

شناسایی آلل‌های خود ناسازگاری در ارقام بادام ایرانی به روش توالی‌یابی

Identification of Self-Incompatibility Alleles in Iranian Almond Cultivars Using Sequencing

سیداصغر موسوی^۱، محمدرضا فتاحی‌مقدم^۲، ذبیح‌اله زمانی^۳، مریم تاتاری^۴،

علی ایمانی^۵ و انکارنا اورتگا پاستور^۶

- ۱- استادیار، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی چهارمحال و بختیاری، شهرکرد
- ۲ و ۳- به ترتیب دانشیار و استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
- ۴ و ۵- به ترتیب کارشناس تحقیقاتی و استادیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج
- ۶- دانشیار، گروه اصلاح نباتات، موسسه تحقیقات CEBAS-SCIC، مورسیا، اسپانیا

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۳/۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۹/۱۳

چکیده

موسوی، س. ا.، فتاحی‌مقدم، م. ر.، زمانی، ذ.، تاتاری، م.، ایمانی، ع. و اورتگا پاستور، ا. ۱۳۹۳. شناسایی آلل‌های خود ناسازگاری در ارقام بادام ایرانی به روش توالی‌یابی. مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۳۰: ۶۶۸-۶۵۱.

شناسایی آلل‌های خود ناسازگاری در ارقام بادام (*Prunus dulcis*) اهمیت زیادی در احداث باغ‌های جدید و انتخاب والدین در برنامه‌های به‌نژادی بادام دارد. به منظور شناسایی آلل‌های جدید ناسازگاری در چند رقم بادام ایرانی، قطعات مربوط به هر آلل تکثیر و محصول PCR آن‌ها خالص‌سازی شد. برای همسانه‌سازی از ناقل PCR-Blunt-II-TOPO استفاده شد. ناقل به باکتری‌های مستعد *Escherichia coli* TOP 10 منتقل و کلونی‌های تراریزش شده شناسایی شدند. DNA پلاسمیدی استخراج و توالی‌یابی با استفاده از آغازگرهای M13 توسط دستگاه SECUGEN انجام شد. نهایتاً توالی حاصل از این پلاسمیدها مقایسه و توالی ثابت مربوط به هر آلل با نرم‌افزار SEQMAN II تعیین شد. براساس نتایج این تحقیق، تعداد هشت آلل در ارقام بادام ایرانی شامل ارقام تجاری (S₃₆)، هلویی (S₃₇)، سفید (S₃₈)، یزد-۱۷ (S₃₉ و S₄₀)، مشهد ۴۰ (S₄₁)، جی-آر-۱۶ (S₄₂) و مامایی (S₄₃) شناسایی شدند. هفت آلل از مجموع هشت آلل شناسایی شده، قبلاً گزارش نشده است، ولی یکی از آلل‌ها (S₄₀) شباهت زیادی با آلل ناسازگاری (S₅) گزارش شده در گونه *P. webbii* داشت. شباهت بین آلل‌های خود ناسازگاری در بادام اهلی با گونه وحشی *P. webbii* به وجود یک جد مشترک با گونه‌های جنس پرونوس و نقش این گونه در تکامل بادام‌های اهلی به عنوان یکی از اجداد اولیه اشاره دارد.

واژه‌های کلیدی: بادام، رقم، آلل ناسازگاری، همسانه‌سازی، توالی‌یابی.

مقدمه

بادام (*Prunus dulcis*) از مناطق مرکزی و جنوب غربی آسیا منشأ گرفته است و اگر چه گزارش شده که بادام اهلی از تلاقی گونه‌های وحشی خویشاوند به دست آمده است، ولی اجداد و والدین وحشی آن همچنان ناشناخته است (Bortiri *et al.*, 2001؛ Ladizinsky, 1999). بادام گونه‌ای خودناسازگار از نوع گامتوفیتیک است که توسط یک مکان ژنی به نام S با چندین آلل کنترل می‌شود (Nettancourt, 2001). در مادگی محصول ژن S با فعالیت ریونوکلئازی به نام S-RNase است که از رشد لوله گرده ناسازگار در خامه جلوگیری می‌کند (McClure *et al.*, 1989). آلل‌های ناسازگار زیادی از گونه‌های خانواده رزاسه، همسانه‌سازی (Cloning) و توالی‌یابی شده‌اند (Sanzol *et al.*, 2009؛ Tao *et al.*, 2007؛ Sassa *et al.*, 1996؛ Ushijima *et al.*, 1998). مطالعات مولکولی و مطابقت توالی‌های اسیدهای آمینه حاصل از ژن ناسازگاری در مادگی نشان داده است که ساختمان این ژن شامل پنج ناحیه حفاظت شده C1، C2، C3، RC4 و C5 و یک ناحیه با چند شکلی بالا (توالی متغیر) به نام RHV است که در حد فاصل نواحی C2 و C3 قرار گرفته است (Iqic and Kohn, 2001). ناحیه RHV نقش مهمی در شناسایی RNA دانه گرده با ژنوتیپ مشابه و تعیین ناسازگاری دارد

(Sassa *et al.*, 1996). مطالعات نشان داده است که این ژن در جنس پرونوس دارای دو ایترون با طول متغیر است که ایترون اول بین توالی ابتدایی (Single Peptide) و ناحیه C1 این ژن است و ایترون دوم بین نواحی حفاظت شده C2 و C3 قرار دارد (Ushijima *et al.*, 1998).

قابلیت دسترسی به تعداد زیادی از توالی آلل‌های ناسازگاری در جنس پرونوس در پایگاه اطلاعاتی امکان طراحی آغازگرهای عمومی و اختصاصی بر اساس توالی نواحی حفاظت شده آن‌ها را فراهم آورده و قابلیت تکثیر دامنه وسیعی از آلل‌های ناسازگاری را در گونه‌های مختلف جنس پرونوس بر اساس این آغازگرها را امکان‌پذیر کرده است (Sutherland *et al.*, 2004؛ Sonneveld *et al.*, 2003). بر اساس آغازگرها در مجموع ۳۰ آلل (شامل ۲۹ آلل خودناسازگاری و یک آلل خودسازگاری) در بادام شناسایی شده است که پنج آلل از آن‌ها قبلاً به اشتباه نام‌گذاری شده بودند و شش آلل دیگر جدید بوده و قبلاً گزارش نشده بودند (Ortega *et al.*, 2005).

آغازگرهای اختصاصی و عمومی مختلف بر اساس توالی مکان ژنی ناسازگاری در بادام و دیگر گونه‌های جنس *Prunus* طراحی شده است (Tamura *et al.*, 2000؛ Channuntapipat *et al.*, 2001, 2002؛ Ma and Oliveira, 2001؛ Sutherland *et al.*, 2004) که به طور

(Ortega *et al.*, 2006). اگر چه نتایج حاصل از این آغازگرها نشان داد که قابلیت بسیار بالایی در شناسایی ژنوتیپ خودناسازگاری در بادام دارند (Ortega *et al.*, 2005). با این وجود، در برخی موارد خاص به نظر می‌رسد که توالی‌یابی به منظور تشخیص دقیق آلل‌ها ضروری است (Halasz *et al.*, 2008). کداد و همکاران (Kodad *et al.*, 2008) در بین چهارده رقم بومی اسپانیا پنج عدد آلل جدید را از طریق همسانه‌سازی و توالی‌یابی شناسایی کرده و به نام آلل‌های S₃₁ تا S₃₅ نام‌گذاری کردند. تاکنون ۳۶ آلل ناسازگاری در بادام (۳۵ آلل ناسازگاری S₁-S₃₅ و یک آلل سازگاری S_f) شناسایی و توالی آن‌ها گزارش شده است (Ushijima *et al.*, 1998؛ Tamura *et al.*, 2000؛ Ma and Oliveira, 2001؛ Channuntapipat *et al.*, 2001, 2002؛ Barckley *et al.*, 2006). به دلیل اهمیت آلل‌های خودناسازگاری این پژوهش با هدف شناسایی و تعیین آلل خودناسازگاری جدید در ارقام بادام ایرانی با روش همسانه‌سازی و توالی‌یابی انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

نمونه‌های برگی از ارقام بادام ایرانی سفید، مامایی، تجاری، هلویی، یزد-۱۷، جی آر-۱۶ و مشهد-۴۰ در فصل رشد از کلکسیون‌های بادام در شهرکرد و کمال آباد کرج جمع‌آوری

موفقیت‌آمیزی باعث تکثیر آلل‌های خودناسازگاری در ارقام بادام می‌شوند (Ortega *et al.*, 2005؛ Kodad *et al.*, 2008). شناسایی آلل‌های ناسازگاری در ارقام بادام ایرانی به روش‌های مولکولی مبتنی بر PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و آغازگرهای عمومی (Sheikh-Alian *et al.*, 2010؛ Rahemi *et al.*, 2010؛ Ebadi *et al.*, 2011؛ Mousavi *et al.*, 2011) گزارش شده است. ارتگا و همکاران (Ortega *et al.*, 2006) به منظور تایید آلل‌های جدید شناسایی شده، کلیه نوارهای حاصل از تکثیر با آغازگرهای اینترون اول و دوم را همسانه‌سازی و توالی‌یابی و گزارش کردند که موتانت آلل S₁₀ گزارش شده توسط چانونتاپیپات و همکاران (Channuntapipat *et al.*, 2002) در واقع یک آلل جدید است و آن را به نام آلل S₂₄ نامگذاری نمودند. این محققان آلل‌های جدید شناسایی شده در تحقیق قبلی خود (Ortega *et al.*, 2005) را به نام آلل‌های S₂₅ تا S₂₉ نام‌گذاری کردند. آن‌ها همچنین گزارش کردند که توالی برخی از آلل‌های قبلی گزارش شده در بادام مشابه هم‌دیگر بوده و در واقع آلل‌های S₁، S₁₆ و S₁₇ با هم و آلل‌های S₄ با S₂₀ و آلل‌های S₁₃ با S₁₉ و همچنین آلل‌های S₅ با S₁₅ توالی یکسانی داشته و مشابه هم‌دیگرند و نهایتاً آلل‌های خودناسازگاری در بادام را از S₁ تا S₂₉ و S_f تایید و نام‌گذاری کردند

شدند.

اپندورف (آلمان) انجام شد. شرایط دمایی شامل واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای دو دقیقه، ۳۵ چرخه با واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ ثانیه، اتصال آغازگر در ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای دو دقیقه، مرحله بسط در دمای ۶۸ درجه سانتی‌گراد برای چهار دقیقه (با افزایش ۱۰ ثانیه به ازای هر چرخه بعد از اتمام چرخه دهم) و بسط نهایی در دمای ۶۸ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه انجام شد. الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد به مدت ۵ ساعت در ۷۰ ولت و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید به مدت یک ساعت انجام شد. در زیر نور ماورای بنفش (UV) عکس‌برداری انجام و اندازه نوارهای تکثیر شده با استفاده از نشانگر اندازه DNA یک کیلو جفت بازی تعیین شد (Ortega *et al.*, 2006).

همسانه‌سازی و توالی‌یابی

۱- خالص‌سازی محصول PCR

به منظور انجام همسانه‌سازی، محصول PCR با استفاده از کیت QIA quick spin از شرکت کیاژن (Qiagen) آمریکا خالص‌سازی و کیفیت آن روی ژل آگارز یک درصد در بافر TAE تعیین شد.

۲- همسانه‌سازی

در این مرحله از ناقل PCR-Blunt-II-TOPO از شرکت اینویترژن (Invitrogene) آمریکا جهت همسانه‌سازی DNA هدف و انتقال به باکتری‌های مستعد

استخراج DNA

DNA ژنومی به روش استخراج در مقیاس کوچک (Miniprep) بر اساس روش دوویل و دوویل (Doyle and Doyle, 1987) و تغییر یافته توسط سونولد و همکاران (Sonneveld *et al.*, 2001) انجام شد. تعیین کمیت و کیفیت DNA روی ژل آگارز و مقایسه وضعیت نوارهای DNA نمونه‌ها از نظر کمیت و کیفیت در مقایسه با نشانگر با DNA لامبدا استاندارد بررسی شد.

تکثیر آل‌های خودناسازگاری

به منظور تکثیر آل‌های جدید خودناسازگاری در این ارقام، از آغازگر مستقیم PaConsI-F (Sonneveld *et al.*, 2003) و آغازگر معکوس EM-PC5ConsRD (Sutherland *et al.*, 2004) برای تکثیر ناحیه بین SP و C5 با استفاده از DNA ژنومی استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در حجم ۳۰ میکرولیتر شامل ۷۵ نانوگرم DNA ژنومی، بافر 1X PCR از شرکت نواژن (Novagene) آلمان، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs، یک میلی‌مولار سولفات منیزیم (MgSO₄)، ۰/۵ میکرو مولار از هر آغازگر، یک واحد از آنزیم پلی‌مرز کدهات استارت (KOD Hot Start DNA Polymerase) از شرکت نواژن در دستگاه ترموسایکلر

شد و توالی نهایی آن‌ها توسط نرم‌افزار ژن داک (GenDoc) (www.PSC.edu/biomed/gendoc) تعیین شد.

نتایج و بحث

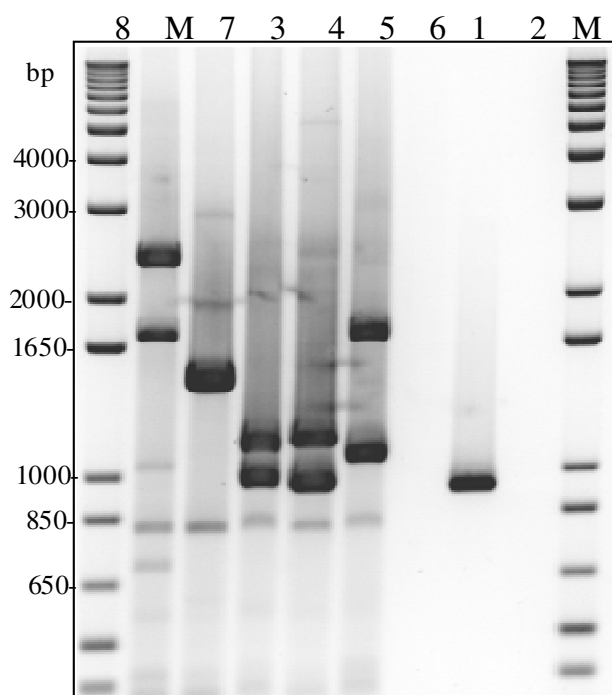
نتایج تکثیر با استفاده از آغازگرهای جفت اینترون و توسط آنزیم کدهات استارت، وجود قطعات مربوط به آلل‌های جدید در ارقام سفید، مامایی، مشهد-۴۰، یزد-۱۷، جی آر-۱۶ و هلویی را نشان داد (شکل ۱). برای اطمینان بیشتر از همسانه‌سازی، DNA پلاسمیدی حاصل از همسانه‌سازی در ۱۶ کلونی مربوط به رقم یزد-۱۷ با استفاده از آغازگرهای پوشش‌دهنده جفت اینترون تکثیر و اندازه‌نوارهای تکثیر شده مربوط به آلل‌های جدید در این رقم تعیین شد. نتایج نشان داد که قطعات مربوط به آلل جدید S₃₉ در ۵ کلونی و قطعات مربوط به آلل جدید S₄₀ در ۸ کلونی، نوارهای مشابه و هم‌اندازه داشتند (شکل ۲).

نتایج تکثیر DNA حاصل از همسانه‌سازی با آغازگرهای PaconsI-F (مستقیم) و EM-PC5cons RD (معکوس) وجود نوارهای تکثیر شده جدید مربوط به آلل‌های S₃₆ (رقم تجاری)، S₃₇ (رقم هلویی)، S₃₈ (رقم سفید)، S₃₉ (ارقام مشهد-۴۰ و یزد-۱۷)، S₄₀ (رقم یزد-۱۷)، S₄₁ (مشهد-۴۰)، S₄₂ (رقم جی آر-۱۶) و S₄₃ (رقم مامایی) را نشان داد (شکل ۳). بدین ترتیب هشت آلل جدید در هفت رقم بادام ایرانی تجاری (S₃₆)، هلویی

E. coli TOP10 (Competent) (شرکت اینویترژن) استفاده شد. باکتری‌های حامل DNA هدف روی محیط کشت LB در حضور آنتی بیوتیک کانامایسین (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) انتخاب شدند و استخراج DNA پلاسمیدی با استفاده از کیت Pure Link Quick Plasmid Miniprep Kit (شرکت کیاژن) انجام شد. تعیین کیفیت DNA پلاسمیدی، روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TAE انجام شد. همچنین به منظور اطمینان از همسانه‌سازی، DNA پلاسمیدی با استفاده از آغازگرهای PaconsI-F (مستقیم) و M-PC5consRD (معکوس) بر اساس روش ارتگا و همکاران (Ortega *et al.*, 2006) تکثیر شد.

۳- توالی‌یابی

توالی‌یابی سه پلاسمید با استفاده از آغازگرهای M₁₃ توسط دستگاه SECUGEN (مادرید، اسپانیا) برای هر آلل انجام شد، سپس توالی حاصل از این پلاسمیدها مقایسه و توالی ثابت مربوط به هر آلل با نرم‌افزار سکمن دو (SEQMAN II) تعیین شد. در نهایت توالی اسید آمینه هر آلل با توالی اسید آمینه سایر آلل‌های موجود در جنس پرونوس در پایگاه اطلاعاتی موسسه بیوانفورماتیک اروپا (www.ebi.ac.uk) به روش BLAST توسط برنامه کلاستال ایکس (Clustal X) (Thompson *et al.*, 1997) با نرم‌افزار مگ‌الاین (MegAlign) مقایسه

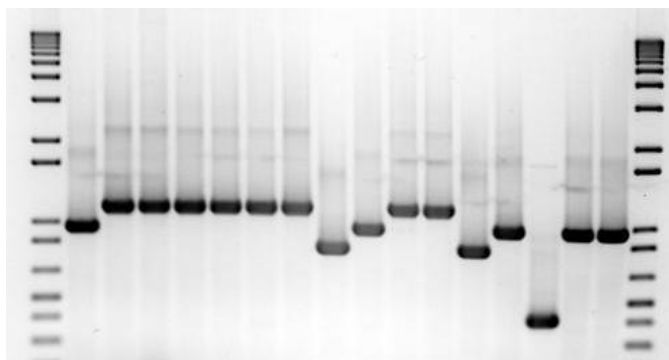


شکل ۱- محصول PCR با انتهای صاف توسط آنزیم کدهات استارت با آغازگرهای Pacons I-F و EM-PC5consRD از چپ به راست شامل (M) نشانگر اندازه DNA یک کیلو جفت بازی (شرکت کیاژن)، (۱) رقم سفید، (۲) رقم مامایی، (۳) رقم مشهد-۴۰، (۴) رقم یزد-۱۷، (۵) رقم جی آر-۱۶، (۶) آب مقطر (کنترل منفی)، (۷) رقم هلویی و (۸) آب مقطر (کنترل منفی)
 Fig. 1. PCR products with Blunt-end by KOD Hot Start DNA polymerase obtained with consensus primers PaConsI-F and EMPC5consRD from left to right including: M) DNA Ladder 1Kb (Qiagene), 1) Sefied, 2) Mamaei, 3) Mashhad-40, 4) Yazd-17, 5) Gr-16, 6) Distillated water (negative control), 7) Holouei and 8) Distillated water (negative control)

نام گذاری شد (شکل ۳). آلل S₂₅ نیز قبلاً با جفت آغازگر اینترون دوم تکثیر و شناسایی شده بود (Mousavi *et al.*, 2011).

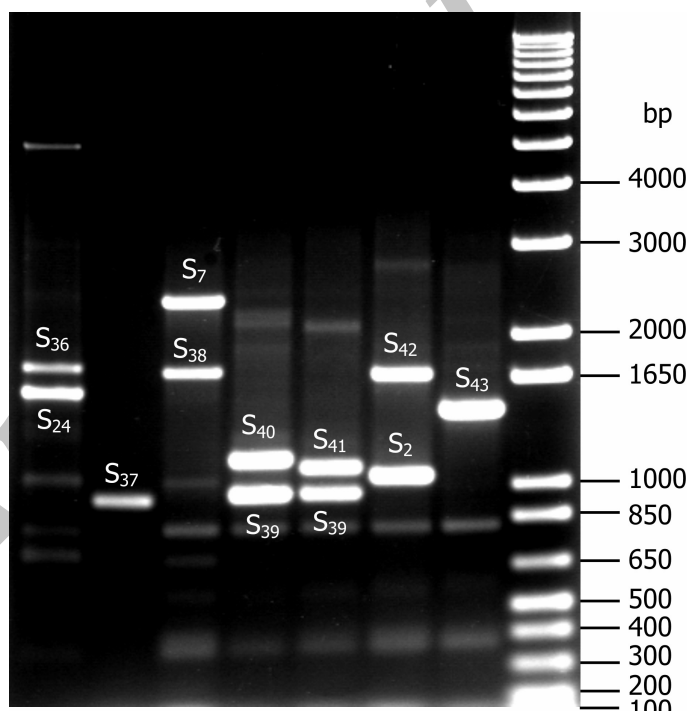
تاکنون آلل‌های S₁ و S₃ (Ma and Oliveira, 2001)، آلل‌های S₁، S₇، S₈ و S_f (Channuntapipat *et al.*, 2001)، آلل‌های S₂، S₉، S₁₀ و S₂₃ (Channuntapipat *et al.*, 2002)، آلل S₅ و S₂₅ (Lopez *et al.*, 2004)، آلل‌های S₁ تا S₂₉ (Ortega *et al.*, 2006)، آلل‌های S₃₀ تا S₃₁ (Halasz *et al.*, 2008) و S₃₅ (Kodad *et al.*, 2008) از طریق

(S₃₇)، سفید (S₃₈)، یزد-۱۷ (S₃₉ و S₄₀)، مشهد ۴۰ (S₄₁)، جی-آر-۱۶ (S₄₂) و مامایی (S₄₃) شناسایی شد (شکل ۳). در رقم هلویی یک قطعه به اندازه ۹۵۰ جفت باز تکثیر شد که مربوط به آلل جدید S₃₇ بود و قطعه مربوط به آلل S₁₃ که قبلاً با آغازگرهای اینترون دوم تکثیر شده بود (Mousavi *et al.*, 2011) با این جفت آغازگر تکثیر نشد. عدم تکثیر آلل S₁₃ با این جفت آغازگر در مطالعات قبلی نیز گزارش شده است (Ortega *et al.*, 2006). همچنین در بادام مامایی یک نوار به طول ۱۴۰۰ جفت باز تکثیر شد که بعد از توالی‌یابی به نام آلل S₄₃



شکل ۲- محصول PCR همسانه سازی DNA پلاسمیدی از کلونی های باکتری *E. coli* در رقم یزد-۱۷ (S39S40) از چپ به راست شامل: ۱) نشانگر اندازه DNA یک کیلو جفت بازی (شرکت کیاژن)، ۲) کلونی ۱ (S39)، ۳ تا ۸ شامل کلونی های ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ (S40)، ۹) کلونی ۸ (اشتباه)، ۱۰) کلونی ۹ (S39)، ۱۱) کلونی ۱۰ (S40)، ۱۲) کلونی ۱۱ (S40)، ۱۳) کلونی ۱۲ (اشتباه)، ۱۴) کلونی ۱۳ (S39)، ۱۵) کلونی ۱۴ (اشتباه)، ۱۶) کلونی ۱۵ (S39)، ۱۷) کلونی ۱۶ (S39) و ۱۸) نشانگر اندازه DNA یک کیلو جفت بازی

Fig. 2. PCR products obtained from cloning of DNA Plasmid from *E. coli* colonies in Yazd-17 cultivar (S39S40) from left to right including: 1) DNA Ladder 1kb (Qiagene), 2) colony 1 (S39), 3-8) colonies 2, 3, 4, 5, 6 and 7 (S40), 9) colony 8 (mistake), 10) colony 9 (S39), 11) colony 10 (S40), 12) colony 11 (S40), 13) colony 12 (mistake), 14) colony 13 (S39), 15) colony 14 (mistake), 16) colony 15 (S39), 17) colony 16 (S39) and 18) DNA Ladder 1Kb



شکل ۳- محصول PCR خالص سازی شده از همسانه سازی با آغازگرهای Pacons I-F و EM-PC5cons RD از ارقام بادام ایرانی از چپ به راست شامل ارقام تجاری (S24S36)، هلوئی (S13S37)، سفید (S7S38)، یزد-۱۷ (S39S40)، مشهد-۴۰ (S39S41)، جی آر-۱۶ (S2S42) و مامایی (S25S43)

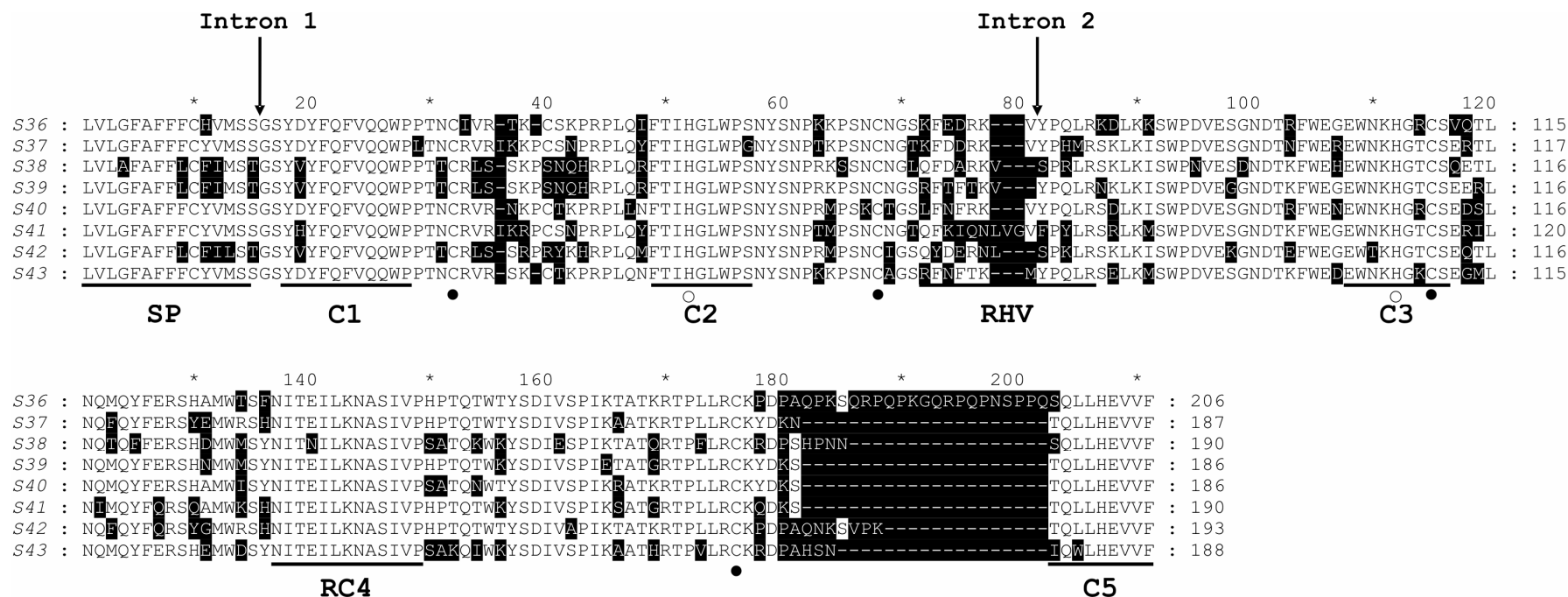
Fig. 3. Purified PCR products from cloning that obtained with consensus primers PaConsl-F and EMPC5consRD for Iranian almond cultivars from left to right including Tejari (S24S36), Holouei (S13S37), Sefied (S7S38), Yazd-17 (S39S40), Mashhad-40 (S39S41), Gr-16 (S2S42), and Mamaei (S25S43) cultivars

S5 شناسایی شده در یک ژنوتیپ وحشی از گونه *P. webbii* از کشور مونتنگرو دارد (جدول ۱)، اما توالی نوکلئوتیدی این آلل‌ها از نظر توالی در نواحی اینترون اول و دوم متفاوت بود. توالی اسیدهای آمینه آلل S43 از رقم مامایی با توالی اسیدهای آمینه آلل S25 از رقم لامونا (Ortega et al., 2006) شباهت زیادی نشان داد و همچنین شباهت بالایی با آلل S15 در گونه *P. spinosa* (Vieira et al., 2007) داشت (جدول ۱). آلل جدید S37 در رقم هلویی از نظر توالی اسیدهای آمینه شباهت زیادی با آلل S8 از گونه *P. cerasifera* (Sutherland et al., 2009) و آلل S7 از گونه *P. spinosa* (Vieira et al., 2007) نشان داد. سایر آلل‌های جدید شناسایی شده هم با آلل‌های موجود در گونه‌های گیلاس (*P. avium*)، زردآلو (*P. armeniaca*)، آلو (*P. salicina* و *P. spinosa*، *P. domestica*) از نظر توالی اسیدهای آمینه شباهت زیادی نشان دادند (جدول ۱).

به هر حال وجود شباهت زیاد و یا تشابه کامل دو آلل در توالی اسیدهای آمینه نمی‌تواند بیانگر عمل مشابه دو آلل باشد (Ortega et al., 2006). لوپز و همکاران (Lopez et al., 2004) گزارش کردند که موتاسیون‌های نقطه‌ای و حذف قسمتی از توالی اینترون آلل‌های S5 و S25 منجر به تفاوت بین این آلل‌ها می‌شود، بنابراین تفاوت در توالی آلل‌ها منجر به ایجاد چند شکلی بین آن‌ها

همسانه‌سازی و توالی‌یابی در بادام شناسایی و تعیین شده‌اند. بنابراین آلل‌های جدید در ارقام مورد بررسی که همسانه‌سازی و توالی‌یابی شدند از آلل S36 تا S43 نام‌گذاری و به عنوان آلل‌های جدید در ارقام ایرانی برای اولین بار شناسایی و توالی اسیدهای آمینه مربوط به این آلل‌ها گزارش گردید (شکل ۴).

نتایج حاصل از مطابقت توالی اسیدهای آمینه آلل‌های جدید با آلل‌های گزارش شده در جنس پرونوس نشان داد که آلل S43 مشابهت بالایی (۹۹ درصد) با آلل S25 در بادام رقم لامونا (Ortega et al., 2006) داشت و تفاوت این دو آلل در یک اسید آمینه است. این تفاوت می‌تواند ناشی از موتاسیون نقطه‌ای در توالی این دو آلل باشد. وجود شباهت در توالی نوکلئوتیدها و توالی اسیدهای آمینه می‌تواند بیانگر انشقاق این دو آلل از یک آلل اجدادی مشابه و یا در اثر موتاسیون از سایر آلل‌ها باشد (Wunsch and Hormaza, 2004). توالی اسیدهای آمینه آلل‌های جدید در این تحقیق نشان داد که این آلل‌ها از نظر اندازه و توالی با هم متفاوت بوده و با آلل‌های قبلی گزارش شده نیز متفاوت هستند و این تفاوت در توالی، عمدتاً در موقعیت‌های بین نواحی حفاظت شده بود (شکل ۴). توالی اسیدهای آمینه در این آلل‌های جدید مشابهت زیادی (بیش از ۸۰ درصد) با آلل‌های ناسازگاری گزارش شده در گونه‌های دیگر پرونوس دارد (جدول ۱). توالی اسید آمینه آلل S40 در یزد-۱۷ شباهت کامل با آلل



شکل ۴- هم‌پوشانی توالی اسیدهای آمینه آلل‌های جدید S₃₆ تا S₄₃ به ترتیب در ارقام بادام ایرانی تجاری، هلویی، سفید، یزد-۱۷، مشهد-۴۰، جی آر-۱۶ و ماماچی به روش Clustal X (آمینو اسیدهای متفاوت در توالی این آلل‌ها با رنگ سیاه مشخص شده‌اند. نواحی حفاظت شده (C1-C5)، ناحیه SP و موقعیت اینترون‌های اول و دوم در ساختمان ژن خودناسازگاری (S-RNases) (Ushijima *et al.*, 1998) در توالی اسیدهای آمینه مشخص شده است. هیستیدین حفاظت شده با دایره‌های سفید (توخالی) و سیستین حفاظت شده با دایره‌های سیاه (توپر) مشخص شده‌اند.

Fig. 4. Alignment by ClustalX method of amino acid sequences of S-RNases S₃₆-S₄₃ from almond cultivars Tejari, Holouei, Sefied, Yazd-17, Mashhad-40, Gr-16, and Mamaei, respectively. Different amino acids from a consensus sequence are indicated with black shading. Conserved regions (C1-C5) and hypervariable region (RHV) of Rosaceae S-RNases described by Ushijima *et al.* (1998), and the signal peptide (SP) are underlined. Position of the two introns is indicated by arrows. Conserved histidine residues are indicated with white circles, and conserved cysteine residues with black circles

جدول ۱- درصد شباهت توالی اسیدهای آمینه آلل‌های جدید S₃₆ تا S₄₃ در ارقام بادام ایرانی با آلل‌های S در گونه‌های پرونوس

Table 1. Percentage of identity of amino acid sequences of S36-S43 almond RNases from Iranian almond cultivars with S-RNases of Prunus species

آلل در ارقام ایرانی			آلل در گونه متعلق به جنس پرونوس		
Allele in Iranian cultivars			Allele in species belong to Prunus		
آلل	رقم ایرانی	درصد شباهت	آلل	گونه	منبع
Allele	Iranian cultivar	Identity (%)	Allele	Species	Reference
S ₃₆	Tejari	تجاری	85	MSRN-2	<i>Prunus mume</i> Yaegaki <i>et al.</i> (2001)
S ₃₇	Holouei	هلویی	98	S ₇	<i>P. tenella</i> Surbanovski <i>et al.</i> (2007)
			98	S ₈	<i>P. cerasifera</i> Sutherland <i>et al.</i> (2009)
			97	S ₀₂	<i>P. lannesiana</i> Kato <i>et al.</i> (2007)
S ₃₈	Sefid	سفید	98	S ₉	<i>P. tenella</i> Surbanovski <i>et al.</i> (2007)
S ₃₉	Yazd- 17	یزد- ۱۷	97	S _k	<i>P. webbii</i> Boskovic <i>et al.</i> (2007)
			96	S ₉	<i>P. armeniaca</i> Halasz <i>et al.</i> (2007)
S ₄₀			100	S ₅	<i>P. webbii</i> Banovic <i>et al.</i> (2009)
			98	S ₉	<i>P. domestica</i> Sutherland <i>et al.</i> (2007)
			97	SX-MK ₁₃	<i>P. lannesiana</i> Kato <i>et al.</i> (2007)
S ₄₁	Mashhad- 40	مشهد- ۴۰	97	S ₁₄	<i>P. avium</i> Vaughan <i>et al.</i> (2008)
			96	S ₂₃	<i>P. avium</i> Wunsch <i>et al.</i> (2004)
			96	S _i	<i>P. salicina</i> Beppu <i>et al.</i> (2002)
S ₄₂	G.R- 16	جی آر- ۱۶	83	S _{n3}	<i>P. webbii</i> Boskovic <i>et al.</i> (2007)
S ₄₃	Mamaei	مامایی	99	S ₂₅	<i>P. dulcis</i> Ortega <i>et al.</i> (2006)
			98	S ₁₅	<i>P. spinosa</i> Vieira <i>et al.</i> (2007)

متفاوت ولی با توالی مشابه در ناحیه RHV در گلابی اروپایی (Zisovich *et al.*, 2008) گزارش شده است که بیانگر این است که فقط ناحیه RHV به تنهایی نمی‌تواند نقش اصلی در شناسایی دانه گرده خودی و توقف رشد لوله گرده را در حالت ناسازگاری نشان دهد. تنوع آلل‌ها تنها ناشی از موتاسیون نقطه‌ای نیست بلکه وجود کراسینگ‌آور (Crossing over) و

می‌شود و این موتاسیون‌ها می‌توانند در توالی اسیدهای آمینه موثر بوده و باعث نقش اختصاصی آلل‌ها و تفاوت بین آن‌ها شوند. در واقع ایجاد آلل جدید در اثر تجمع موتاسیون‌های نقطه‌ای در نهایت منجر به تفاوت در توالی اسیدهای آمینه شده و باعث ایجاد تفاوت در نقش اختصاصی آلل‌ها و ایجاد تنوع آلی می‌شود (Kodad *et al.*, 2008). دو آلل با نقش

آلل S_1 از فرانسوی و آلل S_6 از گونه *P. webbii* از یک جد مشترک منتج شده‌اند. همچنین تشابه بالا (۹۹/۸ درصد) بین آلل S_{21} از بادام و آلل S_2 از گونه *P. webbii* گزارش شده است (Sanchez and Oliveira, 2005). این تشابه نقش گونه وحشی *P. webbii* را در تلاقی‌های بین گونه‌ای به عنوان یکی از گونه‌های موثر در اهلی شدن بادام نشان می‌دهد (Socias i Company, 2004). وجود آلل‌های با تشابه بالا در توالی‌های اسیدهای آمینه در بین گونه‌های جنس پرونوس بیانگر وجود منشا یکسان این گونه‌ها در فرآیند تکامل این جنس است.

ارزیابی آلل‌های خودناسازگاری (S-alleles) در این تحقیق و تحقیقات قبلی (Zenolabedini et al., 2012؛ Valizadeh and Ershadi 2009؛ Mousavi et al., 2011) نشان داد که احتمال وجود آلل‌های جدید در ارقام، ژنوتیپ‌ها و گونه‌های وحشی بادام ایرانی وجود دارد که بیانگر وجود چند شکلی بالا در ژن خود ناسازگاری در جمعیت‌های بادام است که بیانگر آن است که ایران باید یکی از مراکز اصلی تنوع بادام باشد. وجود آلل‌های جدید در ژرم پلاسم بادام‌های محلی اسپانیایی توسط ارتگا و همکاران (Ortega et al., 2005 and 2006) و کداد و همکاران (Kodad et al., 2008 and 2010) نیز گزارش شده است که بیانگر وجود تنوع

نو ترکیبی در توالی نزدیک به اینترون‌ها هم می‌تواند نقش تعیین کننده‌ای در تنوع آللی و وجود چند شکلی بین آلل‌ها داشته باشد (Ortega et al., 2006). وجود تشابه بین توالی اسیدهای آمینه در آلل‌های ناسازگاری بادام با سایر گونه‌های جنس پرونوس توسط سایر محققین نیز گزارش شده است (Ortega et al., 2006؛ Kodad et al., 2008؛ Surbanovski et al., 2007).

وجود شباهت توالی آلل ناسازگاری در ارقام اهلی بادام با گونه وحشی *P. webbii* اشاره به این دارد که این گونه در تکامل بادام‌های اهلی به عنوان یکی از اجداد اولیه مطرح است. در مطالعات قبلی از این گونه به عنوان یکی از گونه‌های موثر در ایجاد و تکامل بادام‌های اهلی اشاره شده است (Socias i Company, 1990 and 2004؛ Ladizinsky, 1999). وجود تشابه بالا (۱۰۰ درصد) بین آلل S_1 از بادام رقم فرانسوی از فرانسه با آلل S_6 گزارش شده از گونه *P. webbii* از منطقه پوگلیا در ایتالیا توسط سانچز و الیویرا (Sanchez and Oliveira, 2005) نیز گزارش شده است. از آنجایی که فرانسوی از تلاقی رقم فرانسوی آی (S_3S_4) و رقم ایتالیایی کریستومورتو (S_1S_2) در منطقه پوگلیا در ایتالیا، منطقه‌ای که بادام‌های اهلی و گونه وحشی *P. webbii* در کنار هم وجود دارند، به دست آمده است، می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که

- آللی بالا در ژن خودناسازگاری است. (Vaughan *et al.*, 2008)
- نتایج این تحقیق نشان داد هشت آلل جدید در ارقام بادام ایرانی مورد مطالعه وجود دارد. این ارقام قبلاً در شناسایی آلل‌های خودناسازگاری ارقام بادام ایرانی به روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) قطعات جدید و متفاوت از اندازه مربوط به آلل‌های ناسازگاری شناخته شده در ارقام استاندارد نشان داده بودند که مربوط به آلل‌های جدید در نظر گرفته شده بودند (Mousavi *et al.*, 2011).
- نتایج روش توالی‌یابی در این تحقیق، وجود آلل‌های جدید خودناسازگاری در ارقام بادام ایرانی را مورد تایید قرار داد. بنابراین روش توالی‌یابی نوکلئوتیدهای موجود در ساختمان آلل‌های خودناسازگاری، یکی از روش‌های دقیق و کارآمد جهت شناسایی آلل‌های خودناسازگاری است. در همین ارتباط قره شیخ بیات و همکاران (Gharesheikhsbayat *et al.*, 2011) آلل‌های خودناسازگاری را در ۲۴ رقم زردآلو از طریق روش‌های کلاسیک و مولکولی شناسایی و گزارش کردند که تعیین ژنوتیپ خودناسازگاری به کمک روش توالی‌یابی اسیدهای نوکلئیک دارای اطمینان و دقت بالایی در مقایسه با سایر روش‌ها است. استفاده از روش توالی‌یابی اسیدهای نوکلئیک، در تعیین آلل‌های جدید و یا تایید آلل‌های شناسایی شده در ارقام بادام (Ortega *et al.*, 2006)؛ (Ma and Oliveira, 2001) گیلان،
- ژنوتیپ ناسازگاری ارقام بادام مورد بررسی در این تحقیق در جدول ۲ ارائه شده است. به دلیل این‌که ارقام مورد بررسی ژنوتیپ خودناسازگاری متفاوتی از سایر ارقام ایرانی (Valizadeh and Ershadi 2009)؛ (Mousavi *et al.*, 2011)؛ (Zenolabedini *et al.*, 2012) و خارجی (Ortega *et al.*, 2005, 2006) گزارش شده دارند، از نظر گروه‌های دگرناسازگار در گروه عمومی (O Group) قرار می‌گیرند و به عنوان یک دهنده دانه کرده عمومی و سازگار با سایر ارقام محسوب می‌شوند (Mousavi *et al.*, 2011). گروه‌دهنده عمومی شامل رقم‌هایی است که می‌تواند رقم‌های موجود در سایر گروه‌های دگرناسازگاری را به طور موفقیت‌آمیزی کرده‌افشانی و تلقیح کنند و به صورت متقابل توسط رقم‌های آن گروه‌ها کرده‌افشانی و تلقیح شوند (Valizadeh and Ershadi, 2009). شناسایی آلل‌های خودناسازگاری و تعیین ژنوتیپ خودناسازگاری ارقام بادام موجود در کشور در این پژوهش و پژوهش‌های قبلی (Zenolabedini *et al.*, 2012)

جدول ۲- ژنوتیپ خودناسازگاری ارقام بادام ایرانی در این بررسی

Table 2. Genotype of self-incompatibility in Iranian almond cultivars in this study

رقم Cultivar	منشا Origin	شجره Pedigree	ژنوتیپ ناسازگاری Incompatibility genotype	گروه دگرناسازگاری Cross incompatibility group	
Tejari	تجاری	Iran	Unknown	S ₂₄ S ₃₆	O
Holuei	هلویی	Iran	Unknown	S ₁₃ S ₃₇	O
Sefid	سفید	Iran	Unknown	S ₇ S ₃₈	O
Yaszd-17	سزد-۱۷	Iran	Unknown	S ₃₉ S ₄₀	O
Mashhad040	مشهد-۴۰	Iran	Unknown	S ₃₉ S ₄₁	O
G.R-16	جی آر-۱۶	Iran	Unknown	S ₂ S ₄₂	O
Mamaei	مامایی	Iran	Unknown	S ₂₅ S ₄₃	O

آلل‌های جدید S₃₆ الی S₄₃ در این ارقام به روش همسانه‌سازی و توالی‌یابی شناسایی شده‌اند.

New alleles from S₃₆ to S₄₃ in these cultivars were identified by cloning and sequencing method.

هم‌پوشانی دوره گل‌دهی بین رقم اصلی و گرده‌زا) و ترکیب مناسب کاشت ارقام در احداث باغ‌های جدید تجاری به منظور موفقیت گرده‌افشانی و تشکیل میوه و در نهایت افزایش عملکرد باغ‌های بادام، برای تولیدکنندگان بسیار مفید و دارای اهمیت است.

؛Ebadi *et al.*, 2011؛ Mousavi *et al.*, 2011 انجام شده است. این ارقام می‌توانند به عنوان والدین مناسب در برنامه‌های به‌نژادی جهت اطمینان از موفقیت در تلاقی‌های کنترل شده برای به نژادگران بادام مورداستفاده قرار گیرند. همچنین انتخاب ارقام مناسب و سازگار از نظر گرده‌افشانی به عنون درختان گرده‌زا (با توجه به

References

- Banovic, B., Surbanovski, N., Konstantinovic, M., and Maksimovic, V. 2009. Basic RNases of wild almond (*Prunus webbii*): Cloning and characterization of six new S-RNase and one "non-S RNase" genes. *Journal of Plant Physiology* 166: 395-402.
- Barckley, K. K., Uratsu, S. L., Gradziel, T. M., and Dandekar, A. M. 2006. Multidimensional analysis of S-alleles from cross-incompatible groups of California almond cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences* 131: 632-636.

- Beppu, K., Yamane, H., Yaegaki, H., Yamaguchi, M., Kataoka, I., and Tao, R. 2002.** Diversity of S-RNase genes and S-haplotypes in Japanese plum (*Prunus salicina* L.). *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 77: 658-664.
- Bortiri, E., Oh, S. H., Jiang, J., Baggett, S., Granger, A., Weeks, C., Buckingham, M., Potter, D., and Parfitt, D. E. 2001.** Phylogeny and systematics of *Prunus* (Rosaceae) as determined by sequence analysis of ITS and chloroplast trnL-trnF spacer DNA. *Systematic Botany* 26: 797-807.
- Boskovic, R. I., Tobutt, K. R., Ortega, E., Sutherland, B. G., and Godini, A. 2007.** Self-(in) compatibility of the almonds *P. dulcis* and *P. webbii*: detection and cloning of 'wild-type S_f' and new self-compatibility alleles encoding inactive S-RNases. *Molecular Genetics and Genomics* 278: 665-676.
- Channuntapipat, C., Sedgley, M., Batlle, I., Arus, P., and Collins, G. 2002.** Sequences of the genomic DNAs encoding the S2, S9, S10, and S23 alleles from almond, *Prunus dulcis*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 77: 387-392.
- Channuntapipat, C., Sedgley, M., and Collins, G. 2001.** Sequences of the cDNAs and genomic DNAs encoding the S1, S7, S8, and S_f alleles from almond, *Prunus dulcis*. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 1115-1122.
- Doyle, J. J., and Doyle, J. L. 1987.** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Ebadi, A., Kamali, K., Fatahi-Moghadam, M. R., Naghavi, M. R., Imani, A., and Ofoghi, H. 2011.** Determination of self-compatible almond genotypes obtained from controlled crosses and identification of S-alleles in some foreign cultivars and genotypes by PCR. *Seed and Plant Improvement Journal* 27-1(1): 57-67 (in Persian).
- Gharesheikhhayat, R., Dendini, 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).
- Halasz, J., Fodor, A., Hegedus, A., and Pedryc, A. 2008.** Identification of a new self-incompatibility allele (S₃₁) in a Hungarian almond cultivar and its reliable detection. *Scientia Horticulturae* 116: 448-451.
- Halasz, 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: 792-803.
- Igic, B., and Kohn, J. R. 2001.** Evolutionary relationships among self-incompatibility RNases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 13167-13171.
- Kato, S., Iwata, H., Tsumura, Y., and Mukai, Y. 2007.** Distribution of S-alleles in island populations of flowering cherry, *Prunus lannesiana* var. *speciosa*. *Genes and Genetics Systems* 82: 65-75.
- Kodad, O., Alonso, J. M., Fernandez I., Marti, A., Oliveira, M. M., and Socias i Company, R. 2010.** Molecular and physiological identification of new S-alleles associated with self-(in)compatibility in local Spanish almond cultivars. *Scientia Horticulturae* 123: 308-311.
- Kodad, O., Sanchez, A. M., Saibo, N., Oliveira, M., and Socias i Company, R. 2008.** Identification and characterization of new S-alleles associated with self-incompatibility in almond. *Plant Breeding* 127: 632-638.
- Ladizinsky, G. 1999.** On the origin of almond. *Genetic Resources and Crop Evolution* 46: 143-147.
- Lopez, M., Mnejja, M., Rovira, M., Collins, G., Vargas, F. J., Arus, P., and Batlle, I. 2004.** Self-incompatibility genotypes in almond re-evaluated by PCR, stylar ribonucleases, sequencing analysis and controlled pollinations. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 954-964.
- Ma, R. C., and Oliveira, M. M. 2001.** Molecular cloning of the self-incompatibility genes S_1 and S_3 from almond (*Prunus dulcis* cv. Ferragnes). *Sexual Plant Reprod.* 14: 163-167.
- McClure, B. A., Haring, V., Ebert, P. R., Anderson, M. A., Simpson, R. J., Sakiyama, F., and Clarke, A. E. 1989.** Style self-incompatibility gene products of *Nicotiana glauca* are ribonucleases. *Nature* 342: 955-957.
- Mousavi, S. A., Fatahi Moghadam, M. R., Zamani, Z., Imani, A., Ortega, E., and Dicenta, F. 2011.** Identification of self-incompatibility alleles in Iranian almond cultivars and genotypes using PCR. *Iranian Journal of Horticultural Sciences* 42(2): 169-183 (in Persian).
- Nettancourt de, D. 2001.** Incompatibility and Incongruity of Wild and Cultivated Plants. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. 322 pp.

- Ortega, E., Boskovic, R. I., Sargent, D. J., and Tobutt, K. R. 2006.** Analysis of S-RNase alleles of almond (*Prunus dulcis*): characterization of new sequences, resolution of synonyms and evidence of intragenic recombination. *Molecular Genetics and Genomics* 276: 413-426.
- Ortega, E., Sutherland, B. G., Dicenta, F., Boskovic, R. I., and Tobutt, K. R. 2005.** Determination of incompatibility genotypes in almond using first and second intron consensus primers: detection of new S alleles and correction of reported S genotypes. *Plant Breeding* 124: 188-196.
- Rahemi, A. R., Fatahi, R., Ebadi, A., Taghavi, T., Hassani, D., Gradziel, T., and Chaparro, J. 2010.** Genetic variation of S-alleles in wild almonds and their related *Prunus* species. *Australian Journal of Crop Science* 4(8): 648-659.
- Sanchez, A. M., and Oliveira, M. M. 2005.** S-alleles in self-compatible *Prunus webbii*. *Options Mediterranean* 63: 147-152.
- Sanzol, J. 2009.** Genomic characterization of self-incompatibility ribonucleases (S-RNases) in European pear cultivars and development of PCR detection for 20 alleles. *Tree Genetics and Genomes* 5: 393-405.
- Sassa, H., Nishio, T., Kowyama, Y., Hirano, H., Koba, T., and Ikehashi, H. 1996.** Self-incompatibility (S) alleles of the Rosaceae encode members of a distinct class of the T2/S ribonuclease superfamily. *Molecular Genetics and Genomics* 250: 547-557.
- Sheikh-Alian, A., Vezvaei, A., Ebadi, A., Fatahi-Moghadam, M. R., and Sarkhosh, A. 2010.** Determination and identification of self-incompatibility alleles in selective Iranian and foreign almond (*Prunus dulcis* M.) cultivars by PCR Method. *Iranian Journal of Horticultural Sciences* 41 (3): 247-252 (in Persian).
- Socias i Company, R. 1990.** Breeding self-compatible almonds. *Plant Breeding Reviews* 8: 313-338.
- Socias i Company, R. 2004.** The contribution of *Prunus webbii* to almond evolution. *Plant Genetic Resources Newsletter* 140: 9-13.
- Sonneveld, T., Robbins, T. P., Boskovic, R., and Tobutt, K. R. 2001.** Cloning of six cherry self-incompatibility alleles and development of allele-specific PCR detection. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 1046-1055.
- Sonneveld, T., Tobutt, K. R., and Robbins, T. P. 2003.** Allele-specific 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.
- Surbanovski, N., Tobutt, K. R., Konstantinovic, M., Maksimovic, V., Sargent, D. J., Stevanovic, V., Ortega, E., and Boskovic, R. I. 2007.** Self-incompatibility of *Prunus tenella* and evidence that reproductively isolated species of *Prunus* have different SFB alleles coupled with an identical S-RNase allele. *The Plant Journal* 50: 723-734.
- Sutherland, B. G., Cerovic, R., Robbins, T. P., and Tobutt, K. R. 2009.** The myrobalan (*Prunus cerasifera* L.): a useful diploid model for studying the molecular genetics of self-incompatibility in plums. *Euphytica* 166: 385-398.
- Sutherland, B. G., Tobutt, K. R., and Robbins, T. P. 2004.** Primers amplifying a range of *Prunus* S alleles. *Plant Breeding* 123: 582-584.
- Sutherland, B. G., Tobutt, K. R., and Robbins, T. P. 2007.** Trans-specific S-RNase and SFB alleles in *Prunus* self-incompatibility haplotypes. *Molecular Genetics and Genomics* 279: 95-106.
- Tamura, M., Ushijima, K., Sassa, H., Hirano, H., Tao, R., Gradziel, T. M., and Dandekar, A. M. 2000.** Identification of self-incompatibility genotypes of almond by allele-specific PCR analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 334-349.
- Tao, R., Watari, A., Hanada, T., Habu, T., Yaegaki, H., Yamaguchi, M., and Yamane, H. 2007.** Self-compatible peach (*Prunus persica*) has mutant versions of the S haplotypes found in self-incompatible *Prunus* species. *Plant Molecular Biology* 63: 109-123.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D. G. 1997.** The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 4876-4882.
- Ushijima, K., Sassa, H., Tao, R., Yamane, H., Dandekar, A. M., Gradziel, T., and Hirano, H. 1998.** Cloning and characterization of cDNAs encoding S-RNases from almond (*Prunus dulcis*): primary structural features and sequence diversity of the S-RNases in Rosaceae. *Molecular Genetics and Genomics* 260: 261-268.
- Valizadeh, B., and Ershadi A. 2009.** Identification of self-incompatibility alleles in Iranian almond cultivars by PCR using consensus and allele-specific primers. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 84 (3): 285-290.
- Vaughan, S. P., Boskovic, R. I., Gisbert-Climent, A., Russell, K., and Tobutt, K. R.**

- 2008.** Characterisation of novel S-alleles from cherry (*Prunus avium* L.). *Tree Genetics and Genomes* 4: 531-541.
- Vieira, C. P., Santos, R. A. M., Morales-Hojas, R., and Vieira, J. 2007.** Different positively selected sites at the gametophytic self-incompatibility pistil S-RNase gene in the Solanaceae and Rosaceae (*Prunus*, *Pyrus*, and *Malus*). *Journal of Molecular Evolution* 65: 175-185.
- Wunsch, A., and Hormaza, J. I. 2004.** Cloning and characterization of genomic DNA sequences of four self-incompatibility alleles in sweet cherry (*Prunus avium* L.) *Theoretical and Applied Genetics* 108: 299-305.
- Yaegaki, H., Shimada, T., Moriguchi, T., Hayama, H., Hajime, T., and Yamaguchi, M. 2001.** Molecular characterization of S-RNase genes and S-genotypes in the Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.). *Sexual Plant Report*. 13: 251-257.
- Zeinolabedini, M., Khayam-Nekoui, M., Imani, A., and Majidian, P. 2012.** Identification of self-compatibility and self-incompatibility genotypes in almond and some *Prunus* species using molecular markers. *Seed and Plant Improvement Journal* 28-1(2): 227-238 (in Persian).
- Zhang, L., Chen, X., Chen, X., Zhang, C., Liu, X., Ci, Z., Zhang, H., Wu, C., and Liu, C. 2008.** Identification of self-incompatibility (*S*-) genotypes of Chinese apricot cultivars. *Euphytica* 160: 241-248.
- Zisovich, A. H., Stern, R. A., Shafir, S., and Goldway, M. 2008.** Identification of seven S-alleles from the European pear (*Pyrus communis*) and the determination of compatibility among cultivars. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 79: 101-106.