

شناسایی آلل‌های خودناسازگاری در ارقام گیلاس ایرانی با استفاده از افزایش ویژه آلل‌ها به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز^۱

IDENTIFICATION OF SELF-INCOMPATIBILITY ALLELES IN IRANIAN SWEET CHERRY CULTIVARS USING ALLELE-SPECIFIC AMPLIFICATION BY POLYMERASE CHAIN REACTION

اسفندیار حسنی مقدم، احمد ارشادی و منصور غلامی^۲

چکیده

خودناسازگاری و دگرناسازگاری بین ارقام گیلاس به یک مکان ژنی چند آلی نسبت داده می‌شود که به صورت گامتوفیتیک کنترل می‌شود. در این پژوهش نژادگان (ژنوتیپ) خودناسازگاری ۲۴ رقم گیلاس ایرانی و خارجی و یک رقم آلبالوگیلاس به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بررسی شد. بدین منظور از ۱۳ جفت آغازگر ویژه که سبب شناسایی آلل‌های خودناسازگاری $S_1, S_2, S_3, S_4, S_5, S_6, S_7, S_9, S_{10}, S_{12}, S_{13}, S_{14}$ در گیلاس می‌شوند، استفاده شد. با استفاده از این جفت آغازگرها ۲۵ آلل از مجموع ۵۰ آلل خودناسازگاری موجود در ارقام مورد بررسی شناسایی شد. در ۱۳ رقم هر دو آلل ناسازگاری و در نه رقم فقط یک آلل شناسایی شد. همچنین در سه رقم هیچ آلل ناسازگاری مشخص نشد. از مجموع ۱۳ آلل مورد بررسی تنها سه آلل S_4, S_3 و S_{14} در ۲۰ رقم گیلاس ایرانی افزوده شد. فراوان ترین گروه دگرناسازگاری در ارقام گیلاس ایرانی گروه S_3S_4 بود. همچنین یک گروه دگرناسازگاری جدید با نژادگان S_4S_{14} در ارقام گیلاس صورتی همدان و سیاه قزوین شناسایی شد. اگرچه تمامی آلل‌های خودناسازگاری با استفاده از افزایش ویژه آلل‌ها به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مشخص نشدند ولی نتایج این بررسی نشان می‌دهد که این یک روش سریع و موثر برای تعیین نژادگان‌های خودناسازگاری در ارقام گیلاس می‌باشد.

واژه های کلیدی: خودناسازگاری، دگرناسازگاری، گیلاس، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز.

مقدمه

ناتوانی یک گیاه دوجنسی بارور در تولید تخم پس از خودگرده‌افشانی را خودناسازگاری گویند. در این حالت هر دو اندام جنسی نر و ماده کارآمد بوده ولی گیاه توانایی باروری و تشکیل بذر پس از خودگرده‌افشانی را ندارد (۷). گیلاس دارای خودناسازگاری گامتوفیتی^۳ است که توسط یک مکان ژنی^۴ با چندین شکل آلی کنترل می‌شود (۴، ۶، ۱۸). این ژن گلیکوپروتئین‌هایی را رمز می‌کند که دارای فعالیت

۱- تاریخ دریافت: ۸۵/۱۲/۱۳

تاریخ پذیرش: ۸۶/۸/۲

۲- دانشجوی پیشین کارشناسی ارشد (اکنون مربی جهاد دانشگاهی واحد لرستان)، استادیار و دانشیار گروه باغبانی دانشکده

کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان، همدان، جمهوری اسلامی ایران.

۳- Gametophytic self-incompatibility ۴- Locus

ريپونوكلنازى هستند. تصور بر اين است كه ريپونوكلنازهاى ناسازگارى از مادگى به درون لوله گرده ناسازگار رفته و آر آن آريپوزومى لوله گرده را تخریب مى کنند كه به مرگ ياخته گرده مى شود (۱۶).
 براى اولين بار (ذکر شده در ۱۷) با استفاده از تلاقى‌هاى کنترل شده شش آلل خودناسازگارى S_1 تا S_6 را در ارقام گيلاس گزارش نمود. در روش تلاقى‌هاى کنترل شده براى شناسايى آللهای خودناسازگارى و تعيين گروه‌هاى دگرناسازگارى، درخت بايد وارد مرحله گلدھى شود كه روى نهال جوان قابل انجام نمى‌باشد. همچنين استفاده از اين روش بسيار وقتگير و هزينه بر است و با اين روش جداسازى دقيق بين تلاقى‌هاى سازگار و نيمه‌سازگار به طور كامل مشخص نمى‌باشد (۱، ۲). بوسكويچ و همكاران^۱ (۵) با مطالعه و بررسى ريپونوكلنازهاى خامه گل در ارقام گيلاس، ۱۰ آلل جديد خودناسازگارى $S_7, S_8, S_{14}, S_9, S_{10}, S_{11}, S_{12}, S_{13}$ ، S_{15} و S_{16} را گزارش دادند. سونوولد و همكاران^۲ (۱۲، ۱۳) بيان كردند آللهای خودناسازگارى S_8, S_{11} و S_{15} كه توسط آزمون ريپونوكلنازهاى خامه گل شناسايى و معرفى شدند به ترتيب با آللهای خودناسازگارى S_3, S_7 و S_5 مشابه مى‌باشند.

بررسى ريپونوكلنازهاى خامه گل يك روش سوئدمند براى شناسايى آللهای جديد خودناسازگارى و همچنين تعيين نژادگان خودناسازگارى در ارقام گيلاس مى‌باشد. براى انجام اين آزمونها بايد ارقام وارد مرحله گلدھى شوند و قابل انجام روى دان نهالهاى جوان نمى‌باشد كه عيب آن محسوب مى‌گردد (۱۲). سونوولد و همكاران (۱۲) c-DNA آللهای خودناسازگارى S_1 تا S_6 را جداسازى و توالى‌يابى كردند و بر اساس نواحى بسيار گوناگون توالى‌هاى اين آللهها شش جفت آغازگر طراحي نمودند كه به طور ويژه سبب افزايش و شناسايى اين آللهها مى‌شوند. همچنين سونوولد و همكاران (۱۳) براى آللهای خودناسازگارى $S_7, S_9, S_{10}, S_{12}, S_{13}, S_{14}, S_{16}$ هفت جفت آغازگر ويژه طراحي كردند.

جفت آغازگرهاى ويژه براى شناسايى و جداسازى بين آللهایی كه داراى اندازه مشابه هستند و همچنين براى تاييد نژادگان‌هاى تعيين شده توسط جفت آغازگرهاى عمومى مفيد مى‌باشند. جفت آغازگرهاى ويژه قادر به تكثير و شناسايى ۱۳ آلل خودناسازگارى كه براى آن‌ها آغازگر طراحي شده، مى‌باشند (۱۳). ارقامى كه داراى نژادگان خودناسازگارى مشابه هستند، تشكيل يك گروه دگرناسازگارى مى‌دهند و توانايى گرده‌افشاني و بارورى يكدیگر را ندارند در باغ‌هاى تجارى گيلاس براى اطمینان از تشكيل ميوه كافی بايد ارقامى كه داراى نژادگان خودناسازگارى متفاوت و همپوشانى گلدھى كافی هستند، با هم كاشته شوند (۱۷). تا كنون با استفاده از بررسى‌هاى تلاقى‌هاى کنترل شده و بررسى ايزوآنزيم ريپونوكلنازهاى خامه گل ۱۹ گروه دگرناسازگارى مختلف و يك گروه دهنده عمومى^۳ (شامل ارقامى است كه مى‌توانند همه ارقام گروه‌هاى دگرناسازگارى ديگر را به طور موفقیت‌آمیزی گرده‌افشاني و تلقیح کنند و همچنين توسط ارقام آن گروه‌ها گرده‌افشاني و تلقیح شوند) گزارش شده است (۱۵). همچنين سونوولد و همكاران (۱۲، ۱۳) با استفاده از افزايش ويژه آللهای خودناسازگارى به روش پى‌سى‌آر چهار گروه جديد دگرناسازگارى شماره ۲۱ تا ۲۴ را گزارش كردند. در اين پژوهش نژادگان خودناسازگارى ۲۴ رقم گيلاس ايرانى و خارجى و يك رقم آلبالوگيلاس موجود در كلکسيون درختان ميوه كمال‌آباد وابسته به موسسه اصلاح و تهيه نهال و بذر كرج با استفاده از افزايش ويژه آللهها به

روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مورد بررسی قرار گرفت و بر اساس نژادگان‌های ناسازگاری تعیین شده گروه‌های دگرناسازگار ارقام گیلاس ایرانی تعیین شد.

مواد و روش‌ها

موادگیاهی

ارقام مورد آزمایش شامل ۲۰ رقم گیلاس ایرانی (مجتهدی، حاج‌یوسفی، شعاع السلطنه، قرمز رضائیه، ابرده، زرد دانشکده، همدان، صورتی همدان، سفید رضائیه، سیاه دانشگاه، صورتی لواسان، اراک، سیاه زودرس، سیاه مشهد، شبستر، قزوین، سیاه قزوین، روشن، شاملو و مشکین‌شهر)، چهار رقم خارجی (بینگ، لامبرت، هدیفینجن و اس‌کا) و یک رقم آلبالوگیلاس (آلبالوگیلاس دانشکده) موجود در کلکسیون درختان میوه کمال‌آباد وابسته به موسسه اصلاح و تهیه نهال بذر بود. در شهریور ماه سال ۱۳۸۴ تعداد ۵ عدد برگ از سرشاخه‌های جوان ارقام مختلف گیلاس جمع‌آوری شده و بی‌درنگ در نیتروژن مایع منجمد و تا زمان استخراج DNA در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

استخراج DNA

استخراج DNA با تغییرهایی نسبت به روش دوپل و دوپل (۸) انجام شد. بدین منظور از بافر استخراج حاوی ۲٪ هگزا دسیل تری متیل آمونیوم بروماید (CTAB) ۱/۴ مولار کلرید سدیم، ۲۰ میلی‌مولار EDTA، ۱۰۰ میلی‌مولار تریس pH=۸، ۲٪ پلی‌وینیل‌پیرولیدون (PVP) و ۱٪ -۲-مرکاپتواتانول استفاده گردید. کیفیت و کمیت DNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ساخت شرکت اپندورف آلمان در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

افزایش ویژه آلل‌های خودناسازگاری به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت اپندورف آلمان انجام گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد که حاوی یک برابر غلظت بافر پی‌سی‌آر، ۲/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs، ۰/۱ میکرومولار از جفت آغازگرهای ویژه تهیه شده از شرکت T.I.B. Mol. Biol. آلمان (جدول ۱)، ۰/۶۲۵ واحد *Taq* پلیمرز و ۲۵ نانوگرم DNA الگو بود (آنزیم *Taq* پلیمرز، آمیخته dNTPs، $MgCl_2$ و بافر پی‌سی‌آر از شرکت سیناژن تهیه گردید). پیش از انجام واکنش‌های پی‌سی‌آر، DNA ژنومی به مدت ۲ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد واسرشته شد و پس از تهیه مخلوط اصلی واکنش حدود ۲۰ میکرولیتر روغن معدنی به نمونه‌ها افزوده شد. افزایش در ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای مناسب اتصال برای هر جفت آغازگر (جدول ۱) به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش توسط *Taq* پلیمرز در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و گسترش پایانی در دمایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۴٪ در بافر TAE به مدت ۲ تا ۴ ساعت در ولتاژ ۶۰ تا ۷۰ ولت انجام شد. رنگ آمیزی ژل‌ها توسط محلول اتیدیوم بروماید به غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر و به مدت ۳۰ دقیقه انجام گردید. پس از رنگ آمیزی، نوارهای افزایش یافته زیر نور فرابنفش مشاهده و عکسبرداری از آن‌ها انجام شد.

كنترل داخلى پى سى آر براى آغازگرهاى ويژه

براى شناسايى مشكل منفي‌هاى كاذب حالتى كه آغازگرهاى ويژه توانايى افزايش نوار مربوط به آلل ناسازگارى در ارقام حاوى آن آلل نمى‌باشند. از يك جفت آغازگر با توالى:

IC-F (5'-C AAA TTG AAG CTG CAG CAA TTA TGG A-3')

IC-R (5'-GG TAA GAC CTG CAT TCC CTA ATC CTG TT-3')

كه براساس توالى يابى ژن هسته‌اى فنيل آلانين آمونى‌لاياز (PAL) در گيلاس طراحي شده است، به غلظت ۱/۱ ميكرومولار در واكنش‌هاى پى‌سى‌آر در كنار جفت آغازگرهاى ويژه استفاده شد. وقتى كه از پى سى آر با شرايط كنترل داخلى استفاده مى‌شود، براى افزايش بهتر جفت آغازگرهاى ويژه دماى اتصال حداقل توصيه مى‌شود (جدول ۱). تمامى مراحل اين پژوهش در آزمایشگاه بيوتكنولوژى گروه باغبانى دانشگاه بوعلی سینا انجام شد.

نتايج و بحث

افزايش ويژه آلل‌هاى خودناسازگارى به روش واكنش زنجيره‌اى پليمراز

با استفاده از ۱۳ جفت آغازگر ويژه تنها سه آلل S_3 , S_4 و S_{14} در ارقام گيلاس ايرانى، افزوده شد و ۱۰ آلل ديگر در هيچ كدام از ارقام ايرانى ديده نشدند. آلل خودناسازگارى S_3 در ۶۰٪ ارقام (بى‌بى‌بى، مجتهدى، حاج-يوسفى، شعاع السلطنه، قرمز رضائيه، ابرده، زرد دانشكده، همدان، سفيد رضائيه، سياه مشهد، شبستر، سياه دانشگاه، شاملو، هديفینجن و اس‌كا)، آلل خودناسازگارى S_4 در ۶۴٪ ارقام (بى‌بى‌بى، مجتهدى، حاج‌يوسفى، شعاع السلطنه، قرمز رضائيه، ابرده، زرد دانشكده، همدان، سفيد-رضائيه، صورتى‌لوسان، اراك، سياه‌زودرس، هديفینجن، لامبرت، صورتى همدان و سياه قزوین) شناسايى شدند (شكل‌هاى ۱ و ۲). همچنين آلل خودناسازگارى S_{14} در ۱۶٪ ارقام (لامبرت، صورتى - همدان، سياه قزوین و آلبالوگيلاس دانشكده) تشخيص داده شد (شكل ۲).

نژادگان خودناسازگارى ارقام گيلاس ايرانى، تعيين شده توسط افزايش ويژه آلل‌ها به روش واكنش زنجيره‌اى پليمراز در جدول ۲ آورده شده است. با استفاده از جفت آغازگرهاى ويژه در ۱۳ رقم هر دو آلل خودناسازگارى و در نه رقم تنها يك آلل خودناسازگارى شناسايى شد و در سه رقم هيچ آلل خودناسازگارى ديده نشد. براساس نژادگان خودناسازگارى تعيين شده با استفاده از جفت آغازگرهاى ويژه دو گروه دگرناسازگارى S_3S_4 و S_4S_{14} تشخيص داده شد. گروه دگرناسازگارى S_3S_4 در ۴۰٪ ارقام (۱۰ رقم) و گروه دگرناسازگارى S_4S_{14} در ۱۲٪ ارقام (۳ رقم) ديده شد. در ارقام صورتى‌لوسان، اراك و سياه‌زودرس فقط آلل خودناسازگارى S_4 و در ارقام سياه مشهد، شبستر، شاملو، سياه دانشگاه و اس‌كا فقط آلل خودناسازگارى S_3 افزايش يافت. در آلبالوگيلاس دانشكده تنها آلل خودناسازگارى S_{14} افزوده شد. در سه رقم قزوین، رورشون و مشكين‌شهر هيچ آلل خودناسازگارى افزوده نشد. در تمام ارقام مورد آزمایش به جز رقم مشكين شهر نوار مربوط به جفت آغازگر فنيل آلانين آمونى‌لاياز (PAL) افزوده شد.

جدول ۱- توالی نوکلئوتیدهای جفت آغازگرهای ویژه، دمای اتصال و اندازه نوار ایجاد شده.

Table 1. Nucleotide sequences of allele-specific primers, optimal annealing temperature for PCR and size of the PCR amplification product.

آغازگر Primer	توالی Sequence 5' → 3'	دمای اتصال Annealing temperature (°C)	اندازه فرآورده پپسی آر (جفت باز) Estimated size of PCR product (bp)
S ₁	F(GTA ATT GCA ACG GGT CAA AAT ATG AG) R(ACA ACT CAG TAT TAG TTG CTG GAT CA)	61-65	820
S ₂	F(CC TGC TTA CTT TGT CAC GCA) R(AAG TGC AAT CGT TCA TTT G)	57-61	640
S ₃	F(GGG TCG CGA TTT AAG AAA GAG C) R(AAC AAT CGT ACT TTG TGA TGA CTT CG)	63-67	960
S ₄	F(CAC TGG GTC GCT GTT TAA CTT TAG G) R(TTG CAT TTG ATT AAG TGA GGC TTC A)	60-63	820
S ₅	F(ACA TGG TAC ATG TTC CCA ACG GAT C) R(CTG CTG TTC GAT GAT TAC AGT CAA TAT GTA C)	50-53	300
S ₆	F(ACT GGA CCG CAA TTT AAG CG) R(AGT TGC TGC TTT AAT GGG TGC A)	62-66	460
S ₇	F(AGC TTC TTT AGC GAC GTT AGA TG) R(TGC ATT TGG TTT AGT TTC TCT ACA)	55-60	584
S ₉	F(TT TGT TAC GTT ATG AGC AGC AG) R(ATG AAA CAA TAC ATA CCA CTT TGC TA)	58-66	495
S ₁₀	F(GTT TGA CGA TGC TCA GTA TCA C) R(GT ACT TCC ATC TTT GTC TTG CAC)	58-66	505
S ₁₂	F(ATT CTG ATG CTG GTC CTA TAG) R(AAC TCA GGC TTA TTAGGG TG)	59-63	562
S ₁₃	F(CA ATG GGT CGC ATT TTG ACG A) R(GGA GGA GGT GGA TTC GAA CAC TTG)	62-66	306
S ₁₄	F(G CAG AAT TTG GTA TGT GTT GGA) R(GG ATC GCT GGA AGT ATT GCA TTA T)	61-65	468
S ₁₆	F(T CAT CAA TTG CGT GAT TAG CAG R(TGT ACC ATG TTT GTT CCA TTC CAT)	57-61	429

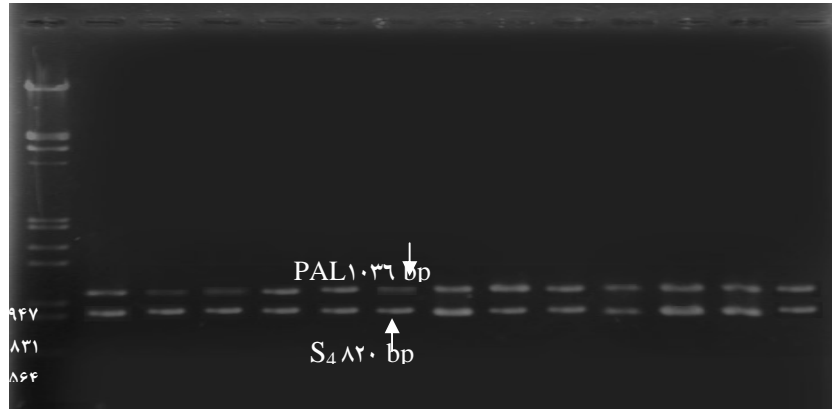


Fig. 1. PCR amplification of genomic DNA with specific primers of S_4 allele and Phenylalanine Ammonialyase (PAL). Samples from left to right: 1- DNA ladder 2-'Bing' 3-'Mojtahedi' 4-'HajYosefi' 5-'Shoa alsaltanah' 6-'Ghermez-e-Rezayieh' 7-'Abardeh' 8-'Zard-e-Daneshkadah' 9-'Hamadan' 10-'Safid-e-rezayieh' 11-'Sorati-e-Lavasan' 12-'Arak' 13-'Siah-e-Zodres' and 14- 'Hedilfingen'.

شكل ۱- افزايش ويژه آلل خودناسازگارى S_4 و ژن هسته‌اى فنيل آلانين آمونياياز (PAL). نمونه‌ها از چپ به راست: ۱- نشانگر اندازه DNA ۲- 'بينگ' ۳- 'مجتهدى' ۴- 'حاج‌يوسفى' ۵- 'شعاع السلطنه' ۶- 'قرمز رضائيه' ۷- 'ابرده' ۸- 'زرد دانشكده' ۹- 'همدان' ۱۰- 'سفيد رضائيه' ۱۱- 'صورتى لواسان' ۱۲- 'اراك' ۱۳- 'سياه زودرس' و ۱۴- 'هديلفينجن' مى‌باشند.

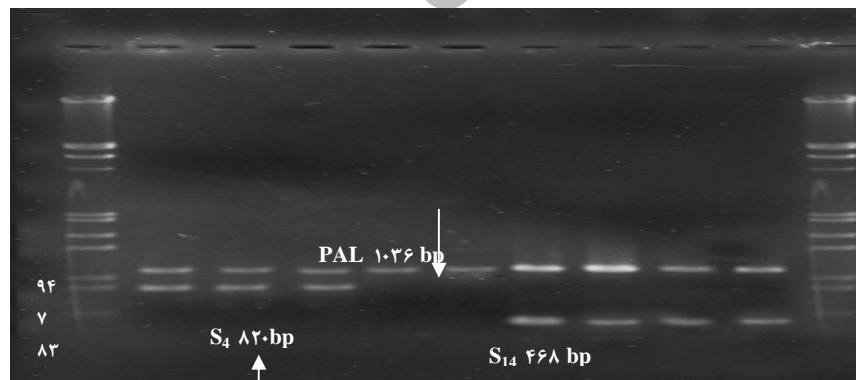


Fig. 2. PCR amplification of genomic DNA with specific primers of S_4 , S_{14} alleles and Phenylalanine Ammonialyase (PAL) samples from left to right: 1- DNA ladder 2-'Lambert' 3-'Sorati-e-Hamadan' 4-'Siah-e-Qazvin' 5-'AlbalaoGilass-e-Daneshkadah' 6- 'Siah-e-Mashha'd 7- 'Lambert' 8- 'Sorati-e-Hamadan' 9- 'Siah-e-Qazvin' 10- 'Albalao GilasS-e-Daneshkadah' and 11- DNA ladder.

شكل ۲- افزايش ويژه آلله‌اى خودناسازگارى S_4 و S_{14} و ژن هسته‌اى فنيل آلانين آمونياياز (PAL). نمونه‌ها از چپ به راست: ۱- نشانگر اندازه DNA ۲- 'لامبرت' ۳- 'صورتى همدان' ۴- 'سياه قزوین' ۵- 'آلبالوگيلاس دانشكده' ۶- 'سياه مشهد' ۷- 'لامبرت' ۸- 'صورتى همدان' ۹- 'سياه قزوین' ۱۰- 'آلبالوگيلاس دانشكده' ۱۱- نشانگر اندازه DNA.

جدول ۲- نژادگان خودناسازگاری ارقام گیلاس با استفاده از افزایش ویژه آللهای به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز.

Table.2. Self-incompatibility genotypes of sweet cherry cultivars using allele-specific amplification by Polymerase Chain Reaction.

شماره No	ارقام Cultivars	نژادگان Genotype
1	'Mojtahedi'	S ₃ S ₄
2	'Haj Yosefi'	S ₃ S ₄
3	'Shoa alsaltanah'	S ₃ S ₄
4	'Abardeh Shoa alsaltanah'	S ₃ S ₄
5	'Ghermez-e-Rezayieh'	S ₃ S ₄
6	'Zard-e-Daneshkadeh'	S ₃ S ₄
7	'Sefid-e-Rezayieh'	S ₃ S ₄
8	'Hamadan'	S ₃ S ₄
9	'Bing'	S ₃ S ₄
10	'Hedelfingen'	S ₃ S ₄
11	'Soratie-e-Hamadan'	S ₄ S ₁₄
12	'Lambert'	S ₄ S ₁₄
13	'Siah-e-Qazvin'	S ₄ S ₁₄
14	'Soratie-e-Lavasan'	S ₄ S-
15	'Arak'	S ₄ S-
16	'Siah-e-Zodras'	S ₄ S-
17	'Siah-e-Mashhad'	S ₃ S-
18	'Shabestar'	S ₃ S-
19	'Shamlo'	S ₃ S-
20	'Siah-e-Daneshkadah'	S ₃ S-
21	'SK1'	S ₃ S-
22	'Albalo-Gilass-e- Daneshkadah'	S ₁₄ S-
23	'Qazvin'	S-S-
24	'Rorshon'	S-S-
25	'Meshkinshar'	S-S-

در این پژوهش از ارقام 'بینگ'، 'لامبرت' و 'هدیفینجن' به عنوان شاهد مثبت حاوی آلل خودناسازگاری S₃ استفاده شد. آلل خودناسازگاری S₃ در ارقام 'بینگ' و 'هدیفینجن' افزوده شد ولی در رقم 'لامبرت' افزوده نشد. به نظر می‌رسد افزایش نیافتن آلل خودناسازگاری S₃ در رقم 'لامبرت' به علت نشانه گذاری اشتباه رقم گیلاس دیگر با نام 'لامبرت' در کلکسیون درختان میوه کمال‌آباد باشد. سیفی و ارزانی (۳) سازگاری ارقام 'بینگ'،

'لامبرت'، 'زرد دانشكده'، 'سفيد اروميه'، 'پروتيو' را با رقم گيلاس 'سياه مشهد' توسط گروه افشاني كنترل شده بررسى نمودند و بيان كردند كه ارقام 'بينگ' و 'زرد دانشكده' به عنوان بهترين ارقام گرده‌زا براي رقم 'سياه مشهد' مي‌باشند ولي رقم 'لامبرت' با گيلاس 'سياه مشهد' ناسازگار مي‌باشد. با توجه به اينكه نژادگان ناسازگاري دو رقم 'بينگ' و 'لامبرت' يكسان و S_3S_4 مي‌باشد بنا بر اين تفاوتى بين اين دو رقم به عنوان گرده‌زا براي رقم سياه مشهد نبايد وجود داشته باشد. در اين بررسى نژادگان خودناسازگاري درخت رقم 'لامبرت' موجود در كلسيون درختان ميوه S_4S_{14} تعيين گرديد. با توجه به اينكه نژادگان ناسازگاري S_4S_{14} تا به حال در هيچ گونه رقم خارجى ديده و گزارش نشده است به نظر مي‌رسد كه رقم نگهدارى شده با نام 'لامبرت'، يك رقم ايرانى باشد. از رقم 'هديلفينجن' با نژادگان ناسازگاري S_3S_5 (۱۵) به عنوان شاهد مثبت حاوى آلل خودناسازگاري S_5 استفاده شد. آلل ناسازگاري S_5 افزايش نيافت و در مقابل آلل S_4 افزايش يافت. از آنجاى كه نژادگان ناسازگاري اين رقم S_3S_4 و متفاوت با نژادگان داده شده مي‌باشد، به نظر مي‌رسد كه درخت نگهدارى شده با نام 'هديلفينجن' در كلسيون يك رقم ديگر باشد. آلل خودناسازگاري S_{14} اولين بار در بررسى ايزوآنزيم ريبيونوكلائزهاى خامه گل گزارش گرديد. اين آلل كمترين فراوانى را در بين آللهای خودناسازگاري شناخته شده دارد و تا كنون تنها در رقم 'ديكلئون' با نژادگان ناسازگاري S_3S_{14} گزارش شده است (۱۵). آلل ناسازگاري S_{14} داراى فراوانى به نسبت بالايى (۱۶٪) در ارقام ايرانى در مقايسه با ارقام خارجى مي‌باشد. افزايش نيافتن يك نوار در ارقام 'صورتى لواسان'، 'اراك'، 'سياه زودرس'، 'سياه مشهد'، 'شبيستر'، 'شاملو'، 'سياه دانشگاه'، 'اسكا' و 'آلبالو گيلاس' دانشكده و هيچ نوارى در ارقام 'قزوين' و 'رورشون' توسط جفت آغازگرهاى ويژه به احتمال به علت وجود آللهای جديد خودناسازگاري و متفاوت از ۱۳ آلل بررسى شده مي‌باشد. افزايش نيافتن نوار مربوط به آغازگر فنيل آلانين آمونىياز (PAL) و جفت آغازگرهاى ويژه در رقم گيلاس 'مشكين شهر' به احتمال به علت از دست رفتن DNA ژنومى مربوط به اين رقم باشد.

نژادگان خودناسازگاري ارقام 'مجتهدى'، 'حاج يوسفى'، 'شعاع السلطنه'، 'ايرده'، 'قرمز رضائيه'، 'سفيد رضائيه'، 'زرد دانشكده'، 'همدان'، 'بينگ' و 'هديلفينجن' S_3S_4 تعيين شد. اين ارقام داراى نژادگان خودناسازگاري مشابه هستند و تشكيل يك گروه دگرناسازگاري را مي‌دهند. تمامى ارقام يكا گروه دگرناسازگاري با هم دگرناسازگار مي‌باشند و نمى‌توان از آن‌ها به عنوان گرده‌زاي مناسب و سازگار براي يكيديگر استفاده كرد (۱۷). اين نژادگان متعلق به گروه دگرناسازگاري شماره ۳ مي‌باشد كه با استفاده از تلاقى‌هاى كنترل شده گزارش و سپس توسط ايزوآنزيم ريبيونوكلائزهاى خامه گل و افزايش ويژه آللهای خودناسازگاري به روش واكنش زنجيره‌اى پليمراز تائيد گرديد (۱۳، ۱۵). نژادگان خودناسازگاري ارقام 'صورتى همدان'، 'رقم 'لامبرت' و 'سياه قزوين' S_4S_{14} تعيين شد. با توجه به اينكه نژادگان خودناسازگاري S_4S_{14} تا كنون در ارقام گيلاس گزارش نشده است به عنوان يك گروه دگرناسازگاري جديد با شماره ۲۵ معرفى مي‌گردد. از سال ۲۰۰۱ تا كنون چهار گروه دگرناسازگاري جديد ضمن شناسايى آللهای ناسازگاري در ارقام گيلاس با استفاده از واكنش زنجيره‌اى پليمراز گزارش شده است (۱۲، ۱۳).

در صورت همزمان بودن تاريخ گلدهى مي‌توان از ارقام 'صورتى لواسان'، 'اراك'، 'سياه زودرس'، 'سياه مشهد'، 'شبيستر'، 'شاملو'، 'سياه دانشگاه'، 'اسكا'، 'آلبالو گيلاس' دانشكده، 'قزوين' و 'رورشون' كه داراى يك يا دو آلل ناسازگاري جديد و متفاوت از ۱۳ آلل مورد بررسى هستند به عنوان گرده‌زاي سازگار براي ساير ارقام كه هر دو آلل ناسازگاري آن‌ها مشخص شده استفاده كرد.

با استفاده از افزایش ویژه آلل‌ها به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ۳۵ آلل از مجموع ۵۰ آلل موجود در ارقام یعنی ۷۰٪ آلل‌ها شناسایی شد. اگر چه این روش قادر به شناسایی تمامی آلل‌های ناسازگاری در ارقام مورد مطالعه نگردید ولی می‌تواند در نهال‌های جوان و حتی بذور درختان نیز مورد استفاده قرار گیرد، که این یک برتری نسبت به روش‌های تلاقی‌های کنترل شده و بررسی ایزوآنزیم ریبونوکلئازهای خامه گل محسوب می‌شود (۱، ۲). نتایج این بررسی نشان می‌دهد که افزایش ویژه آلل‌ها به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز یک روش سریع و موثر برای شناسایی آلل‌های خودناسازگاری و تعیین گروه‌های دگرناسازگاری در ارقام گیلاس نسبت به سایر روش‌های موجود می‌باشد.

REFERENCES

منابع

- ۱- ارشادی، ا. ۱۳۸۲. بررسی گرده‌افشانی و تشکیل میوه و ارزیابی ارقام سیب ایرانی با استفاده از نشانگرهای مولکولی، پایان نامه دکتری دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران
- ۲- ارشادی، ا.، ع. طلایی، و ع. وزوایی، ۱۳۸۱. بررسی آلل‌های خودناسازگار در ۳۲ رقم سیب ایرانی (*Malus domestica* B.) با استفاده از ایزوآنزیم‌های ریبونوکلئازهای خامه گل. مجله نهال و بذر ۴۷۲-۴۶۱: ۱۷.
- ۳- سیفی، ا. و ک. ارزانی، ۱۳۷۷. مطالعه سازگاری و ناسازگاری برخی از ارقام گیلاس در تلقیح و تشکیل میوه گیلاس سیاه مشهد. مجله نهال و بذر ۳۸-۳۰: ۱۴.
4. Boskovic, R. and K.R. Tobutt. 1996. Correlation of stylar ribonuclease zymogram with incompatibility alleles in sweet cherry. *Euphytica* 9:245-250.
5. Boskovic, R., K.R. Tobutt and F.J. Nicol. 1997. Inheritance of isoenzyme and their linkage relationships in two inter specific cherry progenies. *Euphytica* 99:129-143.
6. Boskovic, R. and K.R. Tobutt. 2001. Analyzing stylar ribonucleases to genotype of cherry cultivar assigned to incompatibility groups. *Theor. Appl. Genet.* 103:475-485.
7. de Nettancourt, D. 2001. Incompatibility and incongruity in wild and cultivated plant. Springer-Verlang, Heidelberg, Germany.
8. Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. Rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bull.* 19:11-15.
9. Franklin-Tong, N.V.E. and F.C.H. Franklin. 2003. Gametophytic self-incompatibility inhibits pollen tube growth using different mechanisms. *Plant Sci.* 12:598-605.
10. Nasrallah, J.B. and M.E. Nasrallah. 1978. The molecular genetics of self-incompatibility in *Brassica*. *Annu. Rev. Genet.* 23:121-139.
11. Sassa, H., W. Mase, H. Hirano, and H. Ikehashi. 1994. Identification of self-compatibility related glycoprotein's in styles of apple (*Malus × domestica* B.). *Theor. Appl. Genet.* 89:201-205.
12. Sonneveld, T., T.P. Robbins, R. Boskovic and K.R. Tobutt. 2001. Cloning of six cherry self-incompatibility alleles and development of alleles specific PCR detection. *Theor. Appl. Genet.* 102:1046-1055.
13. Sonneveld, T., K.R. Tobutt and T.P. Robbins. 2003. Alleles-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (S) allele S₁-S₁₆ using consensus and alleles-specific primers. *Theor. Appl. Genet.* 107:1059-1070.
14. Stone, S.L. and D.R. Goring. 2001. The molecular biology of self-incompatibility system in flowering plant. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 67:93-114.
15. Tobutt, K.R., R. Boskovic and T. Sonneveld. 2001. Cherry incompatibility genotypes harmonization for recent result from UK, Canada, Germany, Japan and USA. *Eucarpia Fruit Breed. Sect. New sletter.*

16. Thomas, R.D. and H.H. Kirch. 1992. The S-locus of flowering plant when self rejection is of self-interest. *Trend. Genet.* 8:381-387.
17. Verma, I.F. and, K.K. Jindal 1996- *Fruit Crop Pollination.* Kalyiani Publishers, New Delhi, India. 405 p.
18. Wunsch, A. and J. I. Hormaza. 2004. Cloning and characterization of genomic DNA sequences of four self-incompatibility alleles in sweet cherry (*Prunus avium* L.) *Theor. Appl. Genet.*108:299-305.

Archive of SID