

## بررسی خودسازگاری نژادگان های حاصل از تلاقی در بادام با استفاده از روش

### میکروسکپی و واکنش های زنجیره ای پلیمرز<sup>۱</sup>

#### DISCRIMINATION OF SELF COMPATIBILITY IN GENOTYPES OBTAINED FROM ALMOND CROSSING USING FLUORESCENT MICROSCOPY AND PCR METHODS

علی عبادی، علی مومن پور و علی ایمانی<sup>۲</sup>

#### چکیده

خودناسازگاری بادام موجب کاهش شدید تشکیل میوه و در نهایت ایجاد مشکل در مدیریت باغ می گردد. بنابراین بهنژادی بادام به منظور ایجاد رقم های خودسازگار اهمیت بالایی دارد. این پژوهش به منظور شناسایی خودسازگاری در ۳۸ نژادگان انتخابی بادام حاصل از تلاقی رقم خودسازگار 'تونو' (والد پدری) و رقم خودناسازگار 'شاهرود ۱۲' (والد مادری) از طریق مطالعه میکروسکپی رشد لوله گرده پس از عمل خود گرده افشانی و روش PCR اجرا شد. به منظور مطالعه رشد لوله گرده حاصل از خودگرده افشانی با استفاده از میکروسکپی فلورسنس گل ها به وسیله قلم مو خودگرده افشانی شدند و سپس در کیسه قرار گرفتند. ده نمونه گل در زمان ۱۲۰ ساعت پس از گرده افشانی دستی از هر نژادگان برداشت شد. نتایج در دو سال بررسی نشان دادند که در زمان ۱۲۰ ساعت پس از خودگرده افشانی ۳۹/۴۷٪ از نژادگان ها خودناسازگار، ۲۳/۶۸٪ مشکوک، ۲۶/۳۲٪ خودسازگار و ۱۰/۵۳٪ به طور کامل خودسازگار بودند. به منظور تایید وضعیت نژادگان های خودسازگار و همچنین مشخص نمودن وضعیت خودسازگاری و یا خودناسازگاری در تعدادی از نژادگان هایی که به وسیله میکروسکپی فلورسنس مشکوک تشخیص داده شده بودند از روش PCR استفاده شد. نتایج نشان داد که از ۹ نژادگان که به وسیله میکروسکپی فلورسنس مشکوک تشخیص داده شده بودند ۵ نژادگان دارای آلل S<sub>f</sub> با طول باند ۴۵۰ bp بودند و خودسازگار تشخیص داده شدند و ۴ نژادگان دیگر به عنوان خودناسازگار شناسایی شدند. نتایج کلی نشان داد که ۵۰٪ از نژادگان ها خودسازگار و ۵۰٪ دیگر خودناسازگار بودند. واژه های کلیدی: آلل S<sub>f</sub>، خودسازگاری، خودناسازگاری، نژادگان های مشکوک.

#### مقدمه

بادام یکی از درختان مناطق معتدله است که با توجه به ارزش غذایی آن در کشورهای مختلف به عنوان یک محصول مهم و اقتصادی کشت و کار می شود. تا قبل از پیدایش رقم های خودسازگار، بادام گیاهی به طور کامل دگر گشن محسوب می شد. گرده افشانی در این گیاه به گونه ای است که حالت های مختلفی از ناسازگاری شامل خودناسازگاری و دگر ناسازگاری در آن مشاهده می شود. خودناسازگاری به عنوان مشکلی در تولید محصول در بادام محسوب می شود. امروزه مشکلات مدیریتی مربوط به ضرورت وجود دگر گرده افشانی از

۱- تاریخ دریافت: ۸۹/۴/۲۲ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۰/۷

۲- به ترتیب استاد، دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران (ali\_momenpour2005@yahoo.com) و استادیار موسسه نهال و بذر کرج، کرج، جمهوری اسلامی ایران.

طریق ایجاد رقم های خودسازگار جدید، در برنامه های بهنژادی مرتفع شده است (۶، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۹، ۲۴). خودناسازگاری در بادام از نوع گامتوفیتی می باشد (۲۲). این نوع ناسازگاری به لحاظ رشد کند لوله گرده درون خامه می باشد (۵). کندی رشد لوله گرده در حالت ناسازگاری به دلیل وجود ریبونوکلائزهایی از جنس گلیکو پروتئین بوده که S-RNases نامیده می شوند (۳). این ویژگی در بادام توسط یک مکان ژنی (S-Locus) چند آلی کنترل می شود.

امروزه حدود ۳۰ نوع آل خودناسازگاری ( $S_1, S_2, S_3, \dots, S_{30}$ ) در بادام شناخته شده و آل  $S_f$  به عنوان منشأ خودسازگاری در بادام معرفی شده است (۱۵، ۱۶). به هر حال اگر چه خودسازگاری یک ویژگی کیفی ژنتیکی در بادام است (۱۸) ولی دارای تغییر پذیری و وابستگی به شرایط محیطی می باشد و زیر تاثیر شرایط اقلیمی قرار می گیرد، به همین دلیل برای بیان کمیت خودسازگاری نیاز به مطالعه رفتار خودسازگاری نژادگان ها در چند سال می باشد (۲۱).

از روش های مختلفی مانند گرده افشانی کنترل شده در مزرعه و محاسبه درصد تشکیل میوه، بررسی نفوذ لوله گرده به وسیله میکروسکپ فلورسنت (روش های کلاسیک)، روش PCR و الکتروفورز پروتئین های خامه برای تشخیص خودسازگاری استفاده شده است. در روش میکروسکپی شاخه هایی با تعداد کافی گل در مرحله بالونی از هر نژادگان در مزرعه انتخاب می شوند و سپس شاخه ها را در مرحله بالونی داخل کیسه قرار می دهند. سپس در هنگام باز شدن گل ها کیسه ها را باز کرده و عمل خودگرده افشانی به وسیله قلم مو انجام شده و در زمان مناسب بعد از عمل خودگرده افشانی مادگی گل ها برداشت شده و آماده مشاهده با میکروسکپ فلورسنت می گردند. به این ترتیب رشد لوله گرده و میزان نفوذ آن به درون خامه و تخمدان مشخص می شود. رسیدن لوله گرده به تخمدان دلیل بر خودسازگاری و عدم رسیدن آن دلیل بر خودناسازگاری مطرح شده است. میزان خودسازگاری در نژادگان های خودسازگار بادام با هم متفاوت می باشد (۲، ۲۰). بنابراین برای تعیین سطوح دقیق خودسازگاری، نیازمند به بررسی های میکروسکپی رشد لوله گرده بعد از خودگرده افشانی می باشد (۲۰). بر طبق پیشنهاد آلونسو و همکاران (۱) نژادگان هایی که بیش از ۷۵٪ از مادگی های آن ها دارای لوله گرده در قسمت انتهایی خامه باشند به عنوان خیلی خودسازگار، نژادگان هایی که ۵۰ تا ۷۵٪ از مادگی های آن ها دارای لوله گرده در قسمت انتهایی خامه باشند به عنوان خودسازگار، نژادگان هایی که ۲۵ تا ۵۰٪ از مادگی های آن ها دارای لوله گرده در قسمت انتهایی خامه باشند به عنوان مشکوک و نژادگان هایی که کمتر از ۲۵٪ از مادگی های آن ها دارای لوله گرده در قسمت انتهایی خامه باشند به عنوان خودناسازگار معرفی می شوند. برخی از پژوهشگران زمان مورد نیاز برای رسیدن لوله گرده به انتهای خامه در شرایط آزمایشگاه را ۹۶ ساعت بعد از خودگرده افشانی بیان کردند (۲۲). در روش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، آل ( $S_f$ ) تکثیر شده و بر اساس مشاهده باند مخصوص به این آل، نژادگان های خودسازگار از خودناسازگار تشخیص داده می شوند. این روش در سیب، گلابی، گیلاس، زردآلو، آلو، بادام و بیشتر درختان میوه دیگر که ناسازگاری در آن ها مطرح است به طور موفقیت آمیزی عملی شده است و آغازگرهای ویژه نیز برای شناسایی مکان ژنی آل های S در این گیاهان طراحی و به کار رفته اند (۲۳، ۲۴).

دو رقم در صورتی که دارای دو آل ناسازگاری مشابه نباشند به عنوان رقم های سازگار می توانند در احداث باغ با هم کاشته شوند و همدیگر را گرده افشانی کنند، ولی در صورت داشتن دو آل یکسان با هم ناسازگار خواهند بود و نباید با هم کشت شوند و در صورت داشتن یک آل مشابه به تقریب ۵۰٪ با هم سازگاری خواهند داشت (۲۰).

تامورا و همکاران (۲۳) جفت آغازگر الیگو نوکلئوتید AS1II و AmyC5R را از نواحی حفاظت شده DNA در مکان ناسازگاری جهت تعیین آلل های  $S_a, S_b, S_c, S_d$  در رقم های بادام طراحی کردند. این جفت آغازگر آلل های مختلفی را در واکنش PCR ایجاد نمودند (۲۳). لوپز و همکاران (۱۳) آغازگرهای اختصاصی را برای تعیین آلل های  $S_1, S_3/S_1, S_7, S_8, S_2, S_5, S_9, S_{23}, S_f$  در بادام استفاده کردند. مارتینز گومز و همکاران (۱۴) ثابت کردند که جفت آغازگر  $AS1_{II}$  و  $AmyC5R$  که توسط تامورا از مناطق حفاظت شده طراحی شده بودند برای شناسایی تعدادی از آلل های ناسازگاری مناسب می باشند. سانچ-پرز و همکاران (۱۷) از این جفت آغازگر برای تعیین آلل های ناسازگاری استفاده نمود اما به علت طول مشابه حاصل از دو آلل  $S_3$  و  $S_f$  در رقم های مختلف آن ها، آغازگر جدیدی زیر عنوان  $CEBAS_f$  با استفاده از داده های بانک ژن مربوط به آلل های ناسازگاری که در هشت رقم حضور داشتند طراحی نموده و به این ترتیب توانستند ۱۰ آلل خودناسازگاری را ( $S_1, S_2, S_3, S_5, S_7, S_9, S_{10}, S_{11}, S_{12}$  و  $S_{13}$ ) که اندازه آن ها ۲-۶ kb بود را به همراه آلل سازگاری  $S_f$  در رقم های بادام و نژادگان های مورد مطالعه خود مشخص نمایند. آغازگرهای  $SfR$  و  $SfF$  توسط پژوهشگرانی چون چانون تاتیات و همکاران (۴) و تامورا و همکاران (۲۳) به منظور تعیین آلل خود سازگاری در بادام به کار برده شدند. این آغازگرها در صورت وجود آلل  $S_f$  باندی به طول ۴۵۰bp تولید می کنند. وجود باند دلیل بر خودسازگاری و عدم وجود باند دلیل بر خودناسازگاری بیان شده است.

## مواد و روش ها

در سال ۱۳۸۲ بین رقم خودسازگار بادام 'تونو' (والد پدری) و رقم خودناسازگار 'شاهرود۱۲' (والد مادری) در موسسه نهال و بذر کرج تلاقی انجام گرفته و ۲۸ نتاج از لحاظ ویژگی خود سازگاری مورد ارزیابی قرار گرفتند. در سال اول به دلیل سرمای دیرس بهاره و از بین رفتن گل های برخی از نژادگان ها فقط ۲۸ نتاج مورد بررسی میکروسکپی قرار گرفتند. در سال دوم شرایط آب و هوایی مساعدتر از سال اول بود و هر ۲۸ نتاج مورد بررسی میکروسکپی قرار گرفتند.

### تعیین خودسازگاری با استفاده از میکروسکپ فلورسنس

در این آزمایش ابتدا یک شاخه از هر نژادگان در مرحله بالنی کیسه شد و بعد از باز شدن گل ها کیسه باز شد و به وسیله قلم مو عمل خودگرده افشانی روی گل ها انجام شد و دوباره در کیسه قرار گرفتند. از هر نژادگان دستکم ۱۰ گل در زمان ۱۲۰ ساعت پس از عمل گرده افشانی برداشت شدند و داخل کشت کننده FAA شامل (۵٪ فرم آلدئید ۴۰٪، ۵٪ اسید استیک گلاسیال، ۴/۲۴٪ آب دوبار تقطیر و ۶/۶۵٪ الکل ۹۶٪) تثبیت شدند. سپس نمونه ها از داخل محلول کشت کننده FAA (حدود ۳ ماه بعد از نمونه برداری) بیرون آورده شده و داخل ویال های شیشه ای حاوی ۱۵ میلی لیتر سولفید سدیم ۵٪ قرار گرفتند و در مرحله بعد در داخل اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه و فشار ۱/۲ کیلوگرم بر سانتیمتر مربع به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. در نهایت در دمای ۴ درجه سلسیوس تا زمان مشاهده نگهداری شدند (۲۰). به منظور آماده سازی نمونه ها جهت مشاهده میکروسکپی در ابتدا محلول آنیلین بلو تهیه گردید. برای تهیه یک لیتر محلول آنیلین بلو، ۷/۶۷ گرم فسفات پتاسیم خالص در یک لیتر آب مقطر حل شد و سپس یک گرم آنیلین بلو به آن به آن اضافه گردید و محلول به مدت ۱۲ ساعت روی همزن با دور کم قرار داده شد تا به طور کامل حل و رنگ آن سبز زیتونی شود (۱۲). بعد از تهیه محلول فوق

مادگی ها به مدت ۱۰ ساعت داخل محلول رنگی قرار گرفتند و بعد از آن با یک پنس باریک موهای روی خامه تمیز شدند. سپس با یک تیغ تمیز تخمدان از خامه جدا شد و خامه ها روی لام قرار داده شده و لامل روی آن ها قرار گرفت. رشد لوله گرده به وسیله میکروسکپی فلورسنس (Leitz and Wetzler) مدل HBO 200 W/4 تولید کارخانه مونیخ آلمان بررسی شد. درصد مادگی های دارای لوله گرده حاصل از خودگرده افشانی در قسمت انتهایی خامه در هر نژادگان ثبت شد. این اطلاعات به منظور تعیین وضعیت سازگاری نژادگان های مورد نظر به کار رفت.

### تعیین خودسازگاری با استفاده از روش PCR

در این پژوهش از روش دویل و دویل (۷) جهت استخراج DNA استفاده شد. لازم به گفتن است که استخراج DNA در گیاه بادام به دلیل دارا بودن متابولیت های ثانویه مانند پلی فنل ها و ترکیب های پلی ساکارییدی فراوان، اندکی مشکل است، ترکیب های بافری مورد استفاده در این روش در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- ترکیب های اجزا بافر مورد استفاده برای استخراج DNA.

Table 1. Chemicals and their concentrations in DNA extraction buffer.

اتو کلاو Autoclave	ماده شیمیایی Chemical substances	غلظت نهایی Final concentration	غلظت استوک Stock concentration	برای ۱۰۰ میلی لیتر For 100cc
Yes	Tris-HCl pH 8	100 mM	2M	5MI
Yes	Sodium EDTA	20 mM	0.5M	4 MI
Yes	NaCl	1.4M	5M	28 MI
No	CTAB	2%	-	2gr
No	2-mercaptoethanol	2%	-	2 MI
Yes	P.V.P	2%	-	2gr

پس از استخراج DNA تعیین کمیت و کیفیت DNA با استفاده از روش اسپکتوفتومتری انجام شد. این روش بر مبنای طیف جذب DNA می باشد. پس از این که دستگاه کالیبره شد ۹۸۰ میکرولیتر از آب مقطر و ۲۰ میکرولیتر از DNA نمونه را در کووت ریخته و اعداد مربوط به طول موج های ۲۶۰ نانومتر (طول موج جذب نور توسط نوکلئیک اسیدها) و ۲۸۰ نانومتر (طول موج جذب نور توسط پروتئین ها) خوانده شد و نسبت جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ و غلظت نمونه DNA یادداشت شد. نسبت جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ به منظور تعیین کیفیت DNA به کار می رود که باید بین ۱/۷ تا ۲ باشد. پس از تعیین غلظت نمونه های DNA، برای واکنش زنجیره ای پلیمران، غلظت نمونه به مقدار ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شد.

## تهیه مخلوط واکنش و انجام PCR

برای انجام PCR پس از استخراج DNA ژنومیک (هسته و کلروپلاست) اقدام به تکثیر آن در مخلوط PCR گردید. این مخلوط شامل ۷/۵ میکرو مولار از Master Mix آماده، ساخت شرکت سیناژن (با غلظت ۲X) موجود بود که شامل تمام اجزاء واکنش به غیر از DNA و آغاز گر بود. ۰/۶۲۵ میکرو لیتر از هر آغاز گر با غلظت ۱۰ ماکرومولار در لیتر و ۱۰ میکرو لیتر از DNA با غلظت ۱۰ نانوگرم در لیتر برای این مخلوط استفاده شد. از آن جایی که حجم نهایی این مخلوط ۲۵ میکرولیتر بود، به منظور رساندن حجم مخلوط PCR به این مقدار از آب مقطر سترون استفاده شد (جدول ۲).

جدول ۲- مواد لازم و مقدار آن ها برای تهیه محلول پایه PCR با استفاده از کیت PCR.

Table 2. Ingredients and their amounts for preparation of PCR stock solution using PCR Kit.

مقدار لازم برای واکنش ۲۵ میکرولیتر Content for 25µl reaction	غلظت نهایی Final concentration	غلظت پایه Stock concentration	ماده Substances	کمیت آغازگر PCR
7.5 µl	1 X	2 X	PCR kit	
0.625µl	0.25 µM	10 µM	Primer	
10 µl	4 Ng µl <sup>-1</sup>	10 Ng L <sup>-1</sup>	DNA	
6.25µl	-	-	Distill water	آب مقطر
25	-	-	Total	جمع

برنامه PCR در این آزمایش شامل ۳ دقیقه واسرشت سازی اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس و در ادامه ۳۴ چرخه شامل ۳۰ ثانیه در ۹۵ درجه سلسیوس، ۴۵ ثانیه در ۵۳ درجه سلسیوس و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس بود و پس از اتمام چرخه ها ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس و در نهایت در دمای ۴ درجه سلسیوس تا زمان الکتروفورز بود. پس از انجام PCR مقدار ۵ میکرولیتر از ماده رنگی برموفنل بلو به هر اپندورف اضافه شد و به طور کامل مخلوط گردید. سپس محصول های PCR روی ژل آگارز ۲٪ در بافر بارگذاری TBE به مدت ۱ ساعت و ۴۵ دقیقه در ولتاژ ۸۰ وات الکتروفورز گردیدند. جهت تعیین اندازه باندهای به دست آمده از نشانگر ۱Kbp در غلظت ۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر استفاده شد که به مقدار ۳ میکرولیتر در چاهک اول ژل ریخته شد. پس از پایان الکتروفورز، ژل با اتیدیوم بروماید سه میکرولیتر در لیتر از محلول پایه ۱ میکروگرم در میلی لیتر به مدت ۱۵ دقیقه رنگ آمیزی شد و پس از دو بار شست و شو با آب دو بار تقطیر (هر بار ۱۰ دقیقه) با استفاده از دستگاه عکسبرداری از ژل باندهای به دست آمده مورد بررسی قرار گرفتند. آغازگرهای مورد استفاده در این آزمایش شامل SfF و SfR بودند که توسط پژوهشگرانی چون چانون پیتات و همکاران (۴) و تامورا و همکاران (۲۳) به منظور تعیین آلل خود سازگای در بادام به کار برده شده بودند. وجود باند دلیل بر خودسازگاری و عدم وجود باند دلیل بر خودناسازگاری بیان شده است.

جدول ۳- ویژگی های آغازگرهای مورد استفاده برای تعیین آلل Sf در نتاج بادام.

Table 3. Characteristics of primers used to determine the Sf alleles in almond progenies.

منبع Reference	دمای اتصال Annealing temperature	آلل های قابل مشاهده Visible allele	اندازه باند (bp) Band size	ترکیب آغازگر Primer combination	توالی Sequence	آغازگر Primer
Channuntapitat <i>et al.</i> , 2003	60 °C	S <sub>f</sub>	449	SfF/ SfR	GTGCCCTATCTAATTTGTTGAC GACTTTTTTTTAGAAAAGAGTG	SfF SfR

## نتایج و بحث

### تعیین نژادگان های خودسازگار با استفاده از میکروسکپ فلورسنس

بررسی های میکروسکوپی چگونگی تغییرهایی در نحوه رشد لوله گرده در نتاج را در هر دو سال نشان داد و امکان طبقه بندی پدیدگانی (فنوتیپی) نژادگان ها را فراهم نمود (جدول های ۴ و ۵).

در زمان ۱۲۰ ساعت پس از خودگرده افشانی در سال اول در نژادگان های شماره ۱۶ و ۳۴ بیش از ۷۵٪ مادگی های آن ها دارای لوله گرده در قسمت انتهایی خامه بودند که به عنوان نژادگان های به طور کامل خودسازگار محسوب شدند (جدول ۴). نژادگان های شماره ۵، ۱۰، ۱۵ و ۳۲ که بین ۵۰٪ تا ۷۵٪ از مادگی های آن ها دارای لوله گرده در قسمت انتهایی خامه بودند، در گروه خودسازگار قرار گرفتند (جدول ۳). نژادگان های شماره ۳، ۸، ۱۴، ۲۵ و ۲۷ که ۲۵٪ تا ۵۰٪ از مادگی های آن ها دارای لوله گرده در قسمت انتهایی خامه بودند به عنوان نژادگان مشکوک و ۱۶ نژادگان دیگر که کمتر از ۲۵٪ از مادگی های آن ها دارای لوله گرده در قسمت انتهایی خامه بودند در گروه خود ناسازگار قرار گرفتند (جدول ۴) و (شکل ۱).

در زمان ۱۲۰ ساعت پس از خودگرده افشانی در سال دوم نژادگان های شماره ۱۶، ۲۳، ۳۲، ۳۴ بیش از ۷۵٪ مادگی های آن ها دارای لوله گرده در قسمت انتهایی خامه بودند که به عنوان نژادگان های به طور کامل خودسازگار محسوب شدند. نژادگان های شماره ۵، ۶، ۷، ۱۰، ۱۳، ۱۵، ۲۹، ۳۰، ۳۳ و ۳۸ که بین ۵۰٪ تا ۷۵٪ از مادگی های آن ها دارای لوله گرده در قسمت انتهایی خامه بودند، در گروه خود سازگار قرار گرفتند و نژادگان های شماره ۳، ۴، ۸، ۱۴، ۱۷، ۲۴، ۲۵، ۲۷ و ۳۵ که بین ۲۵٪ تا ۵۰٪ از مادگی های آن ها دارای لوله گرده در قسمت انتهایی خامه بودند، در گروه مشکوک قرار گرفتند. ۱۵ نژادگان دیگر که کمتر از ۲۵٪ از مادگی های آن ها دارای لوله گرده در قسمت انتهایی خامه بودند به عنوان خودناسازگار شناخته شدند (جدول ۴). تعیین نژادگان های خودسازگار و خودناسازگار بر اساس نتایج Alonso و همکاران (۱) انجام شد. این نتایج حاکی از آن است که در بسیاری از رقم های خودناسازگار تعداد زیادی لوله گرده در سطح کلاله و ابتدای خامه دیده می شدند، ولی هیچ کدام به انتهای خامه نمی رسند. در این نمونه ها تجمع پینه دیده شد.

در تعدادی از نژادگان ها تفاوت هایی از نظر تعداد مادگی های دارای لوله گرده در انتهای خامه در زمان ۱۲۰ ساعت پس از خودگرده افشانی در دو سال دیده شد که بر این اساس در برخی نژادگان های یاد شده در سال اول، میزان رشد کمتری در لوله های گرده آن ها دیده شد که این پدیده می تواند به علت میانگین دمای پایین تر در زمان گرده افشانی تا پایان برداشت نمونه در زمان ۱۲۰ ساعت پس از خودگرده افشانی در سال اول

می باشد. میانگین دمایی پایین تر می تواند سبب کاهش سرعت رشد لوله گرده در این مدت و در نتیجه ناکافی بودن زمان ۱۲۰ ساعت برای رشد لوله گرده و رسیدن آن به انتهای خامه باشد. وضعیت متفاوت تعدادی از نژادگان ها در دو سال از نظر تعداد مادگی دارای لوله گرده در انتهای خامه در زمان ۱۲۰ ساعت پس از خودگرده افشانی در جدول ۵ نمایش داده شده است.

همان طور که از جدول بالا مشاهده می شود در سال دوم نژادگان شماره ۴ از حالت خودناسازگار به مشکوک، نژادگان شماره ۲۳ از خودناسازگار به طور کامل خودسازگار، نژادگان شماره ۲۴ از خودناسازگار به مشکوک، نژادگان شماره ۲۹ از خودناسازگار به خودسازگار، نژادگان شماره ۳۲ از خودسازگار به طور کامل خودسازگار و نژادگان های شماره ۳۵ و ۲۴ از خودناسازگار به مشکوک تغییر یافته اند. این مسئله می تواند ناشی از شرایط مساعد تر دمایی در سال دوم باشد که زمان ۱۲۰ ساعت را برای ارزیابی مناسب نموده است. در سال های مختلف نحوه تنژگی دانه گرده در سطح کلاله و رشد لوله گرده به سمت تخمدان زیر تاثیر شرایط اقلیمی قرار می گیرد و در یک سال دما ممکن است آن قدر پایین باشد که زمان ۱۲۰ ساعت نیز برای رشد لوله گرده و رسیدن آن به تخمک کافی نباشد. از طرفی دیگر رشد لوله گرده و نفوذ آن به بخش های پایینی خامه و رسیدن آن به تخمدان زیر تاثیر پیام های دریافتی از تخمک سالم می باشد. بنابراین در سالی که دمای هوا پایین تر باشد، تخمک ها در اثر سرما آسیب می بینند و پیام های موجود برای جذب لوله گرده را نمی توانند تولید نمایند و لوله های گرده در قسمت بالا و وسط خامه متوقف می شوند. به نظر می رسد برای رفع این مشکل در پژوهش های آینده باید گرده افشانی در شرایط آزمایشگاه مد نظر قرار گیرد تا دقت کار بالا رفته و تاثیر شرایط نامساعد محیطی بر رشد لوله گرده به کمینه برسد. با توجه به موارد بیان شده و با مقایسه نتایج دو سال و شرایط بهتر سال دوم، نتایج سال دوم قابل اطمینان تر می باشد. شکل ۱ نژادگان های خودسازگار و خودناسازگار ۳۴ و ۲۱ را نشان می دهند. همان طور که از شکل یک مشاهده می شود در نژادگان شماره ۳۴ لوله گرده به انتهای خامه رسیده است که دلیل بر خودسازگاری این نژادگان می باشد و در نژادگان شماره ۲۱ رشد لوله گرده در قسمت میانی خامه متوقف شده است و عدم رسیدن لوله گرده به انتهای خامه نشان دهنده پدیده خودسازگاری در این نژادگان می باشد.

### تعیین نژادگان های خودسازگار با روش PCR

نتیجه واکنش PCR و باند های به دست آمده در شکل (۲) نمایش داده شده است. در این بررسی ۱۹ نژادگان شامل (نژادگان های شماره ۳، ۵، ۶، ۷، ۸، ۱۰، ۱۱، ۱۳، ۱۶، ۱۷، ۲۳، ۲۴، ۲۷، ۲۹، ۳۰، ۳۲، ۳۳، ۳۴ و ۳۸) به دلیل داشتن باندی به اندازه ۴۵۰bp به عنوان نژادگان های خودسازگار شناسایی شدند. از آنجایی که تلاقی در این آزمایش بین رقم خودسازگار 'تونو' به عنوان والد پدری و رقم خودناسازگار 'شاهرود' ۱۲ به عنوان والد مادری انتخاب شده بود، انتظار می رفت که ۵۰٪ از نتایج حاصل از تلاقی خودسازگار و ۵۰٪ دیگر خودناسازگار شوند که نتایج به دست آمده با این انتظار مطابقت داشت.



جدول ۴- بررسی وضعیت نتاج از نظر درصد مادگی های دارای لوله گرده در انتهای خامه در زمان ۱۲۰ ساعت پس از خودگرده افشانی در سال اول و دوم (۱۳۸۸ و ۱۳۸۹).

Table 4. Percent progenies with pollen tube at the end of their style at 120 h after self pollination in 2009 and 2010.

تعداد و درصد نژادگان های کاملاً خود سازگار No. and percent of highly self-compatible genotypes	تعداد و درصد نژادگان های خود سازگار No. and percent of self-compatible genotypes	تعداد و درصد نژادگان های مشکوک (No. and percent of doubtful genotypes)	تعداد و درصد نژادگان های ناسازگار (No. and percent of self-incompatible genotypes)	تعداد کل نژادگان ها (No. of total genotypes)	زمان (ساعت پس از خودگرده افشانی) Time (hour after self-pollination)	ترکیب تلاقی Cross combination					
							2009		2010		
سال دوم	سال اول	سال دوم	سال اول	سال دوم	سال اول	سال دوم	سال اول	سال دوم	سال اول	-	-
10.53 (4)	7.14 □□ 2□	26.32 (10)	17.86 □□5□	23.58 (9)	17.86 □ □5□	(15) 39.47	57.14 □□16 □	38	28	120	تونو* شاهرود ۱۲



جدول ۵- تفاوت در میزان رشد لوله گرده در قسمت انتهایی خامه در تعدادی از نژادگان ها در سال های ۱۳۸۸ و ۱۳۸۹.

Table 5. Different amounts of pollen tube growth in some genotypes between two years in 2009 and 2010.

وضعیت ژنوتیپ ها از نظر درصد مادگی های دارای لوله گرده در انتهای خامه در زمان ۱۲۰ ساعت پس از خودگرده افشانی در سال ۱۳۸۹	وضعیت ژنوتیپ ها از نظر درصد مادگی های دارای لوله گرده در انتهای خامه در زمان ۱۲۰ ساعت پس از خودگرده افشانی در سال ۱۳۸۸	میانگین دمای روزانه از زمان گرده افشانی تا پایان دوره برداشت نمونه (۱۲۰) ساعت پس از خودگرده افشانی در سال (۱۳۸۹)	میانگین دمای روزانه از زمان گرده افشانی تا پایان دوره برداشت نمونه (۱۲۰) ساعت پس از خودگرده افشانی در سال (۱۳۸۸)	تاریخ خودگرده افشانی برای برداشت نمونه در سال ۱۳۸۹	تاریخ خودگرده افشانی برای برداشت نمونه در سال ۱۳۸۸	شماره ژنوتیپ Number of genotype
Situation of progenies regarding percent of pistils with pollen tube at the base of style at 120 h after self pollination in 2010	Situation of progenies regarding percent of pistils with pollen tube at the base of style at 120 h after self pollination in 2009	Average temperature from pollination time until flower sampling at 120 h after selfing 2010	Average temperature from pollination time until flower sampling at 120 h after selfing 2009	Selfing date in 2010	Selfing date in 2009	
Doubtful	Self incompatible	19.1 °C	9.7 °C	1388/12/23	1387/12/28	4
Highly self compatible	Self incompatible	16 °C	11.4 °C	1388/12/24	1387/12/30	23
Doubtful	Self incompatible	19.1 °C	9.2 °C	1388/12/23	1387/12/27	24
Self compatible	Self incompatible	19.1 °C	11.2 °C	1388/12/23	1387/12/29	29
Highly self compatible	Self compatible	19.9 °C	11.2 °C	1388/12/22	1387/12/29	32
Doubtful	Self incompatible	19.1 °C	11.4 °C	1388/12/23	1387/12/30	35

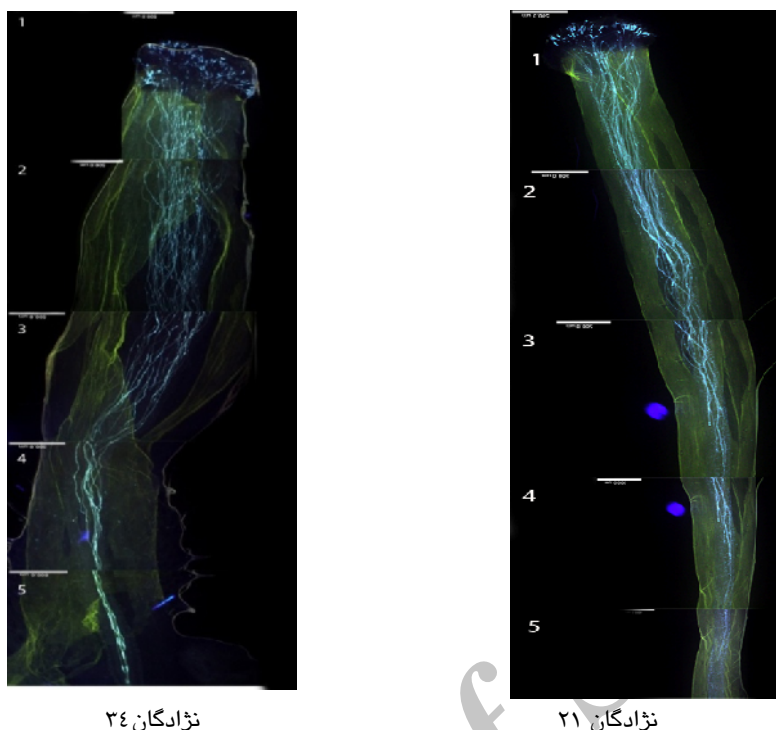


Fig. 1. Situation of pollen tube growth in self-compatible genotype (34 left and 21 right) at 120 h after self-pollination. Germinated pollens at stigma surface and pollen tubes at the upper part of style (1 and 2), Genotype 34: Pollen tubes at middle part of style (3 and 4), and pollen tube at style base (5), Genotype 21: Pollen tubes at the middle part of style and arrest of their growth at the middle part of the style (3, 4 and 5).

شکل ۱- وضعیت رشد لوله گرده در نژادگان خودسازگار ۳۴ (چپ) وجود ناسازگاری ۲۱ (راست) در زمان ۱۲۰ ساعت پس از انجام خودگرده افشانی. دانه های گرده تنزیده در سطح کلالة و لوله های گرده در قسمت فوقانی خامه (۱ و ۲)، نژادگان ۳۴: لوله های گرده در قسمت میانی خامه (۳ و ۴) و لوله های گرده در انتهای خامه (۵)، نژادگان ۲۱: لوله های گرده در قسمت میانی خامه و متوقف شدن رشد آن ها در قسمت میانی خامه (۳، ۴ و ۵).

همان طور که بیان شد در این آزمایش از آغازگرهای SfF و SfR استفاده شدند که توسط پژوهشگرانی چون چانوپیتات و همکاران (۴) و تامورا و همکاران (۲۳) به منظور تعیین آلل خود سازگاری در بادام به کار برده شده بودند که وجود باند را دلیل بر خودسازگاری و عدم وجود باند را دلیل بر خودناسازگاری بیان کرده بودند. همچنین این روش توانست وضعیت ۹ نژادگانی را که در روش میکروسکوپی به صورت مشکوک تشخیص داده شده بودند را مشخص نماید که بر اساس نتایج به دست آمده ۵ نژادگان های ۳، ۸، ۱۷، ۲۴ و ۲۷ به عنوان خودسازگار شناسایی شدند و ۴ نژادگان دیگر شامل ۴، ۱۴، ۲۴ و ۳۵ به عنوان خودناسازگار تشخیص داده شدند.

از آنجایی که دوره نونهالی بادام حداقل ۳ سال طول می کشد، بنابراین، استفاده از آغازگرهای اختصاصی راه سریع و دقیق برای شناسایی نژادگان های خودسازگار بادام می باشد ولی این روش نمی تواند میزان خودسازگاری نژادگان ها را تعیین کند و همان طور که در شکل ۲ مشاهده شد تمام نژادگان ها شامل به

طور کامل خودسازگار، خودسازگار و مشکوک در یک کلاس قرار می گیرند ولی در روش میکروسکپی این تفاوت ها ملموس تر است. بنابراین به عنوان نتیجه گیری کلی می توان این طور بیان کرد که هر دو روش PCR و میکروسکپی فلورسنس در شناسایی نتاج خودسازگار، مشکوک، خودناسازگار کارایی لازم را دارند و با توجه به برخی مشکلات در هر کدام، تلفیق این دو روش می تواند نتایج بهتر و دقیق تری ایجاد نماید.

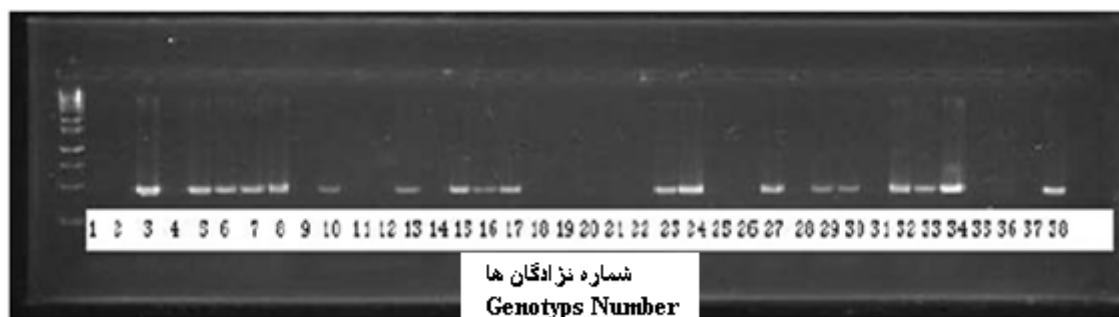


Fig. 2. Self compatibility and incompatibility determination of almond genotypes by primers SfF and SfR.

شکل ۲- تعیین نژادگان های خودسازگار و خودناسازگار با استفاده از آغازگرهای SfF و SfR.

## REFERENCES

## منابع

1. Alonso, J.M. and R. Socias I Company. 2005. Self-incompatibility expression in self-compatible almond genotypes may be due to inbreeding. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 130:865-869.
2. Ben Njima, N. and R. Socias I Company. 1995. Characterization of some self-compatible almonds. I. Pollen tube growth. HortScience 30:318-320.
3. Boskovic, R., K.R. Tobutt, H. Duval, I. Batlle, F. Dicenta and F.J. Vargas, 1999. A stylar ribonuclease assay to detect self-compatible seedlings in almond progenies. Theor. Appl. Genet. 99:800-810.
4. Channuntapitat, C., M. Wirthensohn, S.A. Ramessh, I. Batll, P. Arus, M. Sedgely and G. Collins, 2003. Identification of incompatibility genotypes in almond using specific primers based on the introns of the S-alleles. Plant Breed. 122:164-168.
5. De Nettancourt, D. 1977. Incompatibility in Angiosperms. Springer Verlag, Heidelberg, Germany.
6. Dicenta, F., E. Ortega, P. Martinez-Gomez, R. Boskovic, and K.R. Tobutt, 2002. Comparison of homozygous and heterozygous self-compatible seedlings in an almond breeding programme. Euphytica 124:23-27.
7. Doyle, J. and J. Doyle, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 19:11-15.

8. Duval, H., and C. Grasselly, 1994. Behaviour of some self-fertile almond selections in the south-east of France. *Acta Hort.* 373:69-74.
9. Godini, A. and M. Palasciano, 1997. Growth and yield of four self-unfruitful and four self-fruitful almonds onto three rootstocks: A thirteen year study. *Acta Hort.* 470:200-207.
10. Gradziel, T.M. and D.E. Kester, 1998. Breeding for self-fertility in California almond cultivars. *Acta Hort.* 470 109-117.
11. Grasselly, C. 1980. Oringine et evoition de lamandier cultive. *Options. Mediterr.* 32:45-50.
12. Linskens, M.F., K. Esser, 1957. U" ber eine spezifische Anfarbung der Pollenslauche und die Zahl der Kalloposepfropfen nach Selbstung und Fremdung. *Naturwissenchften* 44:16
13. Lopez, M., M. Mnejja, M. Rovira, G. Collins, F.J. Vargas, and L. Batlle, 2004. Self-incompatibility genotypes in almond re-evaluated by PCR, stylar ribnucleases, sequencing analysis and controlled pollinations. *Theor. Appl. Genet.* 109: 954-964.
14. Martinez-Gomez, P., E. Ortega, R. Sanchez-Perez, F. Dicenta, A.M. Dandekar, J.M. Alonso, R. Socias I Company, M. Lopez, I. Batlle, and T.M. Gradziel, 2003. Indentification of self-incompatibility allele in almond and related *Prunus* species using PCR. *Acta Hort.* 622:397-401.
15. Ortega, E. J. Egea, J.A. Canovas, and F. Dicente, 2002. Pollen tube dynamics following half and fully-compatible pollinations in self-compatible almond cultivars. *Sex. Plant. Repord.* 15:47-51.
16. Ortega, E. and F. Dicente, 2008. Inheritance of self-compatibility in almond. *Theor. Appl. Genet.* 106:904-911.
17. Sanchez-Perez, R., F. Dicenta and P. Martinez-Gomez. 2004. Identification of S-alleles in almond using multiplex PCR. *Euphytica* 138:263-269
18. Socias I Company, R. 1998. Fruit tree genetics at a turning point: The almond example. *Theor. Appl. Genet.* 96:588-601.
19. Socias I Company, R. and A.J. Felipe, 1988. Self-compatibility in almond: transmission and recent advances. *Acta. Hort.* 224:307-317.
20. Socias I Company, R. and A.J. Felipe, 1995. Cross-incompatibility of 'Ferragne' s' and 'Ferralise': Implication for self-compatibility transmission in almond. *Acta. Hort.* 224:307-317.
21. Socias I Company, R., and J.M. Alonso, 2004. Cross-incompatibility of 'Ferragne' s' and 'Ferralise' and pollination efficiency for self-compatibility transmission in almond. *Euphytica* 135:333-338.
22. Socias I Company, R., D.E. Kester, and M.V. Bradley, 1976. Effect of temperature and genotype on pollen tube growth in some self-compatible and self-incompatible almond cultivars. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 101:490-493.
23. Tamura, M. 2000. Identification of self -compoatibility genotypes of almond by allele specific PCR analysis. *Theor. Appl. Genet.* 101:344-349.
24. Vargas, F.J., J. Clave', M.A. Romero, I. Batlle and M. Rovira, 1997. Autogamy studies on almond progenies. *Acta Hort.* 470:74-81.

## DISCRIMINATION OF SELF COMPATIBILITY IN GENOTYPES OBTAINED FROM ALMOND CROSSING USING FLUORESCENT MICROSCOPY AND PCR METHODS

A. EBADI, A. MOMENPOUR AND A. IMANI<sup>1</sup>

Self-incompatibility is one of the most important constraints in almond production which reduce fruit set dramatically and makes orchard management difficult. Therefore, almond breeding to produce self-compatible genotypes is very important. In this research, pollen tube growth was studied in 38 genotypes obtained from crossing between 'Touno' (male parent) and 'Shahrood 12' (female parent) by fluorescent microscopy and PCR. To study pollen tube growth after self pollination, flower samples were harvested at 120 h after hand pollination and pollen tube growth was studied by fluorescent microscopy. Results showed that at 120 h after hand pollination, 39.47% of genotypes were self-incompatible, 23.68% of genotypes were doubtful, 26.32% of genotypes were self-compatible and 10.53% of genotypes were recognized as highly self-compatible. To double check the status of self-compatible genotype and to determinate the situation of doubtful genotypes recognized by fluorescent microscopy, PCR reaction was carried out by specific primers of S<sub>f</sub>F and S<sub>f</sub>R. Results showed that five genotype were self-compatible. However, four another genotype were recognized as self-incompatible. In general, 50% of genotypes were realized as self-compatible and another 50% were self-incompatible.

**Key words:** Doubtful genotype, Self-compatible, Self-incompatible, S<sub>f</sub> allele.

---

1. Associate Professor, M.Sc. Student (ali\_momenpour2005@yahoo.com), Department of Horticultural Science, Agricultural and Natural Science, Campus, Tehran University, Karaj and Assistant Professor, Horticultural Division, Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, I.R. Iran, respectively.