

شناسایی آلل‌های خودناسازگاری در برخی ارقام و ژنوتیپ‌های آلو ژاپنی (*Prunus salicina* Lindl.) با استفاده واکنش زنجیره ای پلی‌مراز

Identification of Self-Incompatibility Alleles in Some Japanese Plum (*Prunus salicina* Lindl.) Cultivars and Genotypes Using Polymerase Chain Reaction

محی الدین پیرخضری

استادیار، پژوهشکده میوه های معتدله و سردسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۲۷

چکیده

پیر خضری، م. ۱۳۹۹. شناسایی آلل‌های خودناسازگاری در برخی ارقام و ژنوتیپ‌های آلو ژاپنی (*Prunus salicina* Lindl.) با استفاده واکنش زنجیره ای پلی‌مراز. مجله نهال و بذر ۳۶: ۵۲۶-۵۰۹.

آلوه‌ها در بین مهمترین درختان میوه در جهان قرار دارند. آلوه‌های ژاپنی دیپلوئید و اغلب ارقام خودناسازگارند. شناسایی آلل‌های خودناسازگاری برای گسترش این محصول و دورگ گیری ضروری است. در این تحقیق آلل‌های خودناسازگاری ۱۴ ژنوتیپ آلو ژاپنی با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی‌مراز (PCR) و گرده افشانی کنترل شده، شناسایی شد. با به کار بردن هفت جفت آغازگر مکان ژن‌های *S-Rnase* و *SFB* تنوع بالایی در آلل‌های ناسازگاری مشاهده شد. هیجده باند با اندازه‌های ۲۱۵ تا ۱۷۳۴ جفت باز با جفت آغازگرهای EMPC2consFD و EMPC3consRD تکثیر گردید. با مقایسه اندازه باندهای بدست آمده با اندازه آلل‌های *S* موجود در NCBI، تعداد پنج باند با اندازه‌های جدید مشاهده شد که پس از توالی‌یابی می‌توانند کاندیدای آلل جدید باشند. ارقام آلو سنقر آبادی، شماره ۱۶ و واعظی دارای آلل *Sb* بودند که عامل خودسازگاری است و با خودگرده افشانی، واعظی، سنقر آبادی و شماره ۱۶ به ترتیب ۰/۷۹، ۰/۲۱ و ۰/۳۲ درصد خودباروری داشتند. نتایج خودگرده افشانی نشان داد که اغلب ارقام و ژنوتیپ‌های مورد بررسی خودناسازگار بودند، اما رقم سیمکا با ۲/۹ درصد خودباروری نیمه خود(نا)سازگار بود. بیشترین میانگین آلل تکثیر شده در آغازگرها مربوط به ارقام لارودا و بلک آمبر و کمترین آلل تکثیر شده مربوط به ارقام شایرو و قطره طلا بود. بر اساس نتایج این پژوهش روش‌های مولکولی در ترکیب با روش‌های باغی در شناسایی آلل‌های ناسازگاری بسیارکارآمد هستند.

واژه های کلیدی: آلو، آغازگر، خودگرده‌افشانی، خودسازگار، روش های مولکولی.

مقدمه

ضروری است (Lopez et al., 2006).

برای مطالعه‌ی خود(نا)سازگاری از روش‌های گرده افشانی کنترل شده و بررسی میزان تشکیل میوه، بررسی رشد لوله گرده در تخمدان و روش‌های مولکولی استفاده می‌شود (Murfett et al., 1992; Ishimizu et al., 1999).

واکنش زنجیره ای پلی‌مرز (PCR) روشی سریع، دقیق و کارآمد در ارزیابی خود ناسازگاری است. ژن *S* ریونوکلئاز در خانواده رزاسه دارای ساختمان مشابهی است و شامل پنج منطقه حفاظت شده (C1-C5) و یک منطقه با تنوع بالا که دارای دو اینترون است (Ushijima et al., 1998).

آلوه‌ای دیپلوئید (آلو ژاپنی و میروبالان) کاملاً خودناسازگارند و خودسازگاری یک پدیده استثنایی در بین آنهاست (Szabo, 2003; Hegedus and Halasz, 2006).

آلل‌های *S* و گروه‌های ناسازگاری تعدادی از درختان میوه مانند گیلاس (Wang et al., 2010)، بادام (Halasz et al., 2008) و زردآلو (Feng et al., 2006) با استفاده از روش‌های مولکولی گزارش شده است.

تعیین اولین آلل *S* در آلو ژاپنی (رقم سوردوم) گزارش شده است (Yaman et al. 1999). شناسایی ۱۴ آلل با آغازگرهای ژن *S-RNase* نشان داد که ژن آلو ژاپنی همانند دیگر گونه‌های جنس پرونوس دارای دو اینترون است (Beppu et al., 2003). تا کنون ۳۶ آلل *S* در

آلوه‌ای یکی از میوه‌های مهم مناطق معتدل هستند. ایران با تولید ۳۱۳ هزار تن آلو رتبه پنج در جهان را دارا می‌باشد (FAO, 2018). آلو متعلق به خانواده Rosaceae زیرخانواده Prunoidae و جنس Prunus با عدد کروموزومی پایه $X = 8$ می‌باشد. عمده آلوه‌ای تجاری شامل آلوه‌ای اروپایی (*P. domestica*) هگزاپلوئید ($n = 6x = 48$) و آلوه‌ای ژاپنی (*P. salicina*) دیپلوئید ($n = 2x = 16$) می‌باشند. میوه‌دهی در آلو و بعضی از اعضای خانواده گل سرخیان مانند سیب، بادام، زردآلو و گیلاس متأثر از عوامل ژنتیکی و محیطی (Gu et al., 2009) نظیر درجه حرارت زمستان (Ruck, 1975; Saure, 1985)، همزمانی دوره گلدهی (Verma and Jindal, 1997) و خودناسازگاری (Crane and Lewis, 1942) است. در صورت وجود خود ناسازگاری، با وجود زنده بودن هر دو عضو جنسی، دانه گرده قادر به باروری مادگی نیست و در نتیجه از عوامل مهم محدود کننده تولید میوه به شمار می‌آید (Hiratsuka and Zhang, 2002).

اکثر آلوه‌ای ژاپنی خودناسازگار هستند و گرده افشانی و لقاح برای تشکیل میوه ضروری است. بنابراین خودناسازگاری آنها مورد مطالعه گسترده قرار گرفته است. جهت تولید میوه اقتصادی و افزایش عملکرد در باغ‌های تجاری شناسایی آلل‌های خودناسازگاری و معرفی گرده‌زا

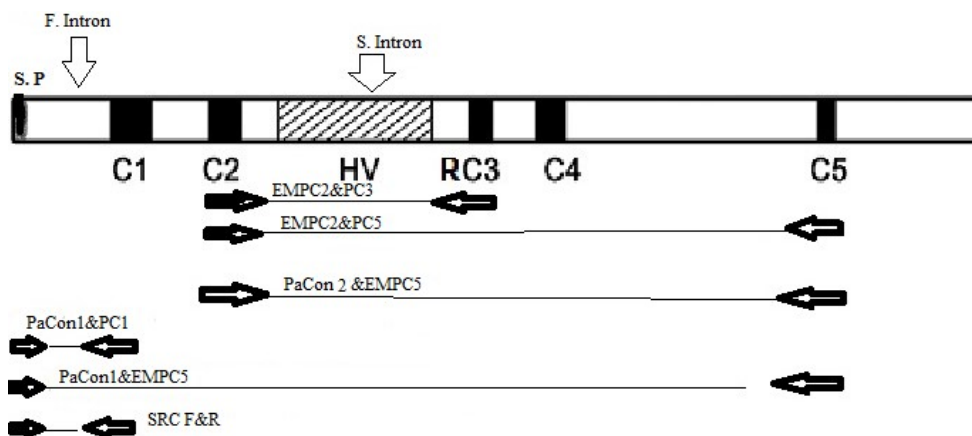
واعظی، شایرو و بلک امبر جهت تعیین آلل‌های خوناسازگاری مورد ارزیابی قرار گرفتند. استخراج DNA با استفاده از روش مینی پرب (۱/۰ گرم نمونه برگ) (Murray and Thompson, 1980) با اندکی تغییر در آزمایشگاه ملکولی پژوهشکده میوه‌های معتدلیه و سردسیری موسسه تحقیقات باغبانی در کرج انجام گردید (Pirkhezri, 2019). جهت تعیین کمیت و کیفیت DNA از ژل آگارز و نانودراپ مدل (Thermo Scientific, 1000) استفاده شد. غلظت DNA در نمونه‌ها به ۱۵ نانوگرم بر میکرو لیتر رسانده شد. در این پژوهش از هفت جفت آغازگر عمومی اینترون اول، اینترون دوم و جفت اینترون ژن *S-RNase* و ژن *SFB* استفاده گردید (جدول ۱ و شکل ۱).

۲۱ گروه ناسازگاری در آلوی ژاپنی گزارش شده است (Sapir *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008; Guerra *et al.*, 2009; Guerra *et al.*, 2012).

هدف از این پژوهش شناسایی آلل‌های ناسازگاری در برخی ارقام و ژنوتیپ‌های آلوی ژاپنی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز و ارزیابی باغی خود(نا)سازگاری در آنها بود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش ۱۴ رقم و ژنوتیپ آلو ژاپنی موجود در کلکسیون پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری، ایستگاه کمالشهر، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، شامل قطره طلا، آلو زرد، بلک استار، سنقر آبادی، سیمکا، ابلنایا، شماره ۱۶، شماره ۱۷، مورتینی، فریار، لارودا،



شکل ۱- نواحی تکثیر شده توسط آغازگرهای مورد استفاده

Fig. 1. Amplified region by primers used

جدول ۱- توالی‌های نوکلئوتیدی آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده برای تکثیر آلل‌های S ارقام و ژنوتیپ‌های آلو

Table 1. Nucleotide sequences of primers used for S-alleles amplification of plum cultivars and genotypes

آغازگر Primer	نوع آغازگر Primer type	توالی آغازگر Primer sequence	منبع References
EM-PC2consFD	پیش رو Forward	5'-TCAC(A/C)AT(C/T)CATGGCCTATGG-3'	Sutherland, 2004
EM-PC5consRD	معکوس Reverse	5'-CAAAATACCACTTCATGTAACA(G/A)C-3'	Sutherland, 2004
EM-PC3consRD	معکوس Reverse	5'-A(A/T)(C/G)T(A/G)CC(A/G)TG(C/T)TTTGTCCATTC-3'	Sutherland, 2004
PaConsI-FD	پیش رو Forward	5'-(C/A)CTTGGTTCTTG(C/G)TTT (T/C)GC TTTCTT C-3'	S-RNase
EM-PC1consRD	معکوس Reverse	5'-GCC A(C/T)T GTT G(A/C)A CAA A(C/T)T GAA-3'	S-RNase
SFBc-FD	پیش رو Forward	5'-TCGACATCCTAGTAAGACTACCTGC-3'	Vilanova, 2006
SFBc-RD	معکوس Reverse	5'-ATTTCTTCACTGCCTGAATCG-3'	Vilanova, 2006
SRc-FD	پیش رو Forward	5'-CTCGCTTTCCTTGTTCTTGC-3'	Romero, 2004
SRc-RD	معکوس Reverse	5'-GGCCATTGTTGCACAAATTG-3'	Vilanova, 2005
PaConsII-FD	پیش رو Forward	5'-GGCCAAGTAATTATTCAAACC-3'	Sonneveld, 2003
PaConsII-RD	معکوس Reverse	5'-CA(T/A)AACAAA(A/G)TACCACTTCATGTAAC-3'	Sonneveld, 2003

استفاده گردید. سپس ژل‌ها در ژل داک در زیر نور ماورا بنفش آشکار و تصویر برداری شدند. اندازه باندهای تکثیر شده در ژنوتیپ‌ها و ارقام آلو با استفاده از نشانگر اندازه یک کیلو جفت بازی (فرمتاز شمار کاتالوگ ۰۳۱۳) برای باندهای با سایز بزرگ و ۱۵۰۰ جفت بازی با فاصله باندهای ۵۰ و ۱۰۰ جفت باز (ساخت شرکت سینا کلون ایران) برآورد شد.

فواصل طی شده باندها با استفاده از نرم افزار Quantity one (شرکت Bio-Rad) در مقایسه با لدر بدست آمد و با استفاده از نرم افزار اکسل رگرسیون فاصله طی شده باندهای نشانگر (Y) بر اندازه باندهای نشانگر (X) برازش شد و فرمول مربوطه بدست آمد (Pirkhezri, 2019). اندازه آلل‌های S آلوکه توالی آن‌ها در NCBI گزارش شده است بررسی و با اندازه باندهای بدست آمده در این بررسی برای هر جفت آغازگر مقایسه شدند.

در شرایط باغ، برای تعیین خود(نا)باروری، از دو روش گرده افشانی ایزوله (خود گرده افشانی مصنوعی) و گرده افشانی آزاد در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی با سه تکرار انجام گردید. به این منظور روی هر یک از سه درخت، چهار شاخه و در چهار جهت جغرافیایی آن، یک هفته قبل از مرحله بالونی انتخاب و غیر از شاخه های مربوط به تیمار گرده افشانی آزاد که به عنوان شاهد، بدون ایزوله کردن در نظر گرفته شدند، بقیه شاخه ها به منظور جلوگیری از گرده افشانی آزاد و ناخواسته، با کیسه های پنبه

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل Master Cycler Gradient ساخت کشور آلمان در حجم ۱۷ میکرولیتر، شامل سه میکرولیتر DNA ژنومی، ۱/۵ میکرولیتر از غلظت پنج میکرو مولار هر آغازگر، ۷/۵ میکرو لیتر از محلول کیت PCR، ۳/۵ میکرو لیتر آب دو بار تقطیر تهیه شد. چرخه حرارتی شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه و به مدت دو دقیقه، ۳۵ سیکل حرارتی که که برای برخی آغازگرها ۱۰ چرخه اول سیکل حرارتی به صورت Touch Down برنامه‌ریزی شده بود. به این صورت که دمای اتصال آغازگر به رشته الگو ۱۰ درجه سانتی‌گراد بالاتر از دمای اتصال واقعی در نظر گرفته شد (۶۰ درجه برای دمای اتصال ۵۰ درجه) و در هر چرخه دور اول با کاهش یک درجه دما، به دمای اتصال واقعی رسید. این کار تا حدودی از ایجاد باندهای کاذب می‌کاهد. در ۲۵ سیکل بعد دمای اتصال ثابت (بسته به دمای اتصال آغازگر متفاوت بود) و زمان آن نیز متغیر بود (Pirkhezri, 2019).

باندهای تکثیری محصول PCR روی ژل ۱/۵ درصد آگارز (تهیه شده با بافر TAE (IX)) جداسازی شد. باندها در ژل‌ها در تانک الکتروفورز (Bio-Rad, USA) با ولتاژ ۷۵ در مدت ۳/۵ ساعت جداسازی شدند. جهت رنگ آمیزی ژل‌ها از ماده ژل رد (Gel Red, Biotium, USA) (شماره کاتالوگ ۴۱۰۰۳) یک ماکرولیتر در ۷۰ میلی لیتر ژل

ای (ململ) ایزوله شدند.

برای خود گرده افشانی مصنوعی، جمع آوری دانه گرده، در زمانی که جوانه های گل در مرحله بالونی بودند، انجام شد. در خود گرده افشانی مصنوعی، گل های ایزوله شده، با دانه های گرده جمع آوری شده از همان رقم و با استفاده از پنبه های گوش پاک کن (هر خلال مخصوص یک ژنوتیپ بود) گرده افشانی در زمان تمام گل دو بار با فاصله ۲۴ ساعت انجام شد. تعداد گل های گرده افشانی شده در هر شاخه ایزوله و گرده افشانی آزاد شمارش گردیدند. میوه های اولیه پس از ریزش گلبرگ و گل های بارور نشده و ناقص شمارش (چهار هفته پس از گرده افشانی) شد و تعداد میوه نهایی زمان برداشت ملاک قرار گرفت. تشکیل میوه نیز در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی در سه تکرار (خود گرده افشانی و گرده افشانی آزاد) بررسی شد. تشکیل میوه نهایی نسبت میوه به تعداد گل اولیه بصورت درصد محاسبه شد (Hartmann and Neumuller, 2009).

مقایسه میانگین های گرده افشانی آزاد با خود گرده افشانی با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد و تجزیه کلاستر به روش (Average linkage between groups) و محاسبه فواصل بعد از استاندارد کردن داده ها انجام شد.

نتایج و بحث

با به کار بردن شش جفت آغازگر مربوط به

مکان ژن *S-Rnase* و یک جفت آغازگر مکان SFB (SLF) تنوع بالایی در آلل های ناسازگاری در نمونه های مورد بررسی مشاهده شد. آغازگرهای دژنره EM PC2 consFD و EM PC3consRD بر اساس اینترون دوم و مناطق حفاظت شده دوم و سوم *S-RNase* جنس پرونوس در ایستگاه ایست مالینگ انگلستان طراحی شده اند (Sutherland et al., 2004; Ushijima et al., 2004) که نواحی حفاظت شده دوم و سوم را تکثیر می کنند (شکل ۱). با استفاده از این جفت آغازگر ۱۸ باندها با اندازه های ۲۱۵ جفت باز (سیمکا) تا ۱۷۳۴ جفت باز (شماره ۱۷) در ۱۴ ژنوتیپ و رقم آلو ژاپنی مشاهده شد (جدول ۲).

اتحاد پُور و همکاران (Etahadpour et al., 2011) در پژوهشی اندازه باندها را با این آغازگرها در ژنوتیپ های آلو و گوجه بین ۳۲۰ تا ۱۸۳۰ جفت باز گزارش کرده اند. البته در پژوهش حاضر فقط گونه آلو ژاپنی بررسی شد، در حالیکه در آزمایش اتحاد پور و همکاران (Etahadpour, et al., 2011) از گونه های مختلف آلو و گوجه استفاده شد. ارتگا و همکاران (Ortega et al., 2006) اندازه باندها را جفت باز در گونه های بادام و برخی گونه های پرونوس بین ۸۰ تا ۲۸۷۲ گزارش نمودند. دلیل این تفاوت در تعداد ژنوتیپ های مورد استفاده و زمینه ژنتیکی آنها می باشد. برای اینترون اول اندازه باندها در پژوهش حاضر بین ۲۰۶ تا ۶۲۰

جدول ۲- طول باند S و میانگین آلل های تکثیر شده در ارقام و ژنوتیپ های آلوی مورد مطالعه در هفت جفت آغازگر (جفت باز)

Table 2: S band length and mean of amplified alleles in studied plum cultivars and genotypes in seven primer pairs (bp)

Genotype	ژنوتیپ	Primer pair							میانگین تعداد آلل های تکثیر شده Mean of amplified alleles
		EM-PC2F & PC3R	آغازگر ایترون اول			آغازگر ایترون دوم		آغازگر ایترون دوم	
	Allele based on/	PaConsI-F & EM-PC1R	PaConsI-F & EM-PC5R	SFBc-F & R	PaConsII-F & R	SRC-F & R	EM-PC2F & EM-PC5R		
Alu Zard	آلوزرد	<i>Sc Sf</i>	285-206	1311-977	516-427-378-321	565-1366	371	772-1650	2.14
Gatreh tala	قطره طلا	<i>Sc Sf</i>	285-206	1254-772	516-444-378	-	-	-	1.29
Black Star	بلک استار	<i>Se</i>	353	1311-1180	548-427-278	646-1366	370	2050	1.43
Morrettini	مورتنی	<i>SIII SIV</i>	285-255	1311-1180	548	565	387	772-1759	1.57
Simka	سیمکا	<i>Sk SI</i>	353	1637-1542-921-642	548-427-378	446-565	387	427-737	2.14
No. 16	شماره ۱۶	<i>SIV Se</i>	321-285-206	1448-1097	594-378	498-1366-1624	371-346	1650-2050	2.29
Oblinaja	اوبلنایا	<i>SII</i>	353-321-206	1542-1050-642	594-378	479-565	387-346	737-827	2.14
Angeleno	آنجلنو	<i>Sh Si</i>	500-321-285-206	1542-977	594-378	479-565	540-371-346	827-1108-1168	2.57
No.17	شماره ۱۷	<i>S19 Sf SIV</i>	386-353	1254-772	641	479	409-387	-	1.57
Songorabadi	سنقر آبادی	<i>Se Sd Sb</i>	324-300	1637-1097	609	479-1934	387-371	1534-1733	2.00
Black Amber	بلک امبر	<i>S25 S24 S23</i>	620-448-364-300	-	541-423	565-603-646-757	625-540-441-409	728-784-1053	2.86
Laroda	لارودا	<i>S25 S24 S23</i>	620-518-403-364-324	1097-642	609-541-423	565-646-757	625-540-441-409	728-784	3.14
Vaezi	واعظی	<i>S22 Se Sb</i>	364-233	1637-1097	609	479-1934	426-409	847-1733	2.00
Shiro	شایرو	<i>Sf</i>	233	1637-2052	609	479	346	-	1.14
Mean of amplified at alleles	میانگین تعداد آلل های تکثیر شده		2.10	2.40	2.10	2.10	1.90	1.90	1.60

اندازه‌های جدید نیز مشاهده شدند که آلل متناظر با آن‌ها در بین آلل‌های شناخته شده یافت نشد که پس از توالی‌یابی می‌تواند کاندیدای آلل جدید باشند (جدول ۳). بر اساس گزارشات قبلی تنوع آلل‌های S در ۴۰ ژنوتیپ و رقم آلو و گوجه، نه باند با اندازه‌های متفاوت مشاهده شد (Etahadpour *et al.*, 2011) و در رقم آلوی ژاپنی ۱۳ آلل جدید (S_{15} - S_{27}) بدست آمد (Zhang *et al.*, 2008).

جفت باز بود (جدول ۲). در حالی که در بررسی عبدالله و همکاران (Abdallah *et al.*, 2019) با آغازگرهای دیگر بین ۲۰۸ تا ۳۸۹ جفت باز گزارش شد. با مقایسه اندازه باندهای بدست آمده با اندازه آلل‌های S موجود در NCBI و دیگر پژوهش‌ها، برخی از آن‌ها با تفاوت‌های جزئی با آلل‌های گزارش شده یکسان در نظر گرفته شدند (Etahadpour *et al.*, 2011; Guerrra *et al.*, 2012). تعداد پنج باند با

جدول ۳- اندازه باندهای مشاهده شده در این پژوهش و آلل‌های متناظر در بانک ژن و آلل‌های جدید
Table 3. Size of bands observed in this research and corresponding alleles in gene bank and new alleles

شماره No.	آلل Allele	آلل متناظر (جفت باز) Corresponding alleles(bp)	تعداد باند مشاهده شده Observed band number	اندازه باند مشاهده شده Observed band size (bp)	تفاوت اندازه مشاهده شده آلل با آلل‌های متناظر The difference in the size of the alleles observed with the corresponding alleles
1	S_I		1	215	
3	$S_k = S_3$	372	14	366	-6
4	S_i	430	7	343	+4
5	S_{II}		6	461	
6	S_{25}	495	10	492	-3
7	S_h	532	15	523	-9
8	S_{22}	579	8	574	-5
9	S_{24}	681	20	676	-5
10	S_{19}	712	9	727	+15
11	S_{23}	772	14	799	+25
12	S_l	907	1	922	+15
13	S_{III}		3	952	
14	S_X		2	1102	
15	$S_c = S_4$	1188	10	1171	-17
16	$S_f = S_6$	1250	10	1227	-23
17	S_d	1317	2	1316	-1
18	$S_e = S_5$	1450	6	1446	-4
19	S_b	1565	3	1554	-11
20	S_{IV}		1	1734	

دهنده هتروزیگوت بودن در مکان آلل‌های S

با این آغازگر، شش رقم، دو باند که نشان

رقم آلل‌های S همانند هم و به صورت $S_{25}S_{24}S_{23}$ بودند. ارقام آلو زرد و قطره طلا ژنوتیپ S یکسانی داشتند (S_eS_f) بنابراین در یک گروه قرار گرفتند و با شایرو در آلل S_f مشترک بودند، شباهت ظاهری آنها می‌تواند نشان از کلون بودن این سه رقم داشته باشد. این ژنوتیپ‌ها گرده دهنده‌ی مناسبی برای یکدیگر نخواهند بود و برای تولید میوه تجاری به ژنوتیپ‌هایی با آلل‌های S متفاوت نیاز دارند.

پپو و همکاران (Beppu *et al.*, 2005) آلل S_e (معادل S_5) را آلل خودباروری در آلو معرفی نمودند که معادل ۱۴۵۰ جفت باز برای جفت آغازگر EMPC2consFD و EMPC3consRD است. در این پژوهش ارقام واعظی، سنقرآبادی و شماره ۱۶ دارای این آلل بودند (جدول ۲). آزمایش‌های مربوط به خود یا دگر گرده افشانی که بین واریته‌های دارای ژنوتیپ S_eS_e انجام شد، آلل S_e را به عنوان آلل خودسازگاری معرفی کرد (Beppu *et al.*, 2003).

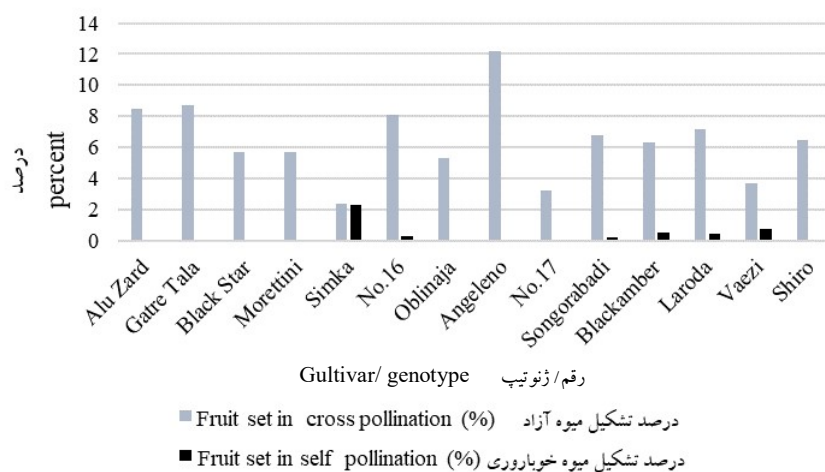
پژوهشگران گزارش کرده اند آلل‌های S_b و S_i ممکن است مسئول خودسازگاری باشند (Beppu *et al.*, 2010). ارقام Karari (S_iS_b) و Hony Rosa (S_gS_b) با ۱۱/۲ درصد تشکیل میوه خودبارور بودند (Guera *et al.*, 2009; Beppu *et al.*, 2010). ارقام آلو سنقرآبادی و واعظی دارای این آلل می‌باشند. در آزمایش باغی، واعظی ۰/۷۹ درصد خودباروری نشان داد

آن‌ها می‌باشد، پنج رقم، سه باند و در دو رقم یک باند نشان دادند. ارقام ابلنایا و شایرو، یک باند نشان دادند که ممکن است به دلیل هموزیگوت بودن مکان آلل‌های S آن‌ها یا عدم شناسایی آلل دوم آن‌ها باشد. اتحادپور و همکاران (Etahadpour *et al.*, 2011) گزارش کردند که ۲۳ ژنوتیپ دو باند نشان دادند در حالی که ۱۵ ژنوتیپ دیگر فقط یک باند نشان دادند. همچنین مشخص شده است که تکثیر یک باند در رقم شایرو (S_f) ممکن است به دلیل آلل‌های با اندازه اینترون مشابه باشد (Halasz, 2007). در پژوهش حاضر نیز رقم شایرو آلل S_f را نشان داد. بر اساس مطالعات پیشین ارقام آنجلنو آلل S_eS_h و در سیمکا آلل‌های S_eS_k گزارش شده است (Beppu *et al.*, 2005; Halasz, 2007). درحالی که در این پژوهش S_iS_k و S_iS_h شناسایی گردیدند. ممکن است عدم هماهنگی یکی از آلل‌ها بدلیل جهش باشد که در گزارشات دیگر نیز آمده است (Guerra *et al.*, 2009).

در آزمایشی که برای شناسایی آلل‌های S در آلوی ژاپنی انجام شد، ژنوتیپ‌های S متفاوتی برای رقم‌های 'Friar' (S_bS_h)، 'Green Sun' (S_bS_c) و 'Kelsey' (S_fS_k) مشاهده شد (Guerra *et al.*, 2009). پپو و همکاران (Beppu *et al.*, 2005) آلل‌های S ارقام بلک امبر و لارودا را همانند هم (S_eS_b) گزارش نمودند. اما در پژوهش حاضر این دو

بادام ایران بجز در گونه *P. elaeagnifolia* مشاهده نشده است (Rahemi *et al.*, 2010; Zinolabedini *et al.*, 2008) در پژوهشی که توسط اتحادپور و همکاران (Etahadpour *et al.*, 2011) انجام شد آلل خود باروری در ژنوتیپ‌های ویان ۴ و آلوی وحشی شناسایی شد.

و سنقرآبادی با ۰/۲۱ درصد خودباروری، تقریباً خودناسازگار بودند (شکل ۲). در بادام آلل خودباروری *S_f* یا *S₂₅* با اندازه ۸۵۰ جفت باز با جفت آغازگر & EMPC2consFD & EMPC3consRD می باشد که در بادام خودگشن سوپرنوا مشاهده شد، در حالی که آلل خودسازگاری برای جمعیت های



شکل ۲- مقایسه میزان تشکیل میوه در گرده افشانی با گرده خودی و گرده افشانی آزاد در ژنوتیپ های آلوی ژاپنی

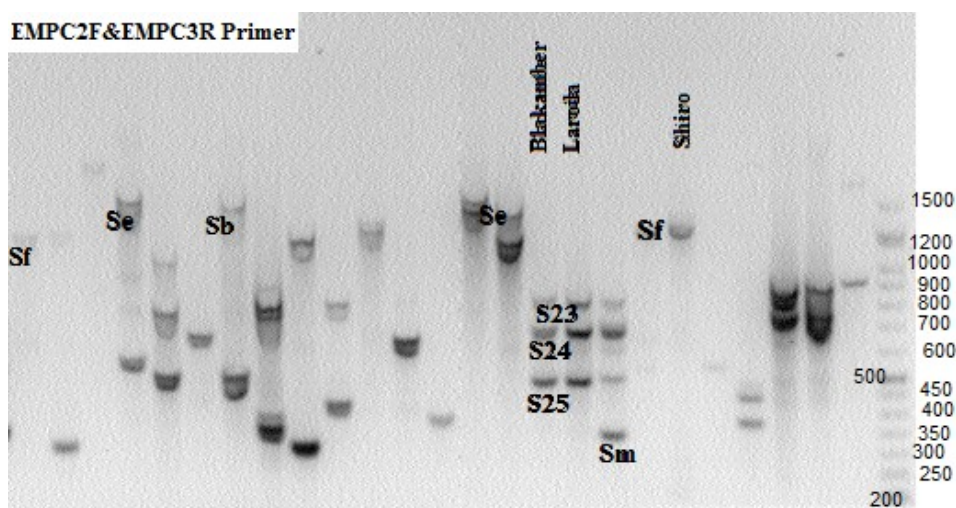
Fig. 3. Comparison of fruit set in self and cross pollination in Japanese plum

سیمکا در منابع *S_eS_k* گزارش شده است که دارای آلل *S_e* مسئول خودسازگاری می باشد (Beppu *et al.*, 2005; Halasz, 2007)، اما در پژوهش حاضر این آلل برای سیمکا شناسایی نشد که ممکن است به دلیل خطای آزمایش و یا جهش باشد. در این پژوهش ارقام شماره ۱۶، واعظی

نتایج گرده افشانی با گرده خودی در مقایسه با گرده افشانی آزاد نشان داد که اغلب ارقام مورد بررسی خودناسازگارند و ارقام سیمکا (*S_fS_k*) با ۲/۹ درصد خودباروری نیمه خودناسازگار شناسایی شد. البته در پژوهش دیگری این میزان چهار درصد گزارش شده است (Guerrra *et al.*, 2009). آلل

تکثیر شده در همه آغازگرها مربوط به ارقام لارودا و بلک آمبر و کمترین آلل تکثیر شده مربوط به ارقام شایرو و قطره طلا بود. این دو رقم خصوصیات ظاهری همانند هم دارند. بیشترین میانگین آلل تکثیر شده مربوط به آغازگر اینترون اول (PaConsI-F & EM-PC1R) (۲/۴) بود (جدول ۲).

و سنقرآبادی دارای آلل S_e بودند که در آزمایشات باغی درصدی از خود باروری نشان دادند (شکل ۲). ارقام بلک آمبر و لارودا (S_cS_b) ۰/۴ تا ۰/۵ درصد خودباروری نشان دادند که دارای آلل S_b بر اساس منابع می باشد، اما در این پژوهش دارای سه آلل $S_{25}S_{24}S_{23}$ همانند هم بودند (جدول ۲ و شکل ۳). بیشترین میانگین آلل



شکل ۳- الگوی بانندی در جفت آغازگر اینترون دوم (EM-PC2F & EM-PC3R)

Fig. 3. Band pattern in the pair of second intron primers (EM-PC2F & EM-PC3R)

دوم) (PaConsII-F & R) بود (جدول ۳). عبدالله و همکاران (Abdallah et al., 2019) با آغازگرهای PruC2-PCER اینترون دوم، آلل S_a معادل ۴۷۰ جفت باز گزارش کردند که معادل S_{II} در پژوهش حاضر و آلل S_h ۵۰۰ جفت بازی معادل ۵۲۳ جفت باز در NCBI می باشد. اندازه این آلل ها در آغازگرهای PaCons1F/PaCons1R2 به ترتیب ۳۸ و ۳۸۹ جفت باز بود که از هم قابل تشخیص

اهمیت استفاده از آغازگرهای مختلف در شناسایی آلل‌های خودناسازگاری، تعیین توالی های متناظر بر اساس سطح پوشش ژن و تکثیر آغازگرها است. بعنوان نمونه در این پژوهش آلل S_c با اندازه ۱۱۸۸ جفت باز معادل ۲۰۶ جفت باز با تکثیر آغازگرهای (اینترون اول) (PaConsI-F & EM-PC1R)، ۹۷۷ جفت باز با آغازگرهای (PaConsI-F & EM-PC5R) و ۵۶۵ جفت باز با آغازگرهای (اینترون

آغازگر $SFBc-F$ & R به ارزیابی آلل‌های متناطر روی این ژن پرداخته شد که نشان از تنوع بالای این مکان ژنی دارد (جدول ۳). در جنس پرونوس دو ژن SLF و $S-RNase$ با فعالیت ریو نوکلئازی با تنوع بالا در این ناحیه حضور دارند (Ushijima *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005). فاصله بین این دو ژن در جنس پرونوس ۳۸۰ جفت باز تا ۴۹ کیلو جفت باز است (Romero *et al.*, 2004; Yamane *et al.*, 2005).

همزمانی دوره گلدهی از ضروریات تشکیل میوه است (Verma and Jindal, 1997). آلوهای ژاپنی زود گل هستند و تفاوت زود گل ترین رقم (بلک استار) و دیرگل ترین رقم (مورتینی) حدود ده روز بود (جدول ۴) که در پژوهش دیگری ۱۱ روز گزارش شده است (Ganji Moghaddam *et al.*, 2010). اغلب ارقام همپوشانی گلدهی دارند فقط این دو رقم برای ابتدای گلدهی (بلک استار) و انتهای گلدهی (مورتینی) مشکل گرفته‌زا دارند. برای رفع مشکل همپوشانی بلک استار (S_eS_f) با توجه به اینکه زودگل ترین رقم آلو ژاپنی در کشور است می‌توان از ارقام گوجه سبز برای دوره ابتدایی گلدهی و شماره ۱۷ (S_{19} S_f S_V) و شماره ۱۶ ($S_{17}S_e$) بیشترین همپوشانی را دارند، اما هر دو دارای یک آلل مشترک هستند (جدول ۳).

بر اساس نتایج گرفته افشانی کنترل شده، گرده زای مناسب برای بلک استار رقم برموزا

نیست. سازکار خودناسازگاری بوسیله دانه گرده و مادگی در گیاهان اعمال می‌شود. پس از کشف ژن $S-RNase$ بعنوان عامل خودناسازگاری در مادگی، جستجوی برای ژن S دانه گرده پس از کلون کردن ژن $S-RNase$ شروع شد و مشاهده شد که پروتئین S دانه گرده متفاوت با $S-RNase$ مادگی است. ژن کاندید برای عامل ناسازگاری در دانه گرده چند شکلی بالایی دارد و در دانه گرده بیان می‌شود و به $S-RNase$ متصل بود (Kao and Tsukamoto, 2004). این ژن در خانواده های اسکروفولاریاسه، سولاناسه و رزاسه شناسایی شد. مطالعات در جنس پرونوس ژن های SLF (SFB) چند شکلی همانند با ژن $S-RNase$ مادگی نشان داد (McClure and Franklton, 2006) که یک الگوی تلاقی اختصاصی S -هاپلوتاایپ (S -haplotype – Specific Hybridization) را نشان می‌هد. این مکان هم مانند $S-RNase$ تنوع بسیار بالایی را نشان می‌دهد. تجزیه توالی ۱۳ آلل ژن SLF در جنس پرونوس نشان دهنده دامنه های حفاظت شده و دامنه با تنوع بالا است (Ikeda *et al.*, 2004; Ushijima *et al.*, 2004).

پروتئین های SLF و $S-RNase$ اساس نظام خودناسازگاری (Self Incompatibility) هستند (Qiao *et al.*, 2004). در جنس پرونوس ناحیه S کمتر از ۷۰ کیلو جفت باز است (Ushijima *et al.*, 2004). در این تحقیق با

جدول ۴- همپوشانی دوره گلدهی ارقام و ژنوتیپ‌های آلودی مورد استفاده در این پژوهش

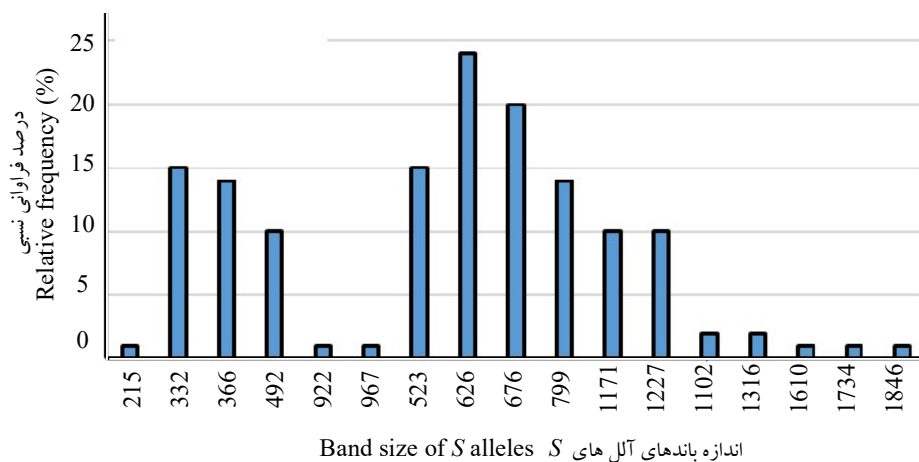
Table 4. Blooming period coverage of plum cultivars and genotypes used in this study

	سیمکا Simka	ابلنایا Oblinaja	مورتینی Morrettini	سنقر آبادی Singorabadi	آلوزرد Alu Zard	بلک امبر Black Amber	لارودا Laroda	آنجلنو Angeleno	بلک استار Black Star	شماره ۱۶ N.o 16	شماره ۱۷ No. 17	قطره طلا Qolden Tala	واعظی Vaezi	شایرو Shiro
	First year سال اول													
شروع گلدهی Blooming start	۲۹ اسفند 19 March	۳۰ اسفند 20 March	۳ فروردین 23 March	۲۷ اسفند 17 March	۲۸ اسفند 18 March	۲۷ اسفند 17 March	۲۹ اسفند 19 March	۳۰ اسفند 20 March	۲۲ اسفند 12 March	۲۵ اسفند 15 March	۲۵ اسفند 15 March	۲۸ اسفند 18 March	۲۶ اسفند 16 March	۲۷ اسفند 17 March
خاتمه گل Blooming end	۱۱ فروردین 01 April	۱۲ فروردین 02 April	۱۴ فروردین 04 April	۱۰ فروردین 30 March	۹ فروردین 29 March	۱۰ فروردین 30 March	۱۲ فروردین 02 April	۱۳ فروردین 03 March	۶ فروردین 26 March	۹ فروردین 29 March	۸ فروردین 28 March	۹ فروردین 29 March	۷ فروردین 27 March	۸ فروردین 28 March
	Second year سال دوم													
شروع گلدهی Blooming start	۲۲ اسفند 12 March	۲۳ اسفند 13 March	۲۵ اسفند 15 March	۲۰ اسفند 10 March	۲۲ اسفند 12 March	۲۰ اسفند 10 March	۲۲ اسفند 12 March	۲۳ اسفند 13 March	۱۶ اسفند 06 March	۱۹ اسفند 09 March	۱۹ اسفند 09 March	۲۲ اسفند 12 March	۲۰ اسفند 10 March	۲۱ اسفند 11 March
خاتمه گل Blooming end	۶ فروردین 26 March	۷ فروردین 27 March	۹ فروردین 29 March	۴ فروردین 24 March	۳ فروردین 23 March	۴ فروردین 24 March	۶ فروردین 26 March	۸ فروردین 28 March	۱ فروردین 21 March	۵ فروردین 25 March	۵ فروردین 25 March	۷ فروردین 27 March	۵ فروردین 25 March	۵ فروردین 25 March

باندهای ۶۲۶ و ۶۷۶ جفت باز به ترتیب ۲۴ و ۲۰ درصد بود (شکل ۴). در گزارش اتحادپور و همکاران (Etahadpour *et al.*, 2011) فراوانی آلل S_c ، باند ۶۲۱ و آلل S_i به ترتیب با ۳۰، ۱۷/۵ و ۱۲/۵ درصد بیشترین فراوانی را در ژنوتیپ‌های آلوی ایرانی داشتند که آلل S_c بیشترین فراوانی (۱۷/۱ درصد) را در جمعیت ویلان کرج نشان داد. فراوانی آلل‌های S با منشا جغرافیایی گونه‌ها ارتباط دارد چراکه فراوانی آلل‌های مناطق مختلف با هم متفاوت هستند (Hegedus and Halasz, 2007). در خصوص ژنوتیپ‌های آلو نیز با پراکنش جغرافیایی و منشا فراوانی آلل‌ها ارتباط دارد.

(با ۵ تا ۱۲ درصد تشکیل میوه در مقایسه با گرده‌افشانی آزاد ۱۶ درصد) می باشد. مورتنی یکی از بهترین ارقام زودرس و دیر گل است (سازکار فرار از سرماهای بهاره)، بهترین گرده زها برای مورتنی، ارقام شماره ۱۶ با ۶/۱۵ درصد تشکیل میوه و بلک امبر با ۵/۱ درصد تشکیل میوه در مقایسه با ۷/۶ درصد گرده افشانی آزاد بودند. در مقابل گرده افشانی با گرده رقم آنجلو ۰/۲۲ درصد تشکیل میوه نشان داد (داده‌های ارائه نشده است).

نتایج بدست آمده نشان داد که بیشترین فراوانی نسبی آللی برای جفت آغازگر EM PC₂ consFD & EM PC₃ consRD در اندازه



شکل ۴- مقایسه فراوانی نسبی آلل‌های S در ژنوتیپ‌های مورد بررسی آلو با استفاده از جفت آغازگر

EM PC₂ consFD & EM PC₃ consRD

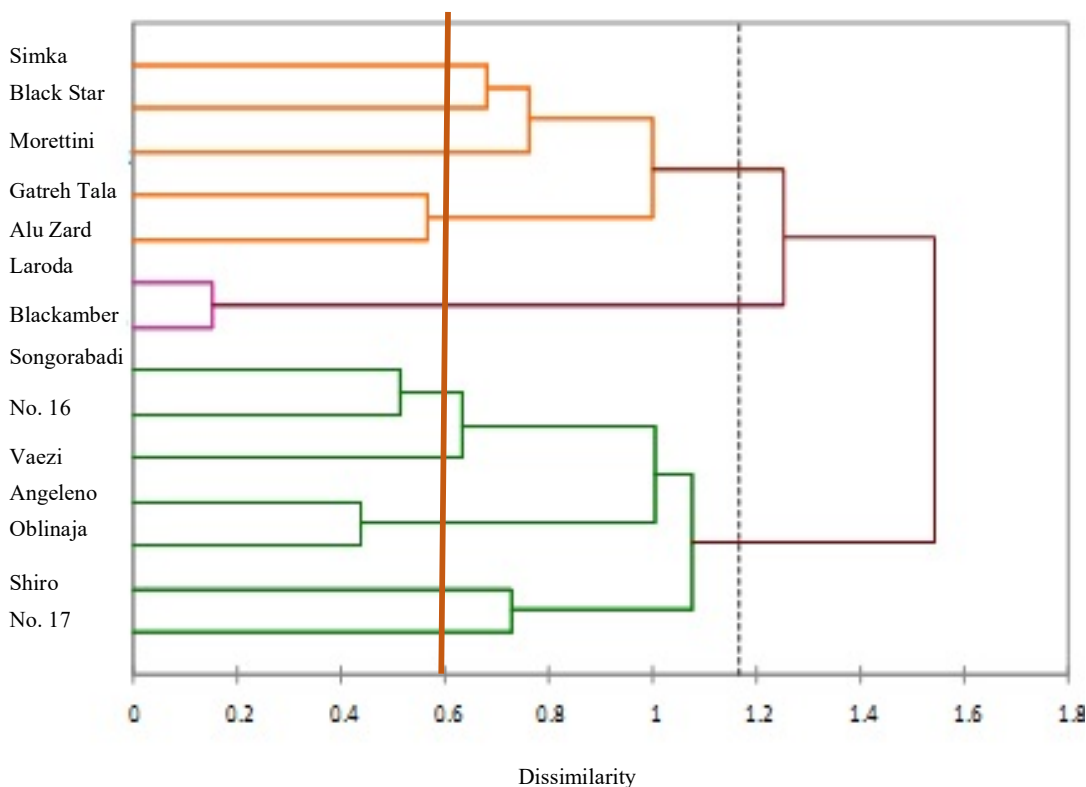
Fig. 4 . Comparison of relative frequency of S -alleles in studied plum genotypes using EM PC₂ consFD & EM PC₃ consRD pairs of primers

بوسیله تکثیر ژن S_RNase و SFB به روش

گروه‌های ناسازگاری ۱۰۵ رقم آلوی ژاپنی را

سیمکا، بلک استار، مورتینی، قطره طلا و آلو زرد بود. در گروه دوم شامل لارودا و بلک امبر قرار گرفتند. سنقر آبادی، شماره ۱۶، واعظی، آنجلنو و ابلنایا گروه سه را تشکیل دادند. شایرو و شماره ۱۷ در گروه چهار بودند (شکل ۵). در تقسیم بندی گروه‌های اصلی ارقام با آلل‌های مشابه در کنار هم قرار گرفتند.

PCR مشخص کردند که ۲۱ گروه ناسازگاری جدید توصیف شد (Guerra *et al.*, 2012). در این پژوهش در فاصله اقلیدسی ۰/۶ ارقام و ژنوتیپ‌ها به چهار گروه و شش ژنوتیپ مستقل تقسیم شدند (شکل ۵). در این گروه‌بندی برخی هم گروه‌ها دارای آلل‌های کاملاً مشابه و برخی دارای حداقل یک آلل مشابه بودند (شکل ۵). گروه اول شامل



شکل ۵- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه ای ۱۴ رقم و ژنوتیپ آلو بر اساس صفات مولکولی

Fig. 4. Dendrogram of cluster analysis of 14 plum cultivars and genotypes based on molecular traits

References

- Abdallah, D., Baraket, G., Perez, V., Mustapha, S. B., Salhi-Hannachi, A., and Hormaza, J. I. 2019.** Analysis of self-incompatibility and genetic diversity in diploid and hexaploid plum genotypes. *Front Plant Science* 10: 896.
- Beppu, K., Takemoto, Y., Yamane, H., Yaegaki, H., Yamaguchi, M., Kataoka, I., and Tao, R. 2003.** Determination of *S*-haplotypes of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) cultivars by PCR and cross-pollination tests. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 78: 315–318.
- Crane, M. B., and Lewis, D. 1942.** Genetic studies in pears. III. Incompatibility and sterility. *Journal of Genetics* 43: 31-44.
- Feng, J., Chen, X., Wu, Y., Liu, W., Liang, Q., and Zhang, L. 2006.** Detection and transcript expression of *S-RNase* gene associated with self-incompatibility in apricot (*Prunus armeniaca* L.). *Molecular Biology Reports* 33: 215-221.
- Ganji Moghaddama, E., Hossein Ava, S., Akhavan, S., and Hosseini, S. 2010.** Phenological and pomological characteristics of some plum (*Prunus* spp.) cultivars grown in Mashhad, Iran. *Crop Breeding Journal* 1 (2): 105-108.
- Gu, Q., Zhang, Q., Hu, H., Chen, Q., and Luo, Z. 2009.** Identification of self-incompatibility genotypes in some sand pears (*Pyrus pyrifolia* Nakai.) by PCR-RFLP analysis. *Agricultural Sciences in China* 8: 154-160.
- Guerra, M. E., Rodrigo, J., Lopez- Corrales, M., and Wunsch, A. 2009.** *S-RNase* genotyping and incompatibility group assignment by PCR and pollination experiments in Japanese plum. *Plant Breeding* 128: 304-311.
- Guerra, M. E., Wunsch, A., Lopez-Corrales, M., and Rodrigo, J. 2011.** Lack of fruit set caused by ovule degeneration in Japanese plum. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 136 (6): 375–381
- 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.
- Hegedus, A., and Halasz, J. 2006.** Self-incompatibility in plums (*Prunus salicina* Lindl., *Prunus cerasifera* Ehrh. and *Prunus domestica* L.). *International Journal of Horticultural Science* 12: 137–140.
- Hiratsuka, S., and Zhang, S. L. 2002.** Cultivar differences in the expression of self-incompatibility in Japanese pears. *Acta Horticulturae* 587: 437-448.

- Ishimizu, T., Inoue, K., Shimonaka, M., Saito, T., Terai, O., and Norioka, S. 1999.** PCR-based method for identifying the *S* genotypes of Japanese pear cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 961-967.
- Lopez, M., Vargas, F. J., and Batlle, I. 2006.** Self-incompatibility in almond genotypes: a review. *Euphytica* 150: 1-16.
- Murfett, J., Cornish, E. C., Ebert, P. R., Bonig, I., McClure, B. A., and Clarke, A. E. 1992.** Expression of a self-incompatibility glycoprotein (S2-Ribonuclease) from *Nicotiana glauca* in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell* 9: 1063-1074.
- Murray, H. G., and Thompson, W. F. 1980.** Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Research* 8: 4321-4325.
- Ortega, E., Sutherland, B. G., Dicenta, F., Boskovic, R., 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.
- Pirkhezri, M. 2019.** *S*-genotyping of some greengage cultivars and genotypes in Iran (*Prunus cerasifera* Ehrh.) by PCR. pp. 1-5 In: Proceedings of the 11th National Horticultural Science Congress of Iran. (in Persian).
- Rahemi, A., Fatahi, R., Ebadi, A., Taghavi, T., Hassani, D., Gradziel, T., and Sapparó, J. 2010.** Genetic variation of *S*-alleles in wild almonds and their related *Prunus* species. *Agriculture Journal of Crop Science* 4 (8): 648-659.
- Ruck, H. C. 1975.** Deciduous fruit tree cultivars for tropical and subtropical regions. *Horticultural Reviews* 3: 84-172.
- Sapir, G., Raphael, A. S., Shafir, S. H., and Goldway, M. 2008.** *S-RNase* based *S*-genotyping of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) and its implication on the assortment of cultivar-couples in the orchard. *Scientia Horticulturae* 118: 8-13.
- Saure, M. C. 1985.** Dormancy release in deciduous fruit trees. *Horticultural Review* 7: 239-287.
- Sutherland, B. G., Robbins, T. P., Tobutt, K. R. 2004.** Primers amplifying a range of *Prunus S*-alleles. *Plant Breeding* 123: 582-584.
- Szabo, Z. 2003.** Plum (*Prunus domestica* L.). pp. 515-522. In: Kozma, P., Nyeki, J., Soltesz, M., Szabo, Z. (eds.): *Floral biology, pollination and fertilization in temperate zone fruit species and grape*. Akademiai Kiado, Budapest.
- Ushijima, K., Sassa, H., Tao, R., Yamane, H., Dandekar, A. M., Gradziel, T. M.,**

- 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 and General Genetics* 260: 261–268.
- Ushijima, K. H., Yamane, A., Watari, E., and Kakehi, K. 2004.** The *S* haplotype-specific F-box protein gene, *SFB*, is defective in self-compatible haplotypes of *Prunus avium* and *P. mume*. *Plant Journal* 39: 573–586.
- Verma, L. R., and Jindal, K. K. 1997.** Fruit crop pollination. Kalyani Publication, Ludhiana, India. 405 pp.
- Vilanova, S., Badenes, M. L., Burgos, L., Martinez-Calvo, J., Llacer, G., and Romero, C. 2006.** Self-compatibility of two apricot selections is associated with two pollen-part mutations of different nature. *Plant Physiology* 14: 629– 641.
- Wang, H., Zhang, K., Su, H., and Naihaoye, K. 2010.** Identification of the *S*-genotypes of several sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars by AS-PCR and pollination. *African Journal of Agricultural Research* 5: 250-256.
- Yamane, H., Tao, R., and Sugiura, A. 1999.** Identification and cDNA cloning for *S-RNases* in self-incompatible Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl. cv. Sordum). *Plant Biotechnology* 16: 389-396.
- Zhang, S. J., Huang, S. X., Heng, W., Wu, H. Q., and Zhang, S. L. 2008.** Identification of *S*-genotypes in 17 Chinese cultivars of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) and molecular characterization of 13 novel *S*-alleles. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 83: 635–640