مجله علوم باغبانی ایران
دوره ۴۲، شماره ۲، ۱۳۹۰ (۱۸۳-۱۶۹)

شناسایی آلل‌های خود ناسازگاری در ارقام و ژنوتیپ‌های بادام ایرانی به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

سید اصغر موسوی قهفرخی[۱]، محمدرضا فتاحی مقدم[۲]*، ذبیح اله زمانی[۳]، علی ایمانی[۴]، اینکارنا اورتگا[۵] و فدریکو دیستنا[۶]

۱، ۲، ۳، دانشجوی سابق دکتری و استادیار فعلی مرکز تحقیقات کشاورزی شهرکرد، دانشیاران گروه علوم باغبانی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، ۴، استادیار بخش تحقیقات باغبانی، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج، ۵، ۶، استادیار و استاد گروه اصلاح نباتات، مؤسسه تحقیقات CEBAS-SCIC مورسیا، اسپانیا

(تاریخ دریافت: ۸۸/۴/۳ - تاریخ تصویب: ۸۹/۳/۹)

چکیده

بادام (*Prunus dulcis L.*) از گونه‌های اقتصادی جنس پرونوس و از خانواده رزاسه است. قسمت تجاری میوه بادام بذر خوراکی آن (مغز) می‌باشد، بنابراین انجام گرده‌افشانی و تلقیح برای تولید محصول در بادام ضروری است. اکثر ارقام تجاری بادام، خودناسازگار و برخی نیز دگرناسازگار هستند. خودناسازگاری در بادام گامتوفتیک بوده و توسط یک مکان ژنی با چندین فرم آللی و به صورت همبارز کنترل می‌شود. در این مطالعه آلل‌های خودناسازگاری ۷۰ رقم و ژنوتیپ بادام ایرانی و ۱۷ رقم خارجی به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) و با استفاده از ترکیب آغازگرهای دژنره که بر اساس توالی نواحی حفاظت شده مکان ژنی ناسازگاری در جنس پرونوس طراحی شده‌اند، تعیین گردید. جداسازی محصول PCR روی ژل آگارز و اندازه باندهای تکثیر شده در ارقام بادام ایرانی با اندازه آلل‌های شناخته شده در ارقام بادام خارجی شاهد و نشانگر یک کیلو جفت بازی مقایسه گردیدند. بر اساس نتایج در ۵۰ رقم و ژنوتیپ ایرانی ازجمله ارقام ربیع (S_7S_{27})، یلدا (S_1S_7)، آذر-۲ (S_3S_4)، حریر (S_4S_{24})، سهند (S_1S_2)، زرقان-۷ (S_1S_4)، زرقان-۸ (S_1S_2)، منقای دیرگل (S_1S_{13})، منقا (S_7S_{14})، خورشیدی (S_4S_8)، شیربادام (S_2S_4)، شمشیری (S_7S_{24})، مامایی اصفهان ($S_{10}S_{12}$) و ژنوتیپ‌های A-92 (S_8S_{23})، A-2 (S_8S_{13})، K-10-15 (S_8S_9)، K-1-16 (S_7S_{24})، K-11-40 (S_1S_4) و A200 (S_1S_9) هر دو آلل خودناسازگاری و در ۲۰ رقم و ژنوتیپ مورد بررسی یک باند مربوط به آلل‌های گزارش شده قبلی مشاهده شد در حالی که اندازه باند دوم مشابه با اندازه باند هیچ یک از آلل‌های شناسایی شده قبلی در بادام نبوده و احتمالاً مربوط به یک آلل جدید است که برای معرفی قطعی آلل‌های جدید باید توالی کامل آنها تعیین گردد. تعداد ۸ باند تکثیر یافته جدید بودند که اندازه آنها متفاوت با اندازه آلل‌های شناخته شده در بادام بود. به طور مثال ارقام مامایی، سفید و تجاری به ترتیب دارای آلل‌های S_{25}، S_7، S_{24} و باندهای جدیدی به اندازه ۱۲۵۰، ۱۰۰۰ و ۱۰۶۵ جفت باز بودند. در بین جمعیت بادام‌های ایرانی مورد مطالعه، آلل‌های خود ناسازگاری S_4، S_1، S_{24}، S_7، S_{12} و S_2 به ترتیب بیشترین فراوانی را در این تحقیق نشان دادند. استفاده از آغازگرهای دژنره، یک روش مناسب برای شناسایی ژنوتیپ ناسازگاری در ارقام و ژنوتیپ‌های بادام می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: بادام، آلل‌های ناسازگاری، آغازگر دیجنریت، نواحی حفاظت شده، مکان ژنی S.

* نویسنده مسئول: محمدرضا فتاحی مقدم تلفن: ۰۹۱۲-۵۶۶۸۶۲۷ E-mail: fattahi@ut.ac.ir

مقدمه

ناسازگاری گامتوفیتیک[1] یک مکانیزم گسترده در برخی گیاهان گلدار به حساب می آید که از خود گشنی یا گاهی دگرگشنی جلوگیری کرده و دگرگشنی را تقویت می‌کند (Nettancourt,1977). بیشتر گونه‌های خانواده رزاسه دارای ناسازگاری گامتوفیتیک هستند. ناسازگاری گامتوفیتیک توسط ژنوتیپ هاپلوئید دانه گرده و دیپلوئید مادگی تعیین می‌شود (McCubbin & Kao, 2000). در این سیستم خودناسازگاری، RNA موجود در لوله گرده که دارای آلل ناسازگاری (S) مشترک با ژنوتیپ ناسازگاری دیپلوئید مادگی است، توسط آنزیم ریبونوکلئاز موجود در خامه، هضم و متلاشی شده و به این ترتیب رشد لوله گرده در خامه متوقف می‌گردد و این یکی از دو فرضیه اصلی در ارتباط با مکانیزم ناسازگاری گامتوفیتیک است (McClure & Franklin-Tong, 2006). انجام گرده‌افشانی و تلقیح برای تولید محصول در بادام ضروری است اما اکثر ارقام تجاری بادام، خودناسازگار و برخی نیز دگرناسازگار هستند. بنابراین کاشت حداقل دو رقم گرده‌زا که علاوه بر سازگاری گرده‌افشانی با رقم اصلی، از نظر زمان گلدهی نیز همپوشانی کامل داشته باشند در کنار رقم اصلی در باغ‌های بادام ضروری است (Kester & Gradziel, 1996; Socias i Company, 1990). خود ناسازگاری در بادام گامتوفیتیک بوده و توسط یک مکان ژنی با چندین فرم آللی کنترل می‌شود (Dicenta & Garcia, 1993). این مکان ژنی روی گروه لینکاژی G6 در نقشه ژنتیکی بادام قرار دارد (Ballester et al., 1998). مکان ژنی کنترل‌کننده ناسازگاری گامتوفیتیک در جنس پرونوس دو قسمتی است. یک ترکیب گلیکوپروتئینی با فعالیت ریبونوکلئازی به نام S-RNase به عنوان عامل تشخیص در بافت ماده و در قسمت خامه قرار دارد (Ushijima et al., 1998; Tao et al., 1997; Certal et al., 2002; Boskovic et al., 1997) و یک ترکیب پروتئینی مخصوص در دانه گرده که حاصل بیان ژن SFB[2] است و به عنوان عامل تشخیص دانه گرده عمل می‌کند (Ushijima et al., 2003). هر دو قسمت (ژن‌های S-RNase و SFB) در جنس پرونوس چند شکلی بالایی داشته و تنوع زیادی در توالی این ژن‌های ناسازگاری مشاهده شده و اثر متقابل این دو ژن منجر به تشخیص و بیان حالت ناسازگاری گامتوفیتیک در خامه شده است (Halasz et al., 2006; Sutherland et al., 2008).

مطالعات اولیه برای تعیین آلل‌های ناسازگاری در بادام با استفاده از تلاقی‌های کنترل شده و در شرایط مزرعه صورت گرفت و آلل‌های خود ناسازگاری S_1, S_2, S_3, S_4, S_7, S_8 و آلل خود سازگاری S_f شناسایی گردیده است (Crossa-Raynaud & Grasselly, 1985; Kester et al., 1994). اگرچه روش گرده‌افشانی کنترل شده در مزرعه و تعیین میزان تشکیل میوه اولیه و نهایی، روش نسبتا کم هزینه ای است ولی نتایج حاصل از آن تحت تاثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرد. بنابراین به منظور حذف تاثیر عوامل محیطی، انجام تلاقی‌های کنترل شده توسط دانه گرده با آلل ناسازگاری مشخص[3] در شرایط آزمایشگاه انجام و رشد لوله گرده و لقاح به روش میکروسکوپ فلورسانس مورد مطالعه قرار می‌گیرد (Halasz & Hegedus, 2006). از این روش برای تعیین وضعیت سازگاری گرده‌افشانی در ارقام بادام استفاده شده است (Ortega et al., 2002; Ortega & Dicenta, 2003). در طی دهه‌های اخیر روش‌های ملکولی برای مطالعه و تعیین آلل‌های خود ناسازگاری توسعه یافته اند. یکی از این روش‌ها، بررسی گلیکوپروتئین های خامه گل با فعالیت ریبونوکلئازی بوده که توسط Boskovic et al. (1997) ابداع شده است و با استفاده از این روش ۲۳ آلل ناسازگاری در بادام گزارش شده است (Boskovic et al., 1997; Boskovic et al., 2003). آنالیز ریبونوکلئازهای خامه گل، یک روش موثر و مفید برای شناسایی آلل‌های ناسازگاری در بادام و سایر درختان میوه خانواده رزاسه می‌باشد. در این روش گیاه باید وارد مرحله گلدهی شده باشد (Certal et al., 2002; Halasz & Hegedus 2006; Ortega & Dicenta, 2004).

1. Gametophytic Incompatibility
2. S-haplotype-specific F-box
3. Tester

در سال‌های اخیر، توالی DNA تعدادی از آلل‌های ناسازگاری (S-alleles) تعیین شده و روش‌های مولکولی مبتنی بر PCR برای شناسایی آلل‌های ناسازگاری توسعه پیدا کرده است. آغازگرهای اختصاصی برای شناسایی برخی از آلل‌های S و آلل خود سازگاری S_f (Channantapipat et al., 2003; Ma & Oliveira, 2001a; Sanchez-Perez et al., 2004)، و همچنین آغازگرهای عمومی بر اساس توالی‌های حفاظت شده در آلل‌های ناسازگاری در بادام (Channantapipat et al., 2001; Kodad et al., 2008; Tamura et al., 2000; Ushijima et al., 1998)، طراحی و مورد استفاده قرار گرفته است. این روش سریع، نسبتاً آسان، مطمئن و قابل اجرا روی نهال‌های جوان بوده و قابلیت بالایی جهت شناسایی ژنوتیپ ناسازگاری در درختان میوه مانند بادام دارد (Halasz & Hegedus, 2006; Ortega & Dicenta, 2004).

آغازگرهای دژنره بر اساس توالی مناطق حفاظت شده ژن خود ناسازگاری در گونه‌های پرونوس طراحی شده‌اند (Ortega et al., 2005; Sonneveld et al., 2003; Sutherland et al., 2004). ترکیب‌های متفاوت این آغازگرهای دژنره به طور موفقیت‌آمیزی جهت تشخیص و شناسایی آلل‌های S در بادام (Ortega et al., 2005; Sutherland et al., 2004)، گیلاس (Sonneveld et al., 2001; Sutherland et al., 2004)، و زردآلو (Halasz et al., 2005; Zhang et al., 2008) استفاده شده‌اند. آغازگرهای رو به جلو EM-PC2cons FD و رو به عقب EM-PC3cons RD بر اساس توالی حفاظت شده و ثابت مناطق حفاظت شده C2 و C3 مکان S در جنس پرونوس توسط Sutherland et al. (2004) طراحی شده‌اند و قادر به تکثیر اینترون دوم آلل‌های ناسازگاری بادام می‌باشند. برای تکثیر اینترون اول در آلل‌های ناسازگاری بادام از ترکیب آغازگر رو به جلو Pacons I-F (Sonneveld et al., 2003) که بر اساس توالی ابتدای ساختمان ژن خود ناسازگاری در گیلاس طراحی شده است با آغازگر معکوس EM-PC1cons RD که بر اساس توالی منطقه حفاظت شده C1 حاصل از توالی ۲۷ آلل ناسازگاری در جنس پرونوس طراحی شده است (Ortega et al., 2005)، استفاده می‌شود.

Ortega et al. (2005) با استفاده از ترکیب جفت آغازگرهای دژنره Pacons I-F/EM-PC1cons RD و EM-PC2cons FD/EM-PC3cons RD و بر اساس محصول PCR، اندازه قطعات توالی اینترون های اول و دوم آلل‌های S_1 تا S_{29} و اندازه آلل S_f را در ارقام مختلف بادام با PCR معمولی و نیز با استفاده از آغازگرهای فلورسنت تعیین کردند. آنها ضمن تأیید آلل‌هایی که قبلاً گزارش شده بودند (آلل‌های S_1-S_{24})، پنج آلل جدید (S_{25}-S_{29}) نیز شناسایی و معرفی کردند.

Ortega et al. (2006) به منظور تأیید آلل‌های شناسایی شده در مکان S، کلیه باندهای حاصل از تکثیر آغازگرهای اینترون اول و دوم را توالی یابی و گزارش کردند که آلل فرضی[1] S_{10} گزارش شده Channantapipat et al. (2003) در واقع یک آلل جدید بوده و به نام آلل S_{24} نامگذاری نمودند. این محققان گزارش کردند که اندازه وتوالی بعضی از آلل‌های قبلی گزارش شده در بادام مشابه همدیگر است و در واقع آلل‌های S_1، S_{16} و S_{17} با همدیگر و آلل‌های S_4 با S_{20} و آلل‌های S_{13} با S_{19} و همچنین آلل‌های S_5 با S_{15} توالی یکسانی داشته و مشابه همدیگرند. شناسایی آلل‌های خود ناسازگاری وتعیین ژنوتیپ خود ناسازگاری در ارقام بادام جهت انتخاب صحیح درختان گرده‌زا[2] در احداث باغات به منظور افزایش عملکرد و همچنین انتخاب والدین مناسب در برنامه‌های به‌نژادی جهت اطمینان از موفقیت در تلاقی‌های کنترل شده مفید و حائز اهمیت می‌باشد (Lopez et al., 2006; Ortega et al., 2006).

به دلیل اهمیت آلل‌های ناسازگاری، این پژوهش با هدف شناسایی و تعیین ژنوتیپ ناسازگاری در ارقام و ژنوتیپ‌های امیدبخش بادام ایرانی با استفاده از آغازگرهای دژنره به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام گرفته است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

مواد گیاهی مورد بررسی در این پژوهش شامل ۷۰

1. Putative
2. Pollinizer

رقم و ژنوتیپ بادام ایرانی (جدول ۱) و ۱۷ رقم بادام خارجی در برگیرنده کلیه آلل‌های شناخته شده خودناسازگاری (جدول۲) بودند. نمونه‌های برگ از سرشاخه‌های جوان ارقام و ژنوتیپ‌های ایرانی موجود در کلکسیون‌های بادام ایستگاه تحقیقات باغبانی واقع در کمال‌آباد کرج وابسته به مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، باغ امامیه در منطقه سامان وابسته به مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی چهار محال و بختیاری (شهرکرد) و ایستگاه تحقیقات باغبانی سهند وابسته به مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی آذربایجان شرقی (تبریز) تهیه شد. ارقام خارجی نیز از کلکسیون بادام مؤسسه تحقیقاتی CEBAS-CSIC در کشور اسپانیا تهیه گردیدند. نمونه‌های برگ با استفاده از ظروف حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل و بلافاصله در ازت مایع منجمد گردیدند و تا زمان استخراج DNA در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

جدول ۱- ارقام و و ژنوتیپ‌های بادام ایرانی مورد بررسی در این پژوهش

ردیف	رقم/ژنوتیپ	منشا	محل جمع آوری	ردیف	رقم/ژنوتیپ	منشا	محل جمع آوری
۱	پوست نازک	ایران	اصفهان	۳۶	*کا-۱-۱۶	ایران	کرج
۲	تجاری	ایران	اصفهان	۳۷	کا-۲-۲۹	ایران	کرج
۳	حاج میرزایی	ایران	اصفهان	۳۸	کا-۱۰-۱۱	ایران	کرج
۴	خورشیدی	ایران	اصفهان	۳۹	کا-۱۰-۱۵	ایران	کرج
۵	سفری	ایران	اصفهان	۴۰	کا-۱۱-۴۰	ایران	کرج
۶	شمشیری	ایران	اصفهان	۴۱	کا-۱۲-۴	ایران	کرج
۷	شیر بادام	ایران	اصفهان	۴۲	کا-۱۶-۸	ایران	کرج
۸	مامایی فریدون شهر(اصفهان)	ایران	اصفهان	۴۳	۵- دانشکده	ایران	کرج
۹	منقا	ایران	اصفهان	۴۴	۱۱- دانشکده	ایران	کرج
۱۰	منقای دیرگل	ایران	اصفهان	۴۵	۹۹- دانشکده	ایران	کرج
۱۱	هلویی	ایران	اصفهان	۴۶	کرمان-۱	ایران	کرمان
۱۲	آ۲۰۰	اسپانیا	تبریز	۴۷	کرمان-۵	ایران	کرمان
۱۳	آ۲۳۰	اسپانیا	تبریز	۴۸	کرمان-۱۹	ایران	کرمان
۱۴	آذر-۲	ایران	تبریز	۴۹	کرمان-۲۰	ایران	کرمان
۱۵	حریر	ایران	تبریز	۵۰	باقر	ایران	قزوین
۱۶	سهند	ایران	تبریز	۵۱	عبداله	ایران	قزوین
۱۷	یلدا-۲	ایران	تبریز	۵۲	قزوین-۱	ایران	قزوین
۱۸	زنجان-۲	ایران	زنجان	۵۳	قزوین-۲	ایران	قزوین
۱۹	زنجان-۱	ایران	زنجان	۵۴	قزوین-۵	ایران	قزوین
۲۰	آذر-۱	ایران	شهرکرد	۵۵	قزوین-۱۶	ایران	قزوین
۲۱	Ar شهرکرد	ایران	شهرکرد	۵۶	قزوین-۲۵	ایران	قزوین
۲۲	E1 شهرکرد	ایران	شهرکرد	۵۷	قزوین کا-۱	ایران	قزوین
۲۳	G2 شهرکرد	ایران	شهرکرد	۵۸	مشهد-۱۳	ایران	مشهد
۲۴	ربیع	ایران	شهرکرد	۵۹	مشهد-۱۷	ایران	مشهد
۲۵	سفید	ایران	شهرکرد	۶۰	مشهد-۳۰	ایران	مشهد
۲۶	شکوفه	ایران	شهرکرد	۶۱	مشهد-۴۰	ایران	مشهد
۲۷	مامایی	ایران	شهرکرد	۶۲	مشهد-۸	ایران	مشهد
۲۸	یلدا-۱	ایران	شهرکرد	۶۳	مشهد-۹۱	ایران	مشهد
۲۹	زرقان-۷	نامعلوم	شیراز	۶۴	یزد-۱۱	ایران	یزد
۳۰	زرقان-۸	نامعلوم	شیراز	۶۵	یزد-۱۳	ایران	یزد
۳۱	شیراز ۱۹	ایران	شیراز	۶۶	یزد-۲	ایران	یزد
۳۲	شیراز ۴۶	ایران	شیراز	۶۷	یزد-۱۵	ایران	یزد
۳۳	نی ریز-۱	ایران	شیراز	۶۸	یزد-۱۷	ایران	یزد
۳۴	آ-۲	ایران	کرج	۶۹	یزد-۲۱	ایران	یزد
۳۵	آ-۹۲	ایران	کرج	۷۰	یزد-۱۰۳	ایران	یزد

* ژنوتیپ‌های تحت شماره کا...، حاصل تلاقی بین ارقام خارجی و ارقام محلی هستند و به عنوان ارقام برتر انتخابی تحت بررسی و ارزیابی می‌باشند.

جدول ۲- ارقام خارجی استاندارد* دارای آلل‌های S شناخته شده به عنوان شاهد

شماره	رقم	Cultivar	ژنوتیپ ناسازگاری	منشاء	منبع
۱	آ ۲- ۱۹۸	A2-198	S_fS_f	اسپانیا	دیسنتا و همکاران ۲۰۰۲
۲	آردچویس	Ardechoise	S_1S_{10}	فرانسه	بوسکویچ و همکاران ۲۰۰۳
۳	آولانرا گروسا	Avellanera Gruesa	$S_{22}S_{26}$	اسپانیا	اورتگا و همکاران ۲۰۰۵
۴	آی	Ai	S_3S_4	فرانسه	بوسکویچ و همکاران ۱۹۹۷
۵	پادر	Padre	S_1S_{18}	آمریکا	بوسکویچ و همکاران ۲۰۰۳
۶	پریمورسکی	Primorskyi	S_5S_9	اکراین	بوسکویچ و همکاران ۲۰۰۳
۷	تیتان	Titan	S_8S_{14}	آمریکا	اورتگا و همکاران ۲۰۰۵
۸	رامیلت	Ramillete	S_6S_{23}	اسپانیا	بوسکویچ و همکاران ۲۰۰۳
۹	رومبتا	Rumbeta	$S_{11}S_{21}$	اسپانیا	بوسکویچ و همکاران ۲۰۰۳
۱۰	سباس- ۱	CEBAS-I	S_4S_{13}	اسپانیا	بوسکویچ و همکاران ۲۰۰۳
۱۱	فرانیس	Ferragnes	S_1S_3	فرانسه	بوسکویچ و همکاران ۱۹۹۷
۱۲	فورنات دبرزند	Fournat de Brezenaud	$S_{24}S_{27}$	فرانسه	بوسکویچ و همکاران ۲۰۰۳
۱۳	فینا دل آلتو	Fina del Alto	$S_{28}S_{29}$	اسپانیا	اورتگا و همکاران ۲۰۰۵
۱۴	کریستومورتو	Cristomorto	S_1S_2	ایتالیا	بوسکویچ و همکاران ۱۹۹۷
۱۵	ال -۹ (آی ایکس ال)	IXL	S_7S_8	آمریکا	بوسکویچ و همکاران ۱۹۹۷
۱۶	لامونا	La Mona	$S_{23}S_{25}$	اسپانیا	اورتگا و همکاران ۲۰۰۵
۱۷	مارکونا	Marcona A.D.	$S_{11}S_{12}$	اسپانیا	بوسکویچ و همکاران ۱۹۹۸

*: منبع: Ortega et al. (2005, 2006).

استخراج DNA

استخراج DNA ژنومی از ارقام ایرانی به روش Murray & Thompson (1980) با کمی تغییرات انجام گرفت. به این منظور از بافر استخراج شامل ۱۰۰ میلی‌مولار تریس pH=۸، ۲۰ میلی‌مولار EDTA، ۱/۴ میلی‌مولار کلرید سدیم، ۲ درصد هگزاستیل تری‌متیل آمونیوم بروماید (CTAB)، ۲ درصد پلی‌وینیل پیرولیدون (PVP_{40}) و ۱ درصد ۲-بتا مرکاپتواتانول استفاده شد. استخراج DNA ارقام خارجی بر اساس روش Doyle & Doyle (1987) و تغییر یافته توسط Sonneveld et al. (2001) که توسط Ortega & Dicenta (2003) برای بادام بهینه‌سازی شده بود، انجام گرفت. به منظور تعیین کمیت و کیفیت DNA از روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز روی ژل آگارز استفاده گردید. استخراج DNA از ارقام و ژنوتیپ‌های ایرانی در آزمایشگاه بیوتکنولوژی گروه علوم باغبانی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی انجام گرفت و نمونه‌های DNA استخراج شده روی یخ خشک به مؤسسه تحقیقاتی CEBAS-SCIC در دانشگاه مورسیا در کشور اسپانیا منتقل گردید و کلیه مراحل آزمایشات مولکولی جهت تعیین آلل‌های S در این مؤسسه انجام گردید.

شرایط PCR

واکنش PCR: شرایط واکنش PCR با آغازگرهای دیجنریت اینترون دوم در حجم ۲۰ میکرولیتر به روش Ortega et al. (2005) و Sutherland et al. (2004) شامل ۱ میکرولیتر از غلظت ۲۰ نانوگرم در ماکرو لیتر DNA ژنومی، ۲ میکرولیتر بافر PCR (10X)، ۰/۸ میکرولیتر کلرید منیزیم ۲۵ میلی‌مولار، ۲ میکرولیتر از مخلوط ۲ میلی‌مولار نوکلوئیدها (dNTPs)، ۱/۲ میکرولیتر از غلظت ۵ میکرومولار هر آغازگر، ۲ میکرولیتر از محلول Q (5X)، ۰/۱ میکرولیتر از آنزیم تگ DNA (Taq) پلیمراز باغلظت ۵ واحد در میکرولیتر انجام گرفت. در واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای دژنره اینترون اول و جفت اینترون از محلول Q استفاده نگردید ولی سایر اجزای واکنش یکسان بودند.

شرایط تکثیر PCR

برای تکثیر عمومی آلل‌های S از آغازگرهای دژنره استفاده گردید (جدول۳). برای تکثیر اینترون دوم از آغازگرهای رو به جلو EM-PC_2consFD و رو به عقب (برگشت) EM-PC_3consRD طراحی شده توسط

Sutherland et al. (2004)، جهت تکثیر اینترون اول از آغازگرهای رو به جلو PaconsI-F، (Sonneveld et al., 2003) و آغازگر رو به عقب EM-PC1consRD، (Ortega et al., 2005) و برای تکثیر هر دو اینترون از آغازگرهای رو به جلو Pacons I-F، (Sonneveld et al., 2003) و آغازگر رو به عقب EM-PC5cons RD (Sutherland et al., 2004) استفاده گردید. به این ترتیب، ترکیب آغازگرها برای اینترون اول (SP+C1)، اینترون دوم (C2+C3) و جفت اینترون (SP+C5) بود (جدول ۳). ابتدا محصول PCR ارقام ایرانی با استفاده از جفت آغازگر اینترون دوم EM-PC2consFD/ EMPC3 consRD در کنار ارقام خارجی استاندارد و نشانگر اندازه یک کیلو جفت بازی در ژل آگارز مقایسه گردیدند. در مواردی که در ارقام ایرانی یک باند تکثیر شد و یا اندازه باند خیلی دقیق نبود، از ترکیب آغازگرهای اینترون اول (PaconsI-F/EMPC1consRD) و یا جفت اینترون (EM-PC2consFD/EM-PC5consRD) برای تکثیر استفاده گردید. در هر واکنش PCR از DNA ژنومی ۳ رقم بادام ایرانی و ۱۵ رقم بادام خارجی (جدول ۲) به عنوان شاهد برای کلیه آلل‌های ناسازگاری شناخته شده در بادام استفاده گردید. ارقام شاهد بر اساس نتایج Ortega et al. (2005، 2006) طوری انتخاب شدند که کلیه آلل‌های شناسایی شده در ارقام بادام را پوشش دهند. شرایط دما و زمان واکنش PCR با استفاده از آغازگر های اینترون اول و دوم براساس روش Ortega et al. (2005) و با استفاده از آغازگرهای جفت اینترون نیز شرایط دما و زمان با کمی تفاوت شامل زمان بسط آغازگر به مدت ۴ دقیقه و مرحله بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه، در بقیه مراحل شبیه شرایط تکثیر با آغازگرهای اینترون دوم بود. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر اپندروف ساخت کشور آلمان انجام گرفت.

شرایط الکتروفورز

شرایط الکتروفورز طبق روش Ortega et al. (2005) با کمی تغییرات و بهینه سازی شرایط به شرح زیر انجام شد. الکتروفورز محصول PCR در بافر TAE با استفاده از آغازگرهای اینترون دوم روی ژل آگارز ۱/۵ درصد به مدت ۵ ساعت در ۷۵ ولت انجام گرفت. الکتروفورز با آغازگرهای اینترون اول روی ژل آگارز ۲ درصد با ولتاژ ۵۵ برای مدت ۶ ساعت انجام گردید. برای آغازگرهای جفت اینترون ژل آگارز ۱/۵ درصد، ولتاژ ۶۰ و برای مدت ۵ ساعت استفاده شد.

رنگ آمیزی و تعیین اندازه باندهای تکثیر شده

رنگ‌آمیزی ژل در محلول اتیدیوم بروماید به غلظت ۰/۵ میکروگرم در لیتر به مدت یک ساعت انجام شد و پس از آن باندهای تکثیر شده در زیر نور ماورابنفش آشکار و عکسبرداری از آنها توسط دستگاه ژل داک مدل SYNGENE انجام گردید. اندازه باندهای تکثیر یافته در ارقام بادام ایرانی با استفاده از نشانگر اندازه یک کیلو جفت بازی (به شماره کاتالوگ ۱۰۷۸۷-۰۱۸، ساخت شرکت Invitrogen) و اندازه باندهای مرتبط با آلل‌های شناخته شده در ارقام خارجی استاندارد (جدول۲) محاسبه شد و ژنوتیپ خودناسازگاری ارقام بادام ایرانی تعیین گردید.

نتایج و بحث

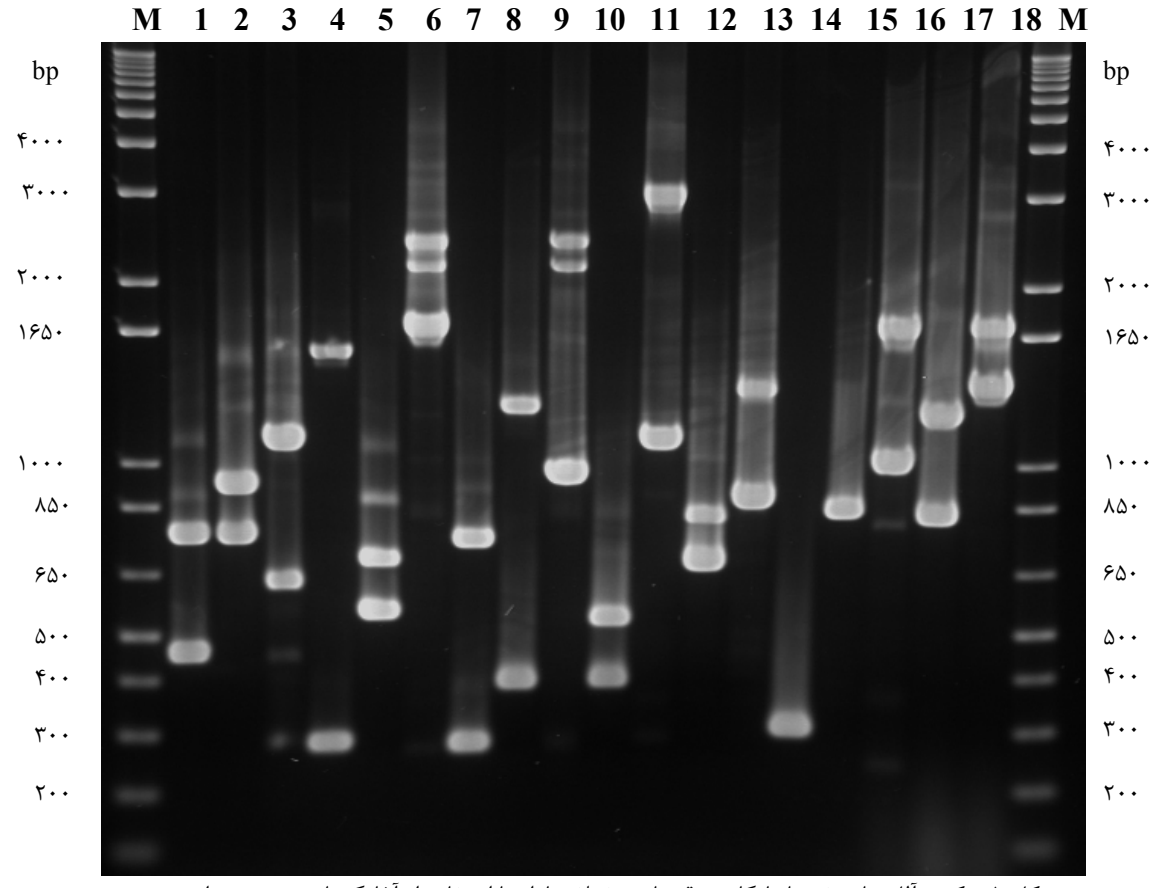
نتایج حاصل از تکثیر آلل‌های مکان S با استفاده از آغازگرهای دژنره اینترون دوم نشان داد که این آغازگرها قادرند ۲۸ آلل از مجموع ۲۹ آلل خود ناسازگاری شناخته شده در بادام را تکثیر نمایند (جدول ۴).

جدول ۳- توالی آغازگرهای دیجنریت مورد استفاده در این پژوهش.

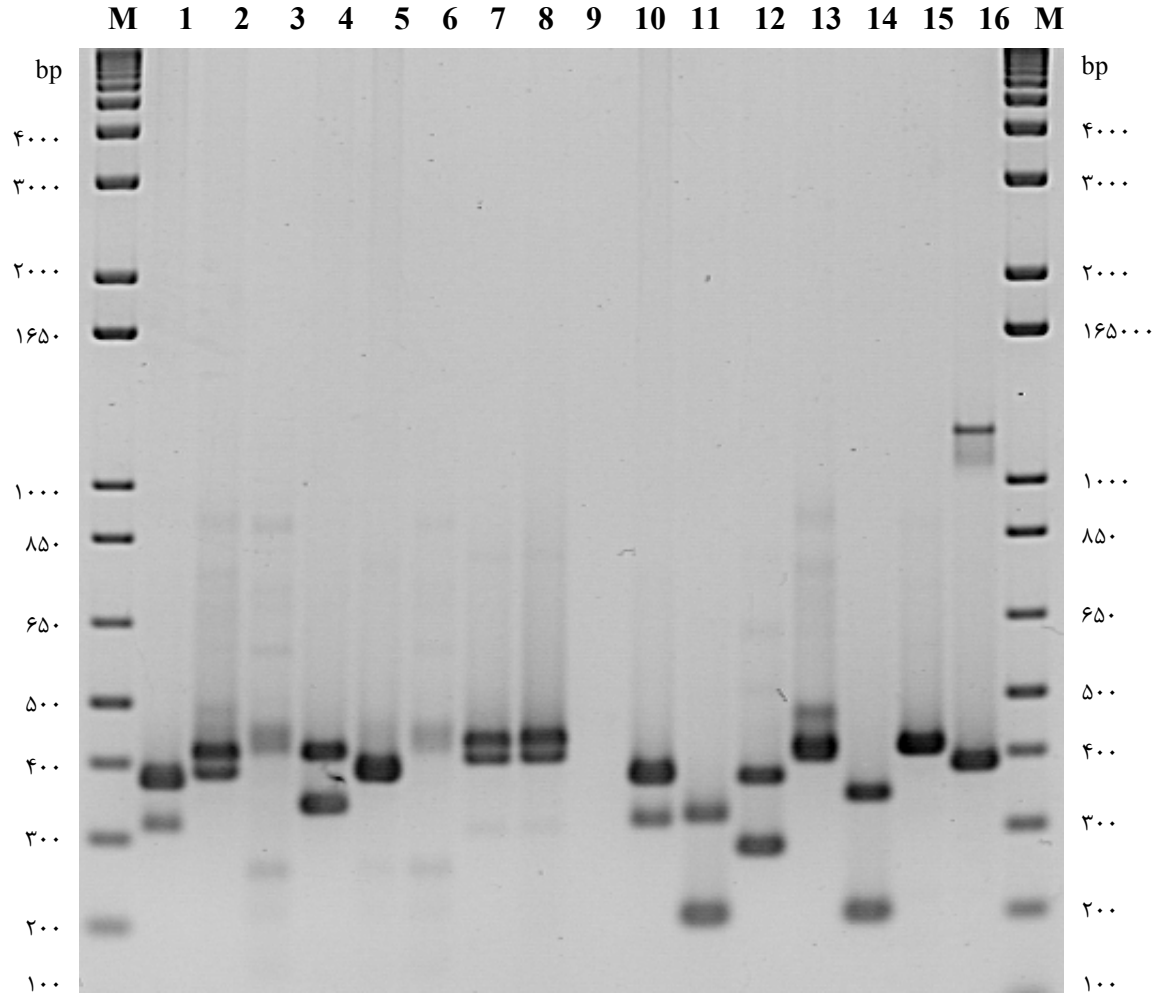
نام آغازگر	کد آغازگر*	توالی آغازگر (3′ → 5′)	منبع
PaConsI-F	SP	(C/A)CT TGT TCT TG(C/G) TTT (T/C)GC TTT CTT C	سانولد و همکاران، ۲۰۰۳
EM-PC1consRD	C1	GCC A(C/T)T GTT G(A/C)A CAA A(C/T)T GAA	اورتگا و همکاران، ۲۰۰۵
EM-PC2consFD	C2	TCA C(A/C)A T(C/T)C ATG GCC TAT	ساترلند و همکاران، ۲۰۰۴
EM-PC3consRD	C3	A(A/T)(C/G) T(A/G)C C(A/G)T G(C/T)TTGT TCC ATT C	ساترلند و همکاران، ۲۰۰۴
EM-PC5consRD	C5	CAA AAT ACC ACT TCA TGT AA CA(A/G)	ساترلند و همکاران، ۲۰۰۴

* کد بر اساس ناحیه مورد تکثیر آغازگر در ساختمان ژن خودناسازگاری تعیین گردیده است.

آغازگرهای اینترون دوم تنها قادر به تکثیر آلل S_{29} در رقم شاهد 'فینادل آلتو' ($S_{28}S_{29}$) (شکل۱) و ارقام ایرانی و خارجی دارای این آلل نبودند که احتمالاً بیانگر تطابق ضعیف این آغازگرها با توالی هدف در این آلل و یا شاید به دلیل وجود یک اینترون خیلی بزرگ در توالی این آلل باشد، بنابراین برای تکثیر این آلل در ارقام ایرانی از آغازگرهای اینترون اول استفاده گردید (شکل۲). بر اساس نتایج رقم خارجی 'فیتادل آلتو' ($S_{28}S_{29}$) و ارقام و ژنوتیپ‌های ایرانی 'A-92'، 'K-11-40'، 'K-16-8'، 'حریر'، 'زرقان-۷'، 'صفری'، 'مشهد-۱۷'، 'مشهد-۴۰'، 'Gr-16 قزوین'، 'محمد باقر'، 'عبداله'، و 'G-99 دانشکده'، در تکثیر با آغازگرهای اینترون دوم یک باند نشان دادند. این ارقام با آغازگرهای اینترون اول نیز بررسی گردیدند که تنها رقم 'Gr-16 قزوین' باندی نزدیک به آلل S_{29} در رقم شاهد 'فینادل آلتو' نشان داد (شکل ۲). به دلیل اینکه اندازه باندهای تکثیر شده با جفت آغازگر اینترون اول خیلی نزدیک به هم هستند و تشخیص تفاوت بر اساس نتایج حاصل از این آغازگرها در ژل آگارز مشکل است (Ortega et al., 2005)، بنابراین ژنوتیپ 'Gr-16 قزوین' با استفاده از آغازگرهای جفت اینترون بررسی مجدد شد. بر اساس آغازگرهای اینترون دوم این رقم فقط دارای آلل S_2 بود ولی بر اساس آغازگرهای جفت اینترون علاوه بر آلل S_2، یک باند به اندازه حدود ۱۷۰۰ جفت باز تکثیر گردید که متفاوت از آلل S_{29} بود و احتمالا یک آلل جدید است (شکل۳).



شکل ۱- تکثیر آلل های خودناسازگاری رقم‌های مختلف بادام با استفاده از آغازگرهای دیجنریت اینترون دوم
M: نشانگر DNA (جفت باز)، ۱) کریستومرتو، ۲) فرانیس، ۳) سباس-۱، ۴) پریمورسکی، ۵) رامیلت، ۶) ال-۹، ۷) آردچویس، ۸) مارکونا، ۹) تیتان، ۱۰) رومبتا، ۱۱) آولانرا گروسا، ۱۲) لامونا، ۱۳) فورنات دی بررزند، ۱۴) فینا دل آلتو، ۱۵) ۱۹۸-۲-A، ۱۶) سفید، ۱۷) مامایی، ۱۸) ربیع.



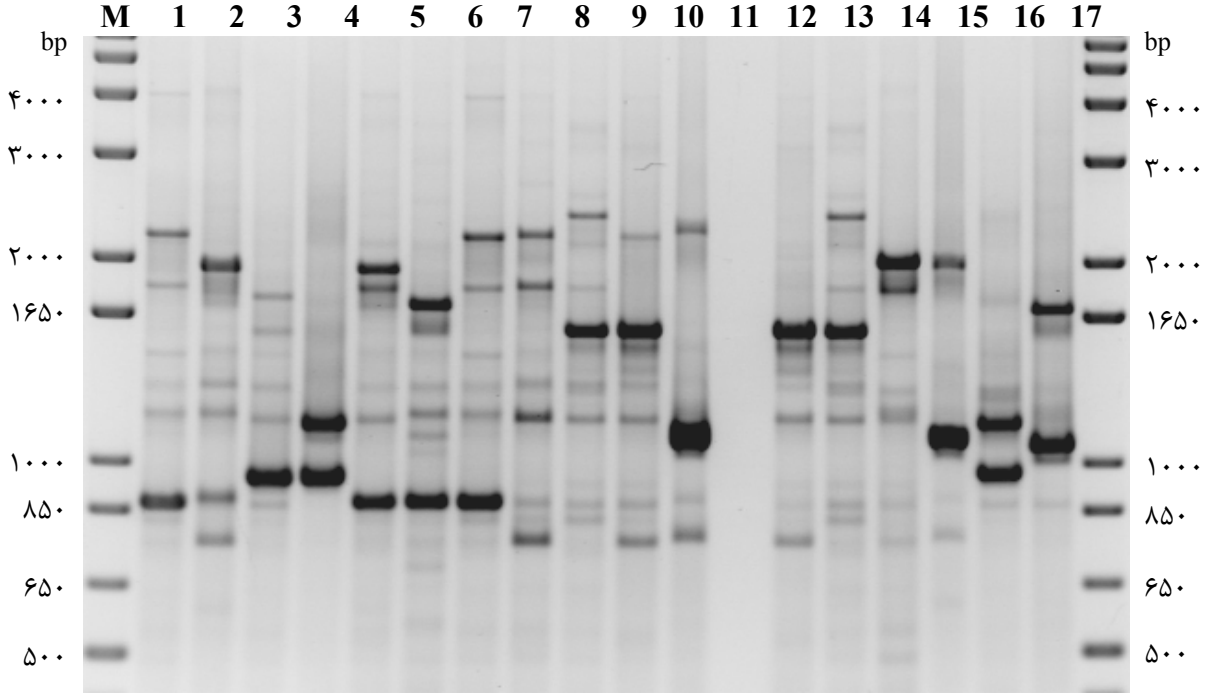
شکل ۲- تکثیر آلل های خودناسازگاری رقم های مختلف بادام با استفاده از آغازگرهای دیجنریت اینترون اول
M: نشانگر DNA (جفت باز)، ۱) فینا دل آلتو، ۲) A-۹۲، ۳) کا-۱۱-۴۰، ۴) کا-۱۶-۸ ، ۵) حریر، ۶) زرقان-۸، ۷) صفری، ۸) مشهد-۱۷، ۹) کنترل منفی (Blank)، ۱۰) فینا دل آلتو، ۱۱) مشهد-۴۰، ۱۲) Gr-۱۶-قزوین، ۱۳) محمد باقر، ۱۴) عبداله، ۱۵) G-۹۹ دانشکده، ۱۶) G-۱۱ دانشکده

نتایج حاصل از تکثیر با استفاده از آغازگرهای اینترون دوم نشان داد که آلل S_8 در ارقام 'آی ایکس ال' و 'تیتان' دارای ۲ باند با اندازه‌های حدود ۲۲۳۰ و ۲۴۷۰ جفت باز بود (شکل۱) که با نتایج Ortega et al. (2005) مطابقت دارد. اندازه باندهای حاصل از تکثیر آلل‌ها با آغازگرهای اینترون دوم در ارقام مورد بررسی از حدود ۳۰۰ جفت باز (S_{10}) تا حدود ۳۰۰۰ جفت باز (S_{26}) متغیر بود (جدول ۴) که این تنوع زیاد در اندازه باندهای تکثیر شده، شناسایی آلل‌های مختلف را امکان پذیر ساخت که با نتایج Ortega et al. (2005) مطابقت داشت. از مجموع ۷۰ رقم و ژنوتیپ بادام ایرانی مورد بررسی، در ۵۰ رقم و ژنوتیپ هر دو آلل ناسازگاری و در ۲۰ رقم و ژنوتیپ باقی مانده، یک باند مربوط به آلل‌های قبلاً گزارش شده مشاهده شد و آلل ناسازگاری مشخص گردید در حالیکه اندازه باند دوم مشابه بااندازه باند هیچ یک از آلل‌های قبلاً شناسایی شده در بادام نبوده و تعداد ۸ باند جدید با اندازه های متفاوت تکثیر گردید که احتمالاً مربوط به آلل‌های جدید ناسازگاری است، که برای معرفی قطعی آلل‌های جدید باید توالی کامل آنها تعیین گردد. با محاسبه اندازه باندهای تکثیر شده در ارقام و ژنوتیپ‌های ایرانی و مقایسه آنها با اندازه باندهای مرتبط با آلل‌های ناسازگاری در ارقام شاهد و با استفاده از نشانگر اندازه یک کیلو جفت بازی، ژنوتیپ ناسازگاری ارقام ایرانی تعیین شد (جدول ۴). به طور مثال ژنوتیپ

ناسازگاری در برخی از ارقام و ژنوتیپ‌های ایرانی که در این بررسی تعیین گردیدند شامل ارقام ربیع (S_7S_{27})، یلدا (S_1S_7)، حریر (S_4S_{24})، سهند (S_1S_2)، زرقان-۷ (S_1S_4)، زرقان-۸ (S_1S_2)، منقای دیرگل (S_1S_{12})، منقا (S_7S_{14})، خورشیدی (S_4S_8)، شیر بادام (S_2S_4)، شمشیری (S_7S_{24})، مامایی فریدون شهر ($S_{10}S_{13}$) و ژنوتیپ‌های A-92 (S_8S_{23})، A-2 (S_8S_{13})، K-10- (S_8S_9) 15، K-1-16(S_7S_{24})، K-11-40 (S_1S_4) و A200 (S_1S_9) بودند.

در برخی از ارقام و ژنوتیپ‌های مورد بررسی یک آلل شناسایی گردید و آلل دیگر اندازه باند تکثیر یافته در آنها متفاوت با اندازه آلل‌های شناخته شده درارقام شاهد (جدول‌های ۲ و ۴) بود، به طور مثال رقم مامایی دارای آلل S_{25} و یک باند جدید به اندازه ۱۲۵۰ جفت باز، رقم سفید دارای آلل S_7 و یک باند جدید به اندازه ۱۰۰۰ جفت باز، رقم تجاری دارای آلل S_{24} و یک باند جدید به اندازه ۱۱۰۰ جفت باز و ژنوتیپ K-2-29 دارای آلل S_8 و یک باند جدید ۱۰۶۰ جفت باز بودند (جدول۴).

نتایج حاصل از تکثیر آلل‌ها در برخی از ارقام ایرانی با آغازگرهای اینترون اول حاکی از اندازه نزدیک باندها به هم بود که این امر شناسایی آلل‌های مذکور از طریق این آغازگرها را مشکل می‌کند (شکل ۲). Ortega et al. (2005) گزارش کردند که در تکثیر توسط آغازگرهای اینترون اول به دلیل کوچکی اندازه باندها (عمدتاً کوچک‌تر از ۵۰۰ جفت باز) و از طرفی نزدیکی این باندها به یکدیگر (در دامنه ۲۰۰ تا ۶۰۰ جفت باز) در ژل آگارز، بهتر است از آغازگرهای فلورسنت استفاده شده و با استفاده از دستگاه توالی‌یاب باندها شناسایی شوند (Ortega et al., 2005). با استفاده از آغازگرهای اینترون اول، در ارقام 'G-99 دانشکده'، 'حریر'، 'بادام هلویی'، 'K-2-29'، 'Ar شهرکرد'، 'G-2 قزوین'، 'GK-1 قزوین' فقط یک باند تکثیر گردید (شکل ۲). این نتایج با Ortega et al. (2005) که گزارش کردند آغازگرهای اینترون اول در بسیاری از ارقام فقط یک باند تکثیر می‌نمایند مطابقت دارد. نتایج Ortega et al. (2006) نشان داد که آلل‌های S_5 و S_{15}، S_{13} و S_{19}، S_4 و



شکل ۳- تکثیر آلل های خودناسازگاری رقم های مختلف بادام با استفاده از آغازگرهای دیجنریت جفت اینترون
M: نشانگر DNA (جفت باز)، ۱) پریمورسکی، ۲) آردچویس، ۳) بادام هلویی، ۴) پوست نازک، ۵) E-1- شهرکرد، ۶) G-2- قزوین، ۷) پریمورسکی، ۸) کا-۱۰-۱۵، ۹) کا-۱-۱۶، ۱۰) کا-۱۰-۱۱، ۱۱) A-۲۳۰، ۱۲) کنترل منفی (Blank)، ۱۳) فورنات دی بررزند، ۱۴) کا-۱-۱۶، ۱۵) ۲۵- G قزوین، ۱۶) کریستومورتو، ۱۷) یزد-۱۷، ۱۸) Gr-۱۶ قزوین.

S_{20}، S_1 با S_{16} و S_{17} دارای اندازه و توالی مشابه هستند و لذا در این مقاله از نام آلل با شماره کوچک‌تر استفاده شده است، بنابراین در ارائه نتایج از آلل S_5 به جای S_{15}، S_{13} به جای S_{19}، S_4 به جای S_{20} و از S_1 به جای S_{16} و S_{17} استفاده شده است. به عنوان مثال، باند با اندازه ۳۳۰ جفت باز تکثیر شده با استفاده از آغازگرهای اینترون دوم تحت عنوان آلل S_5 گزارش شده است (جدول ۴).

جدول ۴- آلل‌های ناسازگاری و اندازه باندهای* مربوط به این آلل‌ها در ارقام و ژنوتیپ‌های بادام ایرانی

ردیف	رقم	اندازه باند (جفت باز)	ژنوتیپ خودناسازگاری	ردیف	رقم	اندازه باند (جفت باز)	ژنوتیپ خودناسازگاری
۱	آ-۲	۱۰۸۰-۲۲۳۰ و ۲۴۷۰	S_8S_{13}	۳۶	کا-۱۰-۱۵	۱۶۰۰-۲۲۳۰ و ۲۴۷۰	S_8S_9
۲	آ-۹۲	۶۸۰-۲۲۳۰ و ۲۴۷۰	S_8S_{23}	۳۷	کا-۱۱-۴۰	۶۲۰-۷۵۰	S_1S_4
۳	آ-۲۰۰	۱۵۶۰-۷۵۰	S_1S_9	۳۸	کا-۱۲-۴	۱۳۰۰-۷۵۰	S_1S_{12}
۴	آ-۲۳۰	۱۵۶۰-۴۵۰	S_2S_9	۳۹	کا-۱۶-۸	۲۲۳۰ و ۲۴۷۰- ۹۰۰	S_3S_8
۵	آذر-۱	۱۳۶۰- ۹۰۰	S_3S_{27}	۴۰	کرمان-۱	۸۷۵-۱۱۳۰	$S_{22}S_{24}$
۶	آذر-۲	۶۲۰-۹۰۰	S_3S_4	۴۱	کرمان-۱۹	۶۹۰-۴۰۰	$S_{11}S_{23}$
۷	باقر (محمد باقر)	۴۰۰-؟[۴]	$S_{11}S_?$	۴۲	کرمان-۲۰	۳۰۰-۴۵۰	S_2S_{10}
۸	پوست نازک	۲۹۰-۴۵۰	S_2S_C[۱]	۴۳	کرمان-۵	۵۰۰-۶۲۰	S_4S_{21}
۹	تجاری	۱۰۶۵-۸۷۵	$S_{24}S_B$[۱]	۴۴	۵- دانشکده	۱۰۵۰-۷۵۰	S_1S_{14}
۱۰	حاج میرزایی	۱۵۶۰-۶۲۰	S_4S_9	۴۵	۱۱- دانشکده	۱۱۳۰-۱۰۵۰	$S_{14}S_{22}$
۱۱	حریر	۸۷۵-۶۲۰	S_4S_{24}	۴۶	۹۹- دانشکده	۷۵۰-؟[۴]	$S_1S_?$
۱۲	خورشیدی	۲۲۳۰ و ۲۴۷۰-۶۲۰	S_4S_8	۴۷	Ar شهرکرد	۱۰۶۵-۱۲۵۰	S_AS_B
۱۳	ربیع	۱۳۶۰-۱۷۲۰	S_7S_{27}	۴۸	E1 شهرکرد	۳۳۰-۷۵۰	S_1S_5
۱۴	زرقان-۷	۶۲۰-۷۵۰	S_1S_4	۴۹	G2 شهرکرد	۱۰۶۵-۳۰۰	$S_{10}S_B$
۱۵	زرقان-۸	۴۵۰-۷۵۰	S_1S_2	۵۰	مامایی	۱۲۵۰-۸۵۰	$S_{25}S_A$
۱۶	زنجان-۱	۸۷۵-۱۳۰۰	$S_{12}S_{24}$	۵۱	مامایی اصفهان	۱۳۰۰-۳۰۰	$S_{10}S_{12}$
۱۷	زنجان-۲	۱۵۶۰-۲۲۳۰ و ۲۴۷۰	S_8S_9	۵۲	منقا	۱۰۵۰-۱۷۲۰	S_7S_{14}
۱۸	سفید	۱۰۰۰-۱۷۲۰	S_7S_D	۵۳	منقای دیرگل	۱۰۸۰-۷۵۰	S_1S_{13}
۱۹	سهند	۴۵۰-۷۵۰	S_1S_2	۵۴	مشهد-۱۳	۸۷۵-۱۳۰۰	$S_{12}S_{24}$
۲۰	شکوفه	۱۳۶۰-۸۷۵	$S_{24}S_{27}$	۵۵	مشهد-۱۷	۱۲۵۰-۱۳۰۰	$S_{12}S_A$
۲۱	شمشیری	۸۷۵-۱۷۲۰	S_7S_{24}	۵۶	مشهد-۳۰	۱۷۲۰-۶۲۰	S_4S_7
۲۲	شیر بادام	۶۲۰-۴۵۰	S_2S_4	۵۷	مشهد-۴۰	۵۵۰-۱۲۰۰[۱]	S_1S_G
۲۳	شیراز ۱۹	۱۳۶۰-۴۵۰	S_2S_{27}	۵۸	مشهد-۸	۱۳۶۰-۶۲۰	S_4S_{27}
۲۴	شیراز ۴۶	۸۷۵-۴۰۰	$S_{11}S_{24}$	۵۹	مشهد-۹۱	۸۷۵-۴۵۰	S_2S_{24}
۲۵	صفری	۱۲۵۰-۱۳۰۰	$S_{12}S_A$[۱]	۶۰	نی ریز-۱	۸۷۵-۱۳۰۰	$S_{12}S_{24}$
۲۶	عبداله	۱۷۰۰-۱۰۸۰ و[۲] ۲۰۰[۳]	$S_{13}S_J$[۱]	۶۱	هلویی	۲۹۰-۱۰۸۰	$S_{13}S_C$
۲۷	قزوین-۱	۱۷۲۰-۶۲۰	S_4S_7	۶۲	یزد-۱۰۳	۱۳۰۰-۶۲۰	S_4S_{12}
۲۸	قزوین-۲	۱۰۶۵-۳۳۰	S_5S_B	۶۳	یزد-۱۱	۱۷۲۰-۵۷۰	S_6S_7
۲۹	قزوین-۵	۳۰۰-۴۵۰	S_2S_{10}	۶۴	یزد-۱۳	۱۷۲۰-۵۷۰	S_6S_7
۳۰	قزوین-۱۶	۴۵۰-؟	S_2S_J	۶۵	یزد-۱۵	۱۰۸۰-۱۳۰۰	$S_{12}S_{13}$
۳۱	قزوین-۲۵	۱۳۶۰-۱۳۰۰	$S_{12}S_{27}$	۶۶	یزد-۱۷	۳۸۰-۵۵۰	S_GS_H
۳۲	قزوین کا-۱	۱۰۶۵-۱۰۸۰	$S_{13}S_B$	۶۷	یزد-۲	۱۳۰۰-۶۲۰	S_4S_{12}
۳۳	کا-۱-۱۶	۸۷۵-۱۷۲۰	S_7S_{24}	۶۸	یزد-۲۱	۵۵۰-۵۰۰	$S_{21}S_G$
۳۴	کا-۲-۲۹	۱۰۶۵-۲۲۳۰ و ۲۴۷۰	S_8S_B	۶۹	یلدا-۱	۱۷۲۰-۷۵۰	S_1S_7
۳۵	کا-۱۰-۱۱	۸۷۵-۱۵۶۰	S_9S_{24}	۷۰	یلدا-۲	۱۷۲۰-۷۵۰	S_1S_7

*: اندازه باندها اکثراً با استفاده از آغازگرهای اینترون دوم تعیین شده است.

۱: آللها با حروف A تا J جدید می‌باشند، ۲: اندازه باند با استفاده از آغازگرهای جفت اینترون تعیین شده است، ۳: اندازه باند با استفاده از آغازگرهای اینترون اول تعیین شده است، ۴: باندی تکثیر نشد.

بر اساس نتایج، اندازه باندهای حاصل از تکثیر آلل‌ها با استفاده ازآغازگرهای اینترون اول عمدتا کوچک تر از ۵۰۰ جفت باز بوده (به جز آلل S_{14} که اندازه آن برابر ۱۱۰۰ جفت باز است) و از طرفی اندازه باندهای حاصل از تکثیر آلل‌ها خیلی نزدیک به هم می‌باشند (شکل ۲)، لذا تخمین و تعیین آلل‌های خودناسازگاری مشکل خواهد بود که با نتایج Ortega et al. (2005) مطابقت دارد. اگر چه آغازگرهای طراحی شده بر اساس اینترون دوم توسط Tamura et al. (2000) و Ma & Oliveira (2001b) برای شناسایی بعضی از آلل‌های خودناسازگاری در بادام مفید هستند، اما این آغازگرها قابلیت تکثیر همه آلل‌های خودناسازگاری شناخته شده در بادام را ندارند (Valizadeh Kaji et al., 2007; Sanchez-Perez et al., 2004). آغازگرهای دیجنریت اینترون دوم که توسط Sutherland et al. (2004) طراحی شده‌اند، قابلیت تکثیر کلیه آلل‌های شناخته شده و همچنین تکثیر آلل‌های جدید را در ارقام و جمعیت‌های بادام (Ortega et al., 2005) و سایر گونه‌های جنس پرونوس از جمله زردآلو (Sutherland et al., 2004; Zhang et al., 2008) را دارند که نتایج این تحقیق نیز مؤید قابلیت و کارایی بالای این جفت آغازگرها می‌باشد.

Valizadeh Kaji et al. (2007) آلل‌های خودناسازگاری را در ۱۶ رقم بادام ایرانی با استفاده از روش پی‌سی‌آر با ترکیب آغازگرهای AS1II، AmyC5R (Tamura et al., 2000) و CEBASf، (Sanchez-Perez et al., 2004) بررسی کردند که در ۱۲ رقم بادام هر دو آلل ناسازگاری و در ۴ رقم فقط یک آلل، تکثیر گردید. نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که هر دو آلل و یا یک آلل خودناسازگاری در ارقام 'مامایی'، 'سفید'، 'ربیع'، 'منقا'، 'آذر'، 'سهند'، 'بادام هلویی'، 'شیر بادام'، 'حاج میرزایی' و 'خورشیدی' با نتایج گزارش شده توسط Valizadeh Kaji et al. (2007) تفاوت دارد (جدول۴) که با توجه به تنوع ژنتیکی در بادام‌های ایرانی این تفاوت عمدتاً می‌تواند ناشی از تفاوت در نمونه‌های بادام مورد بررسی در دو تحقیق باشد. در این تحقیق ژنوتیپ ناسازگاری رقم ربیع، S_7S_{27} به دست آمد، ولی ژنوتیپ خودناسازگاری این رقم توسط Valizadeh Kaji et al. (2007)، S_7S_X و توسط Zeinalabedini (2007)، S_5S_C گزارش شده است. از آنجایی که در سیستم نام گذاری آلل‌های ناسازگاری در آمریکا از حروف به جای اعداد استفاده می کنند و آلل S_C معادل آلل S_7 در سیستم نام گذاری اروپا است، بنابراین ژنوتیپ گزارش شده برای این رقم در واقع S_5S_7 می‌باشد که فقط از جهت وجود آلل S_7 با نتایج تحقیق حاضر مشابهت دارد. این اختلاف در گزارش ژنوتیپ ناسازگاری شاید به دلیل تفاوت در ژنوتیپ گیاهی مورد استفاده در این بررسی‌ها باشد. در تحقیق حاضر ژنوتیپ ناسازگاری رقم یلدا به صورت S_1S_7 تعیین گردید که با نتایج Valizadeh Kaji et al. (2007) مطابقت دارد. نتایج این تحقیق نشان داد که وجود آلل S_2 در رقم 'سهند'، آلل S_3 در رقم 'آذر' و آلل S_7 در ارقام 'سفید'، 'ربیع' و 'منقا' با نتایج Valizadeh Kaji et al. (2007) مطابقت دارد. Sheikh Alyan (2005) گزارش کرد که ژنوتیپ‌های شماره ۵ و ۱۱ دانشکده دارای یک باند جدید مشترک به اندازه ۱۵۰۰ جفت باز بودند که بر اساس تکثیر DNA هدف با استفاده از آغازگرهای AS1II و AmyC5R (Tamura et al., 2000) تکثیر شده بود. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که ژنوتیپ ۵ دانشکده (G-5) دارای آلل‌های S_1 و S_{14} و ژنوتیپ ۱۱ دانشکده (G-11) دارای آلل‌های $S_{14}S_{22}$ بودند که این ژنوتیپ‌ها در آلل S_{14} (۱۰۵۰ جفت باز) مشترک هستند که با نتایج Sheikh Alyan (2005) از جهت وجود آلل مشترک مطابقت دارد. شناسایی ژنوتیپ خودناسازگاری این ارقام با استفاده از آغازگرهای دیجنریت دلیلی بر توانایی و قابلیت این آغازگرها در تکثیر همه آلل‌های ناسازگاری در بادام است. رقم یلدا دارای ژنوتیپ خودناسازگاری S_1S_7 بود که با نتایج Sheikh Alyan (2005) و Valizadeh Kaji et al. (2007) مشابه است، ولی در نتایج Zeinalabedini (2007) فقط یک باند مربوط به آلل S_1 گزارش شده است.

رقم آذر از تلاقی رقم Ai (S_2S_4) و رقم Cristomorto (S_1S_2) به دست آمده است (Chaychi et al., 2002)، و لذا باید حاوی دو آلل از مجموع چهار آلل فوق (S_1، S_2، S_3 و S_4) باشد و لذا ژنوتیپ (S_1S_3) گزارش شده توسط Valizadeh Kaji et al. (2007) به نظر

منطقی تر می آید. نتایج این تحقیق نشان داد که دو نمونه به عنوان رقم آذر از دو منطقه تبریز و شهرکرد دارای ژنوتیپ خودناسازگاری متفاوت از یکدیگر بودند. ژنوتیپ آذر-۱ از منطقه شهرکرد دارای ژنوتیپ خودناسازگاری S_3S_{27} بود در حالی که آذر-۲ از منطقه تبریز دارای ژنوتیپ خودناسازگاری S_3S_4 است. در واقع هر دو نمونه آذر مورد بررسی احتمالاً آذز واقعی نبوده و حاصل تلاقی این رقم با سایر ارقام می‌باشد. از آنجایی که ارقام خارجی آی (S_3S_4) و فرنانت دبرزند ($S_{24}S_{27}$) جز ارقام شاهرودی موجود در ایران هستند، بر اساس این نتایج، ژنوتیپ آذر-۲ یا همان رقم آی بوده است و یا دارای آلل‌های مشابه با آن می‌باشد و ژنوتیپ آذر-۱ (S_3S_{27}) در اثر گرده‌افشانی آزاد از رقم فرنانت دبرزند ($S_{24}S_{27}$) با یک رقم دارای آلل S_3 مانند آی (S_3S_4) و فرانیس (S_1S_3) به دست آمده است.

رقم شکوفه از شهرکرد دارای آلل $S_{24}S_{27}$ بود که با رقم خارجی فرنانت دبرزند ($S_{24}S_{27}$) دارای ژنوتیپ خودناسازگاری یکسان هستند که احتمالا این دو رقم یکسان بوده و یا دارای آلل‌های مشابه با آن می‌باشد. آلل S_3 از ارقام آذر و شکوفه توسط Sheikh Alyan (2005) و Valizadeh Kaji et al. (2007) گزارش شده است که در رقم آذر-۱ (S_3S_{27}) و آذر-۲ (S_3S_4) این آلل تکثیر شده است، ولی در رقم شکوفه آلل S_3 مشاهده نگردید که احتمالاً به اشتباه یک کلون از رقم خارجی فرنانت دبرزند به نام رقم شکوفه درکلکسیون نام‌گذاری شده است، زیرا با رقم شکوفه (S_3S_7) که از تلاقی نان پاریل (S_7S_8) با رقم آی (S_3S_4) به دست آمده (Chaychi et al., 2002)، متفاوت است. بر اساس نتایج این تحقیق ژنوتیپ خودناسازگاری رقم سهند، S_1S_2 به دست آمد. وجود آلل S_1 توسط Zeinalabedini (2007) و ژنوتیپ خودناسازگاری S_2S_X توسط Valizadeh Kaji et al. (2007) در این رقم گزارش شده است.

بر اساس نتایج به دست آمده در بین جمعیت بادام‌های ایرانی مورد مطالعه در این تحقیق، آلل‌های خود ناسازگاری S_4، S_1، S_{24}، S_7، S_{12} و S_2 به ترتیب با ۱۸/۵، ۱۷، ۱۵/۷ و ۱۴/۳ درصد دارای بیشترین فراوانی در بین رقم‌های بادام ایرانی بودند. Lopez et al. (2006) با بررسی ۱۱۵ رقم بادام اروپایی و آمریکایی که ژنوتیپ ناسازگاری آنها به طور کامل شناسایی شده بود، نشان دادند که آلل‌های خودناسازگاری شامل S_1، S_8، S_7، S_5، S_3 به ترتیب با ۲۳/۳، ۱۲/۳، ۷/۸ و ۷/۸ درصد دارای بیشتری فراوانی در بین آلل‌های خودناسازگاری شناخته شده بادام بودند.

آلل‌های S_4، S_{24}، S_{12} و S_2 که بیشترین فراوانی را در بین بادام‌های ایرانی نشان دادند، در ارقام بادام‌های اروپایی و آمریکایی فراوانی کم تا متوسطی دارند، بنابراین بررسی آلل‌های ناسازگاری می‌توانند به عنوان یک نشانگر مناسب بیان‌کننده تفاوت‌های ژنتیکی بین بادام‌های محلی ایرانی و رقم‌های خارجی باشد.

Ortega et al. (2006)، ۲۰ گروه دگرناسازگاری (۲۰-۱) و یک گروه دهنده عمومی (گروه O) را بین ارقام خارجی بادام گزارش کردند. در این تحقیق پس از تعیین ژنوتیپ خودناسازگاری در ۷۰ رقم و ژنوتیپ بادام ایرانی، نتایج نشان داد که تعداد زیادی از ارقام و ژنوتیپ‌های بادام ایرانی مورد بررسی دارای ژنوتیپ ناسازگاری متفاوت بودند و در گروه دهنده عمومی قرار گرفتند. گروه دهنده عمومی شامل رقم‌هایی است که می‌توانند رقم‌های موجود در سایر گروه‌های دگرناسازگاری را به طور موفقیت آمیزی گرده‌افشانی و تلقیح نمایند و به صورت متقابل توسط رقم‌های موجود در آن گروه‌ها گرده‌افشانی و تلقیح شوند. همچنین، تعدادی از ارقام و ژنوتیپ‌های ایرانی در گروه‌های دگرناسازگاری قبلی شامل گروه‌های ۲، ۴، ۷، ۱۰، ۱۵ و ۱۷ قرار گرفتند. به طور مثال ژنوتیپ E1 شهرکرد در گروه ۲، ارقام یلدا ۱ و یلدا ۲ در گروه ۴، رقم A-2 در گروه ۷، رقم منقا در گروه ۱۰، رقم A230 در گروه ۱۵ و ژنوتیپ‌های کرمان ۲۰ و G2 قزوین در گروه ۱۷ قرار گرفت. تعدادی از ارقام و ژنوتیپ‌های بادام ایرانی دارای ژنوتیپ خودناسازگاری مشابهی بودند، بنابراین تعداد ۹ گروه دگرناسازگاری جدید شامل گروه‌های ۲۱ تا ۲۹ به گروه‌های قبلی (Ortega et al., 2006) اضافه گردید. به طور مثال ارقام سهند و زرقان ۸ با ژنوتیپ ناسازگاری S_1S_2، کا-۱-۱۶ و شمشیری با ژنوتیپ S_7S_{24}، کا-۱۱-۴۰ و زرقان ۷ با ژنوتیپ S_1S_4، نی ریز ۱، مشهد ۱۳ و زنجان ۱ با ژنوتیپ $S_{12}S_{24}$ دارای ژنوتیپ ناسازگاری مشابه بودند و در گروه‌های جدید ناسازگاری قرار گرفتند. بر اساس نتایج این تحقیق و نتایج قبلی تعداد

گروه‌های دگرناسازگاری در ارقام بادام به ۳۰ گروه افزایش یافت.

بر اساس نتایج، با توجه به تکثیر آلل‌های شناخته شده در ارقام بادام ایرانی بر اساس مقایسه اندازه باندهای آنها با ارقام شاهد و نشانگر یک کیلو جفت بازی، آغازگرهای اینترون دوم به دلیل پوشش دادن ناحیه با تنوع بالا (HVR) حد فاصل نواحی حفاظت شده C_2 و C_3 در ساختار ژن ناسازگاری در مقایسه با آغازگرهای اینترون اول و آغازگرهای جفت اینترون و آغازگرهای عمومی قابلیت و کارایی بهتری در شناسایی آلل‌های ناسازگاری دارند. لذا استفاده از آغازگرهای اینترون دوم جهت شناسایی آلل‌های ناسازگاری در جمعیت بادام‌های ایران و نتاج حاصل از تلاقی‌های کنترل شده بسیار مفید و سودمند است و قابلیت بالایی در جهت شناسایی آلل‌های ناسازگاری دارند.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی پردیس کشاورزی ومنابع طبیعی دانشگاه تهران به جهت فراهم آوردن بخشی از هزینه های پژوهش و از وزارت علوم، تحقیقات وفناوری به جهت فراهم نمودن زمینه فرصت مطالعاتی تشکر نموده و از مؤسسه تحقیقاتی CEBAS-SCIC اسپانیا به جهت فراهم آوردن امکانات و هزینه‌های آزمایشگاهی این پژوهش قدردانی می‌شود.

REFERENCES

1. Ballester, J., Boskovic, R., Batlle, I., Arus, P., Vargas, F. & Vicente de, M. C. (1998). Location of the self-incompatibility gene on the almond linkage map. *Plant Breeding*, 117, 69-72.
2. Boskovic, R., Tobutt, K. R., Batlle, I. & Duval, H. (1997). Correlation of ribonuclease zymograms and incompatibility genotypes in almond. *Euphytica*, 97, 167-176.
3. Boskovic, R., Tobutt, K. R., Batlle, I., Duval, H., Martinez-Gomez, P. & Gradziel, T. M. (2003). Stylar ribonucleases in almond: correlation with and prediction of incompatibility genotypes. *Plant Breeding*, 122, 70-76.
4. Certal, A. C., Almeida, R. B., Boskovic, R., Oliveira, M. M. & Feijó, J. A. (2002). Structural and molecular analysis of self-incompatibility in almond (*Prunus dulcis*). *Sexual Plant Reprod*uction, 15, 13-20.
5. Channuntapipat, C., Wirthensohn, M., Ramesh, S. A., Batlle, I., Arús, P., Sedgley, M. & Collins, G. (2003). Identification of incompatibility genotypes in almond using specific primers based on the introns of the *S*-alleles. *Plant Breeding*, 122, 164-168.
6. Channuntapipat, C., Sedgley, M., Batlle, I., Arús, P. & Collins G. (2002). Sequences of the genomic cDNAs encoding the S2, S9, S10, and S23 alleles from almond, *Prunus dulcis*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 77(4), 387-392.
7. Channuntapipat, C., Sedgley, M. & Collins, G. (2001). Sequences of the cDNAs and genomic DNAs encoding the S1, S7, S8, and Sf alleles from almond, *Prunus dulcis*. *Theorical and Applied Genetics*, 103, 1115-1122.
8. Chaychi, S., Hassanzadeh, N., Mashhadi Jafarloo, M. & Bybordi, A. (2002). Almond Manual: Agricultural Research and Education Organization, Ministry of Jihad-e Agriculturre, Pp.172. (In Farsi).
9. Crossa-Raynaud, P. & Grasselly, C. (1985). Existence de groupes 'intersterilite chez l'amandier. *Options Me´diterrane´ennes. Serie Etudes* 1, 43-45.
10. Dicenta, F. & Garcia, J. E. (1993). Inheritance of self-compatibility in almond. *Heredity*, 70, 313-317.
11. Dicenta, F., Ortega, E., Martınez-Gomez, P., Boskovic, R. & Tobutt, K. R. (2002): Comparison of homozygous and heterozygous self-compatible seedlings in an almond breeding programme. *Euphytica*, 124, 23-27.
12. Doyle, J. J. & Doyle, J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemistry Bulletin, 19, 11-15.
13. Halasz, J., Hegedus, A., Herman, R., Stefanovits-Banyai, E. & Pedryc, A. (2005). New self-incompatibility alleles in apricot (*Prunus armeniaca* L.) revealed by stylar ribonuclease assay and *S*-PCR analysis. *Euphytica*, 145, 57-66.
14. Halasz, J., Hegedûs, A. & Pedryc A. (2006). Review of the molecular background of self-incompatibility in rosaceous fruit trees. *International Journal of Horticultural Science*, 12(2), 7-18.
15. Halasz, J. & Hegedûs, A. (2006). A critical evaluation of methods used for *S*-genotyping: from trees to DNA level. *International Journal of Horticultural Science*, 12(2), 19-29.
16. Kester, D. E. & Gradziel, T. M. (1996). Almonds (*Prunus*). In: Moore, J.N. and Janick, J. (eds.). *Fruit Breeding*. Vol. 3, New York: Wiley. Pp. 1-97

17. Kester, D. E., Gradziel, T. M. & Micke, W. C. (1994). Identifying pollen incompatibility groups in California almond cultivars. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 119,106-109.
18. Kodad, O., Alonso, J. M., Sanchez, A., Oliviera, M. M. & Socias i Company, R. (2008). Evaluation of genetic diversity of *S*-alleles in an almond germplasm collection. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 83(5), 603-608.
19. Lopez, M., Vargas, F. J. & I. Batlle. (2006). Self-(in) compatibility almond genotypes: A review. *Euphytica*, 150, 1-16.
20. Ma, R. C. & Oliveira, M. M. (2001a). Molecular identification of s-genotypes of almond (*Prunus dulcis*). *Acta Horticulturae*, 546, 575-580.
21. Ma, R. C. & Oliveira, M. M. (2001b). Molecular cloning of the self-incompatibility genes S1and S3 from almond (*Prunus dulcis* cv. Ferragnès). *Sexual Plant Reproduction*, 14, 163-167.
22. McClure, B. A. & Franklin-Tong, V. (2006). Gametophytic self-incompatibility: understanding the cellular mechanisms involved in "self" pollen tube inhibition. *Planta*, 224, 233-245.
23. McCubbin, A. G. & Kao, T. H. (2000). Molecular recognition and response in pollen and pistil interactions. *Annual Review Cell. Developmental Biology*, 16, 333-364.
24. Murray, H. C. & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acid Research*, 8, 4321-4325.
25. Nettancourt, de D. (1997). Incompatibility in angiosperms. *Sex Plant Reprod*, 10, 185-199.
26. Ortega E., Egea, J., Cánovas, J. A. & Dicenta, F. (2002). Pollen tube dynamics following half- and fully-compatible pollinations in self-compatible almond cultivars. *Sexual Plant Reproduction*, 15, 47-51.
27. Ortega, E. & Dicenta, F. (2003). Inheritance of self-compatibility in almond: breeding strategies to assure self-compatibility in the progeny. *Theorical and Applied Genetics*, 106, 904-911.
28. Ortega, E. & Dicenta, F. (2004). Suitability of four different methods to identify self-compatible Seedlings in an almond breeding programme. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 79(5), 747-753.
29. Ortega, E., Sutherland, B. G., Dicenta, F., Boskovic, R. & Tobutt, K. R. (2005). Determination of incompatibility genotypes in almond using first and second intron consensus primers: detection of new S alleles and correction of reported S genotypes. *Plant Breeding*, 124, 188-196.
30. Ortega, E., Boskovic, R., Sangent, D. J. & Tobutt, K. R. (2006). Analysis of S-RNase alleles of almond (*Prunus dulcis*): characterization of new sequences, resolution of synonyms and evidence of intragenic recommendation. *Molecular. Genetics and Genomics*, 76, 413-426.
31. Sanchez-Perez, R., Dicenta, F. & Martinez-Gomez, P. (2004). Identification of *S*-alleles in almond using multiplex PCR. *Euphytica*, 138, 263-269.
32. Sheikh Alyan, A. (2005). *Study of phenotypic and molecular among some hybrids mass on almond*. M.Sc. thesis in Horticultural Science, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Iran. (In Farsi).
33. Socias i Company, R. (1990). Breeding self-compatible almonds. *Plant Breeding. Review*, 8, 313-338.
34. Sonneveld, T., Tobutt, K. R. & Robbins T. P. (2003). Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (*S*) alleles *S*1 to *S*16 using consensus and allele-specific primers. *Theorical and Applied Genetics*, 107, 1059-1070.
35. Sonneveld, T., Robbins, T. P., Boskovic, R. & Tobutt, K. R. (2001). Cloning of six cherry self-incompatibility alleles and development of allele-specific PCR detection. *Theorical and Applied Genetics*, 102, 1046-1055.
36. Sutherland, B. G., Tobutt, K. R. & Robbins, T. P. (2008). Trans-specific *S*-RNase and SFB alleles in *Prunus* self-incompatibility haplotypes. *Molecular Genetics and Genomics*, 279, 95-106.
37. Sutherland, B. G., Robbins, T. P. & Tobutt, K. R. (2004). Primers amplifying a range of Prunus S-alleles. *Plant Breeding*, 123, 582-584.
38. Tamura, M., Ushijima, K., Sassa, H., Hirano, H., Tao, R., Gradziel, T. M. & Dandekar, A. M. (2000). Identification of self-incompatibility genotypes of almond by allele-specific PCR analysis. *Theorical and Applied Genetics*, 101, 344-349.
39. Tao, R., Yamane, H., Sassa, H., Mori, H., Gradziel, T. M., Dandekar, A. M. & Sugiura A. (1997). Identification of stylar RNases associated with gametophytic self-incompatibility in almond (*Prunus dulcis*). *Plant Cell Physiology*, 38(3), 304-11.
40. Ushijima, K., Sassa, H., Tao, R., Yamane, H., Dandekar, A. M., Gradzie, T. M. & 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 Genetics and Genomics*, 260, 261-268.
41. Ushijima, K., Sassa, H., Dandekar, A. M., Gradziel, T. M., Tao. R. & Hirano H. (2003) Structural and transcriptional analysis of the self-Incompatibility locus of almond: identification of a pollen-expressed F-Box gene with haplotype-specific polymorphism. *The Plant Cell*, 15, 771-781.

42. Valizadeh Kaji, B., Ershadi, A. & Gholami, M. (2007). Identification of self-incompatibility alleles in some Iranian and forign almond (*Prunus dulcis* M.) cultivars using PCR. *Iranian Journal of Horticultural science and Technology*, 8(4), 249-258. (In Farsi).
43. Zeinalabedini, M. (2007). *Study of genetic relationships among some of almond cultivars and Prunus related species with using SSR markers*. Ph. D. thesis in Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Iran. (In Farsi).
44. Zhang, L., Chen, X., Chen, X., Zhang, C., Liu, X., Ci, Z., Zhang, H., Wu, C. & Liu, C. (2008). Identification of self-incompatibility (*S*-) genotypes of Chinese apricot cultivars. *Euphytica*, 160, 241-248.