مجله علوم باغبانی ایران
دوره ۴۴، شماره ۳، ۱۳۹۲ (۳۲۸-۳۱۵)

ارزیابی وضعیت تکثیر آلل های ناسازگاری در گونه های مختلف بادام های وحشی و گونه های خویشاوند آن به روش PCR

علی رضا راحمی[۱]، محمد رضا فتاحی مقدم[۲*]، علی عبادی[۳]، تکتم سادات تقوی[۴] و داراب حسنی[۵]
۱، دانشجوی سابق دکتری گروه علوم باغبانی دانشگاه آزاد، واحد علوم وتحقیقات، تهران
۲،۳، ۴، دانشیار، استاد و استادیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۵، دانشیار موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، بخش باغبانی، کرج
(تاریخ دریافت: ۸۹/۶/۲۴ - تاریخ تصویب: ۹۰/۲/۲۵)

چکیده

خودناسازگاری در بادام توسط یک مکان ژنی با چندین آلل کنترل می شود. در این آزمایش بررسی تنوع آلل های احتمالی ناسازگاری با استفاده از واکنش زنجیره پلی مراز در ۹۶ نمونه از گونه های مختلف بادام و گونه های خویشاوند آن انجام شد. واکنش زنجیره پلیمراز با استفاده از سه جفت آغازگر دژنره (PaConsI-F/EM-PC1consR، PaConsI-F/EM-PC3consR، EM-PC2consF/EM-PC3consR)، یک جفت آغازگر اختصاصی ناسازگاری (AS1II /AmyC5R)، یک جفت آغازگر اختصاصی خودسازگاری (CEBASf / AmyC5R) و یک سری آغازگر چندگانه (AS1II /AmyC5R /CEBASf) انجام شد و در مجموع ۱۵۵ آلل ناسازگاری تکثیر شد. محدوده اندازه نوارها و تعداد آلل های تکثیر شده بیشتر از مقادیری است که در گزارش های قبلی آمده است. آلل های تکثیر شده با آلل های گزارش شده در ارقام بادام مقایسه و نامگذاری شدند. آلل های S_9، S_2، S_{13} و S_{25} به ترتیب با ۱۲/۲۶، ۸/۳۹ ، ۷/۷۴ و ۷/۷۴ درصد بیشترین فراوانی را نشان دادند. نوارهای مربوط به آلل های S_{16}، S_{17}، S_{18}، S_{19}، S_{22}، S_{28} و S_{30} در نمونه های مورد مطالعه مشاهده نشدند و آلل های S_{15} و S_{26} نیز با ۰/۶۵ درصد کمترین فراوانی را داشتند. با استفاده از آغازگر های مذکور به ویژه آغازگر اختصاصی (CEBASf /AmyC5R) هیچ نوار آلل خود سازگاری (Sf) در نمونه ها تکثیر نشد. تجزیه خوشه ای نوارهای تکثیر شده آلل های هر یک از نمونه ها با گروه بندی های گیاه شناسی مطابقت نشان داد.

واژه های کلیدی: آغازگرهای اختصاصی، توزیع جغرافیایی، ناسازگاری، فراوانی آلل ها

مقدمه

تعداد زیادی از گونه های وحشی بادام در آسیای مرکزی از غرب چین تا ایران و ترکیه و همچنین در خاورمیانه تا اروپا رویش دارند (Kester & Gradziel 1996; Lopez et al., 2006; Martinez-Gomez et al., 2007). این گونه ها برای استخراج روغن، جلوگیری از فرسایش، احیای جنگل ها، به عنوان پایه و به عنوان خزانه ژنی کاربرد دارند. مشخص شده است که برخی از این گونه ها دارای صفت خودسازگاری می باشند که در برنامه های اصلاح نباتات ارزشمند است (Martinez-Gomez et al., 2003; Zeinalabedini et. al., 2007b). ارقام بادام اهلی (*P. dulcis*) عمدتا خود ناسازگار (SI) هستندکه این خود ناسازگاری بدلیل نقص دانه گرده نمی باشد (Tufts, 1919). به علاوه، برخی از ارقام بادام

* نویسنده مسئول: محمد رضا فتاحی مقدم تلفن: ۲۶-۳۲۲۴۸۷۲۱ E-mail: fattahi@ut.ac.ir

نیز دگرناسازگار می باشند (Tufts & Philp, 1922; Boskovic et al., 2007). این درحالی است که تعداد معدودی بادام با صفت خودسازگاری از ایتالیا، اسپانیا، پرتغال، فرانسه، رومانی، آمریکا و هند گزارش شده اند (Ortega & Dicenta, 2006).

خود ناسازگاری توسط یک مکان ژنی (*S*) کنترل می شود که دارای چند شکلی (Polymorphism) بالا بوده و چندین فرم آللی را شامل می شود (Gagnard, 1954; Channuntapipat et al., 2001; Halasz et al., 2008).

ناسازگاری در بادام بصورت گامتوفیتیک است (Gagnard, 1954; Socias i Company et al., 1976; Sedgley, 1994; Newbigin, 1996 ; Boskovic et al., 2007) و ژنوتیپ گرده تعیین کننده رشد یا عدم رشد دانه گرده در خامه می باشد (Gagnard, 1954).

اگرچه خود ناسازگاری از خود باروری جلوگیری می کند (Socias i Company, 1992) ولی یک مزیت در سیر تکاملی گیاهان گل دار محسوب می شود (Ortega & Dicenta, 2003) بطوریکه از بروز پسروی خویش آمیزی در بادام جلوگیری نموده (de Nettancourt, 1977; Halasz et al., 2005) و با افزایش دگرآمیزی، سبب ایجاد تنوع در توده های بذری و سازگاری بهتر بادام در مناطق مختلف جغرافیایی شده است (Kester & Gradziel, 1996). این تنوع، منبع بالقوه ژنتیکی بسیار غنی برای اصلاح ژنتیکی بادام است بطوریکه عملاً می توان صفات نادر مورد نظر برای برنامه اصلاحی را در میان تیپ های مختلف آن در طبیعت یافت نمود (Popov et al., 1929).

بررسی آلل های ناسازگاری در بادام و گونه های خویشاوند آن بسیار مهم است و برای طراحی برنامه تلاقی ها و انتخاب والدین در برنامه های اصلاحی کاربرد دارد (Channuntapipat, 2003; Lopez et al., 2006; Ortega et al., 2006; Martinez Gomez et al., 2003).

تاکنون بررسی وضعیت آلل های *S* در گونه های وحشی بادام بصورت جامع گزارش نشده است. این بررسی ها می توانند به تولید ارقام خودبارور که برای دستیابی به باغ های تک کشتی (یک دست) و کاهش نیاز به فعالیت زنبور عسل مفید است کمک نمایند (Batlle et al., 1997). همچنین مقایسه آلل های *S* در بین گونه های وحشی بادام اجازه مطالعه روی تعیین منشاء آلل های ناسازگاری در بادام را فراهم می سازد (Martinez Gomez et al., 2003; Zeinalabedini et al., 2007a).

تعیین ژنوتیپ ناسازگاری بادام با روش های مختلف امکان پذیر است که یکی از آنها واکنش زنجیره ای پلیمراز است که امکان شناسایی آلل ها حتی قبل از سن گلدهی را امکان پذیر می سازد (Ortega & Dicenta, 2004). تاکنون حدود ۴۴ آلل ناسازگاری در بادام با استفاده از روش های مولکولی شناسایی شده اند (Ortega et al., 2009).

بدین منظور آغازگر های عمومی AS1II وAmyC5R برای تکثیر آلل های *S* در بادام طراحی گردیدند (Tamura et al., 2000). در ادامه Ma & Oliviera (2001) و سپس Channuntapipat et al. (2001, 2002, 2003) آغازگرهای دیگری را برای شناسایی آلل های *S* معرفی کردند. همچنین آغاز گر اختصاصی CEBASF برای شناسایی آلل *Sf* طراحی گردید (Sanchez - Perez et al., 2004). آنها در PCR چندگانه از سه آغازگر AS1II، CEBASf و AmyC5R برای تشخیص دقیق ۱۰ آلل ناسازگاری و یک آلل خود سازگاری در بادام استفاده کردند. آغازگرهای طراحی شده از توالی حفاظت شده نواحی اینترون اول و دوم *S*-RNases قادر به تکثیر آلل های مختلف *S* است (Channuntapipat et al., 2001, 2003). در همین راستا در آزمایشی دیگر با استفاده از دو جفت آغازگر دژنره (EM-PC2consF, EM-PC3consR)، توالی مکان ناسازگاری ۲۴ آلل S_1 تا S_{24} و آلل خودسازگاری *Sf* در ارقام بادام اروپایی و آمریکایی تعیین گردیدند (Ortega et al., 2005). آنها سپس تعداد آلل های ناسازگاری بادام را تا ۲۹ آلل گزارش نمودند (Ortega et al., 2006).

در پژوهشی دیگر در بادام وحشی (*P. webbii*) آلل S_{30} به عنوان St یا نوع وحشی آلل*Sf* شناسایی و معرفی شد (Boskovic et al., 2007). همچنین با بررسی تنوع آلل های *S*-RNase در ارقام بادام اسپانیا، پنج آلل S_{31}-$_{35}$ بوسیله همسانه کردن و توالی یابی شناسایی گردیدند (Kodad et al., 2008).

در ادامه این بررسی ها تعداد ۹ آلل S_{36}-$_{44}$ از طریق کلون کردن و توالی یابی در بین هفت رقم بادام ایرانی شناسایی گردید (Ortega et al., 2009) .

همچنین ژنوتیپ های *S* مربوط به ۱۲ گونه وحشی وابسته به بادام با کاربرد آغازگرهای اختصاصی AS1II/ AmyC5R بررسی شدند (Martinez Gomez et al., 2003). آنها شش آلل را در گونه های وحشی (*P. tangutica, P. bucharica, P. argentea, P. webbii, P. kuramica, P. pentunikowii*) شناسایی کردند. البته در برخی از گونه ها (*P. scoparia, P. mira, P. kasuensis, P. tenella, P. glandulosa*) هیچ نواری تکثیر نشد. این نتایج، امکان انتقال آلل های *S* از گونه های وحشی به بادام که توسط Gradziel et al. (2001) ارائه گردیده بود را تایید کرد.

تحقیقات Sanchez & Oliviera (2005) روی آلل *Sf* موجود در رقم خود بارور تانو (Tuono) نشان داد که این آلل از گونه *P. webbii* منشاء گرفته است. مطالعات متعددی در خصوص خودسازگاری در گونه *P. webbii* توسط برخی از محققین صورت گرفته است (Gradziel et al., 2001; Channuntapipat, 2003; Socias i Company et al., 2004; Sanchez & Oliviera, 2005; Boskovic et al., 2007; Banovic et al., 2009)

در بررسی آلل های *S* در چهار گونه وحشی شامل *P. elaegnifolia, P. hauskunechtii, P. scoparia, P. lycioides* تنوع بالای آللی در مکان *S* مشاهده شد و تعداد ۱۴ آلل *S* تکثیر گردید. این آلل ها در گونه های مذکور متفاوت بودند ولی یک آلل مشابه در دو گونه *P. elaegnifolia* و *P. hauskunechtii* مشاهده شد. گونه های مورد بررسی غالبا دارای آلل خودناسازگاری بودند و عمدتا دو نوار (آلل) را در ژل آگارز نشان دادند ولی گونه *P. elaegnifolia* دارای یک آلل خودسازگاری (*Sf*) بود و تنها یک نوار با استفاده از آغازگر اختصاصی خودسازگاری CEBASF بدست آمد (Zeinalabedini et al., 2007b). تحقیقات بعد نشان داد که کاربرد آغازگر های اختصاصی خودسازگاری که توسط Channuntapipat et al. (2003) و Ma & Oliviera (2001)برای ارقام بادام طراحی شده بودند در گونه های بادام وحشی *P. elaegnifolia, P. hauskunechtii, P. scoparia, P. lycioides, P. orientalis, P. communis*، باندی تکثیر نکردند (Elahi et al., 2008).

هدف از انجام این پژوهش، تعیین تنوع آلل های خودناسازگاری، ارزیابی احتمال وجود آلل ناسازگاری یا سازگاری در گونه های وحشی بادام و گونه های خویشاوند آن از جنس *Prunus* و نهایتا بررسی وضعیت آلل های *S* به منظور مطالعه روابط بین گونه های بادام می باشد.

مواد و روش ها

مواد گیاهی

تعداد ۷۵ نمونه از ۱۵ گونه بادام وحشی از مناطق مختلف ایران جمع آوری گردید و به دو صورت خشک شده با سیلیکاژل و یا لیوفیلایز شده به همراه تعداد ۱۵ نمونه از گونه های وابسته به بادام از باغ کلکسیون دانشگاه کالیفرنیا، دو نمونه از دانشگاه جورجیا و چهار نمونه از دانشگاه فلوریدا و در مجموع ۹۶ نمونه مورد آزمایش قرار گرفت (جدول ۱).

جدول ۱- مشخصات مواد گیاهی گونه های جنس *Prunus* مورد استفاده در بررسی تنوع آلل های *S*

شماره روی ژل آگارز	شماره نمونه		گروه	کشور	استان/ایالت	شهر
۱	۱۱	*P. trichamygdalus*	*Amygdalus*	ایران	فارس	داراب
۲	۲۳	*P. korshinskyi*	*Amygdalus*	ایران	آذربایجان غربی	ارومیه
۳	۱۳	*P. lycioides (var.horrida)*	*Dodecandra*	ایران	فارس	نیریز
۴	۲۴	*P. korshinskyi*	*Amygdalus*	ایران	آذربایجان غربی	ارومیه
۵	۱۵	*P. elaeagnifolia*	*Orientalis*	ایران	فارس	داراب
۶	۲۵	*P. korshinskyi*	*Amygdalus*	ایران	آذربایجان غربی	ارومیه
۷	۱۶	*P. korshinskyi*	*Amygdalus*	ایران	فارس	داراب
۸	۲۶	*P. korshinskyi*	*Amygdalus*	ایران	آذربایجان غربی	ارومیه
۹	۱۸	*P. lycioides (var.horrida)*	*Dodecandra*	ایران	فارس	داراب
۱۰	۲۷	*P. fenzliana*	*Amygdalus*	ایران	آذربایجان غربی	ارومیه
۱۱	۱۹	*P. scoparia*	*Spartioides*	ایران	فارس	داراب
۱۲	۲۸	*P. fenzliana*	*Amygdalus*	ایران	آذربایجان غربی	ارومیه

ادامه جدول ۱ - مشخصات مواد گیاهی گونه های جنس *Prunus* مورد استفاده در بررسی تنوع آلل های *S*

شماره روی ژل آگارز	شماره نمونه	گونه	گروه	کشور	استان/ایالت	شهر
۱۳	۲۱	*P. korshinskyi*	*Amygdalus*	ایران	آذربایجان غربی	ارومیه
۱۴	۲۹	*P. kotschii*	*Orientalis*	ایران	آذربایجان غربی	ارومیه
۱۵	۲۲	*P. korshinskyi*	*Amygdalus*	ایران	آذربایجان غربی	ارومیه
۱۶	۳۰	*P. kotschii*	*Orientalis*	ایران	آذربایجان غربی	ارومیه
۱۷	۳۱	*P. brahuica*	*Dodecandra*	ایران	آذربایجان غربی	مهاباد
۱۸	۴۴	*P. elaeagnifolia*	*Orientalis*	ایران	کردستان	کامیاران
۱۹	۳۲	*P. kotschii*	*Orientalis*	ایران	آذربایجان غربی	سردشت
۲۰	۴۵	*P. pabotti*	*Orientalis*	ایران	کردستان	کامیاران
۲۱	۳۳	*P. communis*	*Amygdalus*	ایران	آذربایجان غربی	سردشت
۲۲	۴۷	*P. communis*	*Amygdalus*	ایران	کردستان	سقز
۲۳	۳۴	*P. nairica*	*Dodecandra*	ایران	آذربایجان غربی	اشنویه
۲۴	۴۸	*P. communis*	*Amygdalus*	ایران	کردستان	سقز
۲۵	۳۸	*P. nairica*	*Dodecandra*	ایران	کردستان	سنندج
۲۶	۴۹	*P. kotschii*	*Orientalis*	ایران	کردستان	بانه
۲۷	۳۹	*P. nairica*	*Dodecandra*	ایران	کردستان	سنندج
۲۸	۵۳	*P. fenzliana*	*Amygdalus*	ایران	آذربایجان غربی	ماکو
۲۹	۴۰	*P. hauskonechtii (var. pubescence)*	*Amygdalus*	ایران	کردستان	سنندج
۳۰	۵۴	*P. spp*	Almond *spp.*	ایران	فارس	شیراز
۳۱	۴۳	*P. elaeagnifolia*	*Orientalis*	ایران	کردستان	کامیاران
۳۲	۵۵	*P. lycioides*	*Dodecandra*	ایران	فارس	نیریز
۳۳	۵۶	*P. lycioides var.horrida*	*Dodecandra*	ایران	فارس	داراب
۳۴	۶۴	*P. elaeagnifolia*	*Orientalis*	ایران	فارس	داراب
۳۵	۵۷	*P. scoparia*	*Spartioides*	ایران	کرمان	ارزوئیه
۳۶	۶۶	*P. dulcis*	*Amygdalus*	ایران	آذربایجان غربی	صوفیان
۳۷	۵۸	*P. eburnea*	*Dodecandra*	ایران	فارس	نیریز
۳۸	۶۷	*P. dulcis*	*Amygdalus*	ایران	آذربایجان غربی	قره باغ
۳۹	۵۹	*P. spp*	Almond *spp.*	ایران	فارس	شیراز
۴۰	۶۸	*P. dulcis*	*Amygdalus*	ایران	فارس	استهبان
۴۱	۶۰	*P. elaegnifolia*	*Orientalis*	ایران	فارس	نیریز
۴۲	۶۹	*P. dulcis*	*Amygdalus*	ایران	فارس	نیریز
۴۳	۶۱	*P. elaegnifolia*	*Orientalis*	ایران	فارس	نیریز
۴۴	۷۸	*P. spartioides*	*Spartioides*	ایران	تهران	تهران
۴۵	۶۲	*P. hauskonechtii*	*Amygdalus*	ایران	کردستان	مریوان
۴۶	۷۹	*P. keredjensis*	*Spartioides*	ایران	تهران	تهران
۴۷	۶۳	*P. hauskonechtii*	*Amygdalus*	ایران	کردستان	مریوان
۴۸	۸۹	*P. dulcis*	*Amygdalus*	ایران	تهران	کردان
۴۹	۹۰	*P. dulcis*	*Amygdalus*	ایران	تهران	هشتگرد
۵۰	۱۰۳	*P. fenzliana* (5-1)	*Amygdalus*	ایران	فارس	فسا
۵۱	۹۱	*P. spartioides*	*Spartioides*	ایران	تهران	کرج
۵۲	۱۰۴	*P. reticulata* (5-2)	*Orientalis*	ایران	فارس	فسا
۵۳	۹۲	*P. scoparia*	*Spartioides*	ایران	تهران	کرج
۵۴	۱۰۵	*P. korshinskyi* (5-3)	*Amygdalus*	ایران	فارس	فسا
۵۵	۹۸	*P. elaeagnifolia*	*Orientalis*	ایران	چهارمحال و بختیاری	لردگان
۵۶	۱۰۶	*P. elaeagnifolia* (5-4)	*Orientalis*	ایران	فارس	فسا
۵۷	۹۹	*P. spartioides*	*Spartioides*	ایران	چهارمحال و بختیاری	شهرکرد
۵۸	۱۰۷	*P. korshinskyi* (5-5)	*Amygdalus*	ایران	فارس	فسا
۵۹	۱۰۰	*P. spartioides*	*Spartioides*	ایران	چهارمحال و بختیاری	شهرکرد
۶۰	۱۰۸	*P. elaeagnifolia* (6-7)	*Orientalis*	ایران	فارس	فسا
۶۱	۱۰۱	*P. scoparia*	*Spartioides*	ایران	چهارمحال و بختیاری	لردگان
۶۲	۱۰۹	*P. erioclada*	*Dodecandra*	ایران	فارس	فسا
۶۳	۱۰۲	*P. erioclada*	*Dodecandra*	ایران	چهارمحال و بختیاری	فارسان
۶۴	۱۱۰	*P. korshinskyi*	*Amygdalus*	ایران	فارس	فسا

ادامه جدول ۱ - مشخصات مواد گیاهی گونه های جنس *Prunus* مورد استفاده در بررسی تنوع آلل های *S*

شماره روی ژل آگارز	شماره نمونه	گونه	گروه	کشور	استان/ایالت	شهر
۶۵	۱۱۱	*P. erioclada* (5-24)	*Dodecandra*	ایران	فارس	فسا
۶۶	۱۲۰	*P. carduchurum*	*Orientalis*	ایران	کردستان	سقز
۶۷	۱۱۲	*P. glauca* (7-1)	*Spartioides*	ایران	فارس	فسا
۶۸	۱۲۱	*P. orientalis*	*Orientalis*	ایران	کردستان	سقز
۶۹	۱۱۳	*P. scoparia* (8-10)	*Spartioides*	ایران	فارس	فسا
۷۰	۱۲۲	*P. webbii*(DPRU0197-4)	*Amygdalus*	آمریکا	جورجیا	آتاپلگوس
۷۱	۱۱۵	*P. carduchrom*	*Orientalis*	ایران	آذربایجان غربی	ارومیه
۷۲	۱۲۳	*P. persica* (cv.Okinawa)	Peach	آمریکا	فلوریدا	گینزویل
۷۳	۱۱۶	*P. carduchrom*	*Orientalis*	ایران	آذربایجان غربی	ارومیه
۷۴	۱۲۴	*P. dulcis* × *P. persica* (Tardy Nonpareil×97-47C)	Peach&Almond	آمریکا	فلوریدا	گینزویل
۷۵	۱۱۷	*P. trichamygdalus*	*Amygdalus*	ایران	آذربایجان غربی	ارومیه
۷۶	۱۲۵	*P. dulcis* (cv.Nonpareil)(UCD 10,1-20)	*Amygdalus*	آمریکا	کالیفرنیا	دیویس
۷۷	۱۱۸	*P. fenzliana*	*Amygdalus*	ایران	آذربایجان غربی	ارومیه
۷۸	۱۲۶	*P. dulcis* (cv.Carmel)(UCD)	*Amygdalus*	آمریکا	کالیفرنیا	دیویس
۷۹	۱۱۹	*P. kotschii*	*Orientalis*	ایران	کردستان	سقز
۸۰	۱۲۷	*P. dulcis* (cv.Texas, Mission)(UCD 5,4-1)	*Amygdalus*	آمریکا	کالیفرنیا	دیویس
۸۱	۱۲۸	*P. argentea* (USDA 7-23)	*Orientalis*	آمریکا	کالیفرنیا	دیویس
۸۲	۱۳۶	*P. glandulosa* (USDA 8-3)	Plum	آمریکا	کالیفرنیا	دیویس
۸۳	۱۲۹	*P. bucharica* (USDA 10-8)	*Amygdalus*	آمریکا	کالیفرنیا	دیویس
۸۴	۱۳۷	*P. pedunculata* (USDA)	*Leptopus*	آمریکا	کالیفرنیا	دیویس
۸۵	۱۳۰	*P. fenzliana* (UCD species block)	*Amygdalus*	آمریکا	کالیفرنیا	دیویس
۸۶	۱۳۸	*P. triloba*, (*P. ulmifolia*)(USDA 1-2)	Plum	آمریکا	کالیفرنیا	دیویس
۸۷	۱۳۱	*P. kuramica* (USDA 9-33)	*Amygdalus*	آمریکا	کالیفرنیا	دیویس
۸۸	۱۳۹	*P. spp* (USDA 12-30)	*Leptopus*	آمریکا	کالیفرنیا	دیویس
۸۹	۱۳۲	*P. petunnikowii* (USDA)	*Chameamygdalus*	آمریکا	کالیفرنیا	دیویس
۹۰	۱۴۰	*P. salicina* (cv. Gulf rose)	Plum	آمریکا	فلوریدا	گینزویل
۹۱	۱۳۳	*P. tangutica* (*P. dehiscens*)(USDA 2-4)	*Amygdalus*	آمریکا	کالیفرنیا	دیویس
۹۲	۱۴۱	*P. geniculata* (R8T2)	Plum	آمریکا	فلوریدا	گینزویل
۹۳	۱۳۴	*P. tennella* (*P. nana*)(USDA 11-2)	*Chameamygdalus*	آمریکا	کالیفرنیا	دیویس
۹۴	۱۴۲	*P. kansuensis* (1422)	Peach	آمریکا	جورجیا	آتاپلگوس
۹۵	۱۳۵	*P. webbii* (UCD 7-28)	*Amygdalus*	آمریکا	کالیفرنیا	دیویس
۹۶	۱۴۳	*P. dulcis* × *P. persica* (Nonpareil King)(1444)×فلوریدا	Peach&Almond	آمریکا	فلوریدا	گینزویل

استخراج DNA

DNA ژنومی از ۱۰ میلی گرم برگ خشک (لیوفیلیز شده یا خشک شده با سیلیکاژل) با روش مینی پرپ [ستیل تری متیل آمونیوم بروماید (CTAB)، منطبق بر روش Ortega & Dicenta (2003)] با برخی تغییرات بر اساس مینی پروتکل کیاژن Qiagen (2006) استخراج شد و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد ذخیره شد.

واکنش زنجیره ای پلیمراز

واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از سه جفت آغازگر دژنره (EM-PC2consF, EM-PC3consR; PaConsI-F, EM-PC1consR; PaConsI-F, EM-PC3consR) ، یک جفت آغازگرعمومی (AS1II / AmyC5R)، یک جفت آغازگر اختصاصی خودسازگاری (CEBASf / AmyC5R) و یک سری آغازگر چندگانه

Multiplex (AS1II / AmyC5R/CEBASf) برای کلیه نمونه های مذکور (۹۶ نمونه) انجام شد (جدول ۲).

جدول ۲-مشخصات آغازگرهای مورد استفاده (منبع، توالی، دمای اتصال) در بررسی تنوع آلل های *S* گونه های وحشی بادام

ردیف	نوع آغازگر	آغازگرهای آلل S های	منبع	توالی آغازگرها	دمای اتصال (درجه سانتیگراد)
۱	Degenerate Primers (First Intron)	PaConsI-F-FAM EM-PC1consR	Ortega et al. (2005)	5-(C/A)CT TGT TCT TG(C/G) TTT (T/C)GC TTT CTT C-3, 5-GCC A(C/T)T GTT G(A/C)A CAA A(C/T)T GAA-3	۵۴/۷
۲	Degenerate Primers (First & Second Introns)	PaConsI-F-FAM EM-PC3consR	Ortega et al. (2006)	5-(C/A)CT TGT TCT TG(C/G) TTT (T/C)GC TTT CTT C-3, 5-AWS-TRC-CRT-GYT-TGT-TCC-ATT-C-3	۵۸
۳	Degenerate Primers (Second Intron)	EM-PC2consF EM-PC3consR	Sutherland et al. (2004)	5-TCA-CMA-TYC-ATG-GCC-TAT-GG-3 5-AWS-TRC-CRT-GYT-TGT-TCC-ATT-C-3	۵۸
۴	Specific primers	AS1II-F AmyC5R	Tamura et al. (2000)	5-TATTTTCAATTTGTGCAACAATGG-3 5-CAAAATACCACTTCATGTAACAAC-3	۵۷
۵	Specific Primers	CEBASf AmyC5R	Zeinalabedini et al.(2007b)	5-AGATCTATCTATATCTTAAGTCTG-3 5-CAAAATACCACTTCATGTAACAAC-3	۵۷
۶	Multiplex Primers	AS1II-F CEBASf AmyC5R	Sanchez-Perez et al.(2004)	5-TATTTTCAATTTGTGCAACAATGG-3 5-AGATCTATCTATATCTTAAGTCTG-3 5-CAAAATACCACTTCATGTAACAAC-3	۵۷

این آغازگرها از شرکت MWG (Biotech) آلمان و شرکت Eurofins (US) خریداری شدند. در آزمایشات مذکور از ترموسایکلرهای مارک اپندورف (مدل 5341 Mastercycler®epgradient) استفاده شد و بهینه کردن شرایط PCR و پروتکل های موجود انجام شد (جدول ۳).

جدول۳- مراحل و شرایط دستگاه ترموسایکلر در بررسی آلل های *S* گونه های وحشی بادام

		واسرشته سازی اولیه	واسرشته سازی	اتصال	تکثیر	واسرشته سازی	اتصال	تکثیر	تکثیر انتهایی
(PaCons I-FD/ EM-PC1ConsRD)	Tempreture (°C)	۹۴	۹۴	۵۴/۷	۷۲	-	-	-	۷۲
	Time (min)	۲	۱	۱	۱	-	-	-	۵
	Cycles	-		۳۵		-	-	-	-
(PaCons I-FD/ EM-PC3ConsRD) & (EM-PC2ConsFD / EM-PC3ConsRD)	Tempreture (°C)	۹۴	۹۴	۵۸	۶۸	۹۴	۵۸	۶۸	-
	Time (min)	۲	۱۰ ثانیه	۲	۲	۱۰ ثانیه	۲	۲ (به علاوه افزودن ۱۰ ثانیه در هر سیکل)	-
	Cycles	-		۱۰			۲۵		-
&(AS1II / AmyC5R) (CEBASf / AmyC5R) & (AS1II / CEBASf / AmyC5R)	Tempreture (°C)	۹۵	۹۴	۵۷	۷۲	-	-	-	۷۲
	Time (min)	۳	۱	۱	۲	-	-	-	۱۰
	Cycles	-		۳۵		-	-	-	-

الکتروفورز محصولات PCR

محصولات تکثیری روی ژل آگارز (GPG/LE, American Bioanalytical) ۱/۵ درصد جداسازی و با استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد. عکس برداری با استفاده از دستگاه ژل داک Foto/UV®300 و با کمک نرم افزار Foto/Analyst®PcImage انجام شد (شکل ۱).

تعیین اندازه آلل ها

تعیین اندازه آلل ها با استفاده از نرم افزار Quantity One - 4.6.6 (Basic) تحت لیسانس شرکت Biorad انجام گرفت و برای کلیه آغازگرها در تمامی ۹۶ نمونه، اندازه نوارها مشخص گردید. سپس از جفت آغازگر اینترون اول (PaConsI-F(FAM)/EM-PC1consR) مجددا برای تکثیر آلل های *S* استفاده شد و با کمک

دستگاه توالی یاب ABI 3730xl در مرکز ICBR (Interdisciplinary Center for Biotechnology Research, University of Florida) کرومات (رنگ نگار) آلل ها مطابق روش Ortega et al. (2005) تعیین شد. سپس با کمک نرم افزار Gene Marker کد خوانی شدند و اندازه آلل ها بطور دقیق تر تعیین شد. کلیه مراحل مذکور برای تمامی نوارهای ضعیف در دو مرحله دوباره تکرار گردید و در پایان، کلیه نتایج مجددا مورد باز خوانی قرار گرفت و همچنین صحت سنجی لازم انجام شد و اندازه نوارها برای هر یک از نمونه های گیاهی برای این جفت آغازگر تعیین شد.

از مقایسه اندازه آلل های تکثیر شده با استفاده از ۶ جفت آغازگر با اندازه آلل های گزارش شده در منابع قبلی، که عمدتا بر روی ارقام بادام بودند، وضعیت آلل *S* آنها تعیین شد و در صورت جدید بودن به عنوان آلل کاندید تعیین گردید.

با مقایسه آلل های کاندید در شش جفت آغازگر استفاده شده، نهایتا دو آلل با تکرار پذیری بالا به عنوان آلل های *S* گونه مورد نظر تعیین شد. فراوانی آلل های *S* در نمونه های مورد بررسی از طریق تعیین میزان درصد هر نوع آلل *S* نسبت به مجموع آلل های *S* بدست آمده از کلیه نمونه ها (de Cuyper et al., 2005; Schueler et al., 2006; Stanys et al., 2008) محاسبه گردید و نمودار مقایسه فراوانی آنها با نرم افزار Excell ترسیم گردید (شکل ۲).

تجزیه داده ها

نتایج بدست آمده از برنامه Gene marker (مربوط به جفت آغازگرهای PaConsI-FD و EM-PC1consRD) به صورت یک فایل Excell به برنامه Power Marker منتقل و در آنجا تجزیه های لازم انجام پذیرفت و فاصله ژنتیکی گروه های مختلف تاکسونومی (شامل ۱۰ گروه *Amygdalus*, *Orientalis*, *Spartioides*, *Dodecandra*, *Chameamygdalus*, *Leptopus*, Almond *spp.*، دورگ هلو × بادام، هلو و آلو) با توجه به اندازه آلل های *S* تعیین گردید. سپس با کمک نرم افزار Tree view دندروگرام مربوط به روابط فیلوژنیک گروه های مختلف بادام که در آزمایش مورد بررسی قرار گرفته بودند ترسیم شد (شکل ۳).

نتایج و بحث

تنوع آلل های *S*

کاربرد آغازگرهای مختلف تنوع بسیار بالایی از آلل های ناسازگاری را در نمونه های مورد بررسی نشان داد (شکل ۱). علی رغم اینکه این تنوع آللی در گونه های وحشی احتمالا با بادام های زراعی متفاوت بود ولی از سیستم ارزیابی تعیین اندازه و شماره گذاری بادام اهلی در این پژوهش استفاده شده است. اندازه آلل ها در مکان *S* مورد بررسی بسیار متفاوت بود که نشان از تنوع بالای این مکان دارد.

آغازگر رو به جلو PaConsI-F از ناحیه سیگنال پپتاید مربوط به *S*-RNases گیلاس طراحی شده است (Sonneveld et al., 2003) و ناحیه متغیر آغازگر EM- PC1consRD بر اساس اینترون اول و منطقه حفاظت شده اول (جنس *Prunus*) طراحی شده است. مجموع این ۲ آغازگر ناحیه اینترون اول را تکثیر می کنند (Ortega et al., 2005). محدوده اندازه نوارها در نمونه های مورد آزمایش برای جفت آغازگر دژنره اینترون اول PaConsI-F(FAM) / EM-PC1consRD بین ۱۹۶ bp (در بادام *P. dulcis*، نمونه ۶۸) تا ۱۱۴۸bp (در آلو *P. geniculata*، نمونه ۱۴۱) متغیر بود. اندازه نوار های تکثیر شده در اکثر نمونه ها بین ۲۰۰ تا ۴۰۰ جفت باز متغیر بود. اما فقط در سه نمونه، رقم"Texas" و گونه های *P. bucharica* و *P. geniculata* نوارهایی با اندازه های بالا (به ترتیب ۹۴۹، ۱۰۷۶ و ۱۱۴۸ جفت باز) دیده شد کاربرد این آغازگرها توسط Ortega et al. (2006) در اکثر ارقام بادام نیز اندازه آللی بین ۱۲۲ تا ۳۴۶ جفت باز را نشان داد. اما در چهار رقم بادام اندازه های ۷۹۹ برای آلل S_1 و ۱۰۶۴ برای آلل *S*14 در ناحیه اینترون اول تکثیر شد. در نتیجه در این بررسی، آلل تکثیر شده در رقم Texas را آلل S_1 و آلل های تکثیر شده در دو گونه بادام و آلو (نمونه های ۶۸ و ۱۴۱) آلل S_{14} نامگذاری شدند.

کاربرد آغازگرهای PaConsI-F و EMPC3consRD باعث تکثیر ناحیه سیگنال پپتاید تا ناحیه حفاظت شده C3 می شود (Ortega et al., 2006). آلل های تکثیر شده با آغازگرهایPaConsI- / EM-PC3consRD F(FAM)، محدوده اندازه ای بین حداقل ۶۰۸ bp (در

گونه *P. korshinskyi*، نمونه ۲۳) تا ۲۶۳۰ bp (در گونه *P. orientalis*، نمونه ۱۲۱) را تکثیر کردند. کاربرد این جفت آغازگر که در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت قبلا فقط آلل S_{26} را در بادام تکثیر نموده بود (Ortega et al., 2006).

اندازه آلل های تکثیر شده توسط آغازگرهای EM-PC2consFD و EM-PC3consRD محدوده ای بین ۲۴۳ bp (در گونه *P. korshinskyi*، نمونه ۲۱) تا ۲۰۶۶bp (در گونه *P. elaeagnifolia*، نمونه ۱۰۸) متغیر بود. Ortega et al. (2006) نیز اندازه آلل های تکثیر شده با استفاده از این جفت آغازگر را بین ۲۸۷۲ -۸۰ جفت باز در ارقام بادام گزارش نمودند. در گزارش آنها کوچکترین اندازه آلل های تکثیر شده به ترتیب مربوط به آلل های S_{10}، S_{11}، S_{15}، S_{18} و S_{28} بود که اندازه ای بین ۸۰ تا ۱۹۶ جفت باز داشتند. اما در این آزمایش اندازه آلل های تکثیر شده عموما بیشتر از ۲۰۰ جفت باز بود.

آغازگرهای AS1II و AmyC5R دارای توالی مشترک در بین چهار *S*-RNases هستند که به ترتیب در مناطق حفاظت شده C1 و C5 مربوط به *S*-RNases تیره Rosaceae وجود دارند (Tamura et al., 2000). این آغازگرها تقریبا تمام طول مکان *S* را تکثیر می کنند، ولی نقطه ضعف آنها این است که قادر به تشخیص آلل های S_3 و *Sf* نیستند و هر دو این آلل ها اندازه ای برابر ۱۲۰۰ جفت باز را نشان می دهند. در این آزمایش این جفت آغازگر آلل هایی با اندازه حداقل ۵۵۵bp (در گونه *P. communis*، نمونه ۴۸) تا ۲۳۲۳bp (در گونه *P. elaeagnifolia*، نمونه ۱۰۸) را تکثیر کردند و حدود ۹۴ آلل را در بین ۶۳ نمونه مورد بررسی نشان دادند. این در حالیست که Tamura et al., (2000) محدوده اندازه برای آغازگرهای AmyC5R / AS1II را بین۲۰۱۹-۶۰۰bp در پنج رقم بادام گزارش نمودند و تفاوت در اندازه آلل های تکثیر شده را به دلیل تفاوت در اندازه اینترون دوم آنها دانستند که در ناحیه بسیار متغیر (Hypervariable region) قرار دارد. این درحالیست که محدوده اندازه نوارها در گونه های وحشی بادام یا گونه های وابسته با کاربرد آغازگرهای AmyC5R / AS1IIF بین ۱۲۰۰bp-۵۰۰ تعیین شده است (Martinez Gomez et al., 2003). آنها همچنین شش آلل جدید در گونه های جنس *Prunus* گزارش کردند. Zeinalabedini et al., (2007a) نیز اندازه نوار های به دست آمده با این جفت آغازگر را ۱۲۰۰ bp-۴۷۲ گزارش کردند و تنها ۱۴ آلل را در ۱۰ نمونه از چهار گونه وحشی بادام تشخیص دادند.

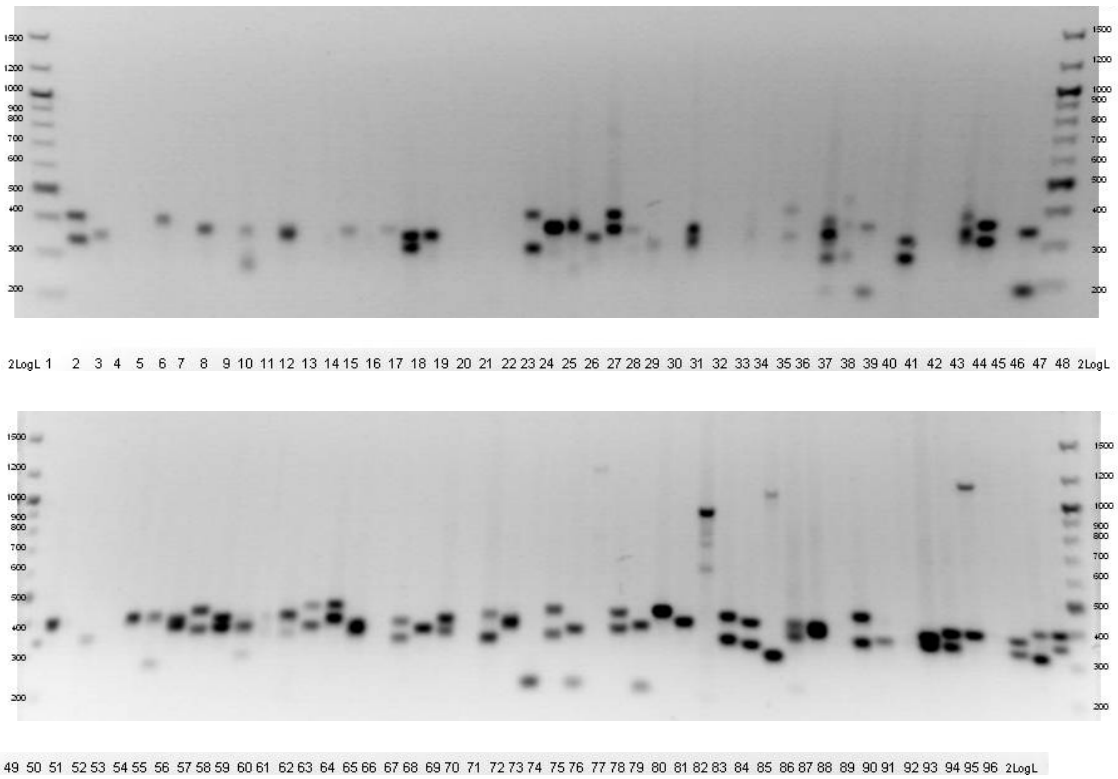
در بررسی حاضر با کاربرد جفت آغازگرAmyC5R / AS1IIF روی پنج نمونه از بادام گونه *P. scoparia*، در نمونه ۱۹ دو آلل و در نمونه ۱۰۱ یک آلل تکثیر شد ولی در سایر نمونه ها هیچ نواری تکثیر نگردید که با نتایج Zeinalabedini et al. (2007) در خصوص گونه *P. scoparia* مطابقت دارد. این در حالیست که در این آزمایش در گونه *P. kansuensis* دو آلل با اندازه های ۷۷۷ و ۸۵۶ جفت باز تکثیر شد. همچنین کاربرد جفت آغازگر AmyC5R / CEBASf هیچ گونه آلل *Sf* حتی در نمونه های *P. webbii* تکثیر نکرد.

کاربرد آغازگر (SfF/SfR) توسط Channuntapipat et al., (2003) نیز قادر به تشخیص آلل *Sf* در *P. webbii* نبود. وی بیان کرد که خودگرده افشانی در *P. webbii* شاید بیش از آنکه نتیجه حضور یک آلل *Sf* باشد ناشی از غیرفعال بودن سیستم *S*-RNases باشد. در این بررسی از آغازگر های چندگانه Multiplex (AS1II / CEBASf / AmyC5R) نیز استفاده شد. این سری آغازگرها قادرند که نوارهایی با اندازه ۴۰۰ و ۱۲۰۰ جفت باز برای تکثیر آلل های *Sf* و *S3* تولید کنند که از طریق کاربرد آغازگرهای AS1II /AmyC5R قابل تشخیص نبود. کاربرد این سری آغازگر در بین ژنوتیپ های مورد بررسی هیچ آلل خودسازگاری (با اندازه حدود ۴۰۰ جفت باز) را نشان نداد. این سری آغازگرها، آلل هایی با اندازه حداقل ۵۵۶ bp (در گونه *P. communis*، نمونه ۴۸) تا۲۱۷۷ bp (در رقم نان پاریل، نمونه ۱۲۵) تکثیر کردند. در حالیکه Sanchez-Perez et al. (2004) محدوده اندازه آلل های تکثیر شده توسط آغازگرهایAmyC5R / CEBASf / AS1II را بینbp ۴۰۰-۲۰۱۹ در بادام گزارش نمود.

کاربرد جفت آغازگر شماره ۲ و ۸ معرفی شده توسط Ma & Oliviera (2001) و جفت آغازگر SfF/SfR معرفی شده توسط Channuntapipat et al., (2003) برای بررسی خودسازگاری در بین گونه های

P. elaegnifolia, P. hauskunechtii, P. scoparia, P. lycioides, P. orientalis, P. communis، هیچ آلل خود سازگاری را نشان نداد (Elahi et al., 2008) . از ۹۶ نمونه مورد بررسی در این آزمایش، در ۱۳ نمونه (شماره های ۲۵، ۲۶، ۲۸، ۴۷، ۵۴، ۵۵، ۵۶، ۵۷، ۵۸، ۶۱، ۶۳، ۹۱ و ۱۱۷) هیچ نواری توسط شش جفت آغازگر های مورد استفاده تکثیر نگردید. در دو نمونه از *P. nairica* (شماره های ۳۸ و ۳۹) بیش از دو آلل تکثیر یافت که می تواند ناشی از پلی پلوئیدی یا چندگانه بودن مکان ژنی باشد. بیشتر آلل هایی که در گزارشات قبلی در ارقام بادام مشاهده شده بود در این بررسی نیز تکثیر شدند. رقم Nonpareil دارای آلل های S_7 و S_8 بود که با گزارش Tamura et al. (2000)، Boskovic et al. (2003) و Sanchez-Perez et al. (2004) مطابقت داشت.

رقم Texas دارای آلل های S_1 و S_5 بود که با گزارش Boskovic al. (1997) ، Tamura et al. (2000) و Sutherland et al. (2004) مطابقت دارد و رقم Carmel که دورگ دو رقم فوق الذکر است دارای آلل های S_5 و S_8 بود که با گزارش Martinez-Gomez et al., (2003) و Lopez et al., (2004) مطابقت دارد.

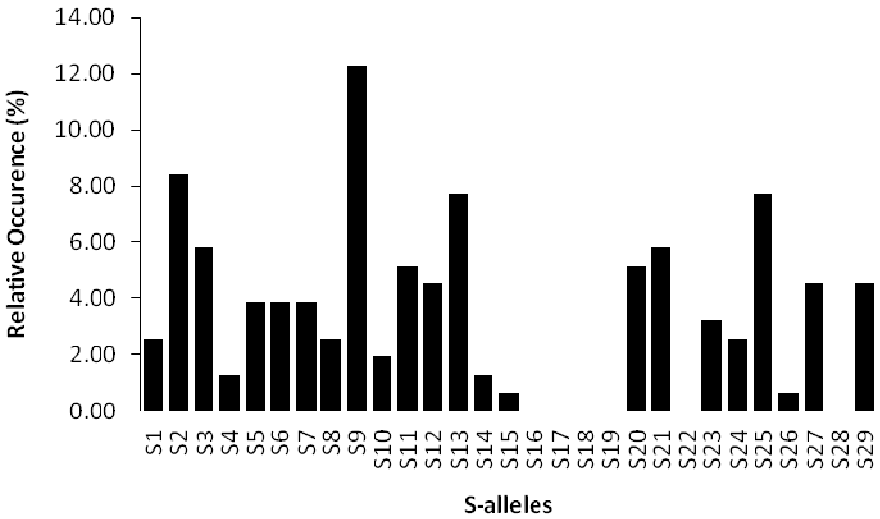


شکل ۱- کاربرد آغازگرهای PaConsI-F / EM-PC1ConsR برای بررسی تنوع آلل های *S* گونه های وحشی بادام، نشانگر وزن مولکولی DNA (2Log Ladder, Biolab, 1ng DNA)، شماره های محور افقی گویای شماره نمونه ها بر روی ژل آگارز می باشد (مطابق جدول ۱).

بررسی فراوانی آلل های ناسازگاری

با استفاده از شش جفت آغازگر دژنره و اختصاصی روی کلیه نمونه ها، تعداد ۱۵۵ آلل ناسازگاری تکثیر گردید که با مقایسه اندازه و نوع آلل ها با گزارشات قبلی مشخص گردید که بیشترین فراوانی مربوط به آلل های S_9، S_2، S_{13} و S_{25} و به ترتیب با ۱۲/۲۶، ۸/۳۹ ، ۷/۷۴ و ۷/۷۴ درصد بودند (شکل۲). آلل های S_{16}، S_{17}، S_{18}، S_{19}، S_{22}، S_{28} و S_{30} در نمونه های مورد مطالعه یافت نگردید و آلل های S15 و S26 نیز هر دو با ۰/۶۵ درصد، کمترین فراوانی را نشان دادند. در پژوهش Lopez et al. (2006) در ۱۱۵ رقم بادام اروپایی و آمریکایی از بین ۱۲۹ آلل خودناسازگاری، آلل های S_8، S_1، S_7 و S_5 را به

ترتیب با ۱۹/۳۷، ۱۶/۲۸، ۱۳/۱۸ و ۱۰/۰۸ درصد به عنوان فراوان ترین آلل ها معرفی کردند. در بررسی ۷۰ رقم بادام ایرانی، از بین ۱۴۶ آلل خودناسازگاری، آلل هایS_4، S_1، S_{24}، S_7، S_{12} و S_2 را به ترتیب با ۱۸/۵، ۱۷، ۱۷، ۱۵/۷، ۱۵/۷ و ۱۴/۳ به عنوان آلل هایی معرفی شدند که بیشترین فراوانی را در بین آلل های ناسازگاری داشتند (Mousavi et al., 2010). فراوانی آلل S_1 در ارقام بادام ایرانی و ارقام اروپایی، گویای این حقیقت می تواند باشد که احتمالا بادام از طریق ایران به غرب آسیا و اروپا منتقل شده است و نظرات Browicz (1974) و Vezvaei (2003) را تایید می کند. همچنین وجود فراوانی آلل های S_1، S_5، S_7 و S_8 در ارقام اروپایی، آمریکایی و استرالیایی نیز تایید کننده نظر Kester & Gradziel (1996) و Wooley et al. (2000) است که به ترتیب معتقدند که بادام از اروپا به آمریکا و سپس از آمریکا به استرالیا برده شده است. این نتایج همگی، نظر Lopez et al. (2006) که معتقدند فراوانی آلل هایS با منشاء جغرافیایی بادام ارتباط دارد را تایید می کند چرا که فراوانی آلل های S ارقام مناطق مختلف با هم متفاوت بوده اند و در مورد گونه های بادام بررسی شده نیز پراکنش جغرافیایی و ارتفاعی بسیار متنوعی در بین آنها مشهود است.



شکل ۲- مقایسه حضور نسبی آلل های S در گونه های وحشی بادام و گونه های وابسته به آن

روابط فیلوژنیک گروه های گیاه شناسی بادام بر اساس آلل های S تکثیر شده

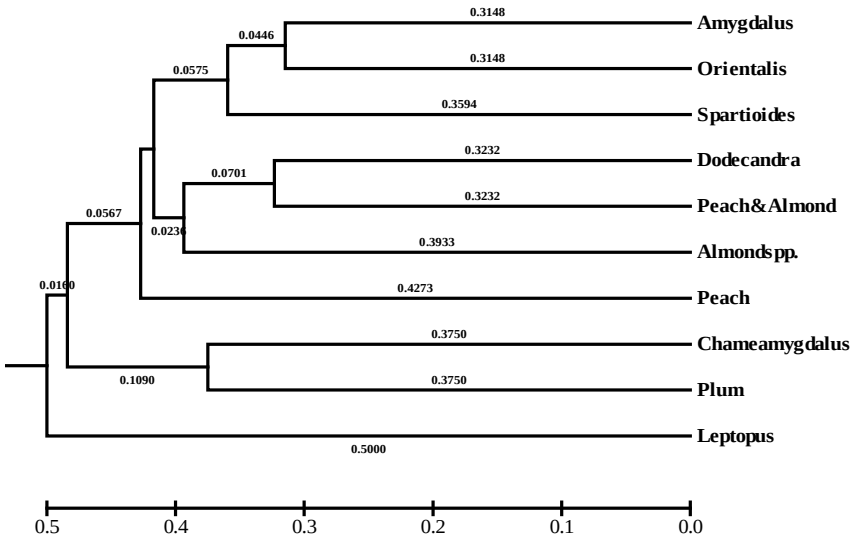
گونه های مختلف بادام وحشی که بر اساس رده بندی گیاه شناسی بطور قراردادی در گروه های مختلف قرار داده شدند در جدول (۱) آورده شده اند.

تجزیه اندازه نوارهای خوانده شده از دستگاه توالی یاب با کمک برنامه Powermarker نشان داد که گروه های تاکسونومیک مختلف که این گونه ها به آنها تعلق دارند را می توان به وسیله آلل های S از هم تفکیک کرد. بعبارت دیگر شاید بتوان ادعا نمود که آلل های موجود در گونه های متعلق به هر گروه Group یا بخش Section نسبتا مشترک بوده و از قرابت نزدیکی برخوردارند و برعکس آلل های S مشترک، در بین گروه هایی که از لحاظ تاکسونومی از هم دور هستند اندک است.

بررسی فواصل ژنتیکی بین گروه های تاکسونومیک قراردادی (ذکر شده در جدول ۱) نشان داد که در برخی از گروه ها حداکثر فاصله ژنتیکی وجود دارد که فاقد هر گونه آلل S مشترکی بوده اند. حداقل فاصله به مقدار ۰/۶۳ بین دو گروه *Amygdalus* و *Orientalis* که در طبقه بندی Socias i Compnay (1998) قرابت نزدیکی به یکدیگر دارند و در بخش Euamygdalus قرار دارند، بدست آمد. بر اساس نتایج حاصل Leptopus، Plum و *Chameamygdalus* بیشترین فاصله ژنتیکی را با سایر گروه ها داشتند. بخش Leptopus نیز بنا بنظر Socias i Compnay (1998) از بادام ها جدا است. این نتیجه

جدایی زود هنگام آلوها از بادام و هلو در حین تکامل را تقویت می کند (Watkins, 1995).

همچنین این نتایج گویای آن است که چرا دورگ گیری بین گونه ای، بین بخش *Chameamygdalus* با بادام معمولی به دشواری قابل انجام است (Kester & Gradziel, 1996) و توجیه کننده نظر Focke (1894) می باشد که بخش *Chameamygdalus* را به عنوان یک زیرجنس جداگانه در جنس *Prunus* در نظر گرفته است (Lee & Wen, 2001).



شکل ۳- دندروگرام گروه ها، بر اساس آلل های *S*، روشUPGMA (بر اساس Nei's, 1983)، با استفاده از آغازگرهایEM-PC1consRD /PaConsI-F (FAM) و تعیین اندازه شده با دستگاه توالی یاب (ICBR,ABI)

تجزیه خوشه ای

تجزیه خوشه ای بیشترین فاصله ژنتیکی بین گروه Leptopus و سایر گروه ها را نشان داد (شکل ۳). Browicz (1974) و Socias i Company (1998) سری *Dodecandra* (*Lycioides*) را بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی (نحوه قرارگیری گل در جوانه، شکل نهنج، تعداد پرچم و وجود خار در شاخه ها) از *Icosandrae* جدا کردند. سری *Icosandrae* شامل بخش های *Euamygdalus*, *Spartiodes*, *Chameamygdalus* و *Leptopus* است. بررسی آلل های *S* در این آزمایش نشان داد که سری *Dodecandra* نزدیک به بخش *Euamygdalus* (شامل گروه های *Amygdalus* و *Orientalis*) قرار گرفته است.

نتیجه گیری کلی

مقایسه آلل های بین گونه های خویشاوند جنس *Prunus* مطالعه اجداد و منشاء آلل های ناسازگاری را ممکن می سازد. همچنین تعیین ارتباط بین آلل ها در ارقام و گونه های جنس *Prunus* امکان گرده افشانی های کنترل شده بین بادام و گونه های خویشاوند آن را فراهم می سازد. کاربرد آغازگرهای مختلف تنوع بسیار بالایی از آلل های ناسازگاری را در نمونه های مورد بررسی نمایش داد و اندازه آلل ها در مکان های ژنی مختلف بسیار متفاوت بود. پس از استفاده از شش جفت آغازگر عمومی و اختصاصی در کلیه نمونه ها، تعداد ۱۵۵ آلل خودناسازگاری تکثیر گردید ولی در این بررسی هیچ نواری منتسب به خودسازگاری مشاهده نگردید. فراوانی آلل های *S* ارقام مناطق مختلف با هم متفاوت بودند و لذا بی شک، فراوانی آلل های*S* با منشاء جغرافیایی بادام ارتباط دارد. در گونه های بادام بررسی شده نیز پراکنش جغرافیایی و ارتفاعی بسیار متنوعی در بین آنها مشهود بود. آنالیز اندازه نوارهای تکثیر شده نشان داد که گروه های تاکسونومیک مختلف که این گونه ها به آنها تعلق دارند را می توان به وسیله آلل های *S* از هم تفکیک کرد و آلل های *S* مشترک، در بین گروه

هایی که از لحاظ تاکسونومی از هم دور هستند، کمتر است. بر اساس نتایج بدست آمده، گروه های *Leptopus*، Plum و*Chameamygdalus* بیشترین فاصله ژنتیکی را با سایر گروه ها داشتند. این نتیجه تئوری جدایی زود هنگام آلوها از بادام و هلو در حین تکامل را تقویت می کند.

سپاسگزاری

این تحقیق در آزمایشگاه میوه های هسته دار گروه علوم باغبانی دانشگاه فلوریدا به انجام رسید. بدینوسیله از دکتر خوزه اگزاویر چاپارو و دکتر کوین فولتا، اساتید دانشگاه مذکور و از دکتر توماس گرادزیل استاد دپارتمان علوم گیاهی دانشگاه دیویس (کالیفرنیا) تشکر و قدردانی می شود. همچنین از بانک ژن موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج (NPGBI)، دپارتمان کشاورزی آمریکا (USDA)، دانشگاه کالیفرنیا (UC Davis)، دانشگاه فلوریدا (UF) و دانشگاه جورجیا (UGA) به منظور ایجاد هماهنگی در تهیه ژرم پلاسم مورد نیاز تشکر می شود.

REFERENCES

1. Banovic, B., Surbanovski, N., Konstantinovic, M. & Maksmovic, V. (2009). Basic RNase of wild almond (*Prunus webbii*): Cloning and characterization of six new *S*-RNase and one non-*S* RNase genes. *Journal of plant Physiology*, 166, 395-402.
2. Batlle, I., Ballester, J., Boskovic, R., Romero, M.A., Tobutt, K.R. & Vargas, F.J. (1997). Use of stylar ribonucleases in almond breeding to design crosses and select self-compatible seedlings. *FAO CIHEAM Network on Nuts, Nucis-Newsletter*, 6, 12–14.
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. Boskovic, R., Tobutt, K.R., Batlle, I., Duval, H., Martinez-Gomez, P. & Gradziel, T.M. (2003). Stylar ribonuclease in almond: correlation with and prediction of incompatibility genotypes. *Plant Breeding*, 122, 70-76
5. Boskovic, R., Tobutt, K.R., Ortega, E., Sutherl, B.G. & Godini, A. (2007). Self (in) compatibility of the almonds *P. dulcis* and *P. webbii*: detection and cloning of wild-type *S*f and new self-compatibility alleles encoding inactive S-RNases. *Molecular Genetics and Genomics*, 278, 665-676.
6. Browicz, K. (1974). The genus *Amygdalus* in Turkey. Proceedings of *International Symposium on Turkish Flora*. Istanbul Univ. Orman Facult. Yainlari, 209, 239-255
7. 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
8. Channuntapipat, C., Sedgley, M., Batlle, I., Arus, P. & Collins, G. (2002). Sequences of the genomic cDNA encoding the *S*1, *S*9, S10 and *S*23 alleles from almond, *Prunus dulcis*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 77(4), 387-392
9. Channuntapipat, C., Wirthensohn, M., Raesh, S.A., Batlle, I., Arus, 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
10. de Cuyper, B., Sonneveld, S. & Tobutt, K.R. (2005). Determining self incompatibility genotypes in Belgian wild cherries. *Molecular Ecology*, 14, 945-955.
11. de Nettancourt, D. (1977). Incompatibility in angiosperms. Springer, Berlin Heidelberg New York.
12. Elahi, M., Ashrafi, S., Kadkhodaei, S. & Nekouei, M.K. (2008). A study on the presence of self compatibility alleles in Iranian wild almonds (*Amygdalus* spp.) using specific allele amplification. *The conference of modern variety breeding for present and future needs*. Valencia, Spain.
13. Focke, W.O. (1894). Rosaceae. *In* A. Engler and K. Prantl [eds.], *Die natu¨rlichen pflanzenfamilien*. III, 3, 1–61. Engelmann, Leipzig, Germany.
14. Gagnard, J.M. (1954). Recherches sur les caracters systematiques et sur les phenomenes de sterilite chez les variete d'amandiers cultivres en Algerie. Ann. Inst Agron. Serv. Rech. Exp. Agric. *Algeric*, 8(2), 163P.
15. Gradziel, T.M., Martinez-Gomez, P. & Dandekar, A.M. (2001). The use of *S*-allele specific PCR analysis to improve breeding efficiency for self –fertility in almond. *HortScience*, 36, 440-449.
16. Halasz, J., Hegedus, A. & Pedryc, A. (2005). Molecular background of self –incompatibility in apricot. *Acta Biologica Szegediensis*, Vol. 49(1-2), 21-22.

17. Halasz, J., Fodor, A., Hegedus, A. & Pedryc, A. (2008). Identification of a new self-incompatibility allele (*S*31) in a Hungarian almond cultivar and its reliable detection. *Scientia Horticulturae*, 116, 448-451.
18. Kester, D.E. & Gradziel, T.M. (1996). Almonds. In: J. Janick and J.N. Moore (Ed). *Fruit Breeding*. Vol. III: Nuts: 1-97. John Wiley & Sons , New York (USA).
19. Kodad, O., Alonso, J.M., Sanchez, A., Oliveira, M.M. & Socias i Company, R. (2008). Evaluation of genetic diversity of *S*-alleles in an almond germplasm collection. *The journal of Horticultural science and Biotechnology*, 83(5), 603-608.
20. Lee, S. & Wen, J. (2001). A phylogenetic analysis of *Prunus* and the *Amygdaloideae* (*Rosaceae*) using ITS sequences of nuclear ribosomal DNA. *American Journal of Botany*, 88, 150-160.
21. Lopez, M., Mnejja, M., Rovira, M., Collins, G., Vargas, F.J., Arus, P. & Batlle, I. (2004). Self-incompatibility genotypes in almond re-evaluated by PCR, stylar ribonucleases, sequencing analysis and controlled pollinations. *Theoretical and Applied Genetics*, 109, 954-964
22. Lopez, M., Vargas, F.J. & Batlle, I. (2006). Self (in)compatibility almond genotypes: A review. *Euphytica*, 150, 1-16
23. Ma, R.C. & Oliveira, M.M. (2001). Molecular cloning of the self-incompatibility genes *S*1 and *S*3 from almond (*Prunus dulcis* cv. Ferragnes). *Sexual Plant Reproduction*, 14, 163-167.
24. Martinez-Gomez, P., Dandekar, A.M., Gradziel, T.M., Lopez, M., Batlle, I., Alonso, J.M., Socias i Company, R., Ortega, E., Sanchez-Perez, R. & Dicenta, F. (2003). Identification of self-incompatibility alleles in almond and related *Prunus* species using PCR. *Acta Horticulturae*, 622, 397-401
25. Martinez-Gomez, P., Sanchez-Perez, R., Dicenta, F., Howad, W., Arus, P. & Gradziel, T.M. (2007). Almond in: *Genome mapping and molecular breeding in plants*, 4, 229-242, *Fruits and Nuts*, Chapter 11, Springer.
26. Mousavi, A., Fatahi, R. & Zamani, Z. (2010). *Evaluation of genetic diversity and identification of self-incompatibility alleles in some almond genotypes and cultivars*. Ph.D. Thesis. University of Tehran. (In Farsi).
27. Ortega, E. & Dicenta, F. (2003). Inheritance of self-compatibility in almond: breeding strategies to assure self-compatibility in the progeny. *Theoretical and Applied Genetics*, 106, 904-911.
28. Ortega, E. & Dicenta, F. (2004). Suitability of four different methodes 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. & Dicenta, F. (2006). Self-fertilization in homozygous and heterozygous self-compatible almonds. *Scientia Horticulturae*, 109, 288–292
31. Ortega, E., Boskovic, R.I., Sargent, 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 recombination. *Molecular Genetics and Genomics*, 276, 413-426
32. Ortega, E., Mousavi, D.J. & Dicenta, F. (2009). Morphological and molecular characterization of Iranian almond cultivars and their implications for breeding. *Abstract book of V International symposium on pistachios and almonds*. Turkey. (pp. 210)
33. Popov, M.G., Kostina, K.F. & Povarkova, A.I. (1929). Wild trees and shrubs in Central Asia (Russian). *Trudi Po Prikladnoi Botanike, Genetike I Selektsii*, 22(3), 241-483.
34. Sanchez, A.M. & Oliveira, M.M. (2005). *S*-alleles in self compatible *Prunus webbii*. *Options Mediterraneans*. 147-152.
35. Sanchez-Perez, R., Dicenta, F. & Martinez-Gomez, P. (2004). Identification of *S*-alleles in almond using multiple-PCR. *Euphytica*, 138, 263-269
36. Schueler, S., Tusch, A. & Scholz, F. (2006). Comparative analysis of the within-population genetic structure in wild cherry (*Prunus avium* L.) at the self-incompatibility locus and nuclear microsatellites. *Molecular Ecology* 15, 3231-3243.
37. Socias i Company, R., Kester, D.E. & Bradley, M.V. (1976), Effects of temperature and genotype on pollen tube growth in some self-incompatible and selfcompatible almond cultivars. *Journal of American Society of Horticultural Science*, 101, 490–493.
38. Socias i Company, R. & Felipe, A.J. (1992). Almond: a diverse germplasm. *HortScience*, 27, 718-863.
39. Socias i Company, R. (1998). La taxonomie de l'amandier. Proceedings of the Xth GREMPA seminar, organized by the INRAM with the collaboration of the FAO CIHEAM Network on Nuts. Meknes, Morocco. 1996, *Options Mediterraneennes*, 33, 91-93.

40. Socias i Company, R., Alonso, J.M. & Gomez Aparisi, J. (2004). Fruit set and productivity in almond as related to self-compatibility, flower morphology and bud density. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 79, 754–758.
41. 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. *Theoretical and Applied Genetics*, 107, 1059-1070.
42. Stanys, V., Stanyte, R., Staniene, G. & Vinskiene, J. (2008). *S*-allele identification by PCR analysis in Lithuanian sweet cherries. *Biologija*, 54(1), 22-26.
43. Sutherland, B.G., Robbins, T.P. & Tobutt, K.R. (2004). Primers amplifying a range of *Prunus S*-alleles. *Plant Breeding*, 123, 582-584.
44. 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. *Theoretical and Applied Genetics*, 101, 344-349
45. Tufts, W.P. (1919). Almond Pollination. California Agricultural Experiment Station Bulletin. 306
46. Tufts, W.P. & Philp G.L. (1922). Almond pollination. *California Agricultural Experiment Station Bulletin*. 346
47. Vezvaei, A. (2003). Izosyme diversity in Iranian almond, *XXVI International Horticulture Congress*: Genetics and Breeding of tree fruits and nuts. *Acta Horticulturae*, 622, 451-456
48. Watkins, R. (1995). Cherry, plum, peach, apricot and almond. In: J. Smartt, and N.W. Simmonds (eds). *Evolution of Crop Plants* (Third ed.). Burnt Mill: Longman Scientific and Technical, 326-332. Longman, Londan.
49. Wooley, F.M., Collins, G.G. & Sedgley, M. (2000). Application of DNA fingerprinting for the classification of selected almond [*Prunus dulcis* (Mill.) D. A. Webb] cultivars. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 40, 995-1001.
50. Zeinalabedini, M., Majourhat, K., Khayam-Nekoui, M., Grigorian, V., Torchi, M., Dicenta, F. & Martinez-Gomez, P. (2007a). Molecular characterization of almond cultivars and related wild species using nuclear and chloroplast DNA markers. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 5(3&4), 242-247
51. Zeinalabedini, M., Majourhat, K., Khayam-Nekoui, M., Grigorian, V., Torchi, M., Dicenta, F. & Martinez-Gomez, P. (2007b). Comparison of the use of morphological, protein and DNA markers in the genetic characterization of Iranian wild *Prunus* species. *Scientia Horticulturae*, 116(1), 80-88.