تعیین گرده‌زای مناسب برای ارقام و ژنوتیپ‌های بادام شاهرود 12، شکوفه و سلکسیون K-4-10 با استفاده از تکثیر اختصاصی آلل‌های ناسازگاری

Determination Suitable Pollinizers for Almond (*Prunus dulcis*) Cultivars and Genotypes "Shahrood 12", "Shokoufeh" and "K-4-10" Using Specific Amplification of S-alleles

احمد ارشادی[1*]، مهدی کلهری[2]، علی ایمانی[3]، بابک ولیزاده[2]، فرشاد دشتی[1]

چکیده

آلل‌های خودناسازگاری 16 رقم و ژنوتیپ بادام با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و عمومی بررسی شد و هم‌چنین هم‌پوشانی گلدهی آن‌ها با ارقام شاهرود12، شکوفه و سلکسیون K-4-10 تعیین گردید. به‌طور کلی 12 آلل مختلف با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و عمومی شناسایی گردید. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی 5 آلل خودناسازگاری S_1، S_2، S_7، S_8 و S_9 و آلل خودسازگاری S_f در ارقام و ژنوتیپ‌های مورد بررسی تکثیر گردید. برای 5 رقم و ژنوتیپ هر دو آلل، در 7 رقم و ژنوتیپ تنها یک آلل و برای 4 رقم و ژنوتیپ هیچ آللی شناسایی نشد. با استفاده از آغازگرهای عمومی دومین اینترون ژن ناسازگاری 31 آلل از مجموع 32 آلل ناسازگاری موجود در ارقام شناسایی گردید. در 15 رقم و ژنوتیپ هر دو آلل و در ژنوتیپ7 تنها آلل S_5 تکثیر گردید. آلل‌های S_1 و S_3 دارای بیشترین فراوانی بوده و به‌ترتیب در 8 و 5 رقم و ژنوتیپ شناسایی شدند. تاریخ شروع گلدهی، تمام گل و پایان گلدهی ارقام و ژنوتیپ‌ها یادداشت برداری شده و درصد هم‌پوشانی گلدهی آن‌ها با ارقام شاهرود12، شکوفه و سلکسیون K-4-10 تعیین گردید. با در نظر گرفتن ژنوتیپ ناسازگاری و درصد هم‌پوشانی گلدهی گرده‌زاهای مناسب برای ارقام مورد بحث تعیین شد. برای سلکسیون K-4-10 ژنوتیپ‌های K-10-11، K-14-12، K-16-30، K-16-25، K-12-4 و ارقام شاهرود12 و مارکونا؛ برای رقم شاهرود12 ژنوتیپ K-4-10 و رقم مارکونا؛ و برای رقم شکوفه ارقام سوپرنوا، سهند، تونو، ژنوتیپ 8، ژنوتیپ 7 و ژنوتیپ K-16-25 به‌عنوان گرده‌زا مناسب پیشنهاد می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: خودناسازگاری، پی‌سی‌آر، هسته‌دارها، گرده افشانی

Archive of SID

1. استادیاران گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان
2. دانشجویان سابق کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان
3. استادیار بخش تحقیقات باغبانی، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج
*: نویسنده مسوول

www.SID.ir

مقدمه

بادام با نام علمی *Prunus dulcis* Miller یکی از گونه‌های دیپلوئید متعلق به خانواده Rosaceae و زیر خانواده Prunoideae می‌باشد که به‌صورت تجاری در تمام دنیا پرورش داده می‌شود. تولید جهانی بادام 2065000 تن بوده و ایران با 110000 تن مقام پنجم را در این زمینه دارا می‌باشد (Anonymous, 2007). بیشتر ارقام بادام خودناسازگار بوده و تعدادی از ارقام با هم دگرناسازگارند (Boskovic *et al*. 2007). سیستم خودناسازگاری در بادام از نوع گامتوفیتیک بوده که توسط یک مکان‌ژنی با چندین فرم آللی کنترل می‌شود (بووسکوویچ و همکاران، 2007). خودناسازگاری اصلی ترین عاملی است که سبب می‌شود بخشی از کل درختان میوه در سطح باغ به درختان گرده‌زا اختصاص یابد. گرده‌زاها باید به دقت انتخاب شوند تا تشکیل میوه کافی را در رقم اصلی باغ تضمین کنند (Jansens *et al*. 1995). گاه در حضور یک رقم گرده‌زا نیز میزان تشکیل میوه پایین است که این می‌تواند به دلیل دگرناسازگاری و یا عدم هم‌زمانی گلدهی ارقام گرده‌زا و اصلی باشد. به‌دست آوردن محصول قابل‌قبول در بادام نیازمند کاشت حداقل دو رقم دگرسازگار با هم‌پوشانی گلدهی و وجود حشرات گرده‌افشان کافی برای انتقال گرده می‌باشد (Socias i Company *et al*. 2005). گل‌های اولیه بادام معمولاً درصد بالاتری از تشکیل میوه را نسبت به گل‌های بعدی همان درخت دارند و رقم گرده‌زا باید توانایی تولید گرده کافی از ابتدا تا اوج گلدهی رقم اصلی را دارا باشد (Asai *et al*. 1996).

ارقام بادام شاهرود12 و شکوفه از ارقام دیرگل و سلکسیون K-4-10 متوسط گل بوده و در صورتی که همراه با گرده‌زاهای سازگار و با همپوشانی گلدهی کافی کاشته شوند از ارقام پر محصول هستند. یکی از نکات اساسی و مهم در توسعه باغ های صنعتی و مدرن کاشت درختان به صورت یکدست و اجتناب از تنوع بیش از حد درختان در باغ می‌باشد، بنا براین انتخاب گرده‌زای مکمل و سازگار برای تلقیح رقم اصلی باغ از اولویت بالایی برخوردار هستند.

در روش سنتی انتخاب گرده‌زای مناسب با استفاده از گرده افشانی دستی صورت می گیرد که این امر مستلزم صرف هزینه و زمان زیاد بوده و همچنین از دقت بالایی برخوردار نیست و گاه نتایج به دست آمده توسط این روش خطا برانگیز بوده و قابل اطمینان نیست. همچنین تمایز دقیق بین تلاقی‌های سازگار و نیمه سازگار با روش‌های سنتی میسر نیست (Ershadi, 2002). *جانسنز* و همکاران (Jansens *et al*. 1995) تکثیر آلل‌های ناسازگاری به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی را یک روش جایگزین مناسب برای شناسایی آلل‌های خودناسازگاری و تعیین روابط ناسازگاری در درختان میوه اعلام کردند. استفاده از نشانگرهای مولکولی برای تعیین گرده‌زای مناسب تحت تاثیر محیط قرار نگرفته و نتایج آن قابل استفاده برای سال‌های مختلف می‌باشد. روش‌های مولکولی علاوه بر دقت و سرعت خیلی زیاد هزینهٔ کمتری نسبت به روش‌های سنتی داشته و بر روی نهال‌های جوان نیز قابل انجام می‌باشد (Ortega *et al*. 2005). این پژوهش با هدف تعیین ژنوتیپ‌های خودناسازگاری 16 رقم و ژنوتیپ بادام با استفاده از نشانگرهای مولکولی و بررسی همپوشانی گلدهی این ارقام با دو رقم شاهرود12 و شکوفه و سلکسیون K-4-10 و به منظور تعیین گرده‌زای مناسب برای آنها انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های گیاهی

مواد گیاهی مورد استفاده شامل 16 رقم و ژنوتیپK-4-10، K-10-11، K-12-4، K-14-12، 25-K-16، K-16-30، ژنوتیپ7، ژنوتیپ8، شاهرود12، ژنوتیپ21، مارکونا، سوپرنوا، تونو، سهند، شکوفه و آذر بود که نمونه‌های برگ آن‌ها از کلکسیون درختان میوه کمال‌آباد کرج وابسته به موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر تهیه گردید. در مرداد سال 1386 تعداد 7-5 عدد برگ از سرشاخه‌های جوان ارقام مختلف بادام جمع‌آوری و بلافاصله در ازت مایع منجمد گردید. نمونه‌های برگی تا زمان استخراج دی‌ان‌ای در ازت مایع نگهداری شدند.

استخراج دی‌ان‌ای

استخراج دی‌ان‌ای به روش *دویل و دویل* (Doyle and Doyle, 1987) با کمی تغییرات انجام شد. به‌این منظور از بافر استخراج حاوی 2% هگزا دستیل تری متیل آمونیوم بروماید (CTAB)، 1/4 مولار کلرید سدیم، 20میلی‌مولار EDTA، 100 میلی‌مولار تریس با pH=8، 2% پلی وینیل پیرولیدون (PVP) و 1% از بتا 2- مرکاپتواتانول استفاده گردید.

تکثیر اختصاصی آلل‌ها به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

تکثیر اختصاصی آلل‌ها به روش *چانونتاپیپات و همکاران* (Channuntapitat *et al*. 2003) و با استفاده از

Archive of SID

www.SID.ir

دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت بیوراد انجام گردید. مخلوط پی‌سی‌آر به حجم 20 میکرولیتر حاوی 30 نانو گرم دی‌ان‌ای الگو، یک برابر غلظت بافر پی‌سی‌آر، 1/5 میلی‌مولار کلریدمنیزیم، 200 میکرومولار dNTPs، 0/25 میکرومولار از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت و 1/1 واحد تک‌دی-ان‌ای پلیمراز (سیناژن) بود. واکنش پی‌سی‌آر به روش *چانونتاپیپات و همکاران* (2003) انجام شد که شامل واسرشته سازی اولیه به مدت 3 دقیقه در دمای 95 درجه سانتی‌گراد، 34 چرخه شامل واسرشته سازی در دمای 95 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 ثانیه، دمای اتصال آغازگر اختصاصی با توجه به جدول 1 و به مدت 45 ثانیه، یک دقیقه توسعه در دمای 72 درجه سانتی‌گراد و سپس 10 دقیقه توسعه نهایی در دمای 72 درجه سانتی‌گراد می‌باشد. الکتروفورز محصول پی‌سی‌آر روی ژل آگارز 1/5درصد در TAE با یک برابر غلظت و به مدت 3 ساعت در 60 ولت انجام گرفت. رنگ‌آمیزی ژل در محلول اتیدیوم بروماید به غلظت 0/5 میکروگرم در میلی‌لیتر و به مدت 45 دقیقه انجام شد. عکس‌برداری باندها زیر نور ماوراءبنفش صورت پذیرفت.

تکثیر دومین اینترون ژن خودناسازگاری به روش پی‌سی‌آر

واکنش پی‌سی‌آر برای دومین اینترون ژن خودناسازگاری به روش *ساترلند و همکاران* (Sutherland *et al*. 2004) و در حجم 20 میکرولیتر انجام شد که شامل 20 نانوگرم دی‌ان‌ای ژنومی، یک برابر غلظت بافر پی‌سی‌آر، 2/5 میلی‌مولار کلرید منیزیم، 0/2 میلی‌مولار dntps، 0/3 میکرومولار از هر آغازگر و 0/5 واحد تک دی-ان‌ای پلیمراز (سیناژن) بود. توالی جفت آغازگرهای دومین اینترون ژن خودناسازگاری EM-PC2consFD و EM-PC3consRD (Sutherland *et al*. 2004) به صورت زیر می‌باشد:

EM-PC2consFD: TCA C(A/C)A T(C/T)C ATG GCC TAT GG

EM-PC3consRD: A(A/T)(G/C) T(A/G)C C(A/G)T G(C/T)T TGT TCC ATT C

تکثیر دومین اینترون ژن ناسازگاری به روش ساترلند و همکاران (2004) انجام گردید و شامل واسرشته-سازی اولیه در دمای 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 2 دقیقه، 10 چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای 94 درجه سانتی-گراد به مدت 10 ثانیه، اتصال آغازگر در دمای 58 درجه سانتی‌گراد به مدت 2 دقیقه، توسعه آغازگر در دمای 68 درجه سانتی‌گراد به مدت 2 دقیقه و به دنبال آن 25 چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 ثانیه، اتصال آغازگر در دمای 58 درجه سانتی‌گراد به مدت 2 دقیقه، توسعه آغازگر در دمای 68 درجه سانتی‌گراد به مدت 2 دقیقه انجام شد. در طی 25 چرخه انجام شده در هر سیکل10 ثانیه به مرحله توسعه اضافه شد به‌طوری که در سیکل بیست و پنجم زمان توسعه 6 دقیقه و 10 ثانیه گردید. الکتروفورز محصول پی‌سی‌آر، روی ژل‌آگارز 1/5 درصد در TAE یک برابر غلظت به مدت 6 ساعت در 100 ولت انجام شد. رنگ‌آمیزی ژل در محلول اتیدیوم بروماید انجام شد و سپس باندها زیر نور ماوراء بنفش نمایان و عکس‌برداری از آن‌ها انجام گردید.

زمان گلدهی

باز شدن 5-10% گل‌ها به عنوان مرحله شروع گلدهی، 50% گل‌ها به عنوان مرحله تمام‌گل، و باز شدن 95% گل‌ها به عنوان پایان‌گلدهی گولکان (Gulcan, 1985) یادداشت گردید. طول دوره گلدهی نیز بر اساس فاصله بین شروع و پایان گلدهی تعیین شد.

جدول1: دمای اتصال مناسب برای آغازگرهای اختصاصی طراحی شده توسط چانونتاپیپات و همکاران (2003)

Table 1: Suitable annealing temperature for allele-specific primers developed by Channuntapitat et al (2003)

آلل‌ها alleles	S_1	S_2	S_5	S_7	S_8	S_9	S_{10}	S_{23}	S_f
دمای اتصال annealing temperature	55-60	60	60	60	65	65	60	60-65	60

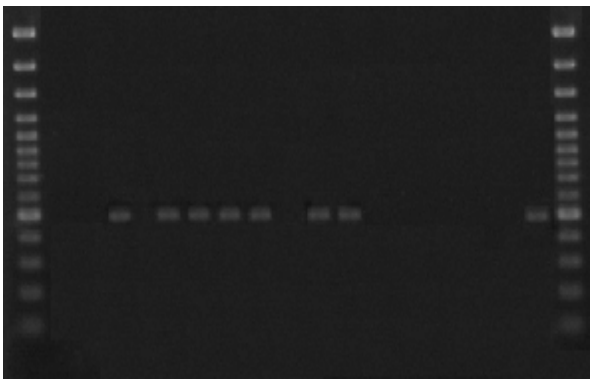
نتایج و بحث

تکثیر اختصاصی آلل‌ها به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

با استفاده از 9 جفت آغازگر اختصاصی موجود 5 آلل خودناسازگاری S_1، S_2، S_7، S_8 و S_9 و آلل خودسازگاری S_f تکثیر گردید و 3 آلل S_5، S_{10} و S_{23} در هیچ کدام از ارقام و ژنوتیپ‌ها مشاهده نگردید. شکل 1 تکثیر آلل خودناسازگاری S_1 را در برخی از ژنوتیپ ها نشان می‌دهد.

Archive of SID

www.SID.ir



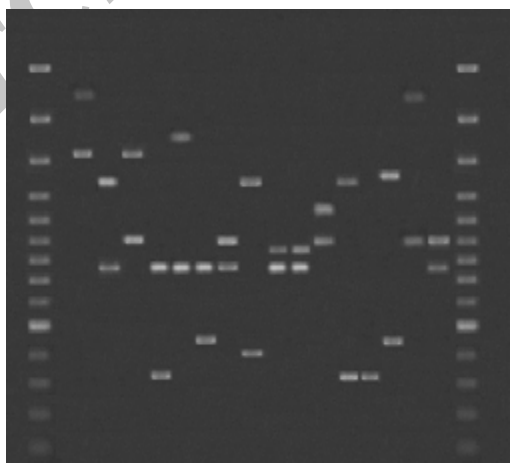
شکل 1: تکثیر آلل خودناسازگاری S_1 با استفاده از آغازگرهای اختصاصی. نمونه‌ها از چپ به راست: نشانگر اندازه 100 جفت بازی، کنترل منفی، K-4-10، K-12-4، K-10-11، K-14-12، K-16-30، K-16-25، شاهرود12، مارکونا، سوپرنوا، تونو، ژنوتیپ شماره21، ژنوتیپ شماره8، ژنوتیپ شماره7، سهند، شکوفه، آذر، نشانگر اندازه 100 جفت بازی.

Figure 1: S1 allele amplification using allele-specific primers. Samples from left to right: 100 bp size marker, negative control, K-4-10, K-12-4, K-10-11, K-14-12, K-16-30, K-16-25, Shahrood 12, Marcona, Supernova, Touno, genotype 21, genotype 8, genotype 7, Sahand, Shokoufeh, Azar, 100 bp size marker.

آلل خودناسازگاری S_1 در ژنوتیپ‌های K-12-4، K-14-12،K-16-30، K-16-25، و در ارقام شاهرود12، سوپرنوا، تونو و آذر؛ آلل خودناسازگاری S_2 در ژنوتیپ K-16-25 و رقم سهند؛ آلل خودناسازگاری S_7 در ژنوتیپ K-16-30؛ آلل خودناسازگاری S_8 در ژنوتیپ K-4-10 و رقم شکوفه؛ آلل خودناسازگاری S_9 در ژنوتیپ‌های K-4-10 و K-10-11 و آلل خودسازگاری Sf در ارقام سوپرنوا و تونو تکثیر گردید.

شناسایی آلل‌های خودناسازگاری با استفاده از آغازگرهای عمومی دومین اینترون

با استفاده از آغازگرهای عمومی دومین اینترون ژن خودناسازگاری در کلیه ارقام مورد مطالعه به‌جز ژنوتیپ شماره 7، هر دو آلل خودناسازگاری تکثیر گردید (شکل 2). در ژنوتیپ شماره 7 فقط یک باند مرتبط با آللS_5 تکثیر شد. اندازه باندهای تکثیر شده توسط آغازگرهای عمومی دومین اینترون ژن خودناسازگاری بین 300 تا 2470 جفت باز می‌باشد (جدول 2). با استفاده از نشانگر اندازه یک کیلو جفت بازی و اندازه باندهای مرتبط با آلل های شناخته شده (Ortega *et al*. 2005)، اندازه باندهای تکثیر شده توسط آغازگرهای عمومی دومین اینترون ژن خودناسازگاری محاسبه گردید.



شکل 2: تکثیر عمومی آلل‌ها با استفاده از آغازگرهای عمومی دومین اینترون. نمونه‌ها به ترتیب از چپ به راست عبارتند از نشانگر اندازه یک کیلو جفت بازی، کنترل منفی، K-4-10، K-12-4، K-10-11، K-14-12، K-16-30، K-16-25، شاهرود12، مارکونا، سوپرنوا، تونو، ژنوتیپ شماره21، ژنوتیپ شماره8، ژنوتیپ شماره7، سهند، شکوفه، آذر، نشانگر اندازه 100 جفت بازی.

Figure 2: S-allele amplification using second intron primers. Samples from left to right: 100 bp size marker, negative control, K-4-10, K-12-4, K-10-11, K-14-12, K-16-30, K-16-25, Shahrood 12, Marcona, Supernova, Touno, genotype 21, genotype 8, genotype 7, Sahand, Shokoufeh, Azar, 100 bp size marker

www.SID.ir

با استفاده از آغازگرهای عمومی دومین اینترون ژن خودناسازگاری در ژنوتیپ K-4-10 یک باند با اندازه 2470 جفت باز مربوط به آلل خودناسازگاری S_8 و باند دیگر با اندازه 1560 جفت باز مربوط به آلل خودناسازگاری S_9 تکثیر شد. در ژنوتیپ K-12-4 دو باند با اندازه‌های 750 و 1300 جفت باز تکثیر گردید که مربوط به آلل‌های خودناسازگاری S_1 و S_{12} می‌باشند. در ژنوتیپ K-10-11 دو باند با اندازه‌های 900 و 1560 جفت باز مرتبط با آلل-های خودناسازگاری S_3 و S_9 تکثیر شد. در ژنوتیپ K-12-4 باند S_1 با اندازه 750 جفت باز و باند S_5 با اندازه 330 جفت باز تکثیر گردید. در ژنوتیپ K-16-30 دو باند با اندازه‌های 750 و 1700 جفت باز تکثیر گردید که مربوط به آلل‌های خودناسازگاری S_1 و S_7 می‌باشند. در ژنوتیپ K-16-25 آلل‌های خودناسازگاری S_1 و S_2 به ترتیب با اندازه باندهای 750 و 450 جفت باز تکثیر گردیدند. در ارقام شاهرود12 و آذر دو باند با اندازه‌های 750 و 900 جفت باز تکثیر گردید که به ترتیب مربوط به آلل‌های خودناسازگاری S_1 و S_3 هستند. در رقم مارکونا آلل خودناسازگاری S_{11} با اندازه 400 جفت باز و آلل خودناسازگاری S_{12} با اندازه 1300 جفت باز تکثیر شدند. در ارقام سوپرنوا و تونو دو باند با اندازه‌های 750 و 850 جفت باز مربوط به آلل خودناسازگاری S_1 و آلل خودسازگاری Sf تکثیر شدند. در ژنوتیپ شماره21 دو باند با اندازه 900 و 1080 جفت باز تکثیر گردید که به ترتیب مربوط به آلل‌های خودناسازگاری S_3 و S_{13} هستند. در ژنوتیپ شماره 8 دو باند با اندازه 330 و 1300 جفت باز تکثیر گردید که به ترتیب مربوط به آلل-های خودناسازگاری S_5 و S_{12} می‌باشند. در رقم سهند دو باند با اندازه 450 و 1360 جفت باز تکثیر گردید که به ترتیب مربوط به آلل‌های خودناسازگاری S_2 و S_{27} می‌باشند. در رقم شکوفه آلل S_3 با باندی با اندازه 900 جفت باز و آلل S_8 با اندازه 2470جفت باز تکثیر شد.

اینترون دوم مکان ژنی ناسازگاری دارای تنوع بالایی در طول خود می‌باشد و برای شناسایی آلل‌های خودناسازگاری کارآمدتر از سایر آغازگرهای عمومی طراحی شده برای بادام است.

تعیین ژنوتیپ ارقام مورد مطالعه

ژنوتیپ ارقام مورد مطالعه با استفاده از تکثیر اختصاصی آلل‌ها به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و همچنین استفاده از آغازگرهای عمومی دومین اینترون ژن ناسازگاری تعیین گردید (جدول 3). در 15 رقم و ژنوتیپ هر دو آلل مشخص گردید و تنها در ژنوتیپ7 یک آلل مشخص گردید. از بین 16 رقم و ژنوتیپ مورد بررسی 14 رقم خودناسازگار و 2 رقم خودسازگار بودند. نتایج حاصل از تکثیر اختصاصی آلل‌ها به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و استفاده از آغازگرهای عمومی دومین اینترون ژن ناسازگاری کاملاً با هم تطابق شده و یکدیگر را تایید کردند. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و آغازگرهای عمومی دومین اینترون ژن ناسازگاری آلل‌های S_8 و S_9 در ژنوتیپ K-4-10 تکثیر شد. در ژنوتیپ K-12-4 با استفاده از آغازگرهای اختصاصی آلل S_1 و با استفاده از آغازگرهای عمومی دومین اینترون ژن ناسازگاری آلل‌های S_1 و S_{12} تکثیر گردیدند. در ژنوتیپ K-10-11 با استفاده از آغازگرهای اختصاصی آلل S_9 و به کمک آغازگرهای عمومی دومین اینترون ژن ناسازگاری آلل‌های S_3 S_9 شناسایی شد. در ژنوتیپ K-14-12 با استفاده از آغازگرهای اختصاصی آلل S_1 و با استفاده از آغازگرهای عمومی دومین اینترون آلل‌های S_1 و S_5 تکثیر گردیدند. در ژنوتیپ K16-30 با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و آغازگرهای عمومی دومین اینترون آلل‌های S_1 و S_7 تکثیر شد. در ژنوتیپ K-16-25 آغازگرهای اختصاصی و آغازگرهای عمومی دومین اینترون آلل‌های S_1 و S_2 را تکثیر نمودند. در رقم شاهرود12 با آغازگرهای اختصاصی آلل S_1 و با استفاده از آغازگرهای عمومی دومین اینترون آلل‌های S_1 و S_3 تکثیر شد. در رقم مارکونا با استفاده از آغازگرهای عمومی دومین اینترون آلل‌های S_{11} و S_{12} تکثیر شد در حالیکه با استفاده از آغازگرهای اختصاصی باندی تکثیر نگردید. در ارقام سوپرنوا و تونو با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و آغازگرهای عمومی دومین اینترون آلل‌های S_1 و Sf تکثیر شد. در ژنوتیپ 21 با استفاده از آغازگرهای عمومی دومین اینترون آلل‌های S_3 و S_{13} تکثیر شد و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی باندی تکثیر نگردید. در ژنوتیپ 8 با آغازگرهای اختصاصی باندی تکثیر نگردید اما آغازگرهای عمومی دومین اینترون آلل‌های S_5 و S_{12} را مشخص نمودند. در ژنوتیپ7 تنها باند مرتبط با آلل S_5 با استفاده از آغازگرهای عمومی دومین اینترون تکثیر گردید و با آغازگرهای اختصاصی باندی تکثیر نشد. در رقم سهند با استفاده از آغازگرهای اختصاصی آلل S_2 و با آغازگرهای عمومی دومین اینترون آلل‌های S_2 و S_{27} تکثیر گردیدند. در رقم شکوفه با استفاده از آغازگرهای اختصاصی آلل S_8 و با آغازگرهای

Archive of SID

www.SID.ir

عمومی دومین اینترون آلل‌های S_3 و S_8 مشاهده گردید. در رقم آذر با آغازگرهای اختصاصی آلل S_1 و با استفاده از آغازگرهای عمومی دومین اینترون آلل‌های S_1 و S_3 تکثیر شد.

جدول 2: اندازه محصول پی سی آر تکثیر شده با استفاده از آغازگرهای عمومی دومین اینترون ژن ناسازگاری*

Table2: Sizes of PCR products amplified by second intron primers

آلل‌های خودناسازگاری S-alleles	محصول پی‌سی‌آر (bp) PCR product (bp)	آلل‌های خودناسازگاری S-alleles	محصول پی‌سی‌آر (bp) PCR product (bp)
Sf	850	S15	330
S1	750	S16	750
S2	450	S17	750
S3	900	S18	350
S4	620	S19	1080
S5	330	S20	620
S6	570	S21	500
S7	1700	S22	1130
S8	2470	S23	690
S9	1560	S24	875
S10	300	S25	850
S11	400	S26	3000
S12	1300	S27	1360
S13	1080	S28	340
S14	1050	S29	-

*: Ortega et al (2005)

جدول 3: ژنوتیپ ناسازگاری ارقام و ژنوتیپ های بادام تعیین شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و عمومی

Table 3: S-genotype of almond cultivars and genotyped determined using specific and consensus primers

ارقام cultivars	آغازگرهای اختصاصی allele-specific primers	آغازگرهای دومین اینترون Second intron primers	ژنوتیپ نهایی deduced S-genotype
K-4-10	S8S9	S8S9	S8S9
K-12-4	S1	S1S12	S1S12
K-10-11	S9	S3S9	S3S9
K-14-12	S1	S1S5	S1S5
K-16-30	S1S7	S1S7	S1S7
K-16-25	S1S2	S1S2	S1S2
Shahroud 12	S1	S1S3	S1S3
Marcona	-	S11S12	S11S12
Supernova	S1Sf	S1Sf	S1Sf
Touno	S1Sf	S1Sf	S1Sf
Genotype 21	-	S3S13	S3S13
Genotype 8	-	S5S12	S5S12
Genotype 7	-	S5	S5S-
Sahand	S2	S2S27	S2S27
Shokoufeh	S8	S3S8	S3S8
Azar	S1	S1S3	S1S3

بر اساس نتایج به‌دست آمده، فراوانی آلل‌ها در ارقام و ژنوتیپ‌های مورد بررسی به صورت S_1 (50%)، S_3 (31/2%)، S_5 (18/6%)، S_{12} (18/6%)، S_2 (12/5%)، S_8 (12/5%)، S_9 (12/5%)، S_f (12/5%)، S_7 (6/25%)، S_{11} (6/25%)، S_{13} (6/25%)، S_{27} (6/25%) بود.

بر اساس ژنوتیپ خودناسازگاری تعیین شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و عمومی؛ ارقام شاهرود12 و آذر با ژنوتیپ S_1S_3 در گروه دگرناسازگاری شماره8 و در کنار ارقامی مانند فرانیس و فرالیس قرار می‌گیرند. K-16-30 با ژنوتیپ خودناسازگاری S_1S_7 همراه با ارقامی مانند مرسدنه‌پلاس‌اولترا و پرایس در گروه دگرناسازگاری

www.SID.ir

Archive of SID

شماره 4، و K-14-12 با ژنوتیپ خودناسازگاری S_1S_5 در گروه دگرناسازگاری شماره 2 در کنار ارقامی هم‌چون میشن و لانگوداک جای می‌گیرند. ژنوتیپ‌های خودناسازگاری S_1S_{12} و S_1S_2 تا به‌حال فقط در ارقام دل‌سید و کریستومورتو گزارش شده‌اند و لذا دو گروه دگرناسازگاری جدید شامل ژنوتیپ K-12-4 و دل‌سید با ژنوتیپ S_1S_{12}، و ژنوتیپ K-16-25 و کریستومورتو با ژنوتیپ S_1S_2 به‌وجود می‌آید. ژنوتیپ‌های K-4-10 و K-10-11، ژنوتیپ21، ژنوتیپ8، ژنوتیپ7 و ارقام سهند و شکوفه همگی در گروه دهنده عمومی قرار می‌گیرند. گروه دهنده عمومی شامل ارقامی است که دارای ژنوتیپ‌های منحصر به‌فرد بوده و می‌توانند ارقام موجود در سایر گروه‌های ناسازگاری را به‌طور موفقیت‌آمیزی گرده‌افشانی و تلقیح نمایند و به‌طور متقابل توسط آن گروه‌ها گرده‌افشانی و تلقیح شوند. در صورت هم‌زمان بودن تاریخ گلدهی می‌توان از ارقامی که دارای ژنوتیپ ناسازگاری متفاوتی هستند به‌عنوان گرده‌زای سازگار استفاده نمود.

ژنوتیپ ارقام خودسازگار سوپرنوا و تونو نیز با توجه به نتایج حاصل از آغازگرهای اختصاصی و آغازگرهای عمومی دومین اینترون ژن ناسازگاری S_1S_f تعیین شد که تاکید کننده گزارش‌های قبلی هستند (Lopez *et al*. 2006).

همپوشانی گلدهی ارقام و ژنوتیپ‌های مورد بررسی و معرفی گرده‌زاهای مناسب

دوره گلدهی 16 رقم و ژنوتیپ بادام مورد مطالعه و میزان هم‌پوشانی گلدهی آن‌ها با ارقام شاهرود12، شکوفه و ژنوتیپ K-4-10 در سال 1387 بررسی شد (جدول4). چنان‌چه یک رقم حداقل 50% هم‌پوشانی گلدهی با رقم اصلی داشته باشد می‌تواند به عنوان گرده‌زا برای رقم اصلی استفاده شود. شکل 3 میزان هم‌پوشانی گلدهی بین ارقام و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد. با توجه به داده‌های جدول 4، ژنوتیپ K-4-10 به عنوان یک رقم متوسط گل، رقم شاهرود12 رقمی متوسط تا دیرگل و رقم شکوفه رقمی دیرگل معرفی می‌گردند. گرده‌زاهای اصلی برای ژنوتیپ K-4-10، با در نظر گرفتن ژنوتیپ ناسازگاری و درصد هم‌پوشانی گلدهی آن‌ها با ژنوتیپ K-4-10 ارقام و ژنوتیپ‌های K-12-4، K-10-11، K-14-12، K-16-30، K-16-25، شاهرود12 و مارکونا می‌باشند که هر یک از آن‌ها بیش از 50% با ژنوتیپ K-4-10 هم‌پوشانی گلدهی بوده و دارای ژنوتیپ ناسازگاری متفاوتی از ژنوتیپK-4-10 می‌باشند. از آن‌جا که ارقام و ژنوتیپ‌های ذکر شده مشکلی از لحاظ ناسازگاری با ژنوتیپ K-4-10 ندارند لذا با در نظر گرفتن زمان گلدهی این ارقام و درصد هم‌پوشانی آن‌ها با ژنوتیپ K-4-10 مناسب‌ترین گرده‌زاها برای این ژنوتیپ به ترتیب K-10-11، K-14-12، شاهرود12، K-16-30، K-16-25، مارکونا و K-12-4 می‌باشند. در صورت یکسان بودن درصد هم‌پوشانی گلدهی، رقم یا ژنوتیپی که با شروع گلدهی رقم اصلی هم‌پوشانی بالاتری داشته باشد گرده‌زای مناسب‌تری تلقی می‌گردد زیرا در بادام گل‌های اولیه معمولاً درصد تشکیل میوه بالاتری را نسبت به گل‌های بعدی همان درخت خواهند داشت (آسایی و همکاران، 1996). رقم سوپرنوا با 40% هم‌پوشانی گلدهی با ژنوتیپ K-4-10 و عدم وجود مشکل ناسازگاری با این ژنوتیپ به عنوان گرده‌زای درجه2 قلمداد می‌گردد و ارقام تونو، سهند، شکوفه، آذر، ژنوتیپ21، ژنوتیپ8 و ژنوتیپ7 علی رقم سازگاری با ژنوتیپ K-4-10 دارای هم‌پوشانی گلدهی کافی با این ژنوتیپ نبوده و لذا گرده‌زاهای مناسبی برای ژنوتیپ K-4-10 محسوب نمی‌گردند. گرده زاهای اصلی برای رقم شاهرود12، با در نظر گرفتن ژنوتیپ ناسازگاری و درصد هم‌پوشانی گلدهی آن‌ها با رقم شاهرود12، ارقام و ژنوتیپ‌های K-4-10، K-12-4، K-10-11، K-14-12، K-16-30، K-16-25، مارکونا و سوپرنوا می‌باشند که هر یک از آن‌ها بیش از 50% با رقم شاهرود12 دارای هم‌پوشانی گلدهی می‌باشند. از آن‌جا که ژنوتیپ‌های K-12-4، K-10-11، K-14-12، K-16-30، K-16-25 و رقم سوپرنوا دارای آلل ناسازگاری مشابه با رقم شاهرود12 می‌باشند به عنوان گرده‌زاهای نیمه‌سازگار و ژنوتیپK-4-10، و رقم مارکونا به عنوان گرده‌زاهای کاملاً سازگار تلقی گردیده و با در نظر گرفتن زمان گلدهی و درصد هم‌پوشانی آن‌ها با رقم شاهرود12، گرده‌زاهای اصلی برای این رقم به ترتیب ژنوتیپ K-4-10 و رقم مارکونا بوده و ژنوتیپ‌های K-10-11، K-14-12، K-16-30، K-16-25، K-12-4 و رقم سوپرنوا به عنوان گرده‌زاهای نیمه سازگار برای رقم شاهرود12 تلقی می‌گردند. ارقام تونو، سهند، ژنوتیپ21 و ژنوتیپ8 گرده‌زاهای درجه2 محسوب شده و رقم شکوفه و ژنوتیپ7 گرده‌زاهای مناسبی برای رقم شاهرود12 نمی‌باشند. به‌علت یکسان بودن ژنوتیپ ناسازگاری ارقام شاهرود12 و آذر با یکدیگر و جای گرفتن در یک گروه دگرناسازگاری، رقم آذر بدون در نظر گرفتن هم‌پوشانی گلدهی با رقم شاهرود12، توانایی تلقیح و باروری رقم شاهرود12 را نخواهد داشت.

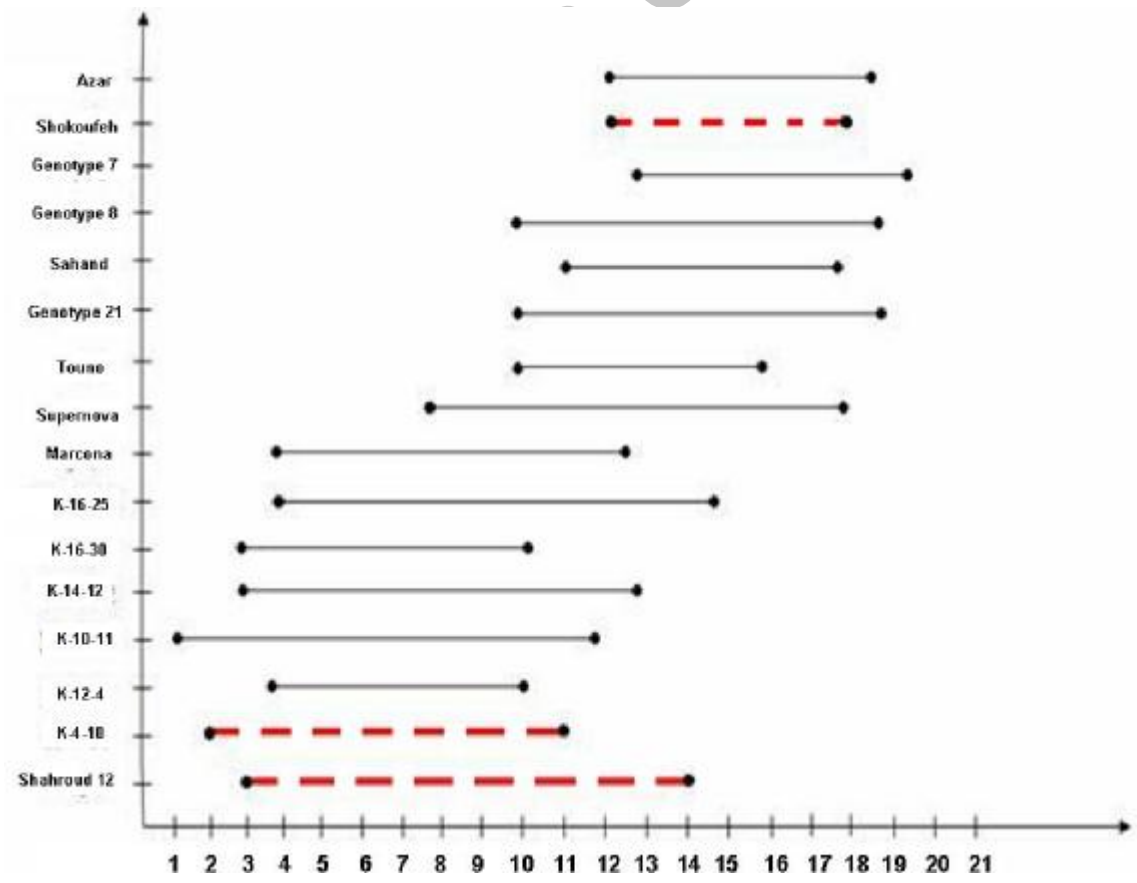
Archive of SID

www.SID.ir

جدول 4: شروع گلدهی، شکوفه دهی کامل و پایان گلدهی ارقام و ژنوتیپ‌های بادام مورد بررسی

Table 4: Beginning of flowering, full bloom and end of flowering of studied Almond cultivars and genotypes

همپوشانی با شکوفه Coincidence with Shokoufeh	همپوشانی با شاهرود12 Coincidence with Shahroud 12	همپوشانی با K-4-10 Coincidence with K-4-10	پایان گلدهی End of flowering	شکوفه دهی کامل Full bloom	شروع گلدهی Beginning of flowering	رقم cultivar
_	75%	%100	31.3.2008	25.3.2008	22.3.2008	K-4-10
_	%58	%70	30.3.2008	27.3.2008	24.3.2008	K-12-4
%14	%83	%100	1.4.2008	28.3.2008	21.3.2008	K-10-11
%28	%91	%90	2.4.2008	25.3.2008	23.3.2008	K-14-12
_	%66	%80	30.3.2008	27.3.2008	23.3.2008	K-16-30
%57	%91	%80	4.4.2008	28.3.1008	24.3.2008	K-16-25
%42	%100	%90	3.4.2008	29.3.2008	23.3.2008	Shahroud 12
%28	%83	%80	2.4.2008	26.3.2008	24.3.2008	Marcona
%100	%58	40%	7.4.2008	1.4.2008	28.3.2008	Supernova
%71	%41	%20	5.4.2008	2.4.2008	30.3.2008	Touno
%100	%41	%20	8.4.2008	2.4.2008	30.3.2008	Genotype 21
%100	%33	%10	7.4.2008	4.4.2008	31.3.2008	Sahand
%100	%41	%20	8.4.2008	5.4.2008	30.3.2008	Genotype 8
%85	%16	-	9.4.2008	5.4.2008	2.4.2008	Genotype 7
%100	%25	-	7.4.2008	4.4.2008	1.4.2008	Shokoufeh
%100	%25	-	8.4.2008	5.4.2008	1.4.2008	Azar



شکل 3: هم‌پوشانی گلدهی بین ارقام و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بادام

Figure 3: Flowering coincidence among studied Almond cultivars and genotyped

www.SID.ir

گرده‌زاهای اصلی برای رقم شکوفه با در نظر گرفتن ژنوتیپ ناسازگاری و درصد هم‌پوشانی گلدهی آن‌ها با رقم مذکور ژنوتیپ K-16-25، ژنوتیپ21، ژنوتیپ8، ژنوتیپ7، و ارقام سوپرنوا، تونو، سهند و آذر هستند که هر یک بیش از 50% با رقم شکوفه دارای هم‌پوشانی گلدهی می‌باشند. از آن‌جا که ژنوتیپ21 و رقم آذر دارای آلل ناسازگاری مشابه با رقم شکوفه می‌باشند به عنوان گرده‌زاهای نیمه‌سازگار و ژنوتیپ K-16-25، ژنوتیپ8، ژنوتیپ7، و ارقام سوپرنوا، تونو و سهند به عنوان گرده‌زاهای کاملاً سازگار تلقی گردیده و با در نظر گرفتن زمان گلدهی و درصد هم‌پوشانی آن‌ها با رقم شکوفه، گرده‌زاهای اصلی برای این رقم به ترتیب ارقام سوپرنوا، سهند، ژنوتیپ8، ژنوتیپ7، رقم تونو و ژنوتیپ K-16-25 می‌باشند و ژنوتیپ21، رقم آذر و رقم شاهرود12 به عنوان گرده‌زاهای نیمه سازگار برای رقم شکوفه تلقی می‌گردند. ژنوتیپ‌های K-4-10، K-10-11، K-14-12، K-30، K-16، K-12-4 و رقم مارکونا نیز گرده‌زاهای مناسبی برای رقم شکوفه محسوب نمی‌شوند. علی‌رغم دقت بالای روش‌های مولکولی در تعیین ژنوتیپ ناسازگاری ارقام و مشخص نمودن ترکیب‌های سازگار، بهتر است که صحت کارهای انجام شده در باغ طی یک تحقیق میدانی مورد تایید قرار گیرد. نتایج این آزمایش نشان‌داد که بررسی ژنوتیپ ناسازگاری ارقام بادام با روش های مولکولی می‌تواند به طراحی و محدود کردن آزمایش‌های شناسایی گرده زا کمک نموده و هزینه زیاد آزمایش های مزرعه‌ای را در حد قابل توجهی کاهش دهد.

منابع:

جهت ملاحظه منابع به صفحه‌های 3-4 متن انگلیسی مراجعه شود.

Archive of SID

www.SID.ir