ژنتیک نوین
دوره هفتم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۱
صفحه ۵۵-۴۷

شناسایی آلل‌های خود ناسازگاری در ژنوتیپ‌های آلو (تجاری و بومی) با استفاده از تکثیر آلل‌ها به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

مرضیه اتحادپور[۱]، محمدرضا فتاحی‌مقدم*[۲]، ذبیح اله‌زمانی[۳]

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیاران گروه علوم باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:fattahi@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۸)

چکیده

در این بررسی، ژنوتیپ‌های S-RNase مربوط به ۳۴ ژنوتیپ آلو (*P.domestica*) از مناطق مختلف کشور به همراه ۵ رقم تجاری و نمونه میروبالان (جمعاً ۴۰ ژنوتیپ) بوسیله تکثیر آلل‌های S با جفت آغازگرهای دژنره و به روش PCR بر اساس ناحیه حفاظت‌شده ژن *S-RNase* جنس پرونوس مورد مطالعه قرار گرفت. با استفاده از جفت آغازگرهای دژنره EM PC2consFD/ EM PC3consRD تعداد ۲۳ باند در محدوده ۱۸۳۰-۳۲۰ جفت باز مشاهده شد که ۱۴ باند مربوط به آلل‌های گزارش شده قبلی و ۹ باند جدید بود. در ژنوتیپ‌های مورد بررسی، ۲۳ ژنوتیپ دو باند نشان دادند که هتروزیگوسیتی در این مکان را نشان می‌دهد و بقیه ژنوتیپ‌ها فقط یک باند نشان دادند. بر اساس نتایج بدست آمده آلل‌های S_c، باند ۶۲۱ bp و S_i به ترتیب با ۳۰، ۱۷/۵ و ۱۲/۵ درصد بیشترین فراوانی را در ژنوتیپ آلوهای ایرانی داشتند که آلل S_c بیشترین فراوانی (۱۷/۱ درصد) را در جمعیت ولیان کرج نشان داد. ژنوتیپ S سانتاروزا در این بررسی S_hS_c تشخیص داده شد که با گزارش‌های قبلی (S_cS_e) متفاوت است. همچنین ژنوتیپ S شایرو در این آزمایش دو آلل نشان داد (S_hS_i) در صورتی‌که قبلاً یک باند (S_f) گزارش شده بود. اختلاف ژنوتیپ‌های S مشاهده شده و گزارش شده در ارقام شایرو و سانتاروزا ممکن است به دلیل موتاسیون در مکان S باشد و یا اینکه ژنوتیپ ارقام موجود در این بررسی با ژنوتیپ ارقام گزارش شده متفاوت باشد. جفت آغازگر دژنره PaConsI-F/ EM PC5consRD تعداد ۱۴ باند در محدوده ۲۴۹۵-۸۷۵ جفت باز در ژنوتیپ‌های مورد بررسی ایجاد کرد. با استفاده از این جفت آغازگر در ۲۵ نمونه از ژنوتیپ‌های مورد بررسی دو باند نشان دادند و بقیه آن‌ها یک باند نشان دادند. همچنین یک ژنوتیپ هیچ‌گونه باندی با استفاده از هر دو جفت آغازگر نشان نداد. نتایج این بررسی نشان داد که PCR می‌تواند یک روش سریع و مؤثر برای تعیین ژنوتیپ‌های خودناسازگاری در آلو می‌باشد.

واژه‌های کلیدی

آلل‌های *S-RNase*، خودناسازگاری گامتوفیتیک، ژنوتیپ‌های بومی آلو.

مقدمه

آلو از جمله گونه‌های مهم جنس پرونوس است که جایگاه ویژه‌ای در صنعت میوه‌کاری دارد. مقدار تولید جهانی آلو و گوجه در سال ۲۰۰۹ حدود ۱۰۷۷۶۲۳۲ تن و سطح زیر کشت آن حدود ۲۵۳۴۸۷۳ هکتار بوده است.

Archive of SID

(FAO 2009). آلوها به‌طور جداگانه در سه منطقه اروپا، آسیا و آمریکای شمالی اهلی شده‌اند. پایه کروموزومی تمام آلوها x=۸ است که ژنوم دیپلوئید تا هگزاپلوئید داشته و از چین تا اروپا گسترش دارند. یکی از عوامل بسیار مهم در گرده‌افشانی و تشکیل میوه وضعیت سازگاری است. خودناسازگاری یک مکانیسم ژنتیکی می‌باشد که گیاهان گلدار برای افزایش دگرگشنی و جلوگیری از پس روی ژنتیکی به کار گرفته‌اند. بسیاری از آلوها خودناسازگار هستند و تولید میوه از طریق خودگشنی در آن‌ها امکان‌پذیر نمی‌باشد. همچنین آلوها همانند دیگر گونه‌های هسته-دار قادر به تولید میوه به‌صورت پارتنوکارپ نیستند و به دلیل این که باروری کافی برای تشکیل میوه اهمیت دارد لذا ژنوتیپ خودناسازگاری آن‌ها مورد مطالعه گسترده قرار گرفته است. شناسایی آلل‌های خودناسازگاری جهت انتخاب صحیح درختان گرده‌زا و افزایش عملکرد در باغ‌های تجاری و همچنین در برنامه-های اصلاحی به‌منظور اطمینان از موفقیت در تلاقی‌های کنترل شده حائز اهمیت می‌باشد (Lopez et al. 2006). خودناسازگاری به‌طور گسترده‌ای در خانواده‌های گیاهی سیب‌زمینی، رز و میمون در سطح ملکولی مطالعه شده است که در تمام آن‌ها به‌صورت گامتوفیتیک کنترل می‌شود. خودناسازگاری گامتوفیتیک در خانواده رزاسه توسط دو ژن به نام‌های *S-RNase* و *SFB* که در مکان ژنی S واقع هستند کنترل می‌شود. فاصله بسیار نزدیک این دو ژن روی DNA کروموزومی باعث می‌شود که احتمال کراسینگ اور بسیار کاهش یابد بنابراین هر دو ژن با هم به توارث می‌رسند (Kao and Tsukamoto 2004). ژن *S-RNase* در خانواده‌های سیب‌زمینی، رز و میمون یک گلیکوپروتئین درون مادگی بیان می-کند که توالی آن در خانواده رزاسه تنوع بالایی نشان داده است. ژن *S-RNase* تمام هسته دارها دارای دو اینترون می‌باشد که در آلل‌های مختلف اندازه‌های متفاوتی دارند. اینترون اول که از نظر اندازه کوچکتر است بین توالی پپتید راهنما و اولین ناحیه محافظت شده قرار دارد و اینترون دوم با فاصله بیشتر درون ناحیه با تنوع بالا است. همچنین ۵ ناحیه محافظت شده با نام‌های C5، C4، C3، C2، C1 در توالی آمینو اسیدهای آن‌ها قابل شناسایی است (Ushijima et al. 1998). روابط سازگاری بین ژنوتیپ‌ها و شناسایی گروه‌های ناسازگاری آن‌ها در درختان میوه به صورت کلاسیک با گرده‌افشانی‌های کنترل شده و مشاهده رشد لوله گرده با میکروسکوپ انجام می‌شود (Imani 1383). به‌علاوه، روش‌های مولکولی DNA مانند شناسایی آلل‌های مربوط به ناسازگاری (Ishimizu et al. 1999) و روش‌های بیوشیمیایی مانند تجزیه گلیکوپروتئین‌های خامه (SRNase) نیز استفاده می‌شود (Murfett et al. 1992). آلل‌های S و گروه‌های ناسازگاری تعدادی از درختان میوه مانند گیلاس (Wang et al. 2010)، بادام (Halasz et al. 2008) و (عبادی و همکاران، ۱۳۹۰)، سیب (Kitahara et al. 2005)، گلابی آسیایی (Sanzol and Herrero, 2002)، زردآلو (Feng et al. 2006) با استفاده از روش‌های مولکولی گزارش شده است. آلوهای دیپلوئید (آلوهای ژاپنی و میروبالان) خودناسازگار هستند و خودسازگاری به‌صورت یک پدیده استثنایی در آن‌ها دیده می‌شود که به دلیل دارا بودن آلل S_e (آلل خودسازگار) می-باشد (Szabo 2003). وضعیت سازگاری در آلوهای اروپایی از حالت خودناسازگاری کامل تا خودسازگاری کامل متغیر است (Hegedus and Halasz 2006). درصد تشکیل میوه متغیر در آن‌ها ممکن است ناشی از دانه‌های گرده با چندین آلل و یا شرایط متفاوت محیطی در سال‌های مختلف باشد. در دانه گرده با چند آلل، آلل‌های S ممکن است به‌صورت رقابتی عمل کنند به‌طوری که دانه گرده‌ای که در خامه رشد می‌کند دارای آلل S مشابه با والد مادری باشد. (Tobutt et al. 2004). در آلوی ژاپنی S-RNase یک گلیکوپروتئین با وزن ملکولی حدود ۳۰ کیلو دالتون می‌باشد که حاوی دو مکان فعال برای RNase نوع T_2/S، پنج منطقه محافظت شده و یک مکان با تنوع خیلی بالا می‌باشد که منحصراً در مادگی بیان می‌شود. اولین ژنوتیپ S (S_aS_b) در آلوی ژاپنی رقم 'Sordum' توسط Yamane گزارش شد. سپس Beppu تنوع آلل‌های S را در آلوهای ژاپنی با استفاده از آغازگرهای طراحی شده از توالی‌های حفاظت شده S-RNase رزاسه گزارش کردند. آن‌ها ۱٤ آلل S متفاوت (S_a-S_n) شناسایی کردند و دریافتند که ژن *S-RNase* آلوی ژاپنی همانند دیگر گونه‌های جنس پرونوس دارای دو اینترون می‌باشد. تاکنون ۲۷ آلل S توسط Beppu، Sapir، Zhang و Guerrra در آلوی ژاپنی گزارش شده است. موتاسیون در سیستم خودناسازگاری گامتوفیتیک ممکن است باعث ایجاد خودسازگاری شود (Tao et al. 2007

www.SID.ir
Archive of SID

Vilanova et al. 2006). در آزمایش‌های مربوط به خود و یا دگر گرده‌افشانی که بین واریته‌های دارای ژنوتیپ S_eS_e توسط Beppu انجام شد نتاج بر اساس توارث ژنوتیپ S به دو گروه S_eS_e و S_eS_e تقسیم شدند که نشان می‌داد فقط آلل S_e از والد پدری به ارث می‌رسد. این نتایج آلل S_e را به‌عنوان آلل خودسازگاری تایید می‌کند. هدف این بررسی شناسایی آلل‌های ناسازگاری در ژنوتیپ‌های آلوی موجود در ایران و چند ژنوتیپ تجاری با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بوده است. شناسایی آلل‌های S-RNase ژنوتیپ‌های آلو و تعیین خود و دگرناسازگاری آن‌ها می‌تواند در انتخاب والدین دربرنامه‌های اصلاحی و در انتخاب ارقام مناسب در باغ‌های تجاری مفید واقع شود.

مواد و روش ها

مواد گیاهی در این تحقیق شامل ۳٤ ژنوتیپ آلو موجود در ایستگاه تحقیقات گروه علوم باغبانی دانشگاه تهران در کرج بود که از مناطق مختلف کشور جمع آوری شده است به همراه ۵ رقم تجاری شامل: سانتاروزا، شابرون، مجار، شایرو، قطره طلا، و نمونه میروبالان بودند (جدول ۱).

استخراج DNA از نمونه‌های برگی و با استفاده از روش Murray and Thompson (۱۹۸۰) با اندکی تغییرات بود که شامل افزودن PVP (۲۰ گرم در لیتر) به بافر استخراج و افزایش زمان قرار دادن نمونه‌ها در آب‌گرم ٦۵ درجه از ۳۰ دقیقه به یک ساعت بود. برای تکثیر عمومی آلل‌های S از جفت آغازگر دژنره اینترون دوم شامل آغازگر پیش‌رو EM PC2consRD و پس‌رو (معکوس) EM PC3consRD طراحی شده توسط ساترلند و جفت آغازگر دژنره جفت اینترون شامل آغازگر پیش‌رو PaConsI-F (Sonneveld et al. 2003) با آغازگر پس‌رو (معکوس) EM PC5consRD (Sutherland et al. 2004) استفاده گردید.

جدول ۱- اسامی ژنوتیپ‌های آلوی مورد بررسی

شماره	ژنوتیپ	شماره	ژنوتیپ	شماره	ژنوتیپ	شماره	ژنوتیپ
۱	جواهرده۱	۱۱	4M-47	۲۱	برجی نیشابور ۲	۳۱	86-n-4
۲	جواهرده۲	۱۲	86-4mm-15	۲۲	آلوی وحشی	۳۲	18-3
۳	جواهرده۳	۱۳	ولیان ۱	۲۳	آلوی شیرین هسته جدا (چناران)	۳۳	86-b3-4
۴	جواهرده۴	۱۴	ولیان ۲	۲۴	اسجیل (چناران)	۳۴	درگزی
۵	4M-63	۱۵	ولیان ۳a	۲۵	آلوچه کلات نادر۲	۳۵	سانتاروزا
۶	4M-25	۱۶	ولیان ۳b	۲۶	آلوچه کلات نادر۴	۳۶	شابرون
۷	4M-91	۱۷	ولیان ۴	۲۷	بی نام۱	۳۷	مجار
۸	4M-69	۱۸	ولیان ۵	۲۸	۸۶-۵۱-۳	۳۸	شایرو
۹	4M-44	۱۹	ولیان ۶	۲۹	بی نام ۲	۳۹	قطره طلا
۱۰	4M-12	۲۰	برجی نیشابور ۱	۳۰	n-1	۴۰	پایه

کدها بیانگر ژنوتیپ‌های مخلوط از نواحی مختلف جمع آوری هستند

جدول ۲- جفت آغازگرهای دژنره مورد استفاده در روش PCR جهت تکثیر آلل‌های S در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه آلو

توالی آغازگر (5 ↔ 3')	نوع آغازگر	کد آغازگر	نام آغازگر
TCA C(A/C)A T(C/T)C ATG GCC TAT	پیش‌رو	C2	EM PC2consFD
A(A/T)(C/G) T(A/G)C C(A/G)T G(C/T)T TTG TCC ATT C	معکوس	C3	EM PC3consRD
(C/A)CT TGT TCT TG(C/G) TTT (T/C)GC TTT CTT C	پیش‌رو	SP	PaConsI-F
CAA AAT ACC ACT TCA TGT AAC A(A/G)	معکوس	C5	EM PC5consRD

Archive of SID

www.SID.ir

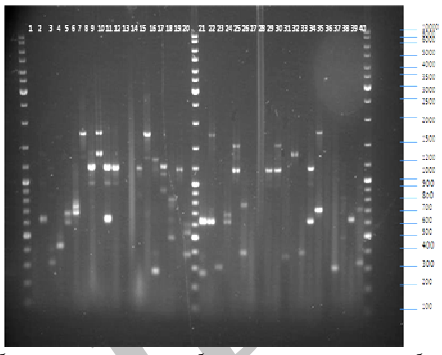
محلول PCR در حجم ۱۷ میکرولیتر، شامل ۳ میکرولیتر از غلظت ۱۵ نانوگرم در میکرولیتر DNA ژنومی، ۱/۵ میکرولیتر از غلظت ۵ میکرومولار هر آغازگر، ۷/۵ میکرولیتر از محلول کیت PCR، ۳/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر تهیه شد. کیت PCR از شرکت سیناژن (ایران) تهیه شد که شامل dNTPs، PCR buffer، *Taq* DNA Polymerase و $MgCl_2$ بود. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به روش Sutherland et al. (2004) و بر اساس مراحل دمایی متناسب با هر جفت آغازگر (جدول ۳) با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Bio-Rad Icycler انجام گرفت که برای جفت آغازگر اینترون دوم به‌صورت زیر انجام شد: یک چرخه ۲ دقیقه‌ای در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۱۰ چرخه حرارتی شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ دقیقه و ۶۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ دقیقه و ۲۵ چرخه حرارتی شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ دقیقه و ۶۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ دقیقه که در هر چرخه ۱۰ ثانیه افزوده می‌شد. مراحل دمایی مربوط به جفت آغازگر جفت اینترون شامل یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و سپس تعداد ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی ثانویه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ ثانیه، اتصال آغازگرها به رشته DNA در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳ دقیقه، بسط در دمای ۶۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤ دقیقه که در هر چرخه بعد از چرخه دهم ۱۰ ثانیه افزوده می‌شد و در نهایت یک چرخه بسط نهایی در دمای ۶۸ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه بود. الکتروفورز محصول PCR در بافر TAE (1X) در تانک الکتروفورز ساخت شرکت Bio-Rad متناسب با محصول PCR تولید شده از هر جفت آغازگر انجام گرفت. الکتروفورز محصول PCR با جفت آغازگرهای اینترون دوم روی ژل آگارز ۱/۵ درصد به‌مدت ۵ ساعت در ۷۵ ولت انجام گردید و برای جفت آغازگرهای جفت اینترون، ژل آگارز ۱/۵ درصد، ولتاژ ۶۰ و برای مدت ۵ ساعت استفاده شد تا باندها کاملاً تفکیک و متمایز شوند. رنگ آمیزی ژل در محلول اتیدیوم بروماید به غلظت ۰/۵ میکروگرم درلیتر به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد و پس از آن باندهای تکثیر شده در زیر نور ماورا بنفش آشکار و عکس برداری از آن‌ها توسط دستگاه ژل داک انجام گردید. اندازه باندهای تکثیر یافته در ارقام آلو با استفاده از نشانگر اندازه یک کیلو جفت بازی (ساخت شرکت Fermentase به شماره کاتالوگ SM ۰۳۳۱) مقایسه شدند. فواصل طی شده باندهای نشانگر با استفاده از نرم‌افزار Adobe Photoshop Image بدست آمد، سپس با استفاده از نرم‌افزار Excel رگرسیون فاصله طی شده باندهای نشانگر (Y) بر اندازه‌های باندهای نشانگر (X) برازش شد و فرمول مربوطه بدست آمد. سپس اندازه مربوط به باندهای آلل‌های ناسازگاری با استفاده از فرمول بدست آمده محاسبه گردید. اندازه آلل‌های S آلو توالی یابی شده و گزارش شده در NCBI بدست آمدند و با اندازه باندهای بدست آمده در این بررسی مقایسه شدند. ماتریس تشابه بین ژنوتیپ‌ها بر اساس اندازه آلل‌های مکان S با استفاده از دو جفت پرایمر که ۳۷ باند تولید کرده بودند محاسبه و سپس تجزیه کلاستر بر اساس ماتریس تشابه بدست آمد.

نتایج و بحث

آغازگر دژنره EM PC2consFD/ EM PC3consRD تعداد ۲۳ باند با اندازه‌های ۳۲۰-۱۸۳۰bp در ٤۰ ژنوتیپ مورد بررسی مشاهده شد (شکل ۱). با مقایسه اندازه باندهای بدست آمده با اندازه آلل‌های S آلو موجود در NCBI، بعضی از آن‌ها با تفاوت-های جزئی با آلل‌های گزارش شده یکسان در نظر گرفته شد (جدول٤). همچنین ۹ باند با اندازه‌های متفاوت مشاهده شد که آلل متناظر با آن‌ها در بین آلل‌های شناخته شده یافت نشد که می-توانند کاندید توالی‌یابی به عنوان آلل جدید باشند. در مطالعات پیشین، Beppu et al. (2003) تنوع آلل‌های S را در آلوهای ژاپنی با استفاده از پرایمرهای طراحی شده از توالی‌های حفاظت شده S-RNase رزاسه گزارش کردند. آن‌ها ١٤ آلل S متفاوت (Sa-Sn) شناسایی کردند. Sapir et al. (2004) پنج آلل S از سه رقم مهم تجاری آلوی ژاپنی بدست آوردند و آن‌ها را به‌صورت عددی نام-گذاری کردند که چهار آلل جدید بودند (S_3، S_4، S_5،S_6) و آلل پنجم (S_1) از 'RedBeaut' متناظر با آلل Sa بود که قبلا توسط Yamane et al. (1999) شناسایی شده بود. Zhang et al. (2008) با استفاده از آغازگرهای طراحی شده از ناحیه محافظت شده ژن *S-RNase* پرونوس ۱۳ آلل جدید (S_{15}-S_{27}) در ۱۷ رقم آلوی

Archive of SID
www.SID.ir

ژاپنی بدست آوردند. Guerrra گروه‌های ناسازگاری ٦٨ ژنوتیپ آلوی ژاپنی را بوسیله تکثیر ژن *S-RNase* به‌روش PCR مشخص کردند که ١٢ گروه ناسازگاری جدید توصیف شد. ژنوتیپ S مربوط به ٥٠ رقم برای اولین بار گزارش شد و ٥ آلل جدید S-RNase (So- Sp- Sq- Sr- Ss) نیز شناسایی شد.



شکل ١- تکثیر آلل‌های خودناسازگاری در آلو با استفاده از از جفت آغازگر EM PC2consFD/PC3consRD EM با روش PCR. نمونه‌ها از چپ به راست: جوارهده١، 4-n-86، ولیان ٥، اسجیل (چناران)، 15-4mm-86، مجار، آلوی وحشی، 4M-47، 1-n، کلات نادر ٤، 4M-44، برجی نیشابور ١، ولیان 3a، ولیان ٢، 4M-69، جوارهر ده ٣، قطره طلا، آلوی شیرین هسته جدا (چناران)، 4M-12، شایرو، بی نام ١، آلوچه کلات نادر ٢، ولیان 3b، ٣-٥١-٨٦، شابرون، بی‌نام ٢، جوارهر ده ٢، 4M-91، ولیان ٦، سانتاروزا، برجی نیشابور ٢، ولیان٤، 4-b3-86، 3-18، 4M-25، 4M-63، ولیان ١، جوارهر ده ٤، میروبالان، درگزی

در ژنوتیپ‌های مورد بررسی، ٢٣ ژنوتیپ دو باند نشان دادند که نشان‌دهنده هتروزیگوت بودن مکان S آن‌ها می‌باشد در حالی‌که ژنوتیپ‌های جوارهده١، 4-n-86، ولیان ٥، اسجیل (چناران)، آلوی وحشی، ولیان ٢، 4M-12، ولیان ٣، جوارهر ده٢، ولیان ٦، ولیان٤، 4-b3-86، 4M-63، ولیان ١، میروبالان فقط یک باند نشان دادند که ممکن است به‌دلیل هموزیگوت بودن در مکان S باشد (جدول ٥) و یا آلل دوم در این رقم‌ها ممکن است با استفاده از این جفت آغازگر قابل شناسایی نباشد. عدم امکان شناسایی تمام آلل‌های خودناسازگاری با استفاده از جفت آغازگرهای عمومی به‌روش PCR در بادام توسط Sanchez et al. (2004) اعلام شده است. همچنین Halasz (2007) گزارش کرد که تکثیر یک باند در رقم شایرو (S_f) ممکن است به‌دلیل آلل‌های با اندازه اینترون مشابه باشد در حالی‌که رقم شایرو در این آزمایش دو آلل (S_hS_i) نشان داد. ژنوتیپ S سانتاروزا در این بررسی (S_bS_c) بدست آمد که با نتایج گزارش شده توسط Guerrra متفاوت بود. آن‌ها ژنوتیپ S_eS_e را برای سانتاروزا گزارش کردند. اختلاف ژنوتیپ‌های S مشاهده شده و گزارش شده در ارقام شایرو و سانتاروزا ممکن است به دلیل موتاسیون باشد و یا اینکه ژنوتیپ ارقام موجود در ایستگاه تحقیقات با ژنوتیپ ارقام گزارش شده متفاوت باشد. در آزمایشی که توسط Guerrra et al. (2009) برای شناسایی آلل‌های S در آلوی ژاپنی انجام شد ژنوتیپ‌های S متفاوتی برای رقم‌های 'Kelsey' (S_fS_k)، 'Green Sun' (S_bS_c) و 'Friar' (S_bS_h) گزارش شد که مطالعات قبلی به ترتیب با ژنوتیپ‌های S (S_fS_h)، (S_cS_h) و (S_hS_k) گزارش شده بودند. هر دو ژنوتیپ گزارش شده برای 'Kelsey' متناسب با توارث S-allele از والدین آن بوده است. ارقام سانتاروزا و شابرون موجود در ایستگاه تحقیقات ژنوتیپ S یکسانی نشان دادند (S_bS_c) بنابراین در یک گروه دگر ناسازگاری قرار می‌گیرند و گرده‌دهنده مناسبی برای یکدیگر نخواهند بود و برای تولید میوه کافی حتماً به ژنوتیپ‌های دیگری با آلل‌های S متفاوت نیاز دارند. ژنوتیپ S رقم شابرون تا کنون گزارش نشده است. ژنوتیپ‌هایی که دارای یک آلل S مشترک هستند سازگاری نسبی با یکدیگر داشته و پتانسیل پایینی به عنوان گرده‌دهنده برای یکدیگر دارند. در این پژوهش آلل خودباروری (S_e) در ژنوتیپ-های ولیان ٤، n-1 و آلوی وحشی شناسایی شد. آلل S_e به‌عنوان آلل خودسازگاری در آلو شناخته شده است که معادل S_5 است. Halasz طول باند ١٤٥٠ bp را با استفاده از جفت آغازگر EM PC2consFD/ EM PC3consRD برای S_e در نظر گرفت. آلل مشابهی در ژنوتیپ‌های 'Santa Rosa' و 'Sweet utumn' شناسایی شده است. بر اساس نتایج بدست آمده با استفاده از روش PCR آلل S_c، باند ٦٢١ و آلل S_i به ترتیب با ٣٠، ١٧/٥ و ١٢/٥ درصد بیشترین فراوانی را در ژنوتیپ‌های آلوی ایرانی داشتند که آلل S_c بیشترین فراوانی (١٧/١ درصد) را در جمعیت ولیان کرج نشان داد همچنین یکی از آلل‌های شابرون و سانتروزا نیز آلل S_c بود. Sapir فراوانی آلل S_c را در ٤٣ ژنوتیپ آلوی ژاپنی ١٦/٨ درصد بدست آوردند. آلل‌های S_e، S_h، S_i، S_{19}، S_{22}، S_{23} و باندهای ٦٦٥ و ٣٩٥ کمترین فراوانی (٢/٥ درصد) را نشان دادند (شکل ٢). ارقام سانتاروزا و شابرون موجود در ایستگاه تحقیقات ژنوتیپ S یکسانی نشان دادند (S_bS_c) بنابراین در یک گروه دگر ناسازگاری قرار می‌گیرند و گرده‌دهنده مناسبی برای یکدیگر نخواهند بود و برای تولید میوه کافی حتماً به ژنوتیپ‌های

Archive of SID
www.SID.ir

دیگری با آلل‌های S متفاوت نیاز دارند. ژنوتیپ S رقم شابرون تا کنون گزارش نشده است. ژنوتیپ‌هایی که دارای یک آلل S مشترک هستند سازگاری نسبی با یکدیگر داشته و پتانسیل پایینی به عنوان گرده‌دهنده برای یکدیگر دارند. در این پژوهش آلل خودباروری (S_e) در ژنوتیپ‌های ولیان ٤، n-1 و آلوی وحشی شناسایی شد. آلل S_e به‌عنوان آلل خودسازگاری در آلو شناخته شده است که معادل S_5 است. Halasz طول باند ١٤٥٠ bp را با استفاده از جفت آغازگر EM PC2consFD/ EM PC3consRD برای S_e در نظر گرفت. آلل مشابهی در ژنوتیپ‌های 'Santa Rosa' و 'Sweet utumn' شناسایی شده است. بر اساس نتایج بدست آمده با استفاده از روش PCR آلل S_c، باند ٦٢١ و آلل S_i به ترتیب با ٣٠، ١٧/٥ و ١٢/٥ درصد بیشترین فراوانی را در ژنوتیپ‌های آلوی ایرانی داشتند که آلل S_c بیشترین فراوانی (١٧/١ درصد) را در جمعیت ولیان کرج نشان داد همچنین یکی از آلل-های شابرون و سانتروزا نیز آلل S_c بود. Sapir و همکاران (٢٠٠٨) فراوانی آلل S_c را در ٤٣ ژنوتیپ آلوی ژاپنی ١٦/٨ درصد بدست آوردند. آلل‌های S_e، S_h، S_l، S_{19}، S_{22}، S_{23} و باندهای ٦٦٥ و ٣٩٥ کم‌ترین فراوانی (٢/٥ درصد) را نشان دادند (شکل ٢). با استفاده از جفت آغازگر دژنره PaConsI-F/ EM PC5consRD تعداد ١٤ باند با اندازه‌های bp ٢٤٩٥-٨٧٥ در ٤٠ ژنوتیپ مورد بررسی مشاهده شد (شکل٣).

جدول ٤- اندازه باندهای مشاهده شده، اندازه نزدیک‌ترین آلل در NCBI و تفاوت آلل‌های مشاهده شده با آلل‌های متناظر در NCBI

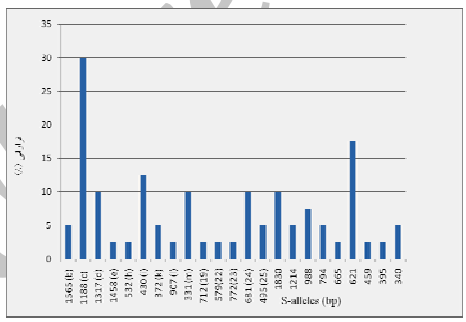
اندازه باندهای مشاهده شده (bp)	نزدیک‌ترین آلل در NCBI (bp)	نام آلل	تفاوت آلل‌های S آلو موجود در NCBI با آلل‌های مشاهده شده متناظر (bp)
1574	1565	S_b	9
1430	1458	S_e	-28
1317	1317	S_d	0
1181	1188	S_c	-7
923	907	S_l	16
768	772	S_{23}	-4
731	712	S_{19}	19
692	681	S_{24}	11
596	579	S_{22}	17
534	532	S_h	2
505	495	S_{25}	10
412	430	S_i	-18
364	372	S_k	-8
326	331	S_m	-5
* اندازه باندهای جدید مشاهده شده			
1830	-	S_I	-
1214	-	S_{II}	-
988	-	S_{III}	-
794	-	S_{IV}	-
665	-	S_V	-
621	-	S_{VI}	-
459	-	S_{VII}	-
395	-	S_{VIII}	-
340	-	S_{IX}	-

* نام باندهای جدید با حروف یونانی مشخص شده است.

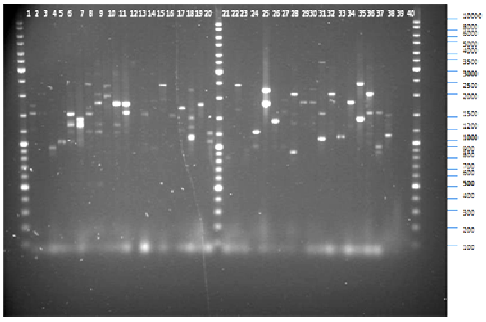
Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۵- طول باند S در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با استفاده از دو جفت آغازگرهای EM PC2consFD/ EM PC3consRD و PaConsI-F/ EM PC5consRD

شماره	رقم	ژنوتیپ S	اندازه آلل مشاهده شده	شماره	رقم	ژنوتیپ S	اندازه آلل مشاهده شده
۱	جواهره۱	S_c	۱۶۶۰,۱۹۰۵	۲۱	برجی نیشابور ۲	S_{VIII}	۱۰۷۰,۱۶۶۰
۲	جواهره۲	S_c	۱۰۲۰,۱۶۶۰	۲۲	آلوی وحشی	S_IS_e	۱۶۶۰,۲۴۹۵
۳	جواهره۳	S_dS_m	۱۶۶۰	۲۳	آلوی شیرین هسته جدا (چناران)	$S_{IV}S_{25}$	۱۱۷۰,۱۳۹۰,۱۵۲۰,۲۲۸۰
۴	جواهره۴	$S_{IV}S_{25}$	۱۱۷۰,۱۶۶۰	۲۴	اسجیل (چناران)	S_{VII}	۱۰۷۰
۵	4M-63	S_d	۱۶۶۰,۲۱۴۱	۲۵	آلوچه کلات نادر۲	S_I S_{VI}	۱۸۰۰و۲۴۹۵
۶	4M-25	S_{24} S_I	۱۵۲۰,۲۴۹۵	۲۶	آلوچه کلات نادر۴	S_c S_{VI}	۱۳۹۰,۱۹۰۵
۷	4M-91	S_dS_m	۹۴۰,۲۱۴۱	۲۷	بی نام۱	$S_{VI}S_m$	۸۷۵
۸	4M-69	S_IS_d	۲۰۵۳و۲۴۹۵	۲۸	۳-۵۱-۸۶	S_{VI} S_V	۱۰۲۰,۱۲۵۰
۹	4M-44	S_cS_{III}	۱۶۶۰,۱۹۰۵	۲۹	بی نام ۲	$S_{23}S_i$	۱۵۲۰
۱۰	4M-12	S_c	۱۹۰۵	۳۰	n-1	S_e S_I	۲۱۴۱,۲۴۹۵
۱۱	4M-47	S_cS_{III}	۱۲۵۰,۱۹۰۵	۳۱	86-n-4	S_{VI}	۱۶۶۰,۲۱۴۱
۱۲	86-4mm-15	$S_{22}S_{24}$	۱۳۹۰,۱۶۶۰	۳۲	18-3	S_{VI} S_c	۱۹۰۵
۱۳	ولیان ۱	S_{IX}	۱۰۲۰,۱۶۶۰	۳۳	86-b3-4	S_i	۱۱۷۰
۱۴	ولیان ۲	S_c	۱۰۲۰,۲۰۵۳	۳۴	درگزی	S_kS_{24}	-
۱۵	ولیان ۳a	S_eS_I	۱۰۲۰ ,۱۶۶۰	۳۵	سانتاروزا	S_eS_b	۱۹۰۵,۲۲۸۰
۱۶	ولیان ۳b	S_{IX}	۸۷۵,۹۴۰	۳۶	شابرون	S_eS_b	۱۹۰۵,۲۲۸۰
۱۷	ولیان ۴	S_e	۲۱۴۱	۳۷	مجار	$S_{19}S_{24}$	۱۳۹۰,۱۵۲۰
۱۸	ولیان ۵	S_k	۱۰۲۰,۹۴۰	۳۸	شایرو	S_hS_i	۱۰۷۰,۱۲۵۰
۱۹	ولیان ۶	S_c	۱۹۰۵	۳۹	قطره طلا	$S_{II}S_i$	۱۲۵۰,۱۸۰۰
۲۰	برجی نیشابور ۱	-	-	۴۰	میروبالان	S_kS_{24}	-



شکل ۲- مقایسه فراوانی نسبی آلل‌های S در ژنوتیپ‌های مورد بررسی آلو با استفاده از جفت آغازگر EM PC2consFD/EM PC3consRD



شکل۳- تکثیر آلل‌های خوداناسازگاری با استفاده از جفت آغازگر PaConsI-F/ EM PC5consRD در آلو با روش PCR. نمونه‌ها از چپ به راست: جواهره۱، 86-n-4، ولیان ۵، اسجیل (چناران)، 86-4mm-15، مجار، آلوی وحشی، 4M-47، n-1، کلات نادر ٤، 4M-44، برجی نیشابور ۱، ولیان 3a، ولیان ۲، 4M-69، جواهر ده ۳، قطره طلا، آلوی شیرین هسته جدا (چناران)، 4M-12، شایرو، بی نام ۱، آلوچه کلات نادر ۲، ولیان 3b، ۳-۵۱-۸٦، شابرون، بی‌نام ۲، جواهر ده ۲، 4M-91، ولیان ٦، سانتاروزا، برجی نیشابور ۲، ولیان٤، 86-b3-4، 18-3، 4M-25، 4M-63، ولیان ۱، جواهر ده ٤، میروبالان، درگزی

Archive of SID

www.SID.ir

در ژنوتیپ‌های مورد بررسی، ۲۵ ژنوتیپ دو باند نشان دادند و ژنوتیپ‌های اسجیل (چناران)، n-1، ولیان ۳، جواهر ده ۳، 4M-12، بی‌نام یک، بی‌نام ۲، ولیان ٦، ولیان٤، 4-b3-86 و 3-18 یک باند نشان دادند. این در حالی بود که ژنوتیپ‌های اسجیل (چناران)، ولیان ٦، 4-b3-86، 4M-12، ولیان ۳ و ولیان٤ در هر دو جفت آغازگر یک باند نشان دادند و ژنوتیپ برجی نیشابور یک در هر دو جفت آغازگر هیچگونه باندی تولید نکرد (جدول ۵ و شکل ٤). اندازه باندهای بزرگ‌تر بدست آمده با استفاده از جفت آغازگر PaConsI-F/ EM PC5consRD نسبت به باندهای حاصل از جفت آغازگر EM PC2consFD/ EM PC3consRD به این دلیل بود که این جفت آغازگر ناحیه وسیع‌تری از ژن S-RNase را تکثیر کرده است که شامل اینترون اول و دوم می‌باشد. مطالعاتی که تاکنون برای شناسایی آلل‌های S آلو صورت گرفته است بیشتر مربوط به اینترون دوم می‌باشد چون اینترون دوم در ناحیه با تنوع بالا قرار دارد و اکثر آغازگرهای طراحی شده در این ناحیه قرار دارند به عبارتی تنوع آلل‌های S بیشتر مربوط به تنوع اندازه اینترون دوم است و توالی‌یابی آلل‌های S بر اساس این ناحیه بوده است و فقط برای چند آلل S بر اساس اینترون اول صورت گرفته است. به‌همین دلیل اطلاعات ثبت شده برای جفت آغازگر مربوط به جفت اینترون در NCBI مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج بدست آمده از تکثیر آلل‌های S آلو بوسیله جفت آغازگر مربوط به اینترون دوم هسته‌دارها، ۲۳ باند با اندازه‌های ۱۸۳۰-۳۲۰ مشاهده شد که ١٤ آلل آن قبلاً شناسایی شده بود و ۹ باند با طول‌های متفاوت بدست آمد. ژنوتیپ S نمونه‌های مورد بررسی تنوع بالایی نشان داد. بعضی از ژنوتیپ‌ها فقط یک باند نشان دادند که برای تکثیر هر دو باند می‌توان از جفت آغازگرهای تخصصی بهره گرفت. تعداد ١٤ باند با اندازه‌های ۲٤۹۵-۸۷۵ با استفاده از جفت آغازگر مربوط به هر دو اینترون مشاهده گردید. به‌دلیل عدم وجود توالی‌های مربوط به اینترون اول در NCBI، نوع آلل تکثیر شده با این روش مشخص نگردید.

منابع

Imani A (1383) Flowering biology of temperate fruit (seed bookmarks, bookmarks kernel, dried fruits and fruit fine grain) (translations), published by the Senate.

Ebadi AS, Kamali K, M Moghaddam Fattahi, M Naqvi, as faith, and horizontal H (1390) Genotyping of self almonds from a breeding program and recognition of the S allele and genotype in some varieties of almonds with external of PCR. Journal of plant breeding and seed, f 1-27, Number 1: 67-57.

Beppu K, Komatsu N, Yamane H, Yaegaki H, Yamaguchi M, Tao R and Kataoka I (2005) Se-haplotype confers self-compatibility in Japanese plum (Prunus salicina Lindl) . Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 80: 760-764.

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.

Beppu K, Yamane H, Yaegaki H, Yamaguchi M, Kataoka I and Tao R (2002) Diversity of S-RNase genes and S-haplotypes in Japanese plum (Prunus salicina Lindl.). Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 77: 658−664.

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.

Guerrra 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

Halasz J (2007) DNA-based S-genotyping of Japanese Plum and Pluot cultivars to clarify incompatibility relationship. HortScience, 42: 46–50.

Halasz J, Fodor A, Hegedus A, 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 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.

Ishimizu T, Inoue K, Shimonaka M, Satio T, Terai A, Noriok S (1999) PCR-based method for identifying the S-genotypes of Japanese pear cultivars. Theoretical and Applied Genetics, 98: 961-967.

Kao T Tsukamoto T (2004) The molecular and genetic bases of S-RNase-based self-incompatibility. The Plant Cell, 16: S72-S83.

Kitahara K, Matsumoto S, Yamamoto T, Soejima J, Kimura T, Komatsu H Abe K (2005) Molecular characterization of apple cultivars in Japan by S-RNase

Archive of SID
www.SID.ir

analysis and SSR markers. Journal of the American Society for Horticultural Science, 130: 885–892.
Lopez M, Vargas FJ and Batlle I (2006) Self-incompatibility in almond genotypes: A review. Euphytica, 150: 1-16.
Murfett J, Cornish EC, Ebert PR, Bonig I, Mcclure BA and Clarke AE (1992) Expression of a Self-Incompatibility Glycoprotein (S2-Ribonuclease) from Nicotiana alata in Transgenic Nicotiana tabacum. The Plant Cell, 9: 1063-1074.
16. Murray HG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight DNA. Nucleic Acids Research, 8: 4321-4325.
Ortega E, Sutherland BG, Dicenta F, Boskovic R, Tobutt KR (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.
Sanchez R, Dicenta F Martinez-Gomez P (2004) Identification of S-alleles in almond using multiple PCR. Euphytica, 138: 263-269.
Sanzol J, Herrero M (2002) Identification of self-incompatibility alleles in pear cultivars (Pyrus communis L.). Euphytica, 128: 325–331.
Sapir G, Raphael AS, Shafir SH 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.
Sonneveld T, Tobutt KR Robbins TP (2003) Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (S) alleles S1 to S16 using consensus and allele-specific primers. Theoretical and Applied Genetics, 107: 1059–1070
Stern RA, Sapir G, Shafir S, Dag A Goldway M (2007) The appropriate management of honey bee colonies for pollination of Rosaceae fruit trees in warm climates. Middle Eastern Russian Journal of Crop Science and Biotechnology, 1: 13−19.
Sutherland BG, Robbins TP Tobutt KR (2004) Primers amplifying a range of Prunus S-alleles. Plant Breeding, 123: 582–584.
Szabo Z (2003) Plum (*Prunus domestica* L.). In: Kozma, P, Nyeki J, Soltesz M, Szabo Z (Eds): Floral Biology, Pollination and Fertilisation in Temperate Zone Fruit Species and Grape. pp. 515–522. Akademiai Kiado, Budapest.
Szabo Z, Nyeki J, Andrasfalvy A, Soltesz M (1999) Association of European plum varieties in the orchards. International Journal of Horticultural Science, 5: 21–24.
Tao R, Watari A Hanada T (2007) Self-compatible peach (*Prunus persica*) has mutant versions of the S haplotypes found in self-incompatible Prunus species. Plant Molecular Biology, 63: 109–123.
Tobutt KR, Bodkovic R, Cerovic R, Sonneveld T, Ruzic D (2004) Identification of incompatibility alleles in the tetraploid species sour cherry. Theoretical and Applied Genetics, 108: 775−785.
Ushijima K, Sassa H, Tao R, Yamane H, Dandekar AM, Gradziel TM, 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.
Vilanova S, Badenes ML, Burgos L, Martınez-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 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.
Watari A, Hanada T, Yamane H, Esumi T, Tao R, Yaegaki H, Yamaguchi M, Beppu K and Kataoka I (2007) A low transcriptional level of Se-RNase in the Se-haplotype confers self-incompatibility in Japanese plum. Journal of the American Society for Horticultural Science, 132: 396-406.
Yamane H, Tao R 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 SJ, Huang SX, Heng W, Wu HQ Zhang S L (2008) Identification of S-genotypes in 17 Chinese cultivars of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) and molecular characterisation of 13 novel S-alleles. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 83: 635–640.

Archive of SID

www.SID.ir