شناسایی آلل‌های خودناسازگاری در برخی از ارقام سیب ایرانی (*Malus domestica*) با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

مجتبی نصرآبادی[۱*]، اسماعیل سیفی[۲]، سیده ساناز رمضان پور[۳] و مهدی شریفانی[۴]

۱*- **نویسنده مسوول:** دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم باغبانی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
(mojtabanasrabady@ymail.com)

۲و۴- به ترتیب استادیار و دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۳- دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۰/۳

چکیده

درختان سیب، مانند تعدادی دیگر از میوه‌های تیره‌ی گل‌سرخیان، خودناسازگار هستند. سیستم ودناسازگاری در سیب از نوع گامتوفتیک است و به وسیله‌ی یک مکان ژنی با چند آلل کنترل می‌شود. در این مطالعه، خودناسازگاری در ۲۲ رقم سیب به روش تکثیر آلل‌ها به وسیله‌ی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و با استفاده از ۱۸ آغازگر ویژه مطالعه شد. در ١٤ رقم، شامل ملکه‌ی لبنان ($S_{23}S_{24}$)، گلاب اصفهان (S_1S_{24})، گلاب نوری مراغه (S_4S_{23})، اطلسی (S_1S_{20})، وسط‌رس قرمز (S_4S_{18})، عباسی دراز خرو (S_1S_7)، شعلی اخلمد (S_1S_{23})، عباسی گرد خرو ($S_{23}S_{26}$)، قاسم‌شاهی (S_1S_{23})، گل‌مکانی (S_3S_{23})، کدو سیب اخلمد (S_1S_{26})، اوگنجی خرو (S_1S_{26})، خوشه-ای خرو (S_1S_{23}) و علیمره‌ای اول‌رس (S_1S_{23})، هر دو آلل شناسایی شدند، ولی در ۸ رقم دیگر، شامل واین‌سپ (S_{19}-)، پرایم‌گلد (S_{23}-)، بل‌درانوار (S_4-)، محلی شیخی زودرس (S_1-)، خوجه تربت (S_1-)، روئین اسفراین (S_1-)، محلی خرو (S_1-) و اوقان شیروان (S_1-)، فقط یک آلل شناسایی شد. برای شناسایی آلل S_1 در ارقام ایرانی از سه آغازگر مختلف استفاده گردید. در برخی از ارقام هیچ باندی تشکیل نشد و یا باندهای غیراختصاصی نمایان شدند. آغازگرMdS1SpF در ۷ رقم، آغازگر FTC168 در ۵ رقم و آغازگرFS1 در ۱۱ رقم باند تشکیل دادند. در سه رقم محلی شیخی زودرس، قاسم‌شاهی و علیمره‌ای اول‌رس آلل S_1 توسط هر سه آغازگر تکثیر شد. نتایج بدست آمده بیانگر آن است که ارقام کدو سیب اخلمد و اوگنجی خرو نسبت به هم و همچنین ارقام شعلی اخلمد، قاسم‌شاهی، خوشه‌ای خرو و علیمره‌ای اول‌رس نسبت به یکدیگر ناسازگار هستند

کلید واژه ها: ناسازگاری گرده، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، مکان ژنی، آغازگر

مقدمه

سیب با نام علمی *Malus × domestica* Mill. از تیره‌ی گل‌سرخیان یکی از مهم‌ترین محصولات میوه‌ای ایران است. سطح زیر کشت سیب در سال ۱۳۹۰ در ایران حدود ۲۰۵ هزار هکتار بوده است. از این سطح، حدود ۳ میلیون تن محصول برداشت شده که در بین محصولات میوه‌ای بعد از انگور مقام دوم را به خود اختصاص داده است (دفتر آمار و فناوری اطلاعات، ۱۳۹۱).

خودناسازگاری یک فرآیند ژنتیکی است که از خودباروری گیاهان جلوگیری می‌کند. ناسازگاری در تیره‌ی گل‌سرخیان هومومورفیک و از نوع گامتوفیتیک است و به وسیله‌ی یک مکان ژنی با چندآلل کنترل می‌شود (کوشش صبا و همکاران، ۱۳۸۷). در این سیستم، فنوتیپ خودناسازگاری دانه‌ی گرده (گامتوفیت) به وسیله‌ی ژنوتیپ هاپلوئید گرده تعیین می‌شود. در اکثر گیاهان که دچار این سیستم هستند، دانه‌های گرده‌ی

ناسازگار به صورت موفقیت‌آمیز روی کلاله جوانه می‌زنند و به درون خامه نفوذ می‌کنند، اما لوله‌های گرده در درون خامه از رشد باز می‌ایستند (دی گراف و همکاران[1]، ۲۰۰۶).

گسترده‌ترین مکانیسم سیستم گامتوفیتیک مکانیسم S-RNase می باشد. در این مکانیسم، پروتئین مسئول اصلی در مادگی S-RNase و پروتئین مسئول در گرده S-Locus F-box یا SFB می‌باشند (مک‌کلور و فرانکلین-تانگ[2]، ۲۰۰۶). هر یک از این دو پروتئین یک محل اتصال اختصاصی و یک محل اتصال غیراختصاصی دارد. در یک واکنش ناسازگار، محل‌های اختصاصی دو پروتئین به یکدیگر متصل شده و با تجزیه‌ی RNA در لوله‌ی گرده به تخریب آن می‌پردازند. در واکنش سازگار، محل غیراختصاصی SFB به محل غیراختصاصی S-RNase متصل می‌شود و از فعالیت تخریبی آن جلوگیری می‌کند (دی گراف و همکاران، ۲۰۰۶).

اکثر ارقام سیب خودناسازگار هستند (هگدوس[3]، ۲۰۰۶)، در نتیجه برای تولید تجاری به گرده‌زا نیازمند می‌باشند. در برخی از ارقام، خودناسازگاری همچنین باعث تشکیل میوه‌های بکربار با کیفیت پایین می‌شود. ارقام مختلف ممکن است آلل‌های خودناسازگاری مشابه داشته باشند که باعث دگرناسازگاری بین آن‌ها می‌شود. با توجه به این نکته، تعیین آلل‌های خودناسازگاری در همه‌ی ارقام ضروری به نظر می‌رسد (جانسنز و همکاران، ۱۹۹۵).

تعیین خود و دگرناسازگاری می‌تواند به صورت سنتی از طریق گرده‌افشانی دستی و به دنبال آن ارزیابی راندمان تشکیل میوه یا بررسی رشد لوله‌ی گرده صورت گیرد. عیب این روش‌ها این است که شدیدا تحت تاثیر عوامل محیطی و شرایط فیزیولوژیکی گیاه قرار می‌گیرند (جانسنز و همکاران[4]، ۱۹۹۵). روش دوم بررسی ریبونوکلئازهای خامه‌ی گل است (ساسا و همکاران[5]، ۱۹۹۴؛ میرمحمدی میبدی، ۱۳۸۲). این روش فقط در درختانی که به گل رفته‌اند امکان‌پذیر است. بروتهارتز و همکاران[6] (۱۹۹۵) و جانسنز و همکاران (۱۹۹۵) یک روش مولکولی برای تعیین آلل‌های خودناسازگاری S_2، S_3، S_5، S_7 و S_9 در سیب و بر اساس تکثیر اختصاصی آلل‌ها به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ابداع کردند.

در چند سال اخیر، توالی cDNA آلل‌های S_{24}، S_{26} و S_{27} (وردووت و همکاران[7]، ۱۹۹۸)؛ S_e و نشانگر عمومی FTQQYQ (ماتسوموتو و کیتاهارا[8]، ۲۰۰۰)؛ S_{20}، S_{22} و S_{24} (وان نروم و همکاران[9]، ۲۰۰۱)؛ S_{27a} و S_{27b} (بروتهارتز[10]، ۲۰۰۳)؛ S_{31} و S_{32} (هوی و همکاران[11]، ۲۰۰۸)، S_{34} الی S_{42} (ژانگ[12]، ۲۰۱۳) و S_{44}، S_{45} و S_{46} (لانگ و همکاران[13]، ۲۰۱۰) مشخص و بر این اساس آغازگرهایی برای تکثیر اختصاصی این آلل‌ها به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز طراحی شده‌اند. البته، ماتسوموتو و همکاران (۱۹۹۹) و کیتاهارا و همکاران[14] (۲۰۰۰) نشان دادند که تکثیر آلل‌ها با این روش همیشه اختصاصی نبوده و در بعضی از موارد آلل‌هایی غیر از آلل‌های هدف تکثیر می‌شوند. همچنین، نام‌گذاری متفاوت آلل‌های خودناسازگاری در سیب (نام‌گذاری حرفی توسط محققین ژاپنی و نام‌گذاری عددی توسط سایر محققان) باعث شد که گاهی اوقات یک آلل توسط محققین مختلف با نام‌های متفاوت شناخته شود. استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز یکی از روش‌های جدید

1- de Graff *et al.*
2- Mc Clure
3- Hegedus

4- Janssens *et al.*
5- Sassa *et al.*
6- Broothaert *et al.*s
7- Verdoodt *et al.*
8- Matsumoto & Kitahara
9- Van Nerum *et al.*
10- Broothaerts
11- Hoy *et al.*
12- Zhang
13- Long *et al.*
14- Kitahara *et al.*

تعیین آلل‌های خودناسازگاری است. در این روش، بدون نیاز به گل و گرده‌افشانی و همچنین در مراحل نونهالی می‌توان سازگار و ناسازگار بودن ارقام را مشخص کرد. با توجه به اینکه ارقام خودناسازگار برای تولید مطلوب به دگرگرده افشانی نیاز دارند، عدم اطلاع از این موضوع و احداث باغ‌های تک‌رقمی باعث میوه‌دهی ضعیف می‌شود. هدف از این پژوهش تعیین آلل‌های خودناسازگاری در ۲۲ رقم سیب بومی و غیر بومی ایران با استفاده از ۱۸ آغازگر اختصاصی بود.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده تولید گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و بر روی ۲۲ رقم سیب شامل ۱۸ رقم سیب بومی ایران و ۴ رقم سیب خارجی صورت گرفت. نمونه‌های برگ در مرداد و شهریور از مجموعه‌ی سیب مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی (طرق) جمع‌آوری و در ازت مایع به آزمایشگاه منتقل و سپس تا شروع آزمایش در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج DNA به روش دویل و دویل[1] (۱۹۹۰) صورت گرفت، با این تغییر که در مرحله‌ی رسوب‌گذاری DNA مقدار ایزوپروپانول افزایش یافت. کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بررسی شد و با هر دو روش مناسب ارزیابی گردید.

برای تعیین آلل‌های خودناسازگاری، از ۱۸ آغازگر اختصاصی استفاده شد (جدول ۱). به دلیل اهمیت و فراوانی آلل S_1 در ارقام سیب، برای تعیین آن از سه آغازگر مختلف استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد که حاوی ۹/۲ میکرولیتر آب مقطر، ۲ میکرولیتر بافر (×۱۰)، ۱/۲ میکرولیتر $MgCl_2$ (با غلظت ۴ میلی‌مولار)، ۰/۴ میکرولیتر dNTP (با غلظت ۱۰ میلی‌مولار)، ۰/۵ میکرولیتر از هر جفت آغازگر (با غلظت ۲۰۰ نانومولار)، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمراز (۵ واحد در لیتر) و ۶ میکرولیتر DNA با غلظت ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر بود.

برنامه‌ی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز عبارت بود از: واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، شروع چرخه (۴۰ چرخه)، واسرشته سازی در دمای ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال به آغازگر در دمای مخصوص آغازگر به مدت ۱ دقیقه، گسترش توسط آنزیم در دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، گسترش در پایان هر چرخه در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، بسته شدن چرخه، گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه.

برای تهیه ژل، از آگارز ۱٪ و بافر TAE استفاده شد. رنگ‌آمیزی ژل آگارز به منظور قابل روئیت شدن DNA ژنومی، قطعات DNA و محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تحت اشعه ماوراء بنفش صورت گرفت. بدین منظور، اتیدیوم بروماید به آگارز ذوب شده اضافه گردید. به منظور عکس برداری از ژل آگارز از دستگاه ژل داکیومنت و تحت اشعه ماوراء بنفش استفاده شد. شکل ۱ تکثیر آلل S_1 را با استفاده از آغازگر FS1 در ارقام سیب مورد آزمایش نشان می‌دهد.

نتایج و بحث

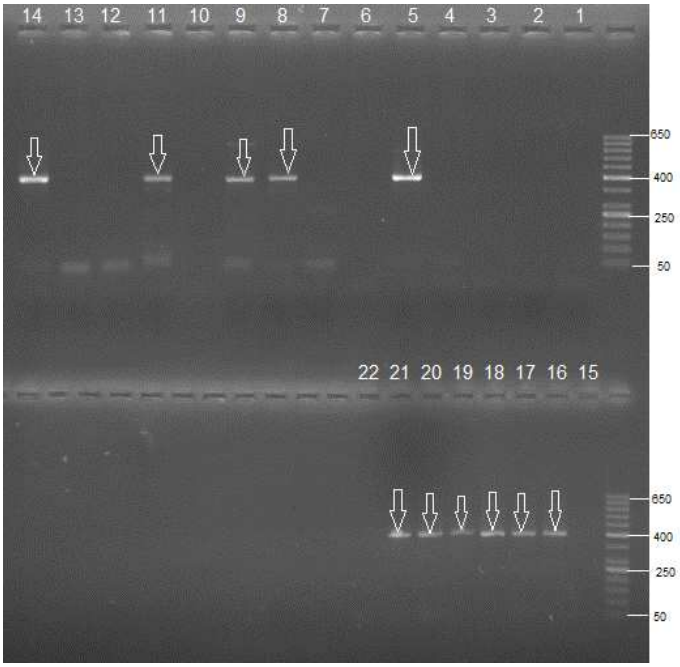
در این آزمایش، از ۱۸ جفت آغازگر برای شناسایی آلل‌های خودناسازگاری در ۱۸ رقم سیب ایرانی و چهار رقم سیب خارجی استفاده شد. برخی از آغازگرها، از جمله S_2، S_5، S_9، S_{10}، S_{11} و S_{21}، در هیچ رقمی باند تشکیل ندادند و یا باندهای غیر اختصاصی تکثیر کردند. به عبارت دیگر، این آلل‌ها در ارقام مورد مطالعه وجود ندارند. در ۱۴ رقم مورد بررسی هر دو آلل و در ۸ رقم فقط یک آلل مشخص شد (جدول ۲). در حال حاضر، بیش از ۳۰ آلل خودناسازگاری در سیب با استفاده از بررسی ایزوآنزیم ریبونوکلئاز شناسایی شده است. از

1- Doyle & Doyle

آنجایی که توالی cDNA مربوط به کلیه‌ی این آلل‌ها شناسایی نشده و آغازگرهای اختصاصی برای آن‌ها طراحی نگردیده‌اند، امکان تعیین ژنوتیپ خودناسازگاری در همه ارقام با استفاده از تکثیر اختصاصی آلل‌ها به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز وجود ندارد (ارشادی، ۱۳۸۲).

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده برای تعیین آلل‌های خودناسازگاری

آلل خودناسازگاری	نام آغازگر	توالی "۳-۵"	اندازه‌ی باند (bp)	دمای اتصال (درجه‌ی سانتی‌گراد)
S_1	MdS1SpF	TGTAAGGCACCGCCATATCATAC	۷۳۴	۶۲
	MdS1SpR	CAACCTCAACCAATTCAGTCAATGA		
S_1	FTC168	ATATTGTAAGGCACCGCCATATCAT	۵۳۰	۶۱
	FTC169	GGTTCTGTATTGGGGAAGACGCACAA		
S_1	FS1	CAATCGAAACGATCATGAAG	۳۹۳	۶۲
	FA1	TCCGTGTATAGGCCATCGAC		
S_2	MdS2SpF	AACATGAATCGAAGTGAATTATTTA	۴۸۹	۵۵
	MdS2SpR	TTGAGGTTTGGTTCCTTACCATG		
S_3	MdS3SpF	GGCGAAAATTAAACCGGAGAAGAA	۲۹۲	۵۸
	MdS3SpR	CCTCTCGTCCTATATATGGAAATCAC		
S_4	MdS4SpF	ATTGCAAGACAAGGAATCGTCGGAA	۴۳۳	۶۳
	MdS4SpR	AGAAATGTGCTCTGTTTTTATCG		
S_5	MdS5SpF	GGTCAAACCCACGGCGTCTCA	۱۴۴۷	۶۳
	MdS5SpR	ATTCAGTTATCCCATTCTTCG		
S_7	MdS7SpF	AGTAAATCAACCGTGGATGCTCAG	۳۹۷	۶۳
	MdS7SpR	TTACAATATCTACCTGTTTCCTGGG		
S_9	MdS9SpF	CCACTTTAATCCTACTCCTTGTAGA	۵۲۲	۶۳
	MdS9SpR	TCAATTTCCTTCTGTGTCCTGAATT		
S_{10}	FTC12a	CCAAACGTACTCAATCGAAG	۲۰۳	۶۶
	MdS10SpR	TCCCGTGTCCTGAATCTCCC		
S_{11}	MdS11SpF	AAATATTGCAAGGCGCCGC	۶۷۸	۶۳
	MdS11SpR	TTTCAATATCTACCAGTCTCCGGC		
S_{18}	DS2	ATCGAACTGATCATGTAGGC	۳۵۵	۶۲
	DA1	TATCGTGAACCTTGTGGTGG		
S_{19}	MdS19SpF	GCCTTCAAACAAGAATGGACC	۴۸۱	۶۳
	MdS19SpR	TCAATATCCACCAATGACCTGTT		
S_{20}	MdS20SpF	GTTGTGGCCTTCAGACTCG	۸۸۲	۶۴
	MdS20SpR	GGCCAACTACTTTTATTTTTCATC		
S_{21}	MdS21SpF	AAGTAATTGCCCGATAAGGAACATA	۵۸۴	۶۳
	MdS21SpR	AGTTTATGAAATGTTCTCCGCTGTA		
S_{23}	MdS23SpF	AAGAATACAACCATTACGCCTCAGC	۴۵۰	۶۳
	MdS23SpR	ATTGTTGGTACTAATGCTTATGGCG		
S_{24}	MdS24SpF	ATGGCTCCTGTGCGTCTTCCC	۴۲۱	۶۱
	MdS24SpR	CGTCATCCGTGTATAGGGCAACT		
S_{26}	MdS26SpF	TCCATCAAACGTGACTTCTCAT	۴۲۳	۵۵
	MdS26SpR	ATCCTTCAGCATCCTGATTCG		



شکل ۱- تکثیر آلل S_1 در ارقام سیب با استفاده از آغازگر FS1: ۱- واین‌سپ، ۲- پرایم‌گلد، ۳- ملکه‌ی لبنان، ٤- بل‌درانوار، ٥- محلی شیخی زودرس، ٦- گلاب اصفهان، ۷- گلاب نوری مراغه، ۸- خوجه تربت، ۹- اطلسی، ۱۰- وسطرس قرمز، ۱۱- عباسی دراز خرو، ۱۲- شعلی اخلمد، ۱۳- عباسی گرد خرو، ١٤- قاسم‌شاهی، ١٥- گل‌مکانی، ١٦- کدو سیب اخلمد، ۱۷- اوگنجی خرو، ۱۸- خوشه‌ای خرو، ۱۹- روئین اسفراین، ۲۰- محلی خرو، ۲۱- علیمره‌ای اول‌رس، ۲۲- اوقان شیروان. ارقامی که با حروف پر رنگ چاپ شده‌اند دارای آلل S_1 (با اندازه‌ی bp ۳۹۳) می‌باشند.

جدول ۲- ژنوتیپ خودناسازگاری در ارقام سیب مورد مطالعه

ردیف	رقم	ژنوتیپ خودناسازگاری	ردیف	رقم	ژنوتیپ خودناسازگاری
۱	واین‌سپ	S_{19-}	۱۲	شعلی اخلمد	S_1S_{23}
۲	پرایم‌گلد	S_{23-}	۱۳	عباسی گرد خرو	$S_{23}S_{26}$
۳	ملکه‌ی لبنان	$S_{23}S_{24}$	۱۴	قاسم‌شاهی	S_1S_{23}
٤	بل‌درانوار	S_{4-}	۱۵	گل‌مکانی	S_3S_{23}
٥	محلی شیخی زودرس	S_{1-}	۱۶	کدوسیب اخلمد	S_1S_{26}
٦	گلاب اصفهان	S_1S_{24}	۱۷	اوگنجی خرو	S_1S_{26}
۷	گلاب نوری مراغه	S_4S_{23}	۱۸	خوشه‌ای خرو	S_1S_{23}
۸	خوجه تربت	S_{1-}	۱۹	روئین اسفراین	S_{1-}
۹	اطلسی	S_1S_{20}	۲۰	محلی خرو	S_{1-}
۱۰	وسطرس قرمز	S_4S_{18}	۲۱	علیمره‌ای اول‌رس	S_1S_{23}
۱۱	عباسی دراز خرو	S_1S_7	۲۲	اوقان شیروان	S_{1-}

-: آلل ناشناخته

در ارقام واین‌سپ، پرایم‌گلد، بل‌درانوار، محلی شیخی زودرس، خوجه تربت، روئین اسفراین، محلی خرو و اوقان شیروان فقط یک آلل شناسایی شد و آلل دوم قابل شناسایی نبود. این مسئله می‌تواند به دلایل مختلف باشد: وجود آلل‌هایی به غیر از آلل‌های تکثیر شده، عدم استفاده از آغازگرهای مناسب و وجود آلل‌های جدیدی که هنوز برای آن‌ها آغازگر اختصاصی طراحی نشده است. پیش از این، ارشادی (۱۳۸۲) در رقم گلاب اصفهان هیچ آللی گزارش نکرد، در حالی که در آزمایش حاضر هر دو آلل این رقم (S_1S_{24}) مشخص شد. علت این مسئله عدم استفاده وی از آغازگری بود که بتواند آلل S_{24} را مشخص کند، هر چند که از طریق بررسی ایزوآنزیم ریبونوکلئاز آلل‌های S_{3a} و S_{9a} در رقم گلاب اصفهان مشخص گردید. ارشادی (۱۳۸۲) عنوان کرد که در پاره‌ای از موارد بین ژنوتیپ‌های خودناسازگاری بدست آمده از این دو روش (بررسی ایزوآنزیم ریبونوکلئاز و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز) تفاوت وجود دارد و در روش اول تنوع آللی بیشتر است.

آلل‌های شناسایی شده در ارقام کدو سیب اخلمد (S_1S_{26}) و اوگنجی خرو (S_1S_{26}) و همچنین در ارقام شعلی اخلمد (S_1S_{23})، قاسم‌شاهی (S_1S_{23})، خوشه‌ای خرو (S_1S_{23}) و علیمره‌ای اول‌رس (S_1S_{23}) کاملا شبیه به یکدیگر بوده و در نتیجه این ارقام نسبت به یکدیگر ناسازگار هستند و به عبارت دیگر در یک گروه ناسازگاری قرار می‌گیرند.

نتایج این آزمایش نشان داد که رقم گل‌مکانی دارای آلل‌های S_3 و S_{23} است. این آلل‌ها در ارقام کاردینال، اسمیت سیدر و درومبو (لانگ و همکاران،۲۰۱۰)، گرانی‌اسمیت (بورتهارتز، ۲۰۰۳ ، هگدوس، ۲۰۰۶، هوی و همکاران، ۲۰۰۸ و دریسن و همکاران[1]، ۲۰۱۰) و نیکوگرین (دریسن و همکاران، ۲۰۱۰) گزارش شده‌اند و در نتیجه این ارقام با یکدیگر ناسازگاری گرده دارند. رقم اطلسی دارای آلل‌های خودناسازگاری S_1 و S_{20} بود. این آلل‌ها در ارقام جئوکینگ، لیافئو و موئرو (لانگ و همکاران، ۲۰۱۰) و آمریکن سامر پیارماین (هگدوس، ۲۰۰۶) گزارش شده‌اند و در نتیجه این ارقام با یکدیگر یک گروه ناسازگاری را تشکیل می‌دهند. رقم عباسی دراز خرو دارای ژنوتیپ خودناسازگاری S_1 و S_7 است. این آلل‌ها در ارقام جئولینگ و میزه (لانگ و همکاران، ۲۰۱۰) گولد رومن (ماتسوموتو[2]، ۲۰۱۴) و شینانوسویت (سکیدو و همکاران[3]، ۲۰۱۰) گزارش شده‌اند و در نتیجه این ارقام با یکدیگر ناسازگارند. هگدوس (۲۰۰۶) گروه‌هی ناسازگاری گرده را در مقاله‌ی مروری خود به صورت تقریبا کامل بیان کرده است.

در این آزمایش، آلل S_{23} در رقم پرایم‌گلد شناسایی شد که با نتایج قبلی ($S_{19}S_{26}$) (لانگ و همکاران، ۲۰۱۰) اختلاف دارد. در رقم واین‌سپ نیز آلل S_{19} مشخص شد، که با نتایج قبلی (S_1S_{28}) (هوی و همکاران، ۲۰۰۸) مطابقت ندارد. این در حالی است که در هر دو آزمایش از آغازگرهای مشابه استفاده شد. وجود این گونه تفاوت‌ها می‌تواند به دلایل زیر باشد: خطاهای موجود در آزمایش (هر چند آزمایش برای رقم پرایم‌گلد چند بار تکرار شد)، وجود جهش در این رقم و اشتباه هنگام اتیکت گذاری آن.

نظر به اهمیت و فراوانی آلل S_1، برای شناسایی آن از سه آغازگر مختلف استفاده گردید (جدول ۳). در برخی از این ارقام هیچ باندی تشکیل نشد و یا باندهای غیراختصاصی تکثیر شدند. آغازگرMdS1SpF در ۷ رقم (محلی شیخی زودرس، قاسم‌شاهی، اوگنجی خرو، خوشه‌ای خرو، روئین اسفراین، علیمره‌ای اول‌رس و اوقان شیروان)، آغازگر FTC168 در ۵ رقم (محلی شیخی زودرس، گلاب اصفهان، شعلی اخلمد، قاسم‌شاهی و علیمره‌ای اول‌رس) و آغازگر FS1 در ۱۱ رقم (محلی شیخی زودرس، خوجه تربت، اطلسی،

1- Dreesen *et al.*

2- Matsumoto

3- Sekido *et al.*

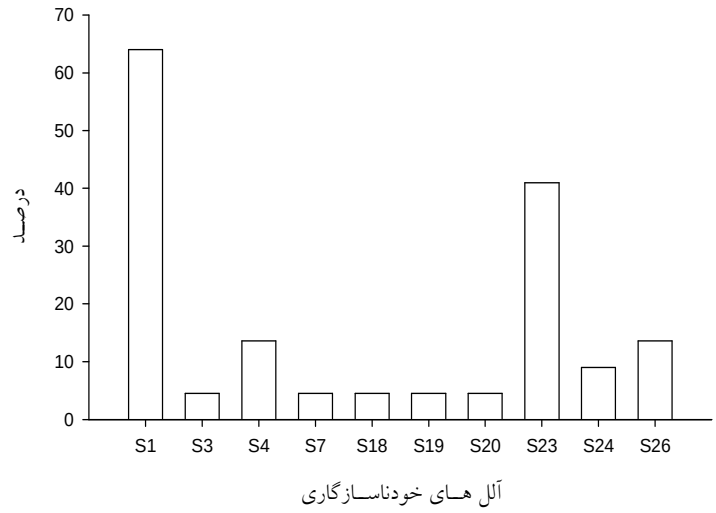
عباسی دراز خرو قاسم‌شاهی، کدو سیب اخلمد، اوگنجی خرو، خوشه‌ای خرو، روئین اسفراین، محلی خرو و علیمره‌ای اول‌رس) (شکل۱) باند تشکیل دادند. در سه رقم، هر سه آغازگر باند تشکیل دادند. آغازگرهای FS1 و MdS1SpF در نه رقم و آغازگرهای FS1 و FTC168 در سه رقم به صورت مشترک باند تشکیل دادند.

اندازه‌ی باندهای تولیدی برای هر یک از آغازگرها (۷۳۴ bp در MdS1SpF، ۵۳۰bp در FTC168 و ۳۹۳ bp در FS1) کاملا متفاوت بودند. آلل S_1 توسط ساسا و همکاران (۱۹۹۴) از رقم فوجی کلون شده در ابتدا S_f نامگذاری شده بود. این آلل در سطوح نوکلئوتیدی حدود ۹۲٪ با آلل‌های S_{20} و S_{24} تطابق دارد (بورتهارتز، ۲۰۰۳). با این وجود، بورتهارتز (۲۰۰۳) دو آغازگر طراحی نمود (FTC168 و FTC169) که آلل S_1 را با دقت زیاد مشخص می‌کنند. کاربرد این آغازگر برای تعیین آلل S_1 از تطابق ناحیه‌ای با آلل‌های S_{24} و S_{20} جلوگیری می‌کند. در نتیجه، ارقامی مانند محلی شیخی زودرس، گلاب اصفهان، شعلی اخلمد، قاسم‌شاهی و علیمره‌ای اول‌رس که آلل S_1 در آن‌ها توسط این آغازگر مشخص شده است به طور حتم دارای این آلل می‌باشند. ارشادی (۱۳۸۲) هیچ گونه آللی را در رقم گلاب اصفهان مشاهده نکرد، ولی در این آزمایش دو آلل S_1 و S_{24} در این رقم مشخص شدند. علت مشاهده نشدن آلل S_1 توسط ارشادی (۱۳۸۲) ممکن است به دلیل استفاده از آغازگر نه چندان دقیق FC1 باشد. ولی در این پژوهش آغازگر FTC168 وجود آلل S_1 را در این رقم مشخص کرد.

در این مطالعه، میزان فراوانی آلل‌های S_1 در ارقام مورد مطالعه ۶۴٪ بود (شکل ۲). این فراوانی زیاد می‌تواند به دلیل وجود روابط بالای خویشاوندی و ژنتیکی بین ارقام باشد. ارشادی (۱۳۸۲) در بررسی ۳۲ رقم سیب ایرانی فراوانی این آلل را ۴۰/۶٪ گزارش کرد. نتایج همچنین نشان داد که میزان فراوانی آلل S_{23} در بین ارقام مورد مطالعه ۴۱٪ است. ارشادی (۱۳۸۲) آلل‌های S_4 و S_{20} را به ترتیب در ۹ و ۷ رقم مشخص کرد، در حالی که در آزمایش حاضر این آلل‌ها به ترتیب در ۳ و ۱ رقم مشاهده شدند.

جدول ۳- بررسی وجود آلل S_1 در ارقام ایرانی با استفاده از سه آغازگر مختلف (+ وجود باند و – عدم وجود باند را نشان می دهند)

ردیف	رقم	آغازگر			ردیف	رقم	آغازگر		
		MdS1SpF	FTC168	FS1			MdS1SpF	FTC168	FS1
۱	محلی شیخی زودرس	+	+	+	۱۰	قاسم‌شاهی	+	+	+
۲	گلاب اصفهان	–	+	–	۱۱	گل‌مکانی	–	–	–
۳	گلاب نوری مراغه	–	–	–	۱۲	کدو سیب اخلمد	–	–	+
۴	خوجه تربت	–	–	+	۱۳	اوگنجی خرو	+	–	+
۵	اطلسی	–	–	+	۱۴	خوشه‌ای خرو	+	–	+
۶	وسط‌رس قرمز	–	–	–	۱۵	روئین اسفراین	+	–	+
۷	عباسی دراز خرو	–	–	+	۱۶	محلی خرو	–	–	+
۸	شعلی اخلمد	–	+	–	۱۷	علیمره‌ای اول‌رس	+	+	+
۹	عباسی گرد خرو	–	–	–	۱۸	اوقان شیروان	+	–	–



شکل ۲- فراوانی آلل‌های خودناسازگاری شناسایی شده در ارقام مورد مطالعه‌ی سیب

این پژوهش به شناسایی هر دو آلل خودناسازگاری در ۱۴ رقم و یک آلل خودناسازگاری در ۸ رقم انجامید. بعضی از ارقام، از جمله شعلی اخلمد، قاسم‌شاهی، خوشه‌ای خرو و علیمره‌ای اول‌رس، دارای آلل‌های مشابه (S_1S_{23}) بودند و نسبت به یکدیگر ناسازگارند. تکرار آزمایش به وسیله‌ی گرده‌افشانی دستی می‌تواند عملکرد آلل‌های ناسازگاری تعیین شده در این ارقام را در شرایط مزرعه نشان دهد. آلل S_1 در ۶۴٪ از ارقام مورد مطالعه وجود داشت و به وسیله‌ی سه آغازگر مختلف شناسایی گردید. جهت گروه‌بندی ارقام ایرانی از نظر ناسازگاری گرده، استفاده از مجموعه‌ای کامل‌تر از آغازگرها و تعداد بیشتری رقم توصیه می‌گردد.

سپاس گزاری

از مدیریت محترم مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی (طرق) جهت تامین نمونه‌های گیاهی تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

۱. ارشادی، ا. ۱۳۸۲. بررسی گرده‌افشانی و تشکیل میوه و ارزیابی ارقام سیب ایرانی با استفاده از نشانگرهای مولکولی، پایان نامه دکتری، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران. ۲۶۲ ص.

۲. دفتر آمار و فناوری اطلاعات وزارت جهاد کشاورزی. ۱۳۹۱. آمارنامه‌ی کشاورزی سال ۱۳۹۰. دفتر آمار و فناوری اطلاعات وزارت جهاد کشاورزی، تهران، ایران. ۴۲۵ ص.

۳. کوشش صبا، م.، ارزانی، ک. و جلالی جواران، م .۱۳۸۷. مطالعه آلل‌های ناسازگاری برخی ژنوتیپ‌های گلابی آسیایی (*Pyrus serotina* Rehd.) به کمک روش PCR. نهال و بذر. ۲۴: ۴۵۶ .

۴. میر محمدی میبدی، م. ۱۳۸۲. اصلاح نباتات در باغبانی، انتشارات جهاد دانشگاهی اصفهان، اصفهان، ایران. ۲۵۰ ص.

5. Broothaerts, W. 2003. New findings in apple S-genotype analysis resolve previous confusion and request the re-numbering of some S-alleles. Theoretical and Applied Genetics, 106: 703–714.

6. 6- Broothaerts, W., Janssens, G.A., Proost, P., and Broekaert, WF. 1995. cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. Plant Molecular Biology, 27: 499–511.

7. de Graaf, B.H.j., Lee, C., McClure, B.A., and Franklin-Tong, N. 2006. Cellular mechanisms for pollen tube growth inhibition in gametophytic self-incompatibility. In: Malho, R. (ed.). The Pollen Tube: A Cellular and Molecular Perspective. Springer-Verlag, Berlin, pp: 201-221.

8. Doyle, J.J., and Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12: 13-15.

9. Dreesen, R.S., Vanholme, B.T., Luyten, K., Van Wynsberghe, L., Fazio, G., Roldán-Ruiz, I., and Keulemans, J. 2010. Analysis of *Malus* S-RNase gene diversity based on a comparative study of old and modern apple cultivars and European wild apple. Molecular Breeding 26 (4): 693-709.

10. Hegedus, A., 2006. Review of the self-incompatibility in apple (*Malus* × *domestica.*, syn: *Maluspumila* Mill). International Journal of Horticultural Science 12 (2): 31-36.

11. Hoy, TK., Park, J., Yutaka, H., and Illsup, N. 2008. Molecular characterization of new S-RNases (S_{31} and S_{32}) in apple (*Malus* × *domestica* Borkh). Journal of Plant Biology, 51 (3): 202-208.

12. Long, S., Li, M., Han, Z., Wang, K., and Li, T. 2010. Characterization of three new S-alleles and development of an S-allele-specific PCR system for rapidly identifying the S-genotype in apple cultivars. Tree Genetics and Genomes, 6: 161-168.

13. Janssens, G.A., Goderis, IJ., Broekaert, W.F., and Broothaerts, W. 1995. A molecular method for S-allele identification in apple based on allele-specific PCR. Theoretical and Applied Genetics 91: 691–698.

14. Kitahara, K., Soejima, J., Komatsu, H., Fukui, H., and Matsumoto, S. 2000. Complete sequences of the S-genes ‘Sd-’ and ‘Sh-RNase’ cDNA in apple. Hort Science, 35: 712–715.

15. Matsumoto, S. 2014. Apple pollination biology for stable and novel fruit production: search system for apple cultivar combination showing incompatibility, semicompatibility, and full-compatibility based on the S-RNase allele database. International Journal of Agronomy, 2014: 1-9.

16. Matsumoto, S., and Kitahara, K. 2000. Discovery of a new self-incompatibility allele in apple. Hort Science, 35: 1329–1332.

17. Matsumoto, S., Komori, S., Kitahara, K., Imazu, S., and Soejima, J. 1999. S genotypes of 15 apple cultivars and self-compatibility of ‘Megumi’. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 68 (2): 236–241.

18. McClure, B.A. and Franklin-Tong, V. 2006. Gametophytic self-incompatibility: understanding the cellular mechanisms involved in "self" pollen tube inhibition. Planta, 224: 233-245.

19. Sassa, H., Mase, N., Hirano, H., and Ikehashi, H. 1994. Identification of self-incompatibility related glycol-proteins in styles of apple (*Malus*× *domestica*). Theoretical and Applied Genetics, 89: 201–205.

20. Sekido, K., Hayashi, Y., Yamada, K., Shiratake, K., and Matsumoto, S. 2010. Efficient breeding system for red-fleshed apple based on linkage with S3-RNase allele in ‘Pink Pearl’. Hort Science, 45 (4): 534-537.

21. Van Nerum, I., Geerts, M., Van Haute, A., Keulemans, J., and Broothaerts, W. 2001. Re-examination of the self-incompatibility genotype of apple cultivars containing putative ‘new’ S alleles. Theoretical and Applied Genetics, 103: 584–591.

22. Verdoodt, L., Van Haute, A., Goderis, IJ., De Witte, K., Keulemans, J., and Broothaerts, W. 1998. Use of the multi-allelic self-incompatibility gene in apple to assess homozygosity in shoots obtained through haploid induction. Theoretical and Applied Genetics, 96: 294–300.

23. Zhang, X. 2013. Isolation and identification of self-incompatibility allele in 11 apple cultivars. Journal of Plant Genetic Resources, 14 (2): 311-316.