= نازک، ۹= کاغذی
۱۰	وزن مغز	گرم	ترازوی دیجیتال
۱۱	درصد مغز	درصد	وزن صد عدد مغز به صد عدد خشک میوه
۱۲	درصد دوقلویی مغز	درصد	تعداد مغزهای دوقلو در نمونه صدتایی
۱۳	رنگ مغز	کد	۱= خیلی‌روشن، ۳= روشن، ۵= متوسط، ۷= تیره، ۹= خیلی‌تیره

جدول۳. مشخصات آغازگر استفاده‌شده برای تعیین آلل S_f در بادام

منبع	دمای اتصال	آلل‌های قابل تشخیص	اندازهٔ نوار(bp)	ترکیب آغازگر	توالی ۵′ ⟶ ۳′	آغازگر
(۳)	۶۰ درجه سانتی‌گراد	S_f	٤٤٩	SfF/SfR	GTGCCCTATCTAATTTGTTGAC	SfF
					GACTTTTTTTTAGAAAGAGTG	SfR

آغازگر استفاده‌شده

مشخصات ترکیب آغازگر استفاده‌شده در این پژوهش ازجمله توالی و دمای اتصال در جدول۳ ذکر شده است.

شرایط، نحوهٔ انجام واکنش PCR و الکتروفورز

از نمونه‌های DNAی نگهداری‌شده در فریزر، ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر برای استفاده در واکنش PCR برداشت شد. در مخلوط PCR اجزای واکنش شامل یک واحد آنزیم Taq پلیمراز، 3mM $MgCl_2$ (۱/۵ میکرولیتر)، mM dNTPs ۰/٤، ۰/٦۲۵ میکرومولار از هر پرایمر (پسرو و پیشرو) و ۱۰ نانوگرم DNA ی ژنومی بود. درنهایت حجم نهایی با آب دو بار تقطیر استریل به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. سپس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Bio-Rad مدل i-Cycler در پژوهشکدهٔ ملی ژنتیک ایران انجام شد. برنامهٔ PCR در این واکنش شامل سه دقیقه در دمای ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد جهت واسرشته‌سازی اولیه، در ادامه ۳٤ چرخه با شرایط ۳۰ ثانیه دردمای۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد، ٤۵ ثانیه در دمای ۵۳ درجهٔ سانتی‌گراد و سپس یک دقیقه در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد و پس از اتمام چرخه‌ها، ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد، انجام شد. پس از پایان PCR، محصول آن در چهار درجهٔ سانتی‌گراد (یخچال) تا زمان الکتروفورز نگهداری شدند. محصول PCR با استفاده از آگاروز دودرصد و بافر TBE در شدت جریان ۱۲۵ ولت و با استفاده از سایز مارکر ۱۰۰bp ارزیابی شدند. بعد از پایان الکتروفورز، ژل با اتیدیوم بروماید (یک میکروگرم در میلی‌لیتر) رنگ‌آمیزی و قطعات تکثیریافته DNA تحت نور UV توسط دستگاه ژل داک مشاهده و عکس‌برداری از ژل صورت گرفت. همچنین جهت آزمون معناداری نتایج به‌دست‌آمده از نتاج حاصل از تلاقی و مطابقت آن‌ها با نسبت‌های مندلی از آزمون کای‌اسکور (χ^2) استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج به‌دست‌آمده از اندازه‌گیری صفات ارزیابی‌شده در والدین تلاقی‌های بررسی‌شده در جدول٤ ارائه شده است. ازجمله صفات مهم می‌توان به صفت زمان گلدهی در بین ارقام مطالعه‌شده اشاره کرد که بین والدین جمعیت‌های مطالعه‌شده رقم شاهرود ۱۲ دیرگل‌ترین رقم بود. همچنین ارقام سوپرنووآ و شاهرود ۱۷ نیز جزء ارقام دیرگل بودند. با توجه به این مطلب جهت به‌دست‌آوردن نتاج دیرگل انتخاب والدین دیرگل از بین ارقام ذکرشده با درنظرگرفتن سایر صفات بررسی شده توصیه می‌شود. همچنین ارقام تونو و سوپرنووآ خودسازگارند که جهت به‌دست‌آوردن نتاج خودسازگار هموزایگوت تلاقی این دو رقم پیشنهاد می‌شود.

جدول ٤. برخی ویژگی‌های مهم والدین استفاده‌شده در جمعیت‌های بادام حاصل از تلاقی‌های کنترل‌شده براساس توصیفگر بادام (٦)

ردیف	رقم یا ژنوتیپ	منشأ	زمان گلدهی	قدرت رشد	تراکم شاخه و برگ	سطح برگ	وزن خشک میوه	طول خشک میوه	عرض خشک میوه	وزن مغز	رنگ مغز	درصد دوقلویی	درصد مغز	سختی پوست چوبی	زمان رسیدن
	کشور		کد	کد	کد	mm^2	گرم	cm	cm	گرم	کد	درصد	درصد	کد	کد
١	تونو	ایتالیا	٥	٧	٧	١١٥١/٠١	٣/٩٦	٣/٠٨	٣/٣٨	١/٢٣	٣	١٢	٤٠	٣	٣
٢	ژینکو	ایتالیا	٦	٣	٥	١٠٢٩/٢٥	٢/١٤	٢/٧٠	٢/١٠	١/٠٣	٣	٣٥/٠٠	٤٨/١٣	٣	٥
٣	١٠١	ایران	٥	٧	٧	٦٥٢/٤١	١/٢	٢/٩٦	١/٩٠	٠/٧٤	٣	١٠	٣٨	١	٥
٤	سوپرنوو	ایتالیا	٧	٧	٥	١٠٩١/٨٣	٤/٠٦	٣/٤٧	٢/٦٣	١/٢٥	١	٨	٣٨	٣	٥
٥	شاهرود١٢	نانشناخ	٩	٥	٧	١٥١٢/٣٢	٦/٢١	٣/٩٧	٢/٧٤	١/٩٦	٥	٠	٣٢	٣	٥
٦	شاهرود١٧	نانشناخ	٧	٧	٧	١٢٠٧/٤٧	١/٩١	٢/٦٣	١/٩٧	٠/٧٥	٥	٢	٤٠	٥	٧
٧	شاهرود٢١	نانشناخ	٥	٥	٧	٨٦٠/٣٧	٣/٣٥	٢/٧١	٢/٠٤	١/٠٤	٢	١٥	٤٥	٣	٣

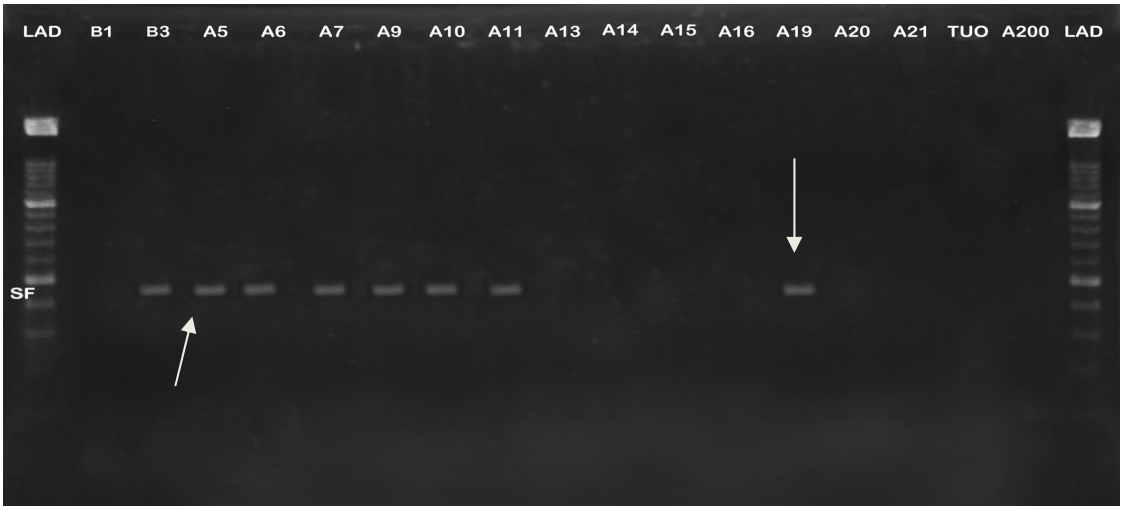
برای غربالگری نتاج خودسازگار و خودناسازگار، تعداد ۷٤ نتاج حاصل از دورگ‌گیری مطالعه شدند. براساس نتایج به‌دست‌آمده (جدول۵) برخی از نتاج تمام پنج ترکیب تلاقی بررسی‌شده آلل S_f (آلل عامل ایجاد خودسازگاری) داشتند. تعداد نتاج خودسازگار با توجه به نامعلوم‌بودن آلل S والدین مادری مطابق نسبت‌های مندلی بود. براساس اصول مندلی انتظار می‌رفت که نیمی از نتاج خودسازگار و نیمی دیگر نتاج خودناسازگار باشند که تقریباً همین نسبت در تمامی گروه‌های تلاقی به‌دست آمد (جدول۵). در پنج گروه تلاقی بررسی‌شده پس از انجام آزمون کای‌اسکور χ^2 مشخص شد که نتایج به‌دست‌آمده مطابق انتظار بوده است و در هر یک از گروه‌های آزمایش‌شده براساس نتایج آماری نیمی از نتاج خوناسازگارند که با نسبت‌های مندلی مطابقت داشت. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که والدین مادری در پنج گروه تلاقی بررسی‌شده آلل S_f نداشت.

نتایج نشان داد که وجود نواری به اندازهٔ ٤٤۹bp در عکس گرفته‌شده با استفاده از دستگاه عکس‌برداری بیانگر وجود آلل خودسازگاری (S_f) در آن ژنوتیپ است که با نتایج پژوهشگران مختلف مطابقت دارد (۳،۱، ٤، ۷ و ۸). در تلاقی حاصل از هیبرید A (تونو × رقم ۱۰۱) از ۱۸ عدد هیبرید بررسی‌شده در نه نمونه آلل مربوط به خودسازگاری دیده شد. همچنین در تلاقی B (سوپرنووآ × رقم ۱۰۱) از تعداد ۱۲ نمونه موجود هفت تا از نتاج خودسازگار بوده و باقی دیگر خودناسازگار بودند (شکل۱).

جدول۵. بررسی نتاج حاصل از تلاقی‌های مختلف به‌روش PCR با استفاده از آزمون χ^2

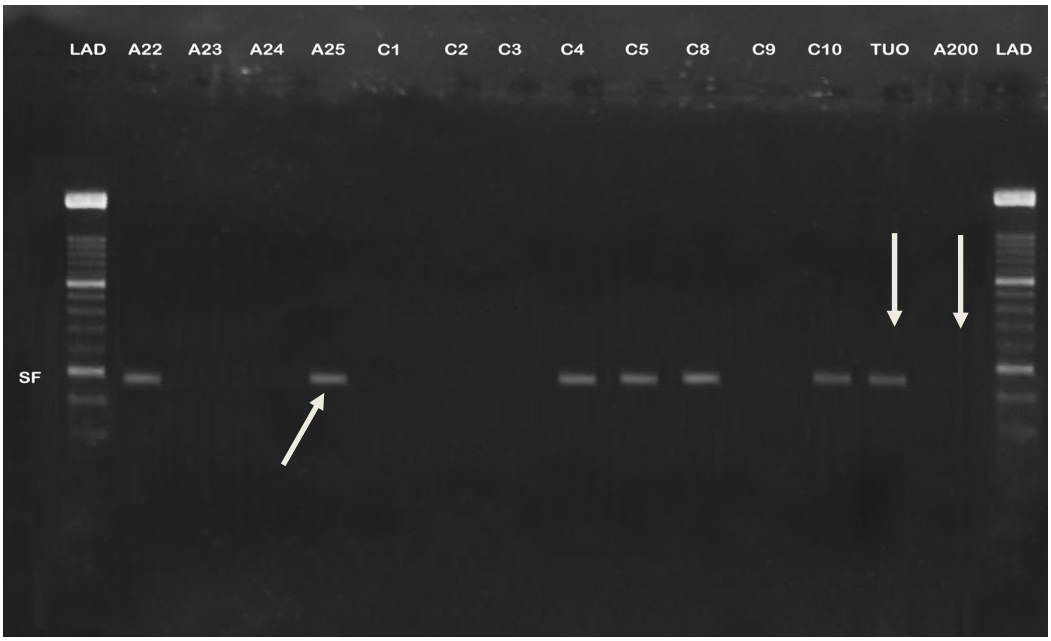
نام تلاقی‌های بررسی‌شده	تعداد نتاج بررسی‌شده	ژنوتیپ والدین تلاقی (♀) × (♂)	ژنوتیپ‌های مورد انتظار	ژنوتیپ‌های به‌دست‌آمده	χ^2
نتاج تلاقی گروه اول (A)	۱۸	$(S_xS_x) \times (S_1S_f)$	S_1S_X[1] S_fS_X	۹ ۹	۰/۰۰ ns
نتاج تلاقی گروه دوم (B)	۱۲	$(S_xS_x) \times (S_1S_f)$	S_1S_X S_fS_X	۷ ۵	۰/۱٦٦ ns
نتاج تلاقی گروه سوم (C)	۱٦	$(S_xS_x) \times (S_1S_f)$	S_1S_X S_fS_X	۱۰ ٦	۰/۵۰۰ ns
نتاج تلاقی گروه چهارم (D)	۱٦	$(S_xS_3) \times (S_1S_f)$	S_1S_X, S_1S_3 S_fS_X, S_fS_3	۹ ۷	۰/۱۲۵ ns
نتاج تلاقی گروه پنجم (E)	۱۲	$(S_xS_3) \times (S_1S_f)$	S_1S_X, S_1S_3 S_fS_X, S_fS_3	۸ ٤	۰/٦٦۷ ns

۱-S_X منظور تمام والدین و نتاجی هستند که لااقل یک آلل آن S_f نیست. ns: غیرمعنادار.

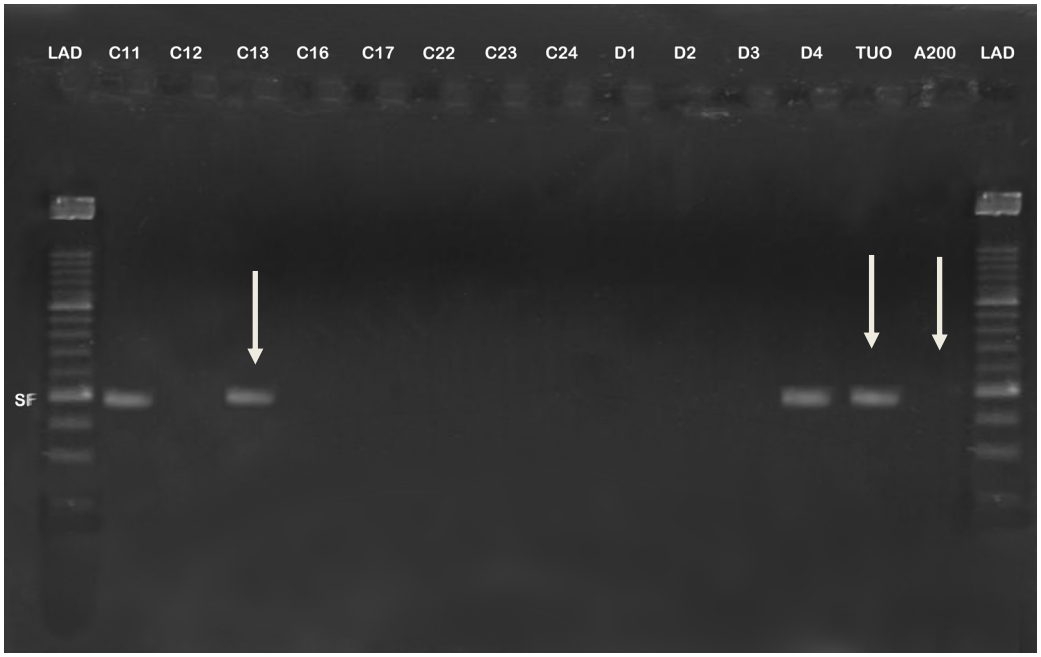


شکل۱. آلل مربوط به خودسازگاری (S*f*) در تعدادی از نتاج حاصل از تلاقی‌های A (تونو × رقم ۱۰۱) و B (سوپرنوواَ × رقم ۱۰۱).

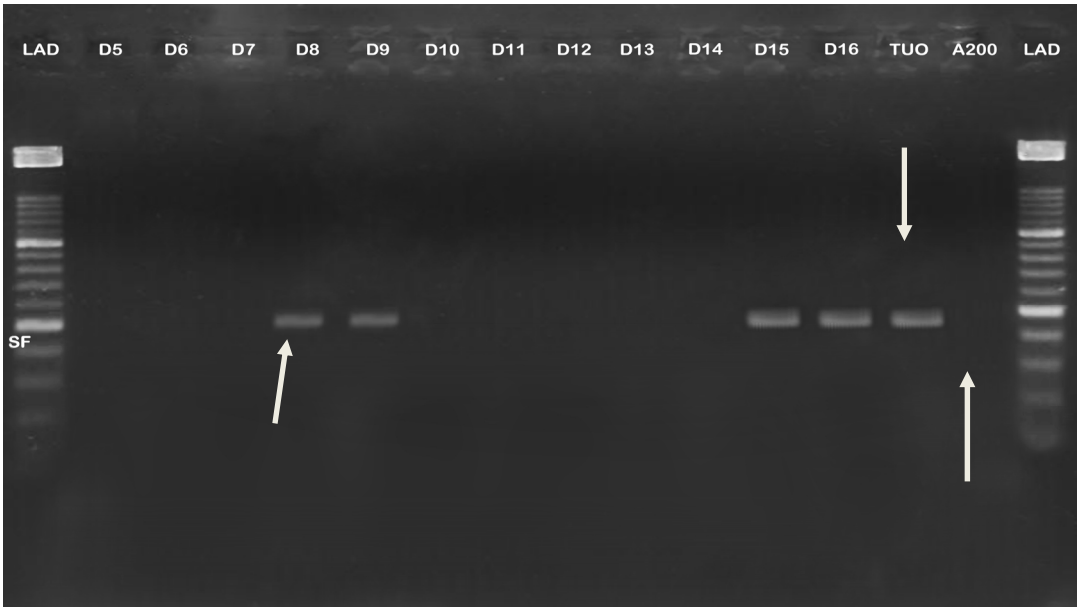
بر این اساس تعداد شش نتاج از ۱٦ نمونهٔ گیاهی تلاقی C (تونو × شاهرود ۱۷) و تعداد هفت نتاج از ۱٦ نمونهٔ گیاهی تلاقیD (شاهرود ۲۱ × ژینکو) و تعداد چهار نتاج از ۱۲ نمونهٔ گیاهی تلاقی E (تونو × شاهرود ۱۲) خودسازگار و بقیهٔ ژنوتیپ‌ها خودناسازگار بودند (شکل‌های ۲، ۳، ٤، ٥ و ٦).



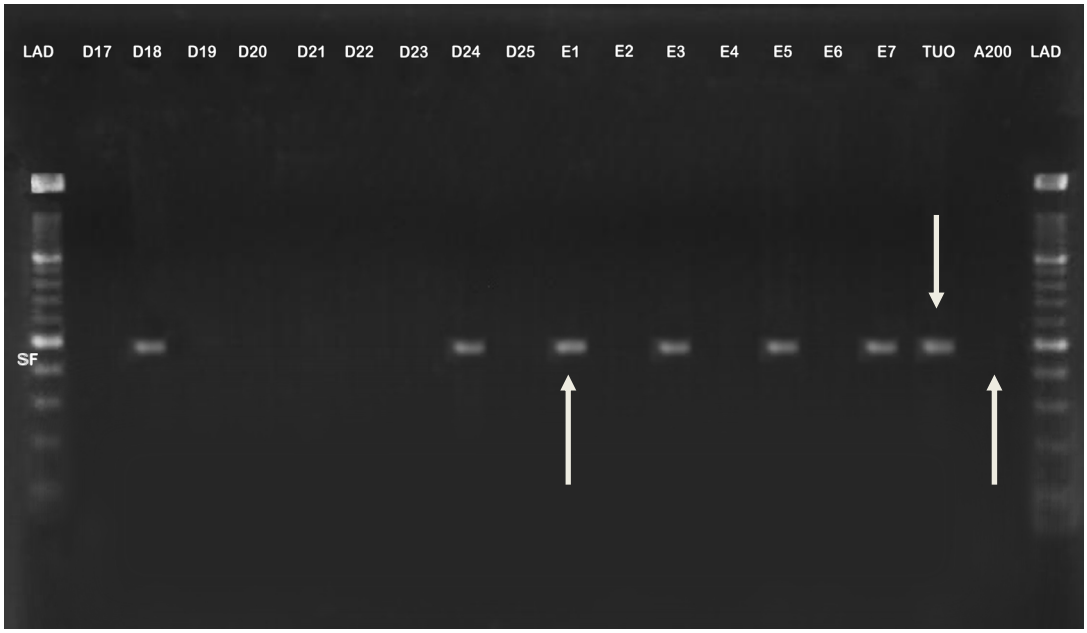
شکل۲. آلل مربوط به خودسازگاری (S*f*) به اندازهٔ ٤٤۹ جفت باز در تعدادی از نتاج حاصل از تلاقی‌های A (تونو × رقم ۱۰۱) و C (تونو × شاهرود ۱۷).



شکل۳. آلل مربوط به خودسازگاری (*Sf*) به اندازهٔ ٤٤٩ جفت باز در تعدادی از نتاج حاصل از تلاقی‌های C (تونو × شاهرود ۱۷) و D (شاهرود ۲۱ × ژینکو).



شکل٤. آلل مربوط به خودسازگاری (S_f) به اندازهٔ ٤٤٩ جفت باز در تعدادی از نتاج حاصل از تلاقی D (شاهرود ۲۱ × ژینکو).



شکل۵. وجود آلل مربوط به خودسازگاری (S_f) به اندازهٔ ٤٤٩ جفت باز در تعدادی از نتاج حاصل از تلاقی D (شاهرود ۲۱ × ژینکو) و E (تونو × شاهرود ۱۲).

شکل٦. وجود آلل مربوط به خودسازگاری (S_f) به اندازهٔ ٤٤٩ جفت باز در والد خودسازگار تونو و نبودن این آلل در تعدادی از نتاج حاصل از تلاقی E (تونو × شاهرود ۱۲).

از آنجا کـه تمـامی والـدین پـدری (تونـو، سـوپرنووآ، ژینکو) با وضعیت ژنتیکی (S_f S_1) خودسـازگار هـستند و والدین مادری (ژنوتیـپ ۱۰۱، شـاهرود ۱۷، شـاهرود ۲۱، شـاهرود ۱۲) همگـی خودناسـازگارند، دو حالـت قابـل پیش‌بینی است.

۱. اگر در ژنوتیپ‌هـای مـادری آلـل S_1 وجـود داشـته باشـد، تمـامی نتـاج خودسـازگار خواهنـد بـود، چـرا کـه دانه‌گردهٔ حاوی آلل S_1 والد پدری قادر بـه نفـوذ بـه درون خامهٔ گیـاه مـادری و رسـیدن بـه تخمـک نخواهـد بـود و درنتیجه بذری تولید نخواهد شد و فقط دانه‌گردهٔ حاوی S_f به درون خامه نفوذ می کند و می‌تواند تخمک را بارور کند. درنتیجه تمامی نتاج آلل‌های (S_1S_f و S_fS_x) خواهند داشت (S_x = نوع آلل نامعلوم است).

۲. اگر در ژنوتیپ والد مـادری آلـل S_1 وجـود نداشـته باشد و ژنوتیپ والد مادری را S_x S_x در نظر بگیریم انتظـار مـی‌رود ژنوتیـپ نتـاج از لحـاظ خودسـازگاری و خودناسازگاری به شکل (S_fS_x، S_1S_x و S_fS_x) باشـد. ایـن حالـت نـشان مـی‌دهـد کـه ۵۰درصـد نتـاج خودسـازگار و ۵۰درصد نتاج نیز خودناسازگارند.

نتاج به‌دست‌آمده از تلاقی‌هـای انجـام‌شـده بـین ارقـام خارجی (تونو، سـوپرنووآ و ژینکـو) کـه همگـی ژنوتیـپ S_fS_1 داشـتند بـه‌منزلـهٔ والـد پـدری بـا ارقـام داخلـی (شـاهرود۱۷، شـاهرود ۲۱، ژنوتیـپ ۱۰۱و شـاهرود ۱۲) به‌منزلهٔ والد مادری، نشان داد که در تمامی نتاج حاصـل از تلاقی‌ها، تعدادی از نتاج آلل خودسازگاری داشتند که نتایج آن توسط نوارهای به‌دست‌آمده از PCR قابل مشاهده است (شکل‌های ۱ تا ٦).

در مورد تمامی نتاج حاصل از تلاقی‌هـای A، B، C، D وE می‌توان این طور بیان کرد که به‌دلیل خودناسـازگاری و نبـود آلـل S_f در اکثـر ارقـام تجـاری داخلـی و از طرفـی خودسازگاربودن و داشـتن آلـل S_f تمـامی والـدین پـدری استفاده‌شده در این تلاقی‌ها، اگر یکی از آلـل‌هـای والـدین مادری آلل S_f باشد انتظار مـی‌رود کـه آلـل S_1 مربـوط بـه والدین پدری قادر به نفوذ به درون خامهٔ والد مادری نبوده و فقط آلل S_f توانایی ورود به خامهٔ مادری را داشته باشـد. درنتیجه فقط ژنوتیپ‌هایی با وضعیت ژنتیکی S_xS_f (کـه در آن x هر آللی می‌تواند باشد) انتظار می رود، درصـورتی‌کـه مطابق شکل‌های ۱ تا ٦ مشاهده می‌شود فقـط درصـدی از نتاج خودسازگار و مابقی خودناسازگارند. این مطلب بیانگر این است که آلل S_1 تحت هیچ شرایطی در والدین مادری (ارقام خودناسازگار داخلی) وجود ندارد.

نتیجه‌گیری کلی

این پژوهش با هدف غربالگری ژنوتیپ‌هـای خودسـازگار بـادام جهـت اسـتفاده در برنامـه‌هـای اصـلاحی بـه‌منظـور صرفه‌جویی در زمـان و هزینـه، بـا اسـتفاده از روش PCR روی نتـاج حاصـل از دورگ‌گیـری بـین ارقـام داخلـی و خارجی انجام شد که درنهایت از بـین ٧٤ نتـاج حاصـل از دورگ‌گیری، ۳۱ نتـاج خودسـازگار (دارای آلـل S_f عامـل ایجـاد خودسـازگاری) شناسـایی شـدند. تعـداد نتـاج خودسازگار با توجه به نامعلوم‌بودن آلل S والـدین مـادری مطابق نسبت‌های مندلی بود.

منابع

1. Alonso JM and Socias i Company R (2005) Identification of the self-incompatibility allele in almond by specific primers. Journal of Agricultural Research. 3: 296-303.
2. Boskovic R Tobutt KR Rovira M Romero MA Batlle I Du val H an d Dicenta F (1998) Inheritance of stylar ribonucleases in two almond progenies and their correlation with self-compatibility. In: Proc 2nd Int Sym p Pistachios Almonds. Acta Horticulturae. 470: 118-122.

3. Channuntapipat CM Sedgley and G Collins (2001) Sequences of cDNAs and genomic DNAs encoding the S1, S7, S8 and Sf alleles from almond, *Prunus dulcis*. Theoretical and Applied Genetics**.** 103: 1115-1122.

4. Channuntapipat CM Wirthensohn SA Ramesh Batlle I Arús PM Sedgley 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.

5. Godini A (2002) Almond fruitfulness and role of self-fertiliy. Acta Horticulturae. 591, pp. 191-204.

6. Gulcan R (1985) Descriptor List for Almond (*Prunus amygdalus*)(Revised). *International Board for Plant Genetic Resources* (IBPGR), Rome, pp: 32.

7. Halasz J, Fodor A Hegedus A and Pedryc A (2008) Identification of a new self-incompatibility allele (S_{31}) in a Hungarian almond cultivar and its reliable detection. Scientia Horticulturae. 448-451

8. Kamali K, Ebadi A Fatahi Moghadam R Naghavi MR and Imani A (2009) Heritability of S_f Allele in Almond Progenies with PCR Method. Iranian Journal of Horticulture Sciences, 40, 61-68.

9. Kester DE and Gradiziel TM (1996) Almonds, in: Janick J., Moore J. N. (Eds.), Fruit Breeding. Vol. 3. Nuts, John Wiley and Sons, New York, pp: 1-97.

10. López M, Mnejja M Romero MA Vargas FJ and Batlle I (2004) Use of S_f specific PCR for early selection of self-compatible seedlings in almond breeding. In: 12th GREMPA Meet. Mirandela.

11. Martin-gomez P M. Lopez Alonso JM Ortega E Batlle I and Socias i Company R (2003) Identification of self-incompatibility alleles in almond and related *prunus* species using PCR. Acta Horticulturae. 622: 397-400.

12. Murray M. and Thompson W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research, 8: 4321- 4325.

13. Ortega E. and Di centa F (2008) Inheritance of self-compatibility in almond. Journal of Applied Genetics. 106: 904-911.

14. Socias i Company R and Felipe AJ (1988) self-compatibility in almond: transmission and resent advances. Acta Horticulturae. 224:307-317.

15. Socias i Company R, Kester DE and Bradley MV (1976) Effect of temperature and genotype on pollen tube growth in some self-compatible and self-incompatible almond cultivars. Journal of the American Society for Horticultural Science. 101: 490-493.

16. Tamura M. K. Ushijima H Sassa H Hirano R Tao TM Gradziel and AM Dandekar (2000) Identification of self-incompatibility genotypes of almond by allele-specific PCR analysis. Theoretical and Applied Genetics. 101:344-349