مجله علوم باغبانی ایران
دوره ۴۱، شماره ۳، ۱۳۸۹ (۲۵۲-۲۴۷)

تعیین و شناسایی آلل‌های خودناسازگاری (S-آلل) در ژنوتیپ‌های و ارقام منتخب ایرانی و خارجی بادام به روش PCR

ابوذر شیخ علیان[1]*، علی وزوایی[2]، علی عبادی[3]، محمدرضا فتاحی مقدم[4] و علی سرخوش[5]
۱، ۲، ۳، ۴، ۵، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار، استاد، دانشیار و دانشجوی سابق دکتری
پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۸۷/۱۲/۱۰ - تاریخ تصویب: ۸۸/۱۱/۴)

چکیده

بادام با نام علمی *Prunus dulcis* Miller [D.A. Webb] دارای خودناسازگاری گامتوفیتیک است. برای کشت وسیع و تجاری بادام استفاده از ارقام خودسازگار و کشت حداقل دو رقم سازگار با هم الزامی است. تعیین خودناسازگاری در بادام روش‌های متعددی دارد که جدیدترین آنها استفاده از آغازگرهای اختصاصی به روش PCR است. در این آزمایش از جفت آغازگر اختصاصی AS1II و AmyC5R برای تعیین آللهای خودناسازگاری در بعضی ارقام ایرانی، ژنوتیپ‌های برتر در کلکسیون پردیس کشاورزی دانشگاه تهران و چند رقم خارجی به عنوان شاهد، استفاده شد. این جفت آغازگر برای تعیین آلل‌های خودناسازگاری (S- آلل) S_1، S_2، S_3، S_5، S_7، S_9، S_{10}، S_{11}، S_{12} و S_{13} مناسب است. نتایج به دست آمده در این آزمایش نشان داد که اندازه باندهای ارقام خارجی با گزارش‌های ارائه شده به طور کامل مطابقت دارد. بنابراین باندهای شناخته شده مربوط به ارقام خارجی ملاک مقایسه باندهای مربوط به ژنوتیپ‌ها و ارقام ایرانی مورد بررسی قرار گرفت. با مقایسه اندازه باندها نوع آلل خودناسازگاری مربوط به ژنوتیپ یا رقم مورد مطالعه پیش‌بینی گردید. اندازه باندهای ارقام ایرانی و ژنوتیپ‌های برتر مرکز تحقیقات باغبانی پردیس کشاورزی دانشگاه تهران عبارتند از: "یلدا" به اندازه ۱۱۰۰ و ۲۰۰۰ جفت باز متعلق به S_1 و S_7؛ "شاهرودی-۵"، "آذر" و "شکوفه" به اندازه ۱۲۰۰ جفت باز متعلق به S_f یا S_3؛ "تلخ-۱۳" با باندی به اندازه ۲۰۰۰ جفت باز متعلق به S_7 و باندی به اندازه ۱۶۰۰ جفت باز متعلق به S_{12}؛ ژنوتیپ دیرگل شماره ۵ به اندازه ۱۲۰۰ و ۱۴۰۰ جفت باز که متعلق به S_1 و S_{13}؛ ژنوتیپ دیرگل شماره ۱۱ به اندازه ۱۴۰۰ جفت باز متعلق به S_{13} می باشد.

واژه‌های کلیدی: بادام، خودناسازگاری، آغازگر، آلل، PCR.

مقدمه

بادام از خانواده رزاسه[1] با نام علمی *Prunus dulcis* Miller [D.A. Webb] می‌باشد. بادام به همراه محصولاتی مانند انگور، زیتون و انجیر در جریان تمدن‌های اولیه در سراسر آسیای مرکزی و جنوب غربی پراکنده شده است (Arshi & Sherafatian, 2002; Zohary & Spiegel-Roy, 1975) که در این بین بادام دارای ارزش اقتصادی، دارویی و آرایشی است.

1. Rosaceae

* نویسنده مسئول: ابوذر شیخ علیان تلفن: ۰۹۱۳-۱۱۹۰۷۷۷ E-mail: Abuzar_7@yahoo.com

اغلب ارقام بادام دارای خودناسازگاری از نوع گامتوفتیک[1] هستند که توسط یک مکان ژنی چند آللی کنترل می‌شود. وجود این پدیده فیزیولوژیکی منجر به کاهش عملکرد بادام مخصوصاً در مورد کشت یک رقم می‌شود، بنابراین به منظور احداث باغ‌های تجاری بادام کشت حداقل دو رقم سازگار با هم ضرورت دارد. به این علت شناسایی آلل‌های خودناسازگار (S-آلل) به خصوص در ارقام ایرانی و ژنوتیپ‌های برتر برای تعیین ارقام گرده دهنده از اهمیت ویژه ای برخوردار است.

یکی از روش‌های اولیه برای تعیین خودناسازگاری در بادام استفاده از کیسه برای پوشاندن گل قبل از گرده‌افشانی و بررسی میزان باروری است (Janick & Moore, 1996; Sanchez-Perez et al., 2004). با خودگرده‌افشانی[2] مصنوعی و مشاهده جوانه‌زنی و رشد لوله گرده توسط میکروسکوپ فلورسنت می‌توان خودناسازگاری ارقام را تعیین نمود.

روش‌های متعددی برای تشخیص خودناسازگاری ارقام بادام به جای گرده‌افشانی کنترل شده ابداع شده است که شامل الکتروفورز غیرمتوازن شیب pH[3] (Ballester et al., 1998; Boskovic et al., 1997)، 2D-PAGE با استفاده از NEPHGH (Kester, 1993)، الکتروفورز ایزوالکتریک فوکوسینگ ژل پلی اکریل آمید[4] (Hiratsuka, 1995) و درحال حاضر واکنش زنجیره ای پلیمراز اختصاصی آلل PCR می‌باشد (Channuntapipat et al., 2001; Ma & Oliveira, 2001a,b; Ortega & Dicenta, 2004).

شناسایی ژنوتیپ‌های خودناسازگار بوسیله PCR، بر مبنای تکثیر DNA هدف، توسط آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای توالی DNA رمزکننده S- آلل‌ها است که به دنبال آن الکتروفورز افقی و رنگ‌آمیزی[5] صورت می‌گیرد. استفاده از PCR برای شناسایی S-آلل از روش‌های جدیدی است که کاربرد آن هر روز افزایش می‌یابد.

در یک تحقیق ضمن بکارگیری چهار روش تعیین خودناسازگاری در ژنوتیپ‌های بادام، شامل: کیسه پوشاندن شاخه‌ها، میکروسکوب فلورسنت، روش NEPHGE و PCR، مزایا و معایب آنها مورد بررسی قرارگرفت. نتایج آن نشان داد که مناسب‌ترین روش برای تشخیص آلل‌های خودناسازگاری در دوره نونهالی و قبل از بلوغ استفاده از روش PCR است (Ortega & Dicenta, 2004). مبنای مولکولی خودناسازگاری گامتوفتیک به صورت گسترده توسط پژوهشگران مختلفی بررسی شده است (Franklin et al., 1995; Hinata et al., 1993; Kao & McCubbin, 1996; Newbigin et al., 1993; Stone & Goring, 2001).

با شناسایی آلل‌های کنترل‌کننده صفت خودناسازگاری می‌توان میزان خودناسازگاری و میزان دگرناسازگاری احتمالی بین ژنوتیپ‌ها را پیش‌بینی نمود. استفاده از PCR بر سرعت شناسایی کمک می‌کند. بر همین اساس هدف از انجام این پژوهش تعیین آلل‌های مربوط به خودناسازگاری بادام به روش PCR و تعیین کارآیی آن در شناسایی ژنوتیپ‌های برتر (دیرگل) کلکسیون مرکز تحقیقات باغبانی پردیس کشاورزی دانشگاه تهران و بعضی ارقام ایرانی می باشد.

مواد و روش‌ها

ژنوتیپ‌های بادام مورد استفاده در این بررسی از کلکسیون بادام مرکز تحقیقات گروه علوم باغبانی پردیس کشاورزی دانشگاه تهران واقع در جاده محمدشهر در بهار ۱۳۸۳ تهیه شدند. نمونه‌های برگی از ژنوتیپ‌های شماره ۵، ۱۱ جمع‌آوری شدند که دیرگل‌ترین ژنوتیپ‌های کلکسیون هستند که گلدهی آنها همزمان با گلدهی درختان سیب، گلابی و گیلاس باغ بود.

در خردادماه از برگ‌های جوان و بالغ نمونه‌گیری انجام شد. نمونه‌ها بلافاصله پس از برداشت داخل کیسه‌های شماره دار و درون پلاستوفوم دستی که حاوی یخ خرد شده بود قرارگرفتند. این نمونه‌ها سریعاً به آزمایشگاه حمل و در یخچال با دمای ۱۸°C- نگهداری شدند. نمونه‌های دوم که شامل ارقام داخلی و خارجی بودند از شهرکرد تهیه و مانند نمونه‌های قبلی آماده استخراج DNA شدند.

1. GSI: Gametophytic Self-incompatibility
2. Selfpollination
3. Non-equilibrium pH gradiant electro-focusing
4. IEF-PAGE
5. Staining

استخراج DNA از نمونه‌های برگی با استفاده از روش Murry & Thompson (1980) صورت گرفت. کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA با استفاده از روش اسپکتروفتومتری در طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و الکتروفورز ژل آگارز با غلظت یک درصد تعیین گردید و سپس نمونه‌ها به غلظت ۵ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شدند.

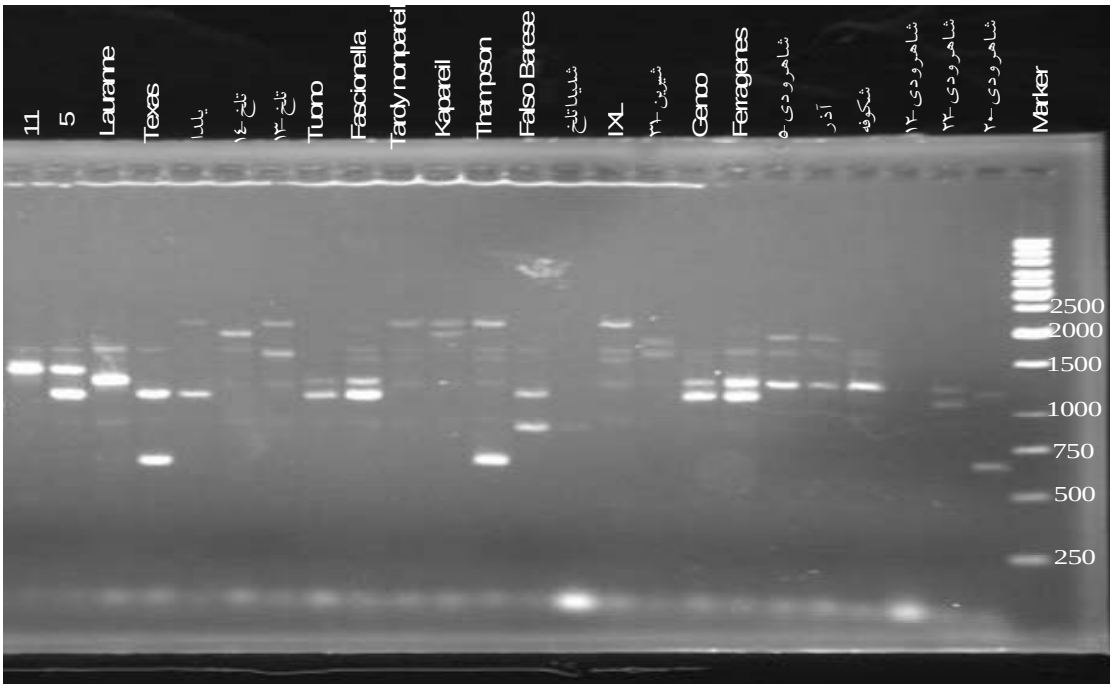
تعداد یک جفت آغازگر اختصاصی AS1II و AmyC5R در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. توالی این آغازگر به شرح زیر است (Tamura et al.,1999):

AS1II : 5' TATTTTCAATTTGTGCAATGG 3'
AmyC5R:5' CAAAATACCACTTCATGTAACAAC 3'

واکنش PCR با حجم ۲۵µl، شامل بافر واکنش PCR به صورت ۱X، ۷۵/ mM $MgCl_2$ ، مخلوط dNTP ۰/۲ mM، ۰/۴ µM آغازگر، ۱ واحد آنزیم Taq پلیمراز (SmarTaq، شرکت سیناژن- ایران) و ۲۰ ng از DNA الگو بود. شرایط PCR با چرخه های دمایی بصورت یک چرخه ۵ دقیقه در دمای ۹۴°C برای واسرشت سازی DNA ژنومی، تعداد ۳۰ چرخه در دمای ۹۴°C به مدت یک دقیقه، در دمای ۵۳°C به مدت یک دقیقه و در دمای ۷۲°C به مدت دو دقیقه برای تکثیر قطعات و در نهایت یک چرخه ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه برای تکمیل قطعات با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر Bio-Rad مدل I-Cycler انجام گردید.

پس از انجام واکنش PCR به محتویات هر لوله مقدار ۵ میکرولیتر بافر بارگذاری اضافه گردید و ۲۰ میکرولیتر از مخلوط حاصله در چاهک‌های ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TBE[1] ریخته شد. نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت با جریان ۱۰۰ ولت الکتروفورز شدند. پس از این مرحله ژل به مدت ۳۰ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید ۰/۵µg/l رنگ‌آمیزی شد. قطعات تکثیر یافته DNA تحت نور ماوراء بنفش[2] مشاهده و سپس توسط دستگاه، عکسبرداری از ژل[3] صورت گرفت (شکل ۱). با مقایسه اندازه باندهای ارقام و ژنوتیپ‌های مختلف و مقایسه آن با شاخص‌های اندازه در چاهک ابتدایی ژل، اندازه دقیق باندهای خودناسازگاری به دست آمد.

1. Tris Boric Acid EDTA
2. UV
3. Gel document



شکل ۱- اندازه‌های متفاوت باندهای DNA و ژنوتیپ های بادام در کلکسیون بادام پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

نتایج

اندازه باندهای خودناسازگاری به دست آمده با اندازه باندهای گزارش شده توسط منابع مختلف مقایسه شدند (Channuntapipat et al., 2001; Ma & Oliveira, 2001b; Martinez-Gomez et al., 2003; Sanchez-Perez, 2004). نتایج حاصله از تمام ارقام خارجی با گزارش‌های قبلی مطابقت داشت.

Martinez-Gomez et al. (2003) کارآیی دو آغازگر اختصاصی AS1II و AmyC5R در تشخیص S-آلل چندین رقم بادام را در واکنش PCR مفرد به اثبات رساندند. ولی گزارش کردند که با استفاده از این دو آغازگر در بسیاری از ارقام مهم اروپایی مانند "لائوران"[1] آلل‌های S_3 از آلل‌های S_f قابل تشخیص نبودند. تشخیص دو آلل S_3 و S_f در نتاج تلاقی‌های حاصل از برنامه‌های اصلاحی مهم است، این مطلب در رقم "لائوران" صادق است چون بدون شناسایی این دو آلل، دانهال خودبارور غیرقابل تشخیص است.

Sanchez-Perez et al. (2004) گزارش نمودند که اندازه آلل‌های خودناسازگاری با استفاده از این دو آغازگر اختصاصی به این ترتیب بودند: S_7 ۲۰۰۰ جفت باز، S_9 ۱۸۰۰ جفت باز، S_{13} ۱۴۰۰ جفت باز، S_{11} ۷۰۰ جفت باز، S_3 ۱۲۰۰ جفت باز، S_f ۱۲۰۰ جفت باز، S_1 ۱۱۰۰ جفت باز، S_{10} ۶۰۰ جفت باز، S_2 ۸۰۰ جفت باز، S_5 ۶۰۰ جفت باز، S_{12} ۱۶۰۰ جفت باز.

برای مثال رقم "تونو" طبق گزارش ها دارای باندهایی به اندازه باند ۱۱۰۰ و ۱۲۰۰ جفت باز است که آزمایش حاضر نیز همان اندازه را نشان داد. همچنین بر اساس نتایج حاصل از این آزمایش اندازه باندهای متعلق به ارقامی مانند "تگزاس"، "تاردی نان پاریل"، "جینکو"، "فرانیس" و "تامسون" با نتایج گزارش شده توسط محققین مطابقت دارد.

رقم فرانسوی "لائوران" که از تلاقی "فرانیس"×"تونو" حاصل شده است. دارای آلل خودناسازگار S_3 و آلل خودسازگار S_f است. نتایج PCR باند آلل خودناسازگاری S_3 را نشان داد ولی باند آلل خودسازگاری S_f دیده نشد. مانند اغلب تحقیقاتی که با استفاده از دو آغازگر اختصاصی AS1II و AmyC5R انجام شده است، آلل‌های S_f و S_3 در یک موقعیت ظاهر می شوند و قابل تفکیک نیستند. Sanchez-Perez et al. (2004) با استفاده از آغازگر اختصاصی CEBASf توانستند آلل S_f به اندازه ۴۵۳ جفت باز را آشکار نمایند.

رقم "تگزاس" ("**میشن**"[2]) دارای آلل‌های S_1 وS_5 است (Certal et al., 1999). باندهای تکثیر شده روی ژل آگاروز نشان دهنده باندهایی به اندازه ۶۰۰ و ۱۱۰۰ جفت باز است که به ترتیب متعلق به S_5 و S_1 می‌باشد.

رقم "یلدا" جزء ارقام میان گل است که دارای دوره گلدهی طولانی است. منشأ این رقم امریکا است (Emani, 1997). باندهای تولیدی برای این رقم ۱۱۰۰ و۲۰۰۰ جفت باز است که به ترتیب متعلق به آللهای S_1 و S_7 است.

ژنوتیپ "تلخ-۱۳" دارای باندی به اندازه ۲۰۰۰ جفت باز است که متعلق به آلل S_7 می باشد. آلل دیگر باندی به اندازه ۱۶۰۰ جفت باز را نشان می‌دهد که متعلق به S_{12} است.

ژنوتیپ "تلخ-۱۴" دارای تک باندی در محدوده ۱۸۰۰ جفت باز است که متعلق به S_9 است.

رقم ایتالیایی "تونو"[3] رقمی خودگشن دارای آلل S_f و S_1 است (Ballester et al., 1998; Sanchez-Perez et al., 2004). اندازه باندهای مشاهده شده برای این رقم ۱۱۰۰ و ۱۲۰۰ جفت باز است که باند اولی متعلق به آلل S_1 است اما باند دومی متعلق به S_f می‌باشد (Boskovic et al., 1997; Channuntapipat et al., 2001; Ma & Oliveira, 2001b; Sanchez-Perez et al.,2004).

رقم "فاسیونلا"[4] دارای دو باند است، یکی به اندازه ۱۱۰۰ جفت باز که متعلق به S_1 و دیگری اندازه ۱۲۰۰ جفت باز که ممکن است متعلق به S_f یا S_3 باشد. لازم به ذکر است که گزارشی در مورد نوع آلل در این رقم در دست نیست.

رقم "تاردی نان‌پاریل"[5] موتاسیون جوانه "نان پاریل" بوده و هفت تا ده روز بعد از آن گل می‌دهد. این رقم دارای آلل‌های S مشابه به "نان پاریل" یعنی S_8S_7 است

1. 'Lauranne'

2. 'Mission'
3. 'Tuono'
4. 'Fascionella'
5. 'Tardy Nonpareil'

(Ortega & Dicenta, 2004). که فقط باندی به اندازه ۲۰۰۰ جفت باز ظاهر شده که متعلق به S_7 است این امر با گزارش‌های دیگر مبنی بر عدم تولید باند S_8 با دو آغازگر AS1II و AmyC5R مطابقت دارد (Sanchez-Perez et al., 2004).

رقم "کارپاریل"[1] رقمی است که توسط کستر در دانشگاه کالیفرنیا معرفی شد. دارای باند S_7 به اندازه ۲۰۰۰ جفت باز است (Janick & Moore, 1996).

رقم "فالسو بیرز"[2] دارای دو باند آلل خودناسازگاری به اندازه ۸۰۰ و ۱۱۰۰ جفت باز است که به ترتیب متعلق به S_2 و S_1 می‌باشد.

ژنوتیپ "شدیداً تلخ" باندی تولید نکرد که این امر ممکن است به علت نامناسب بودن کیفیت DNA و یا عدم توانایی این دو آغازگر در تشخیص آلل خودناسازگاری آن باشد.

رقم "آی اکس ال"[3] دارای آلل خودناسازگاری S_7 به اندازه ۲۰۰۰ جفت باز است.

ژنوتیپ "شیرین-۳۱" دارای باندی ضعیف به اندازه ۱۶۰۰ جفت باز است که متعلق به S_{12} می باشد.

رقم ایتالیایی "جینکو"[4] خودبارور، خیلی دیرگل و مغزهای دوقلو زیادی دارد. این رقم خودسازگار دو باند به اندازه های ۱۱۰۰ و ۱۲۰۰ جفت باز نشان داد که به ترتیب متعلق به S_1 و S_3 یا S_f است. با توجه به خودگشن بودن این رقم به نظر می‌رسد باند ۱۲۰۰ جفت باز متعلق به S_f باشد.

رقم "فرانیس"[5] هیبریدی بین رقم ایتالیایی "کریستومورتو"[6] و رقم فرانسوی "آی"[7] است. رقمی بسیار بسیار دیر گل که دارای آلل‌های S_1 و S_3 است. دو باند مشاهده شده مربوط به این رقم مطابق گزارش‌ها دارای اندازه ۱۱۰۰ و ۱۲۰۰ جفت باز بود. در این تحقیق باند ۱۱۰۰ جفت باز متعلق به S_1 است، اما باند ۱۲۰۰ جفت باز بر خلاف رقم "تونو" (که متعلق به S_f می‌باشد) در رقم "فرانیس" متعلق به S_3 است.

رقم "شاهرودی-۵" با داشتن باند ۱۲۰۰ جفت باز موقعیت آلل‌های S_f و S_3 نشان می‌دهد که برای تشخیص این دو آلل خودناسازگاری نیاز به استفاده از آغازگر اختصاصی CEBASf است (Sanchez-Perez et al., 2004).

رقم "آذر" هیبرید حاصل از دو رقم خارجی به نام‌های "آی" و "کریستومورتو" می باشد. که در ایستگاه تحقیقاتی باغبانی آذرشهر به دست آمده است. هر دو والد بسیار دیرگل و پربار هستند. اندازه باند ۱۲۰۰ جفت باز، نشان‌دهنده آلل‌های خودناسازگاری S_3 و S_f است که مانند رقم فوق برای تشخیص این دو آلل خودناسازگاری نیاز به استفاده آغازگر اختصاصی CEBASf است (Sanchez-Perez et al., 2004).

رقم "شکوفه" (از تلاقی دو رقم "نان پاریل" و "آی" به دست آمده است)، مانند رقم قبلی دارای باندی به اندازه ۱۲۰۰ جفت باز است که موقعیت S_3 و S_f را نشان می‌دهد.

ژنوتیپ شماره ۵، ژنوتیپی دیرگل از کلکسیون مرکز تحقیقات گروه علوم باغبانی دانشگاه تهران است که تا حدودی با ژنوتیپ شماره ۱۱ همزمانی دارد، این ژنوتیپ دارای باندهای به اندازه ۱۲۰۰ و ۱۴۰۰ جفت باز است که باند اولی متعلق به S_1 و باند دومی متعلق به S_{13} است.

ژنوتیپ شماره ۱۱، ژنوتیپی خیلی دیرگل از کلکسیون مرکز تحقیقات گروه علوم باغبانی دانشگاه تهران است که همزمان با درختان سیب، گلابی و بادام کلکسیون گل می‌دهد. این ژنوتیپ دارای باندی به اندازه ۱۴۰۰ جفت باز متعلق به S_{13} است که با ژنوتیپ شماره ۵ مشترک می‌باشد. این اشتراک در اندازه یک باند، نیمه سازگار بودن این دو ژنوتیپ فوق‌الذکر را نشان می‌دهد.

در این آزمایش با استفاده از آغازگرهای اختصاصی AS1II و AmyC5R به روش PCR بعضی از آلل‌های خودناسازگاری مربوط به تعدادی از ژنوتیپ‌ها و ارقام ایرانی شناسایی شدند. به علاوه احتمال وجود خودناسازگاری در بعضی از ژنوتیپ‌های مهم کلکسیون پردیس کشاورزی مورد تأیید قرار گرفت. تشابه موجود بین نتایج حاصل از این پژوهش و گزارش‌های قبلی صحت نتایج این تحقیق را تأیید می‌کند.

1. 'Karpareil'
2. 'Falso Barese'
3. 'I.X.L'
4. 'Genco'
5. 'Ferragenes'
6. 'Cristomorto'
7. 'Ai'

REFERENCES

1. Arshi, Y. & Sherafatian, D. (2002). *Almond production*. (1st ed.). (Translation). Olom Keshavarsi Karbod Press. (In Farsi).
2. Ballester, J., Boskovic, R., Batlle, I., Artis, P., Vargas F. & DeVicente, MC. (1998). Location of the self-incompatibility gene on the almond linkage map. *Plant Breeding*, 117, 69-72.
3. Boskovic, R., Tobutt, K. R., Batlle, I. & Duval, H. (1997). Correlation of ribonuclease zymograms and incompatibility genotypes in almond. *Euphytica*, 97, 167-176.
4. Certal, A. C., Sanchez, A. M., Kokko, H., Broothaerts, W., Oliveira, M. M. & Feij, J. A. (1999). S-RNases in apple are expressed in the pistil along the pollen tube growth path. *Sex Plant Report*, 12, 94-98.
5. Channuntapipat, C., Sedgley, M. & Collins, G. (2001). Sequences of the cDNAs and genomic DNAs encoding the S_1, S_7, S_8, and S_f alleles from almond, *Prunus dulcis. Theoretical and Applied* Genetics, 103, 1115-1122.
6. Imani, A. (1997). *Determination of some Biological and Physiological traits effects on selective Almond yield (local cultivar)*. Ph. D. Thesis. University of Tarbiat Modares, Iran. (In Farsi).
7. Franklin, F. C. H., Lawrence, M. J. & Franklin-Tong, V. E. (1995). Cell and molecular biology of self-incompatibility in flowering plants. *International Review of Cytology*, 158, 1-64.
8. Hinata, K., Watanabe, M., Toriyama, K. & Isogai, A. (1993). A review of recent studies on homomorphic self-incompatibility. *International Review of Cytology*, 143, 257-296.
9. Hiratsuka, S., Okada, Y., Kawai, Y., Tamura, F. & Tanabe, K. (1995). Stylar basic proteins corresponding to 5 self-incompatibility alleles of Japanese pears. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 64, 471-478.
10. Janick, J. & Moore, J. N. (1996). *Fruit breeding, Nuts.* Volume 3.John Wiley & Sons, Inc.
11. Kao, T. H. & McCubbin, A. G. (1996). How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to prevent inbreeding. In: Proceedings of *the National Academy of Sciences*, USA. 93, 12059-12065.
12. Kester, D. E., Kader, A. & Cunningham, S. (1993). Almonds. *Encyclopedia of food science*. Academic Press. London.
13. Ma, R-C. & Oliveira, M. M. (200la). Molecular identification of S-genotypes of almond *(Prunus dulcis)*. Proceedings of the Symposium "*Molecular Markers in Horticulture*" AGRO Montpellier, France, 2000. Acta *Horticulturae*, 546, 575-580.
14. Ma, R-C. & Oliveira, M. M. (200Ib). Molecular cloning of the self-incompatibility genes S_l and S_3 from almond *(Prunus dulcis* cv. Ferragnes). *Sex Plant Report*, 14, 163-167.
15. Martinez-Gomez, P., Ortega, E., Sanchez-Perez, R., Dicenta, F., Dandekar, A.M., Alonso, J. M., Socias i Company, R., Lopez, M., Batlle I. & Gradziel, T. M. (2003). Identification of self-incompatibility alleles in almond and related *Prunus* species using PCR. *Acta Horticulturae*, 622, 397-401.
16. Murry, M. & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8, 4321-4325.
17. Newbigin, E., Anderson, M. A. & Clarke, A.E. (1993). Gametophytic self-incompatibility systems. *Plant Cell*, 5, 1315-13 24.
18. Ortega, E. & Dicenta, F. (2004). Suitability of four different methods to identify self-compatible seedlings in an almond breeding program. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 5, 747-753.
19. Sanchez-Perez, R., Dicenta, F. & Martinez-Gomez, P. (2004). Identification of S-alleles in almond using multiplex PCR. *Euphytica*, 138, 263-269.
20. Stone, S. L. & Goring, D. R. (2001). The molecular biology of self-incompatibility systems in flowering plants. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 67, 93-113.
21. Tamura, M., Gradziel, T. M. & Dandekar, A. M. (1999). Cloning of genomic DNA sequences encoding almond *(Prunus dulcis)* S-RNases genes (PGR99-117). *Plant Physiology*, 120, 1206.
22. Zohary, M. & Spiegel-Roy, P. (1975). Beginnings of fruit growing in the old world. *Science*, 187, 319-327.