سومین کنفرانس ملی فیزیولوژی گیاهی ایران – ۱۷ تا ۱۹ اردیبهشت ۱۳۹۳، دانشگاه صنعتی اصفهان
Iranian Society of Plant Physiology

مطالعه سازگاری برخی از ارقام و ژنوتیپ‌های بادام با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

فلاح مهدی* [۱]، شرفی[۱] یاور ، رسولی موسی[۲] و ایمانی[۳] علی

[۱و۲] به ترتیب، دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار گروه علوم باغبانی دانشگاه شاهد تهران، [۲]، استادیار گروه علوم باغبانی دانشگاه ملایر، [۳]، دانشیار بخش تحقیقات باغبانی، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج.

fallah_mahdi@yahoo.com

بادام (*Prunus dulcis L.*) یکی از مهمترین گونه‌های جنس *prunos* می‌باشد که اکثر ارقام و ژنوتیپ‌های آن خودناسازگار و برخی نیز دگرناسازگار هستند، بنابراین برای گرده‌افشانی، تلقیح و تولید محصول تجاری نیازمند دانه‌گرده سازگارسایر ارقام یا مادگی خود می‌باشند. خودناسازگاری موجود در ارقام مختلف بادام از نوع گامتوفیتیک است که به وسیله یک مکان ژنی بنام S در مادگی و مکان ژنی SF در گرده کنترل می‌شود. در این مطالعه باندهای مربوط به آلل‌های خودناسازگاری در سه رقم Tuano، شکوفه، سهند و پنج ژنوتیپ برتر $A_{1.16}$، $A_{9.7}$، $A_{8.39}$، $A_{10.11}$، A_{230} حاصل از برنامه‌های اصلاحی در موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج، با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR) و با استفاده از آغازگرهای دژنره(EM-PC1consRD ،EM-PC2consFD ،EM-PC3consRD ،PaCosI-F) تعیین گردید. با استفاده از آغازگرهای موجود و براساس اندازه جفت بازها، ده باند مختلف در ارقام و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه شناسایی گردید، براساس نتایج ژنوتیپ‌های $A_{8.39}$ با $A_{10.11}$ صددرصد ناسازگار و سهند، A_{230} و Tuano پنجاه درصد ناسازگار می‌باشند. همچنین، رقم Tuano و ژنوتیپ $A_{1.16}$ دارای باند مربوط به آلل خودسازگاری هستند.

واژه‌های کلیدی: بادام، آلل‌های خودناسازگاری، آغازگرهای دژنره، PCR

Compatibility relationships among some almond genotypes and cultivars using PCR .

Mehdi Fallah[1], Yavar Sharafi[1], Mousa Rasouli[2] and Ali Imani[3]

1- *Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Shahed University, Tehran, Iran.*
2- *1Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Malayer University, Malayer, Iran.*
3- *Horticultural Departments of Seed and Plant Improvement Institute (SPII), P.O. Box31585-4119 Karaj, Iran*

fallah_mahdi@yahoo.com

Almond (*Prunus dulcis* Botch.) is one of the most important nut crops of Iran. Almond cultivars have self and cross incompatibility which prevents high quantitative yields in orchards. Self- incompatibility states with S alleles. However, knowledge about S alleles before orchard establishment is very efficient in cultivar selection. In this study compatibility relationships of 8 almond genotypes and cultivars were investigated by PCR with EM-PC3consRD ,PaCosI-F ,EM-PC1consRD ,EM-PC2consFD Results showed that all of the studied genotypes and cultivars are not cross compatible.

مقدمه

بادام (*Prunus dulcis*) یکی از مهمترین میوه‌های خشک مناطق معتدله می‌باشد که اکثر ارقام آن خودناسازگار هستند و برای تولید میوه تجاری نیاز به گرده‌افشانی با دانه گرده مناسب و سازگار دارند بنابراین، تعیین سازگاری ارقام قبل از احداث باغ از اهمیت بالایی در تولید بادام برخوردار است(رسولی و همکاران ۱۳۸۸، شرفی و همکاران 2010) . انتخاب گرده‌زاهای سازگار با رقم اصلی می‌تواند در تولید محصولی با کمیّت و کیفیّت بالا موثر باشد (Kester et al, 1994). خودناسازگاری موجود در ارقام مختلف بادام و گونه‌های دیگر جنس *Prunus* از نوع گامتوفیتیک می‌باشد (Dicenta et al, 1993). لازم به ذکر است که آلل‌های ناسازگاری جنس *Prunus* دارای دو اینترون هستند (Martinez Gomez et al, 2003). شناخت کافی سازگاری بین گرده و مادگی ارقام مختلف درختان میوه یکی از جنبه‌های بسیار مهم در باردهی است که از دیدگاه میوه‌کاری

همچنین، در گزینش درختان گرده‌زای مناسب برای ارقام جدیدی که از برنامه‌های اصلاحی معرفی می‌شوند، از اهمیت ویژه ای برخوردار می‌باشد(Dicenta et al, 2002).

مواد و روشها

مواد گیاهی بکار رفته در این آزمایش شامل سه رقم (سهند، A_{230} و Tuano) و پنج ژنوتیپ برتر($A_{1.16}$، $A_{8.39}$، $A_{9.7}$، $A_{10.11}$ و A_{23}) حاصل از برنامه‌های اصلاحی در باغ کلکسیون تحقیقاتی مشکین شهر واقع در کیلومتر۷ جنوب شهرستان کرج وابسته به موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر وزارت جهاد کشاورزی بودند.

استخراج DNA ، PCR، الکتروفورز و رنگ‌آمیزی: استخراج DNA با روش Doyl and Doyl (1987) با کمی تغییرات انجام گرفت. بافر استخراج شامل ۱۰۰ میلی‌مولار تریس PH=8، ۲۰میلی‌مولار EDTA، ۱/۴ میلی‌مولار کلرید سدیم، ۲ درصد هگزاستیل تری متیل آمونیوم بروماید (CTAB) ، ۲درصد پلی‌وایتیل پیرولیدین(PVP) و ۲ درصد ۲–بتا مرکاپتواتانول استفاده شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز روی ژل آگارز 2% تعیین شد. شرایط وکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگرهای دجنریت اینترون اول و اینترون دوم در حجم ۲۰ میکرولیتر باروش Ortega et al(2005) و Satherland et al(2004) شامل ۲میکرولیتر بافرPCR (10X)، ۰/۸ میکرولیتر کلرید منیزیم، ۲ میکرولیتر از مخلوط نوکلئوتید (dNTP)، ۱/۲ میکرولیتر ازهرآغازگر رویه‌جلو و رویه‌عقب،۳ میکرولیتر DAN ژنومی، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم تک (Taq) پلیمراز و۹/۶ میکرولیتر آب مقطر انجام گرفت. برای تکثیر آلل‌های S از آغازگرهای دجنریت PaConsI-F، EM-PC1consRD، EM-PC2consFD، EM-PC3consRD. برای تکثیر اینترون دوم ازآغازگرهای رو به جلو EM-PC2consFD و رو به عقب EM-PC3consR (satherland et al, 2004) و جهت تکثیر اینترون اول از آغازگرهای رویه جلو PaConsI-F (sonneveld et al, 2003) و آغازگر رویه عقب EM-PC1consRD (Ortega et el, 2005) استفاده گردید. شرایط دما و زمان واکنش PCR بر اساس روش Ortega et al (2005) انجام گرفت. الکتروفورز محصولات PCR در بافر TAE انجام گرفت.الکتروفورز به مدت ۲/۵ ساعت و با ولتاژ ۷۵ انجام گرفت. رنگ‌آمیزی ژل در محلول اتیدیوم بروماید با غلظت ۰/۸ سی سی در لیتر به مدت ۳ دقیقه انجام شد و پس از آن، عکسبرداری از باندهای تکثیر شده توسط دستگاه ژل داک انجام گرفت. اندازه نوارهای حاصله با استفاده از یک نشانگر 3000 bp تعیین و بر اساس اندازه این باندها سازگاری بین ژنوتیپ‌ها یا ارقام بررسی شد.

نتایج و بحث

بر اساس نتایج حاصل از تکثیر آلل‌های S با استفاده از آغازگرهای دژنره اینترون اول و اینترون دوم در تمامی ارقام وژنوتیپ-های مورد مطالعه در این پژوهش تمامی اندازه باندهای بدست آمده با اندازه باند آلل‌هایی که قبلا شناسایی شده بودند مطابقت داشته و هیچ باندی با اندازه جدید مشاهده نگردید. (شکل ۲ و ۱).

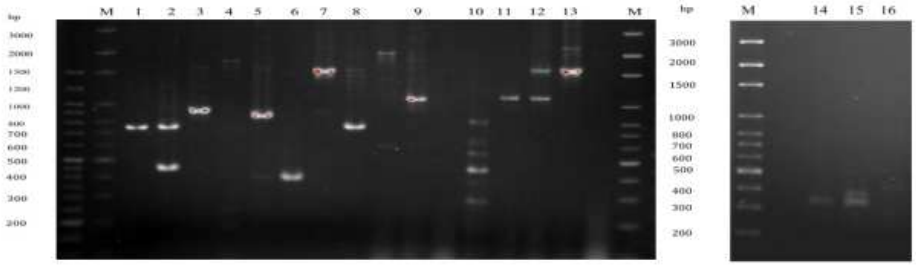
S_7)، $A_{9.7}$ (S_{24} و S_{12})، $A_{8.39}$ (S_{11} و S_9)، $A_{10.11}$ (S_9 و S_9) و A_{230} (S_1 و S_5) می‌باشند(جدول ۱).

جدول۱- آلل‌های ناسازگاری و انداز باندهای مربوط به این آلل‌ها در ارقام وژنوتیپ‌های مورد مطالعه

ردیف	رقم	اندازه باند(جفت باز)	ژنوتیپ خوداسازگاری
۱	Tuano	۷۵۰و ۲۵۰	S_1S_7
۲	سهند	۱۱۳۰ و ۷۵۰،۴۵۰	S_1S_2
۳	شکوفه	۹۰۰ و ۳۰۰	S_1S_3
۴	$A_{1.16}$	۱۷۲۰ و ۴۵۰	S_5S_7
۵	$A_{9.7}$	۸۷۵ و ۱۳۰۰	S_12S_{24}
۶	$A_{8.39}$	۱۵۶۰،۱۳۰۰ و ۴۰۰	S_9S_{11}
۷	$A_{10.11}$	۱۵۶۰ و ۱۵۶۰	S_9S_9
۸	A_{230}	۷۵۰ و ۳۳۰	S_5S_1

شکل ۱: M نشانگرDNA (جفت باز)، ۱)اینترون دوم Tuano، ۲)اینتروم دوم سهند، ۳)اینترون دوم شکوفه، ۴) اینترون دوم $A_{1.16}$، ۵)اینترون دوم$A_{9.7}$، ۶) اینترون دوم $A_{8.39}$، ۷) اینترون دوم $A_{10.11}$، ۸) اینترون دوم A_{230}، ۹)اینترون اول سهند، ۱۰)اینترم اول $A_{1.16}$، ۱۱)اینترون اول $A_{9.7}$، ۱۲) اینترون اول $A_{8.39}$، ۱۳)اینترون اول $A_{10.11}$، شکل ۲-۱۴) اینترون اول A_{230}، ۱۵) اینترون اول شکوفه، ۱۶)اینترون اول Tuano.

آغازگرهای اینترون اول و اینترون دوم بکار رفته در این پژوهش قادر به شناسایی ۱۰ آلل ناسازگاری در ارقام و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بودند که شامل ارقام Tuano (S_7 و S_1)، سهند (S_2 و S_1)، شکوفه (S_3 و S_{10}) و ژنوتیپ‌های $A_{1.16}$ (S_7 و



شکل (۲) شکل (۱)

بر اساس نتایج ارقام سهند، Tuano و ژنوتیپ A_{230} به دلیل داشتن آلل S_1 ناسازگاری مشترک، ۵۰ درصد ناسازگار و ژنوتیپ‌های $A_{8.39}$ با $A_{10.11}$ به دلیل داشتن آلل S_9 ناسازگاری مشترک، صددرصد ناسازگار می‌باشند. ژنوتیپ‌های $A_{8.39}$ (S_9S_{11}) و A9.7 (S_{24} و S_{12}) صددر صد دگرسازگار می‌باشند ولی بر اساس نتایج حاصل از تکثیر با آغازگرهای اینترون اول در ژنوتیپ $A_{8.39}$ اندازه باند ۱۳۰۰ کیلو جفت باز نیز مشاهده گردید. بر اساس نتایج حاصل از تکثیر با آغازگرهای اینترون دوم، آلل‌های خوداسازگاری رقم سهند S_1S_2 بدست آمد که با نتایج سایر محققین مطابقت داشت همچنین، نتایج حاصل از تکثیر با آغاز گرهای اینترون اول در رقم سهند یک باند با اندازه ۱۱۳۰ جفت باز نیز نشان داد. نتایج حاصل از تکثیر با آغازگرهای اینترون اول و اینترون دوم در رقم شکوفه آلل‌های خوداسازگاری S_3S_{10} را در این رقم نشان داد. آلل S_3 شکوفه توسط

Sheikh allyan (2005) و Valizadeh kaji et al (2007) گزارش شده است. آلل S_3 بدست آمده در این پژوهش با آلل‌های خودناسازگاری شکوفه (S_3S_4) حاصل از تلاقی رقم نان‌پاریل (S_7S_8) با رقم آی(S_3S_4) بدست آمده توسط Chaychi et al (2002) مطابقت دارد. وجود آللS_{10} در رقم شکوفه مورد بررسی احتمالا به دلیل تطابق ضعیف آغازگرهای اینترون اول با توالی هدف مربوط به آللS_4 یا تلاقی ناخواسته رقم شکوفه با سایر ارقام می‌باشد. در نتایج حاصل از تکثیر با آغازگرهای اینترون اول در رقم Tuano وژنوتیپ $A_{1.16}$ آلل خودسازگاری SF با اندازه باند ۴۵۰ کیلو جف باز مشاهده شد که برای اثبات خودسازگار بودن این رقم و ژنوتیپ نیازمند توالی‌یابی باند آنها یا تلاقی کنترل شده می‌باشد. شناسایی آلل‌های ناسازگاری در نمونه‌های بکار رفته در این تحقیق بخوص شناسایی آلل‌های ناسازگاری در ژنوتیپ‌های برتر ($A_{8.39}$، $A_{9.7}$، $A_{10.11}$، $A_{23.0}$، $A_{1.16}$) حاصل از برنامه‌های اصلاحی این امکان را فراهم می‌کند تا ارقام و ژنوتیپ‌های سازگار را برای احداث باغ‌های تجاری بادام و به منظور دست یابی به عملکرد بیشتر انتخاب کرد.

منابع:

۱. رسولی م.، فتاحی‌مقدم م.، زمانی ذ.، ایمانی ع.، عبادی ع. ۱۳۸۸ بررسی سازگاری و تاثیر گرده‌افشانی تکمیلی رقم سوپرنووا با گرده ارقام مختلف بادام. مجله علوم باغبانی ایران دوره ۴۰،۴ : ۶۱ – ۷۰.

2- 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).

3- Dicenta, F., García, J., Carbonell, E. 1993. Heritability of flowering productivity and maturity in almond. Hortic Scien 68:113–120.

4- Dicenta, F., Ortega, E. Canovas, J, A. and Egea, J. 2002. Self-pollination vs. cross pollination in almond; pollen tub growth, fruit set and fruit characteristics. Plant Breed 121: 163-167.

5- Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemistry Bulletin 19: 11-15.

6- Kester, D. E., Gradziel, T. M. and Micke, W. C. 1994. Identifying pollen incompatibility groups in California almond cultivars. J. Amer. Soc Hort Sci 119: 106-109.

7- Martinez Gomez, P. Alonso, J. M., Lopez, M., Battle. I., Ortega, E., Sanchez-perez, R. and Disenta, F. 2003. Identification of self-incompatibility alleles in almond and related *Prunus* species using PCR. Genet123: 397-401.

8- 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 Breed, 124, 188-196.

9- Sharafi, Y., karimi, M., and Ghorbanifar, M. 2010. Study of pollen tub cross-compatibility and fruit set in some almond genotypes. Afric J Plant Sci 4:134-137.

10-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).

11- Sonneveld, T., Tobutt, K. R. & Robbins T. P. (2003). Allele-specific PCR detection of sweet cherry self-incompatibility (S) alleles S1 to S16 using consensus and allele-specific primers. Theorical and Applied Genetics, 107, 1059-1070

12- Sutherland, B. G., Robbins, T. P. & Tobutt, K. R. 2004. Primers amplifying a range of Prunus S-alleles. Plant Breed, 123, 582-584.