

شناسایی آلل‌های خودناسازگاری برخی از ژنوتیپ‌های بادام استان یزد با استفاده از روش PCR

میترا ابویی^۱، کاظم کمالی^{۲*}، محمود سلوکی^۳، لیلا فهمیده^۳ و علی ایمانی^۴

۱ و ۳. دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۲. دانشیار، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه یزد، یزد، ایران

۴. دانشیار، پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۴/۴ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۶/۵)

چکیده

یکی از مشکلات تولید بادام، خودناسازگاری در این گیاه بوده که از نکات مهم اصلاحی این گیاه تلقی می‌شود. خودناسازگاری در بادام باعث غیر یکنواختی زمان برداشت، مشکلات مربوط به گرده‌افشانی و بروز مشکلاتی در مدیریت باغ خواهد شد. اغلب ارقام بادام دارای خودناسازگاری از نوع گامتوفیتیکی هستند که توسط یک مکان ژنی چند آللی کنترل می‌شود. عامل بازدارنده لقاح گل در این پدیده توقف رشد لوله گرده در میانه خامه می‌باشد. هدف از این تحقیق شناسایی و تعیین آلل‌های مربوط به خودناسازگاری در ژنوتیپ‌های بادام در استان یزد بوده است. در این تحقیق، ژنوتیپ‌های برتر بادام جمع‌آوری و پس از استخراج DNA برای تشخیص آلل‌های S جفت آغازگرهای اختصاصی AS1II-AmyC5R، ConF-ConR و Cebador2-Cebador8 مورد استفاده قرار گرفت. در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جفت آغازگر AS1II-AmyC5R و Cebador2-Cebador8 به ترتیب باندهایی به اندازه ۱۲۰۵ و ۱۲۰۰ جفت بازی برای آلل S_f تشکیل گردید. لازم به ذکر است ارقام خودناسازگار از تلاقی تونو با ترکیب آللی S_f/S_f به‌عنوان والد پدری و خودسازگار و آیدین با ترکیب آللی S_1/S_{23} به‌عنوان والد مادری و خودناسازگار به‌دست‌آمده است. با استفاده از جفت آغازگر ConF-ConR آلل‌های S_1 ، S_2 ، S_3 ، S_{10} ، S_{11} ، S_{23} و S_{31} در نمونه‌های خودناسازگار شناسایی شدند. در این تحقیق آلل‌های S_f ، S_3 ، S_2 ، S_1 ، S_5 ، S_{10} ، S_{11} و S_{23} با استفاده از جفت آغازگر AS1II-AmyC5R شناسایی شدند. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده آلل‌های S_1 ، S_2 ، S_3 و S_{11} دارای بیشترین فراوانی و آلل‌های S_5 ، S_{23} ، S_{10} و S_{31} به ترتیب کمترین درصد فراوانی را نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: آلل خودناسازگاری، بادام، نشانگر مولکولی، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز.

Identification of self-incompatibility alleles in some of Yazd province almond genotypes by using PCR method

Mitra Abouei¹, Kazem Kamali^{2*}, Mahmood Soluki³, Leila Fahmideh³ and Ali Imani⁴

1, 3. M.Sc. Student and Associate Professor, Faculty of Agriculture, Zabol University, Zabol, Iran

2. Associate Professor, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Yazd University, Yazd, Iran

4. Associate Professor, Temperate Fruits Research Center, Horticultural Science Research Institute (HSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

(Received: June 25, 2019 - Accepted: Aug. 27, 2019)

ABSTRACT

One of the problems in almond production is self-incompatibility in this plant, which is considered as an important point of breeding. Self-incompatibility causes non-uniformity of harvesting time as well as some of garden management and pollination problems. Most cultivars of almonds have gametophytic self-incompatibility that is controlled by a multi-allelic gene locus. The fertilization inhibitor factor in this phenomenon, pollen tube growth stops in the middle of the style. The purpose of this research was identification and determination of the self-compatible genotype in the Yazd province. In this investigation better genotypes of almond were collected and after DNA extraction was done, in order to detect S alleles in different almond and some hybrid genotypes, the specific primer pairs, including AS1II-AmyC5R, ConF-ConR and Cebador2-Cebador8, were used in the polymerase chain reaction. In polymerase chain reaction, using the AS1II-AmyC5R and Cebador2-Cebador8 primers, the S_f allele with the size of 1200 base pairs was detected. Using the ConF-ConR pair of primer, the S_1 , S_2 , S_3 , S_{10} , S_{11} , S_{23} , and S_{31} alleles were detected in the self-incompatible samples. Using AS1II-AmyC5R pair of primer, the known alleles of S_3 , S_f , S_2 , S_1 , S_5 , S_{10} , S_{11} , S_{23} , and S_{13} were detected. The other bands obtained from the PCR were related to the known self-incompatibility alleles that might be considered as new alleles. According to the obtained results, S_1 , S_2 , S_3 , and S_{11} alleles had the highest frequency and S_5 , S_{23} , S_{10} , S_{13} and S_{31} alleles respectively had the lowest frequency.

Keywords: Almond, molecular marker, PCR, S-allele, self-compatibility.

* Corresponding author E-mail: kkamali@yazd.ac.ir; kamali100in@yahoo.com

مقدمه

در باغداری نوین میزان محصول و یکنواختی آن دارای اهمیت زیادی است. تنها زمانی که شرایط برای انجام گرده‌افشانی و تشکیل میوه در درخت بهینه باشد، می‌توان عملکرد زیادی انتظار داشت. شناسایی آلل‌های خودناسازگاری جهت انتخاب صحیح درختان گرده‌زا و افزایش عملکرد در باغ‌های تجاری و همچنین در کارهای اصلاحی به‌منظور اطمینان از موفقیت در تلاقی‌های کنترل‌شده حائز اهمیت می‌باشد (Valizadeh *et al.*, 2014; Mousavi *et al.*, 2007). بادام (*Prunus dulcis*) متعلق به خانواده گل‌سرخیان (Rosacea) و زیرخانواده پرونوئیده (Prunoideae) است. ارقام وحشی بادام از توده‌های طبیعی در آسیای مرکزی منشأ گرفته‌اند و بومی مناطق کوهستانی خشک آسیای مرکزی و غربی هستند که تا سواحل دریای مدیترانه گسترش یافته است. گونه‌های وحشی این گیاه نیز در این مناطق مشاهده می‌شود. امروزه مناطق عمده کشت بادام در سه نقطه دنیا شامل آسیا، حوزه مدیترانه و آمریکا (ایالت کالیفرنیا) متمرکز بوده ولی در سطوح محدودی هم در استرالیا، آفریقای جنوبی، آرژانتین و شیلی کشت می‌شود (Gradezile & Kester, 1996; Socias i Company, 2017). بادام یکی از درختان مهم مناطق معتدله است که با توجه به ارزش غذایی آن در کشورهای مختلف به عنوان یک محصول مهم و اقتصادی کشت می‌شود. افزایش کمی و کیفی محصول بادام از اهداف برنامه‌های تحقیقاتی اکثر کشورهای تولیدکننده آن است. یکی از مشکلات تولید بادام خودناسازگاری است که از نکات مهم در اصلاح بادام می‌باشد (Ebadi *et al.*, 2011; Rasouli, 2017). خودناسازگاری در بادام یک پدیده ژنتیکی تلقی شده و از نوع گامتوفیتیک می‌باشد. در این نوع ناسازگاری رشد لوله گرده در میانه خامه متوقف می‌شود. علت این توقف به‌دلیل وجود ریبونوکلتازهایی از جنس گلیکوپروتئین بوده که تحت عنوان S-RNase نامیده می‌شوند (Gómez *et al.*, 2019). این صفت در بادام توسط یک مکان ژنی (S-locus) چندآلی کنترل می‌شود. وجود آلل‌های مشابه در دانه گرده و مادگی موجب نرسیدن لوله‌گرده به تخمدان و توقف آن در طول خامه می‌شود. امروزه ۴۴ نوع آلل S تحت نام‌های S₁، S₂،

S₃، ...، S_n در بادام شناخته شده و آلل S_r به‌عنوان منشأ خودسازگاری در بادام معرفی شده است (Ortega & Dicenta, 2003; Zainalabedini *et al.*, 2008; Kodad, 2016; Gradziel, 2015; *et al.*). خودناسازگاری مانع از خودباروری می‌شود که در تکامل یک مزیت محسوب می‌شود چرا که موجب افزایش تلاقی‌های بین‌گونه‌ای می‌شود (Ortega & Dicenta, 2003; Herrera, 2018). وجود این پدیده فیزیولوژیکی باعث کاهش عملکرد بادام در مورد کشت یک رقم می‌شود. بنابراین به‌منظور احداث باغ‌های تجاری بادام کشت حداقل دو رقم سازگار با هم ضرورت دارد. به این علت شناسایی آلل‌های خودناسازگار (S-آلل) به‌ویژه در ژنوتیپ‌های برتر برای تعیین ارقام گرده‌دهنده از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. امروزه روش‌های مختلفی برای تشخیص ژنوتیپ‌ها و ارقام خودسازگار از خودناسازگار و همچنین تعیین آلل‌های S در بادام ابداع شده است که از جمله آن‌ها می‌توان به کیسه‌زنی شاخه و شمارش میوه در شرایط باغ، بررسی رشد لوله گرده به میکروسکوپ فلورسنس، آنالیز ریبونوکلتازهای خامه گل‌ها با روش NEPHGE و روش PCR اشاره کرد (Kamali *et al.*, 2014).

استفاده از تکنیک PCR به‌عنوان روش‌های جدید مولکولی برای تشخیص خودناسازگاری در بادام تلقی شده و امروزه با توجه به دقت بالا و سهولت کاربرد، نسبت به روش آنالیز ریبونوکلتازهای خامه بیشتر مورد استفاده قرار می‌گیرد (Sanchez *et al.*, 2004). اساس کاربرد این روش استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای چند آلل یا اختصاصی تک‌آلل بوده که موجب تکثیر قسمتی از زنجیره DNA یعنی آلل ژن مربوطه خواهد شد (Chanuntapitate *et al.*, 2001; Ma & Oliviera, 2001; Tamura *et al.*, 2000; Chanuntapitate *et al.*, 2000). در سال‌های گذشته، محققین از انواع آغازگرهای اختصاصی برای تعیین آلل‌های S₁، S₅، S₈، S₉، S₁₀، S₂₃، S₂، S₇ و S_r استفاده کرده و توانستند نسبت به تأیید برخی از آلل‌ها یا اعلام ژنوتیپ‌های جدید موفق شوند (Chanuntapitate, 2003). امروزه آغازگرهای زیادی جهت تشخیص آلل‌های بادام شناخته شده که بیش از ۲۰ جفت آغازگر قابل ذکر است (Alonso & Socias i Company, 2005). تاکنون مطالعات نسبتاً زیادی در

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

نمونه‌های برگ مورد استفاده در این تحقیق شامل ۱۰۰ ژنوتیپ گیاه بادام است که از مناطق اطراف استان یزد، با مختصات جغرافیایی ۵۳ درجه و ۵۸ دقیقه طول شرقی و ۳۱ درجه و ۲۷ دقیقه عرض شمالی، در ۱۸ کیلومتری جنوب غربی یزد و ارتفاع ۲۳۰۰ متر از سطح دریا که در سال‌های گذشته محصول مناسبی داشته‌اند جمع‌آوری شده است. لازم به ذکر است که اکثر نمونه‌های تهیه‌شده از لحاظ صفاتی مانند اندازه میوه، پر محصول بودن و مقاوم به سرما از بین ژنوتیپ‌های سنگی و کاغذی انتخاب شدند. برای بررسی در اردیبهشت‌ماه، تعداد ۵-۷ عدد از برگ از سرشاخه‌های جوان ژنوتیپ‌های مختلف بادام جمع‌آوری و تحت شرایط سرد سریعاً به آزمایشگاه منتقل شده و در دمای ۲۰- قرار گرفتند. نمونه‌های دوم که به‌عنوان شاهد مد نظر قرار گرفته بودند ۶ عدد از بادام‌های هیبرید خودسازگار هستند که از ایستگاه تحقیقاتی پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری وابسته به مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی کشور تهیه شدند.

رابطه با خودناسازگاری بادام در ایران هم انجام شده است (Ebadi *et al.*, 2011; Shikhalian *et al.*, 2010; Zeinalabedini *et al.*, 2012; Kamali *et al.*, 2009; Valizadeh *et al.*, 2007; Rasouli, 2017; Imani, 2000; Mousavi *et al.*, 2011). اما طی این سال‌ها روی بادام‌های استان یزد مطالعات خودناسازگاری صورت نگرفته است. این در حالی است که اکثر بادام‌زارهای استان یزد بذری بوده و تنوع زیادی در ژنوتیپ‌های موجود دیده می‌شود لذا به دلیل اهمیت آل‌های خودناسازگاری در اصلاح بادام هدف اصلی این تحقیق، تعیین آل‌های خودناسازگاری در بادام‌های موجود بوده تا بتوان در آینده با یک برنامه اصلاحی مناسب و انجام تلاقی‌های کنترل‌شده مدیریت بهتری را در این باغات به‌ویژه در مباحث گرده‌افشانی این محصول اعمال کرد. به همین منظور، با استفاده از آغازگرهای مختلف، شناسایی آل‌های خودناسازگاری در ژنوتیپ‌های بادام مورد بررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است از این نوع آغازگرها ConF-ConR و AS1II-AmyC5R در تشخیص آل‌های بادام خودسازگار و خودناسازگار استفاده شده است و نتایج دقیقی حاصل شده است (Kamali *et al.*, 2014).

جدول ۱. خصوصیات ژنوتیپ‌های بادام بررسی شده

Table 1. Characteristics of investigated almond genotypes

| Row | Plant origin | Plant trait | Row | Plant origin | Plant trait | Row | Plant origin | Plant trait | Row | Plant origin | Plant trait |
|-----|--------------|----------------------|-----|--------------|----------------------|-----|--------------|------------------|-----|--------------|-----------------------|
| 1 | Mehriz | Stony almond | 26 | Seyyedabad | Stony almond | 51 | Banadkook | Thin skin almond | 76 | Mehriz | Stony almond |
| 2 | Mehriz | Stony almond | 27 | Seyyedabad | Stony almond | 52 | Banadkook | Stony almond | 77 | Mehriz | Stony almond |
| 3 | Mehriz | Stony almond | 28 | Seyyedabad | Stony almond | 53 | Banadkook | Stony almond | 78 | Mehriz | Stony almond |
| 4 | Mehriz | Stony almond | 29 | Seyyedabad | Stony almond | 54 | Banadkook | Paper almond | 79 | Mehriz | Stony almond |
| 5 | Mehriz | Resistance latebloom | 30 | Seyyedabad | Stony almond | 55 | Banadkook | Paper almond | 80 | Mehriz | Stony almond |
| 6 | Mehriz | High Product | 31 | Seyyedabad | Paper almond | 56 | Banadkook | Paper Late bloom | 81 | Mehriz | Stony almond |
| 7 | Mehriz | Stony almond | 32 | Seyyedabad | Stony almond | 57 | Banadkook | Stony almond | 82 | Mehriz | Resistance Fruit full |
| 8 | Mehriz | Stony almond | 33 | Banadkook | Stony almond | 58 | Banadkook | Stony almond | 83 | Mehriz | Stony late bloom |
| 9 | Mehriz | Stony almond | 34 | Banadkook | Stony almond | 59 | Banadkook | Stony almond | 84 | Mehriz | Stony almond |
| 10 | Mehriz | Stony almond | 35 | Banadkook | Paper almond | 60 | Banadkook | Stony almond | 85 | Mehriz | Stony almond |
| 11 | Mehriz | Stony almond | 36 | Banadkook | Paper almond | 61 | Banadkook | Stony almond | 86 | Mehriz | Stony almond |
| 12 | Mehriz | Stony almond | 37 | Banadkook | Stony almond | 62 | Banadkook | Stony Fruit full | 87 | Mehriz | Stony almond |
| 13 | Seyyedabad | Stony almond | 38 | Banadkook | Paper almond | 63 | Banadkook | Stony Fruit full | 88 | Mehriz | Stony almond |
| 14 | Seyyedabad | Stony almond | 39 | Banadkook | Stony almond | 64 | Banadkook | Stony Resistance | 89 | Mehriz | Stony almond |
| 15 | Seyyedabad | Sandy Fruiful | 40 | Banadkook | Chilling resistance | 65 | Banadkook | Late bloom | 90 | Mehriz | Stony Fruit full |
| 16 | Seyyedabad | Resistance latebloom | 41 | Banadkook | Stony late bloom | 66 | Banadkook | Stony late bloom | 91 | Mehriz | Stony almond |
| 17 | Seyyedabad | Late bloom | 42 | Banadkook | Stony late bloom | 67 | Banadkook | Stony Resistance | 92 | Mehriz | Bitter almond |
| 18 | Seyyedabad | Paper almond | 43 | Banadkook | Stony late bloom | 68 | Banadkook | Paper almond | 93 | Mehriz | Stony almond |
| 19 | Seyyedabad | Paper resistance | 44 | Banadkook | Stony almond | 69 | Banadkook | Paper almond | 94 | Mehriz | Stony almond |
| 20 | Seyyedabad | Paper almond | 45 | Banadkook | Stony almond | 70 | Banadkook | Paper almond | 95 | Mehriz | Bitter almond |
| 21 | Seyyedabad | Paper almond | 46 | Banadkook | Resistance latebloom | 71 | Mehriz | Stony almond | 96 | Mehriz | Bitter almond |
| 22 | Seyyedabad | Stony almond | 47 | Banadkook | Stony almond | 72 | Mehriz | Stony almond | 97 | Mehriz | Stony almond |
| 23 | Seyyedabad | Stony almond | 48 | Banadkook | Stony almond | 73 | Mehriz | Stony almond | 98 | Mehriz | Stony almond |
| 24 | Seyyedabad | Stony almond | 49 | Banadkook | Stony almond | 74 | Mehriz | Stony almond | 99 | Mehriz | Stony Fruit full |
| 25 | Seyyedabad | Stony almond | 50 | Banadkook | Late bloom | 75 | Mehriz | Stony almond | 100 | Mehriz | Stony late bloom |

استخراج DNA

به منظور استخراج DNA از نمونه های برگ گی جوان در این ژنوتیپ ها به روش گپت و کلگ با کمی تغییرات انجام گرفت (Gept & Clegg, 1989). در ابتدا برای خرد کردن برگ ها و سهولت کار نصف پهنک در هر میکروتیوب قرار داده شد و سپس ۲۰۰ میکرو لیتر از بافر استخراج CTAB شامل تریس هیدروکلرید ۱۰۰ میلی مولار، EDTA ۲ میلی مولار، NaCl ۱/۴ مولار، CTAB ۲ درصد، PVP ۱ درصد و سولفید یدیم ۰/۱ درصد) داخل میکروتیوب ریخته شد تا روی نمونه را کاملاً بپوشاند. سپس میکروتیوب ها برای مدت ۴۸ ساعت در ۱۸۰- درجه سانتی گراد قرار گرفت و بعد به وسیله ابزار مخصوص استریل، له شد و مابقی مراحل استخراج داخل میکروتیوب انجام گرفت (در این تحقیق از هاون برای خرد کردن برگ ها استفاده نشد). پس از استخراج DNA، خلوص آن در دستگاه الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. برای بررسی اولیه کمیت، میزان آلودگی آن به مواد فنولی و پروتئین از دستگاه نانودراپ مدل Lite ساخت کمپانی ترمو آمریکا استفاده شد. دستگاه میزان جذب نور را در فاصله ۲۲۰ تا ۳۵۰ نانومتر برای DNA به صورت نمودار و نسبت جذب نور در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ (نشان دهنده میزان خلوص و آلودگی) و در نهایت غلظت DNA را به نانوگرم بر میکرو لیتر نشان داد.

آغازگرهای مورد استفاده

از بین آغازگرهای مربوط به تشخیص خودناسازگاری در بادام، چندین آغازگر شامل ۱- AS1II-AmyC5R و ۲- ConF-ConR، ۳- Cebador2-Cebador8 تهیه شده از شرکت های اینویترورژن آمریکا و سینا کلون در این

تحقیق مورد بررسی قرار گرفت. توالی و سایر مشخصات این آغازگرها در جدول ۲ مشخص شده است. تمام آغازگرهای مورد استفاده، توسط محققان دیگر برای تشخیص آلل های بادام استفاده شده بودند (Chanuntapitat, 2001; Ma & Oliviera, 2001;) (Tamura *et al.*, 2000).

شرایط تکثیر (PCR)

واکنش زنجیره ای پلیمرز، توسط دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت پی. کیو. لب (PEQLAB) آلمان انجام گرفت. دما از ۵۵ تا ۶۲ درجه در نظر گرفته شد. بسته به دمای اتصال مربوط به هر آغازگر برنامه پی. سی. آر تنظیم شد. برای انجام واکنش PCR از مستر میکس شرکت بایرپل فناور (FIREPOL whit 7/5 Mm) (Kamali *et al.*, 2014) استفاده شد.

واکنش PCR شامل ۴ میکرو لیتر مخلوط PCR فایرپل، ۲ میکرو لیتر از هر آغازگر و ۱ میکرو لیتر از DNA می باشد. حجم نهایی مخلوط در هر میکرو تیوب (اپندورف) به ۲۰ میکرو لیتر رسانده شد. برنامه PCR شامل، یک چرخه واسرشت سازی اولیه به مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و سپس ۳۵ چرخه با واسرشت سازی در ۹۵ درجه به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۵ تا ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵۰ ثانیه و به دنبال آن گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۸ دقیقه انجام شد (Kamali *et al.*, 2014). این نکته قابل ذکر است که مخلوط PCR استفاده شده در این تحقیق حاوی لودینگ بافر (Loading buffer) بوده و محصولات حاصل از واکنش زنجیره ای نیازی به اضافه کردن بافر سنگین کننده نداشت.

جدول ۲. آغازگرهای استفاده شده و آلل های قابل تشخیص با روش پی. سی. آر

Table 2. Used Primers and detectable alleles by PCR method

| Primer name | Primer sequences | Alleles detected | Sources |
|----------------------|---|---|------------------------------------|
| AS1II AmyC5R | TATTTTCAATTTGTGCAATGG CAAAATACCACTTCATGTAACAAC | S ₁ , S ₆ , S ₃ , S ₁₁ , S ₁₃ | Tamura <i>et al.</i> (2000) |
| ConF ConR | GTGCAACAATGGCCACCGAC TACCACTTCATGTAACAACCTG | S ₁ , S ₂ , S ₂₃ , S ₃₁ , S ₆ , S ₃ , S ₁₁ | Chanuntapitat <i>et al.</i> (2001) |
| Cebador2 Cebador8 | TACCACTTCATGTAACAACCTG ACCACCTGCAGATTTAGCGGC | S _f | Ma & Oliviera (2001) |

الکتروفورز

محصولات واکنش به وسیله الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ در بافر TAE (0.5X) با ولتاژ ۹۰ ولت به مدت ۱ ساعت، از یکدیگر تفکیک شدند. رنگ آمیزی ژل در مرحله تهیه ژل به وسیله Green Viewer انجام شد و نیازی به استفاده از اتیدیوم بروماید نبود. بعد از انجام الکتروفورز، با استفاده از اشعه ماورای بنفش (UV)، عکسبرداری از ژل، با دستگاه ژل داگ ساخت شرکت سلول بافت زیست (سبز) صورت گرفت. اندازه باندهای تکثیرشده توسط آغازگرهای استفاده شده در ژنوتیپ‌های مورد بررسی با استفاده از مارکر ۱۰ کیلو باز تهیه شده توسط شرکت دنا زیست آسیا انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج حاصله در این آزمایش نشان داد استفاده از روش Gept & Celegg (1989) برای استخراج DNA نمونه‌های بادام بدون استفاده از ازت مایع روش مناسبی جهت استخراج بوده، کیفیت و کمیت DNA به دست آمده مطلوب است و در این مطالعه کارایی این روش تأیید شد (Ebadi *et al.*, 2011; Kamali *et al.*, 2015; Kodad *et al.*, 2014). علاوه بر این با یک روش ابتکاری نمونه‌ها به طور مستقیم به میکروتیوب‌ها (اپندورف) ریخته شده و نیازی به استفاده از هاون به تعداد زیاد نیست و آلودگی احتمالی نیز به شدت کاهش می‌یابد. لازم به ذکر است برای استخراج DNA معمولاً از برگ‌هایی که نه خیلی جوان بوده و نه خیلی پیر استفاده گردید چون برگ‌های خیلی جوان دارای مواد پلی‌ساکاریدی زیادی بوده و ممکن است خلوص DNA کاهش یابد و در برگ‌های پیر نیز به دلیل سختی بافت‌های برگ ممکن است DNA به خوبی استخراج نشود. استفاده از این تکنیک و نتایج حاصله با نتایج Socias I *et al.* (2015) و Alonso *et al.* (2015) و Kamali *et al.* (2014) و Company *et al.* (2008) مطابقت دارد.

با توجه به نتایج به دست آمده از PCR ژنوتیپ‌های مورد بررسی، این ژنوتیپ‌ها به دو گروه خودسازگار و خودناسازگار تقسیم شده‌اند. لازم به ذکر است که ۳۲ نمونه مورد بررسی، ژنوتیپ بادام هیبرید می‌باشد که از بین این ۳۲ ژنوتیپ هیبرید، ۶ ژنوتیپ خودسازگار

تشخیص داده شد و به عنوان شاهد آلل خودسازگار S_f در نظر گرفته شده است. مابقی ژنوتیپ‌ها بومی استان یزد بوده‌اند و همگی خودناسازگار تشخیص داده شدند. در نهایت با محاسبه اندازه باندهای تکثیرشده در ژنوتیپ‌های بادام مورد مطالعه و مقایسه آن‌ها با اندازه باندهای مرتبط با آلل‌های ناسازگاری از قبل شناسایی شده، تمام آلل‌های خودناسازگاری ژنوتیپ‌ها تعیین شد. به نحوی که در ابتدا با استفاده از جفت آغازگر AmyC5R و AS111 در نمونه‌های خودسازگار باندهای تکثیر شده با اندازه ۱۲۰۵ جفت بازی به دست آمد. در نتیجه، همان طوری که گفته شد، با استفاده از این آغازگر از بین ۳۲ نمونه هیبرید مورد بررسی، ۶ نمونه خودسازگار شناسایی شدند که این نمونه‌ها به عنوان نمونه شاهد خودسازگار از تلاقی تونو (S_f/S_f) به عنوان والد پدری خودسازگار و آیدین (S_f/S_{23}) به عنوان والد مادری خودناسازگار با شماره‌های مختلف شامل (AT_5 ، AT_6 ، AT_{30} ، AT_{17} و AT_{13}) به دست آمده است (شکل ۱).

به دلیل نزدیکی اندازه آلل S_f (۱۲۰۵ جفت باز) با اندازه آلل S_3 (۱۱۹۶ جفت باز) با اختلاف فقط ۹ جفت باز، باندهای ایجاد شده بسیار نزدیک به هم بودند و ممکن است گاهی اوقات اشتباهاتی در تشخیص، رخ دهد (Kamali *et al.*, 2008). به همین دلیل در مرحله بعد آزمایش، برای تفکیک آلل S_f از S_3 از پرایمر اختصاصی جهت تشخیص آلل S_f استفاده شد. به این منظور از پرایمر اختصاصی Cebador2 و Cebador8 جهت تشخیص آلل S_f استفاده شد. پس از استفاده از این جفت آغازگر از باندهای ایجاد شده روی ژل آگارز انتظار می‌رفت که باند 1200bp را تکثیر کنند، که با استفاده از این جفت پرایمر، ۶ نمونه مورد نظر خودسازگار قبلی تأیید شدند (شکل ۲).

علاوه بر این، به منظور شناسایی آلل‌های خودسازگاری و خودناسازگار در ژنوتیپ‌های بادام، از جفت پرایمر AS111 (رو به جلو) و AmyC5R (معکوس) استفاده شد. در این مطالعه با استفاده از پرایمر مذکور آلل‌های S_2 ، S_3 ، S_{11} ، S_{10} ، S_5 ، S_{13} و S_{23} شناسایی شد. علاوه بر باندهای مذکور، باندی به اندازه

که این نتایج با نتایج حاصله از محققین دیگری (Ebadi *et al.*, 2011; Sheikh-Alian *et al.*, 2010; Zeinalabedini *et al.*, 2010; Tamura *et al.*, 2000; ValizadehKaji *et al.*, 2007; Zeinalabedini *et al.*, 2012) مطابقت دارد.

در تشخیص آلل S_{31} با استفاده از جفت پرایمر ConF-ConR باندی به اندازه ۷۹۲ جفت بازی به دست آمد، درحالی که این آلل با استفاده از جفت آغازگر AS1II-AmyC5 با اندازه باندی معادل ۸۰۰ جفت باز تأیید شد. این نتایج با نتایج Sergio *et al.* (2015) مطابقت دارد. هر چند این محققین برای وضوح بیشتر این آلل از آغاز گر سوم (Rozen & Skaletsky, 2000) استفاده کردند (Halasz *et al.*, 2008). براساس نتایج حاصله از این تحقیق آلل S_1 در دنیا بیشترین فراوانی را داشته ولی در مورد فراوانی سایر آلل ها مناطق مختلف دارای تنوع بیشتری هستند، به نحوی که ممکن است فراوانی برخی از آلل ها در منطقه ای بیشتر باشد که دلیل اصلی آن گرده افشانی های آزاد و تفاوت های ژنتیکی بین بادام های داخلی و خارجی هم چنین شرایط جغرافیایی مناطق می باشد و این نتیجه با نتایج Rasouli *et al.* (2016)، Mousavi *et al.* (2011)، Rahemi *et al.* (2010) و Sergio *et al.* (2015) مطابقت دارد.

نتایج حاصله نشان داد با وجودی که استفاده از جفت آغازگر (AS1II-AmyC5R) می تواند در تشخیص آلل های S_3 و S_f به کار برود، ولی با توجه به نزدیکی اندازه باندهای ایجاد شده در مورد این دو آلل بهتر است از این آغازگر در بادام هایی که لاقل یکی از این آلل ها را ندارند استفاده شود و اگر با استفاده از این جفت آغازگر این دو آلل (S_f و S_3) تشخیص داده شد حتماً با آغازگرهای Sff-SfR و یا Cebador2-Cebador8 وجود آلل خودسازگاری Sf مورد بررسی قرار گیرد. در مورد استفاده از جفت پرایمر (Oliviera *et al.*, 2000) Cebador2-Cebador8 نیز می توان به خوبی ژنوتیپ ها و ارقام خودسازگار را از خودناسازگار تشخیص داد و باندی به اندازه ۱۲۰۰ جفت باز به دست آورد. علاوه بر این می توان از جفت آغازگر Sff-SfR در ارقام خودسازگار باندی به اندازه ۴۵۰ جفت باز به دست آورد. بنابراین پیشنهاد می شود برای

۷۵۰ جفت بازی S_f مشاهده شد که برای تعیین دقیق باید توالی یابی شود (شکل ۳).

نتایج حاصل از کاربرد آغازگر ConF-ConR

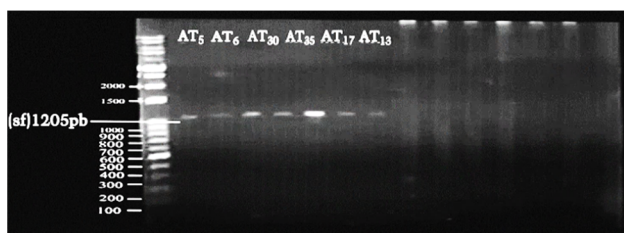
این جفت آغازگر شامل ConF (رو به جلو) و ConR (معکوس) می باشد. اندازه باندهای ایجاد شده حاصل از محصولات PCR روی ژل آگارز با استفاده از این جفت آغازگر، شامل باندهای مشاهده شده به اندازه های ۱۱۰۰، ۸۰۰، ۱۲۰۰، ۶۰۰، ۷۰۰، ۹۷۸ و ۷۹۲ جفت بازی که به ترتیب مربوط به آلل های S_1 ، S_2 ، S_3 ، S_{10} ، S_{11} ، S_{23} و S_{31} می باشند. همچنین باندهایی با اندازه ۹۰۰ و ۱۰۰۰ جفت بازی نیز مشاهده شد که متعلق به هیچ کدام از آلل های S شناخته شده نبود و ممکن است مربوط به آلل های جدید ناسازگاری باشد (شکل ۴).

نتایج حاصل از PCR با استفاده از جفت پرایمر ConF-ConR و انجام الکتروفورز، روی ژل آگارز توانست ۷ نوع آلل خودناسازگاری را شناسایی کند. با بررسی اندازه باندهای به دست آمده از PCR هر نمونه DNA، جفت آلل مربوط به هر ژنوتیپ تعیین شد. نتایج حاصل از کاربرد پرایمر (Chanuntapitate *et al.*, 2001, 2003) ConF-ConR مطابق با گزارش های قبلی بوده و قادر به تولید باند آلل های S_1 ، S_3 و S_f می باشد. با وجودی که با استفاده از این آغازگر آلل Sf نیز با اندازه ۱۲۰۵ جفت باز قابل تشخیص می باشد ولی به لحاظ اندازه های بسیار نزدیک با آلل S_3 بهتر است برای تشخیص خودسازگاری از آغازگرهای اختصاصی مانند Sff-SfR (Alonso & Cebador2-Cebador8, 2005) و (Socias i Company, 2005) استفاده شود. (Ma & Oliviera, 20001)

کارایی جفت آغازگر ConF-ConR جهت تشخیص آلل های S_1 ، S_3 ، S_{11} و S_f تأیید شد (Channuntapitat *et al.*, 2001; Ebadi *et al.*, 2011; Alonso *et al.*, 2015). همچنین با جفت پرایمر مذکور آلل های S_{31} ، S_{10} ، S_2 و S_{23} نیز تشخیص داده شد. هر چند برای تأیید این آلل ها استفاده از جفت آغازگر AS1II-AmyC5R نیز مناسب تشخیص داده شد. به نحوی که با استفاده از این آغازگر (AS1II-AmyC5R) وجود آلل های S_1 ، S_2 ، S_3 ، $S_{5/10}$ ، S_{11} ، S_{13} و S_{23} در ژنوتیپ های مورد بررسی تأیید گردید

تشخیص خودسازگارها از خودناسازگارها در ابتدا از این جفت آغازگرها استفاده شده و پس از جداسازی خودسازگارها، آللهای خودناسازگار با استفاده از سایر آغازگرها مورد بررسی قرار گیرد (Kamali *et al.*, 2015; Alonso *et al.*, 2014; Kodad *et al.*, 2015). علاوه بر این، برای تأیید آلل S_3 از جفت آغازگر

تشخیص خودسازگارها از خودناسازگارها در ابتدا از این جفت آغازگرها استفاده شده و پس از جداسازی خودسازگارها، آللهای خودناسازگار با استفاده از سایر آغازگرها مورد بررسی قرار گیرد (Kamali *et al.*, 2015; Alonso *et al.*, 2014; Kodad *et al.*, 2015). علاوه بر این، برای تأیید آلل S_3 از جفت آغازگر



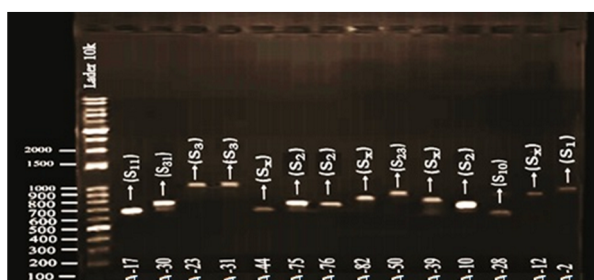
شکل ۱. استفاده از جفت آغازگر اختصاصی AS1II-AmyC5R در تشخیص آلل S_f در بادام
Figure 1. The use of specific primer pairs AS1II-AmyC5R in recognition S_f allele in almond



شکل ۲. آغازگر اختصاصی Cebador2-Cebador8 در تشخیص آلل S_f در نمونه‌های بادام هیبرید شاهد خودسازگار
Figure 2. Specific primer Cebador2-Cebador8 in the diagnosis S_f allele in control hybrid self-compatible samples of almond



شکل ۳. نتایج حاصل از PCR بر روی ژل آگارز: استفاده از جفت آغازگر AS1II-AmyC5R تشخیص آللهای S_1, S_2, S_3, S_{11}
Figure 3. The results of PCR on agarose gel: The use of primer pairs AS1II-AmyC5R identification alleles $S_1, S_2, S_3, S_{11}, S_{13}, S_{5/10}, S_{23}$ in almond plant



شکل ۴. تکثیر آللهای خودناسازگاری در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بادام به روش PCR با استفاده از نشانگر Conf-ConR
Figure 4. Amplification of self-incompatible alleles in studied genotypes of almond by PCR and using primer pairs Conf-ConR

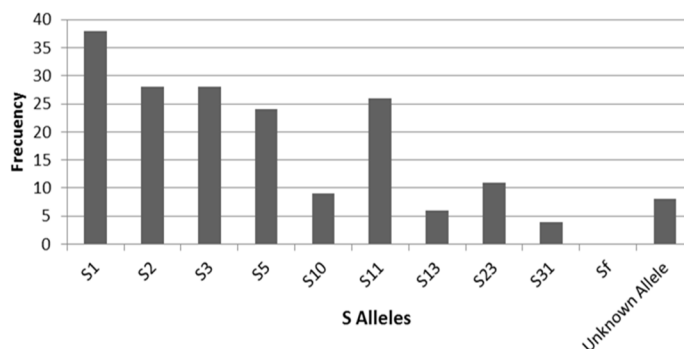
دارد. هرچند این نتایج با نتایج Rahemi *et al.* (2010) روی بادام‌های وحشی از لحاظ آلل S_I مطابق نیست زیرا وی کمترین فراوانی را در بین آلل‌های S_I و S_{26} گزارش نموده است. Zainalabedini *et al.* (2012) نیز بیشترین فراوانی آلل‌های خودناسازگاری را در مورد آلل S_I گزارش نموده که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در یزد آلل S_f دیده نشد. نمودار فراوانی آلل‌ها در شکل ۵ مشخص شده است.

در نهایت با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه، می‌توان در بررسی دیگری ژنوتیپ‌های خودسازگار شناسایی شده را با ژنوتیپ‌های خودناسازگار بومی استان یزد هیبرید کرد و ژنوتیپ‌های خودسازگار ایجاد کرد و با کشت و پرورش ژنوتیپ‌های خودسازگار میزان محصول بادام را در استان یزد بالا برد و یکی از مشکلات باغداری بادام که خودناسازگاری می‌باشد را مرتفع نمود.

در مجموع در این مطالعه، ۹ آلل خودناسازگاری شامل آلل‌های $S_1, S_2, S_3, S_5, S_{10}, S_{11}, S_{13}, S_{23}, S_{31}$ در ژنوتیپ‌های مورد بررسی، شناسایی شد (جدول ۳). با بررسی تعداد و نوع آلل‌های شناسایی شده در هر ژنوتیپ، میزان فراوانی هر آلل در جمعیت مورد بررسی مشخص شد. در این میان آلل‌های S_1, S_2, S_3 و S_{11} به ترتیب با ۳۷، ۲۷، ۲۷ و ۲۵ درصد دارای بیشترین فراوانی و آلل‌های $S_5, S_{23}, S_{10}, S_{31}$ به ترتیب با ۲۴، ۱۰، ۹، ۵ و ۴ درصد دارای کمترین فراوانی را داشته‌اند. این نتایج با نتایج Hamzaoui *et al.* (2015) روی ۷۰ ژنوتیپ بادام‌های مراکشی در مورد آلل‌های S_1, S_2, S_3 و S_{11} مطابقت داشته ولی در مورد آلل S_{13} مطابقت ندارد که ممکن است ناشی از گرده‌افشانی‌های آزاد در منطقه و ژنوتیپ‌های غالب باشد. علاوه بر این از لحاظ فراوانی آلل‌های خودناسازگارد در بادام، این تحقیق با نتایج Mousavi *et al.* (2015) و Rasouli (2017) مطابقت

جدول ۳. آ‌غازگرهای استفاده شده و اندازه باندهای ایجاد شده در آلل‌های S ژنوتیپ‌های بادام
Table 3. Used pair primers and created band size in S-alleles of almond genotypes

| Primer | Sequence 5'→3' | S-Aleles | Bp | Annealing temperature | Source |
|----------|--------------------------|------------|-------|-----------------------|-------------------------------------|
| | | S_1 | 1199 | | |
| | | S_2 | 800 | | |
| | | S_3 | 1200 | | |
| | | $S_{5/10}$ | 600 | | |
| | | S_7 | 2000 | | |
| ASIII | TATTTCAATTGTGCAACAATGG | S_9 | 1800 | 57 °C | Tamura <i>et al.</i> (2000) |
| AmyC5R | CAAAATACCACTTCATGTAACAAC | S_{12} | 1600 | | |
| | | S_{13} | 1400 | | |
| | | S_{23} | 995 | | |
| | | S_{11} | 700 | | |
| | | S_X | 750 | | |
| | | S_f | 1205 | | |
| Cabador2 | TACCACTTCATGTAACAACCTG | 1200 | S_f | 55 °C | Ma & Olivira (2001) |
| Cebador8 | ACCACCTGCAGATTAGCGGC | | | | |
| | | S_1 | 1100 | | |
| | | S_7 | 200 | | |
| | | S_8 | 2700 | | |
| | | S_f | 1200 | | |
| | | S_2 | 800 | | |
| ConF | GTGCAACAATGGCCACCGAC | S_3 | 1200 | 55 °C | Channuntapitat <i>et al.</i> (2001) |
| ConR | TACCACTTCATGTAACAACCTGAG | S_{10} | 600 | | |
| | | S_{11} | 700 | | |
| | | S_{23} | 978 | | |
| | | S_{31} | 792 | | |
| | | S_X | 900 | | |
| | | s_x | 1000 | | |



شکل ۵. فراوانی آلل‌های S تکثیرشده در ژنوتیپ‌های مورد بررسی بادام
Figure 5. Frequency of amplified S-alleles in the studied genotypes of almond

جدول ۴. مشخصات و ترکیب آلل‌های ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بادام
Table 4. Specifications and alleles composition of studied almond genotypes

| Row | Plant origin | Genotype | Plant trait | Row | Plant origin | Genotype | Plant trait |
|-----|--------------|---------------------------------|----------------------|-----|--------------|--------------------------------|----------------------|
| 1 | Mehriz | S ₁ S ₃ | Stony almond | 39 | Banadkook | S ₅ S _X | Stony almond |
| 2 | Mehriz | S ₁ S ₁₁ | Stony almond | 40 | Banadkook | S ₁ S ₃ | Chilling resistance |
| 3 | Mehriz | S ₁ S ₃ | Stony almond | 41 | Banadkook | S ₁ S ₅ | Stony late bloom |
| 4 | Mehriz | S ₁ S ₃ | Stony almond | 42 | Banadkook | S ₁ S ₃ | Stony late bloom |
| 5 | Mehriz | S ₃ S ₁₁ | Resistance latebloom | 43 | Banadkook | S ₅ S ₂₃ | Stony late bloom |
| 6 | Mehriz | S ₃ S ₁ | High Product | 44 | Banadkook | S _X S ₁ | Stony almond |
| 7 | Mehriz | S ₁ S ₂₃ | Stony almond | 45 | Banadkook | S ₁ S ₃ | Stony almond |
| 8 | Mehriz | S ₁ S ₃ | Stony almond | 46 | Banadkook | S ₁ S ₃ | Resistance latebloom |
| 9 | Mehriz | S ₅ S ₁₀ | Stony almond | 47 | Banadkook | S ₃ S ₅ | Stony almond |
| 10 | Mehriz | S ₂ S ₁₁ | Stony almond | 48 | Banadkook | S ₁ S ₁₀ | Stony almond |
| 11 | Mehriz | S ₁₁ S ₃ | Stony almond | 49 | Banadkook | S ₁ S ₂ | Stony almond |
| 12 | Mehriz | S ₁₁ S _X | Stony almond | 50 | Banadkook | S ₂ S ₂₃ | Late bloom |
| 13 | Seyyedabad | S ₅ S ₃ | Stony almond | 51 | Banadkook | S ₂ S ₁₃ | Thin skin almond |
| 14 | Seyyedabad | S ₅ _ | Stony almond | 52 | Banadkook | S ₂ S ₁₃ | Stony almond |
| 15 | Seyyedabad | S ₃ S ₁₁ | Sandy Fruiful | 53 | Banadkook | S ₂ S ₅ | Stony almond |
| 16 | Seyyedabad | S ₅ S ₂ | Resistance latebloom | 54 | Banadkook | S ₅ _ | Paper almond |
| 17 | Seyyedabad | S ₂ S ₁₁ | Late bloom | 55 | Banadkook | S ₁ S ₂₅ | Paper almond |
| 18 | Seyyedabad | S ₁₃ S _X | Paper almond | 56 | Banadkook | S ₁ S ₁₁ | Paper Late bloom |
| 19 | Seyyedabad | S ₁ S ₁₁ | Paper resistance | 57 | Banadkook | S ₁ S ₂₃ | Stony almond |
| 20 | Seyyedabad | S ₁ S ₁₃ | Paper almond | 58 | Banadkook | S ₁ S ₁₁ | Stony almond |
| 21 | Seyyedabad | S ₁₁ S ₁ | Paper almond | 59 | Banadkook | S ₁ S ₃ | Stony almond |
| 22 | Seyyedabad | S ₂ S ₂₃ | Stony almond | 60 | Banadkook | S ₂₃ S ₁ | Stony almond |
| 23 | Seyyedabad | S ₁₁ S ₃ | Stony almond | 61 | Banadkook | S ₂ S ₂₃ | Stony almond |
| 24 | Seyyedabad | S ₃ S ₅ | Stony almond | 62 | Banadkook | S ₁ S ₃₁ | Stony Fruit full |
| 25 | Seyyedabad | S ₅ S ₂ | Stony almond | 63 | Banadkook | S ₅ S ₃₁ | Stony Fruit full |
| 26 | Seyyedabad | S ₁₁ S ₁ | Stony almond | 64 | Banadkook | S ₁ S ₃ | Stony Resistance |
| 27 | Seyyedabad | S ₁₀ S ₂ | Stony almond | 65 | Banadkook | S ₂ S ₃ | Late bloom |
| 28 | Seyyedabad | S ₁₀ S ₁₃ | Stony almond | 66 | Banadkook | S ₃ S ₅ | Stony late bloom |
| 29 | Seyyedabad | S ₂ S ₃₁ | Stony almond | 67 | Banadkook | S ₁ S ₃ | Stony Resistance |
| 30 | Seyyedabad | S ₃₁ S ₂ | Stony almond | 68 | Banadkook | S ₁₁ S ₁ | Paper almond |
| 31 | Seyyedabad | S ₃ S ₁₁ | Paper almond | 69 | Banadkook | S ₁ _ | Paper almond |
| 32 | Seyyedabad | S ₃ _ | Stony almond | 70 | Banadkook | S ₂₃ S ₁ | Paper almond |
| 33 | Banadkook | S ₁₀ S ₂ | Stony almond | 71 | Mehriz | S ₂ S ₂₃ | Stony almond |
| 34 | Banadkook | S ₁ S ₁₀ | Stony almond | 72 | Mehriz | S ₁ S ₃₁ | Stony almond |
| 35 | Banadkook | S ₁₀ S ₂₃ | Paper almond | 73 | Mehriz | S ₁₁ S ₁ | Stony almond |
| 36 | Banadkook | S ₅ S ₁₃ | Paper almond | 74 | Mehriz | S ₁₁ S ₁ | Stony almond |
| 37 | Banadkook | S ₁ S ₃ | Stony almond | 75 | Mehriz | S ₁ S ₂ | Stony almond |
| 38 | Banadkook | S ₂ S ₁₀ | Paper almond | 76 | Mehriz | S ₂ S ₅ | Stony almond |

ادامه جدول ۴. مشخصات و ترکیب آلل‌های ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بادام
Continue table 4. Specifications and alleles composition of studied almond genotypes

| Row | Plant origin | Genotype | Plant trait | Row | Plant origin | Genotype | Plant trait |
|-----|--------------|---------------------------------|-----------------------|-----|--------------|--------------------------------|------------------|
| 77 | Mehriz | S ₁₁ S ₂ | Stony almond | 89 | Mehriz | S ₂ S ₅ | Stony almond |
| 78 | Mehriz | S ₁₁ S ₂ | Stony almond | 90 | Mehriz | S ₁₁ S ₃ | Stony Fruit full |
| 79 | Mehriz | S ₂ S ₅ | Stony almond | 91 | Mehriz | S _X S ₁ | Stony almond |
| 80 | Mehriz | S ₅ S ₂₃ | Stony almond | 92 | Mehriz | S ₂ S ₃₁ | Bitter almond |
| 81 | Mehriz | S ₁ S ₁₀ | Stony almond | 93 | Mehriz | S ₁₁ | Stony almond |
| 82 | Mehriz | S ₅ S _X | Resistance Fruit full | 94 | Mehriz | S ₁₃ S ₁ | Stony almond |
| 83 | Mehriz | S ₁₁ S ₂₃ | Stony late bloom | 95 | Mehriz | S ₃ S ₅ | Bitter almond |
| 84 | Mehriz | S ₁ S ₅ | Stony almond | 96 | Mehriz | S ₂ S ₁₁ | Bitter almond |
| 85 | Mehriz | S ₃ S ₅ | Stony almond | 97 | Mehriz | S ₂ S ₂₃ | Stony almond |
| 86 | Mehriz | S ₂ S ₅ | Stony almond | 98 | Mehriz | S ₃ S ₁₁ | Stony almond |
| 87 | Mehriz | S ₃ S ₁₁ | Stony almond | 99 | Mehriz | S ₃ S ₅ | Stony Fruit full |
| 88 | Mehriz | S ₃ S ₅ | Stony almond | 100 | Mehriz | S ₂ S ₅ | Stony late bloom |
| AT | Institute | S1Sf | Self-compatible | AT | Institute | S1Sf | Self-compatible |
| AT | Institute | S1 Sf | Self-compatible | AT | Institute | S1Sf | Self-compatible |
| AT | Institute | S23Sf | Self-compatible | AT | Institute | S1Sf | Self-compatible |

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق و تعیین آلل‌های غالب باغ‌های بادام در استان یزد می‌توان با استفاده از ژنوتیپ‌های سازگار و بومی که از لحاظ آللی تعیین تکلیف شده‌اند تلاقی‌های کنترل‌شده انجام داده و درختان خودسازگار را جایگزین باغات قدیمی نمود. بدیهی است به این ترتیب می‌توان ضمن بهبود مدیریت باغات، نسبت به رسیدن یکنواخت و هم‌زمان محصول همت گماشت. از طرف دیگر با توجه به شرایط سخت کویری در استان و بروز هوای سرد و بارندگی در زمان گرده‌افشانی، گسترش ارقام و ژنوتیپ‌های خودسازگار می‌تواند دارای اهمیت بسیاری باشد. گفتنی است با تعیین ترکیب آللی ارقام ناسازگار بهتر است از والد پدری خودسازگار که دارای یک آلل مشابه با ژنوتیپ خودناسازگار است، استفاده شده تا درصد بیشتری از نتایج به‌دست‌آمده دارای صفت خودسازگاری باشند. به‌علاوه چون ژنوتیپ‌های خودناسازگار نیز از درختانی که دارای صفات مطلوبی چون دیر گلی، میزان محصول بالا، اندازه

میوه مطلوب و سازگاری با شرایط نامساعد محیطی بوده‌اند با تلاقی ارقام خودسازگار با این ژنوتیپ‌ها یعنی ژنوتیپ‌های برتر می‌توان برخی صفات مطلوب را نیز علاوه بر صفت خودسازگاری به نتایج حاصله اضافه و موجب توسعه این گیاه مقاوم به شرایط کم‌آبی در منطقه شد. لازم به ذکر است با توجه به فراوانی آلل S₁ می‌توان از ارقامی خودسازگار مانند توتو به‌عنوان والد پدری استفاده کرده و درصد بالایی از نتایج خودسازگار به‌دست آورد.

سپاسگزاری

از ایستگاه تحقیقاتی پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری وابسته به مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی کشور به‌خاطر در اختیار قراردادن هیبریدهای خودسازگار بادام، همچنین از دانشکده منابع طبیعی یرد و نیز شرکت تحقیقاتی زانا مستقر در پارک علم و فناوری یزد به‌خاطر در اختیار قراردادن امکانات آزمایشگاهی، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

- Alonso, J. M. Socias i Company, R. (2005). Identification of the S3 self-incompatible allele in almond by specific primers. *Journal of Agricultural Research*, 3, 296-303.
- Channuntapipat, C., Sedgley, M. & Collins, G. (2001). Sequences of the cDNAs and genomic DNAs encoding the S₁, S₇, S₈, and S_f alleles from almond, *Prunus dulcis*. *Theoretical and Applied Genetics*, 103(6-7), 1115-1122.

3. Channuntapipat, C., Wirthensohn, M., Ramesh, S. A., Batlle, I., Arús, P., Sedgley, M. & Collins, G. (2003). Identification of incompatibility genotypes in almond (*Prunus dulcis* Mill.) using specific primers based on the introns of the S-alleles. *Plant Breeding*, 122(2), 164-168.
4. Ebadi, A., Kamali, K., Moghaddam, M. R. F., Naghavi, M. R., Imani, A. & Ofoghi, H. (2011). Determination of self-compatible almond genotypes obtained from controlled crosses and identification of S-alleles in some foreign cultivars and genotypes by PCR. *Seed and Plant Improvement Journal*, 27(1), 57-67. (in Farsi)
5. Fallah, M., Rasouli, M., Sharafi, Y. & Imani, A. (2016). Study of pollen compatibility relationships among some selected promising almond cultivars and genotypes. *Iranian Journal of Horticulture Sciences*, 47(3), 457-467. (in Farsi).
6. Gómez, E. M., Buti, M., Sargent, D. J., Dicenta, F. & Ortega, E. (2019). Transcriptomic analysis of pollen-pistil interactions in almond (*Prunus dulcis*) identifies candidate genes for components of gametophytic self-incompatibility. *Tree Genetics & Genomes*, 15(53), 1-13.
7. Gepts, P. & Clegg, M. T. (1989). Genetic diversity in pearl millet (*Pennisetum glaucum* [L.] R. Br.) at the DNA sequence level. *Journal of Heredity*, 80(3), 203-208.
8. Gradziel, T. M. & Kester, D. E. (1996). Genetic improvements. *Almond production manual*, 70-75.
9. Gradziel, T. M. (2016). Self-compatibility sources and sources of variation in advanced almond introgression lines. *Options Méditerranéennes, Series A*, 119, 43-47.
10. Halasz, J., Fodor, A., Hegedus, A. & Pedryc, A. (2008). Identification of a new self-incompatibility allele (S31) in a Hungarian almond cultivar and its reliable detection. *Scientia Horticulturae*, 116(4), 448-451.
11. Hamzaoui, A. E., Oukabli, A. & Moumni, M. (2015). Identification of self-incompatibility S alleles in Moroccan almond (*Prunus dulcis* Miller) germplasm using PCR. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 90(3), 337-343.
12. Imani, A. (2000). Almond breeding, *Agricultural Extension and Education*, Tehran. (in Farsi).
13. Kamali, K. (2008). *An investigation of classical and molecular methods in almond breeding program to produce self-compatible genotypes*. Ph.D. Thesis, University of Tehran, Tehran, Iran. (in Farsi).
14. Kamali, K., Ebadi, A., Fatahi Moghadam, R. Naghavi, M.R. & Imani, A. (2009). Heritability of S_f allele in almond progenies with PCR method. *Iranian Journal of Horticulture Sciences*, 40, 61-68. (in Farsi)
15. Kodad, O., Socias, I., Company, R. & Alonso, J.M. (2015). Unilateral recognition of the S_f allele in almond. *Scientia Horticulturae*, 1, 1-6.
16. Ma, R. C. & Oliveira, M. M. (2001). Molecular cloning of the self-incompatibility genes S₁ and S₃ from almond (*Prunus dulcis* cv. Ferragnès). *Sexual Plant Reproduction*, 14(3), 163-167.
17. Momenpour, A., Ebadi, A. & Imani, A. (2012). Determination of self and cross compatible genotypes obtained from almond breeding program. *Iranian Journal of Horticulture Sciences*, 43(4), 447-461. (in Farsi)
18. Mousavi, A., Babadaei, R., Fatahi, M. R., Zamani, Z., Dicenta, F. & Ortega, E. (2014). Self incompatibility in the Iranian almond cultivar 'Mamaei' using pollen tube growth, fruit set and PCR technique. *Journal of Nuts*, 5(2), 1-10.
19. Mousavi, A., Fatahi, R., Zamani, Z., Imani, A., Dicenta, F. & Ortega, E. (2014). Genetic variation and frequency of S- alleles in Iranian almond cultivars. *Acta Horticulture*, 1028, 45-48.
20. Mousavi, A., Fatahi, R., Zamani, Z., Imani, A., Ortega, E. & Dicenta, F. (2011). Identification of self- incompatibility (S-) genotypes of Iranian almond genotypes and cultivars using PCR. *Iranian Journal of Horticulture Sciences*, 42(2), 169-183. (in Farsi)
21. Mousavi, A., Fatahi, R., Zamani, Z., Imani, A., Dicenta, F. & Ortega, E. (2011). Identification of self- incompatibility genotypes in Iranian almond cultivars. *Acta Horticulture*, 912, 303-311.
22. Mousavi, A., Fatahi, R., Zamani, Z., Imani, A., Ortega, E. & Dicenta, F. (2014). Identification of new S- alleles in Iranian almond cultivars using cloning and sequencing. *Seed and Plant Improvement Journal*, 30, 651-668. (in Farsi).
23. 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(5), 904-911.
24. Rahemi, A., Fatahi, R., Ebadi, A., Taghavi, T., Hassani, D., Thomas Gradziel, T. & Chaparro, J. (2010). Genetic variation of S-alleles in wild almonds and their related *Prunus* species. *Australian Journal of Crop Science* 4(8), 648-659.
25. Rasouli, M. (2017). The Study of morphological traits and identification of self-incompatibility alleles in almond cultivars and genotypes. *Journal of Nuts*, 8(2), 137-150.
26. Sanchez-PR', Dicenta, F. & Mart'inez-G'omez, P. (2004). Identification of S-alleles in almond using PCR. *Euphytica*, 138, 263-269.

27. Herrera, S., Rodrigo, J., Hormaza, J. I. & Lora, J. (2018). Identification of self-incompatibility alleles by specific PCR analysis and S-RNase sequencing in apricot. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(11), 3612.
28. Sergio, C., Stefano, L.M., Gaetano, D., Guiyou, L., Francesco, S. & Alessandra, G. (2015). Analysis of S-allele genetic diversity in sicilian almond germplasm comparing different molecular methods. *Plant Breeding*, 134(6), 713-718.
29. Sheikh-Alian, A., Vezvaei, A., Ebadi, A., Fatahi-Moghadam, M. R. & Sarkhosh, A. (2010). Determination and identification of self-incompatibility alleles in selective Iranian and foreign almond (*Prunus dulcis* M.) cultivars by PCR method. *Iranian Journal of Horticultural Sciences*, 41(3), 247-252. (in Farsi)
30. 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(3), 344-349.
31. Valizadeh, B., Ershadi, A. & Gholami, M. (2008). Identification of self-incompatibility alleles in some Iranian and foreign almond (*Prunus dulcis* M.) cultivars using PCR. *Iranian Journal of Horticultural science and Technology*, 8(4), 249-258. (in Farsi)
32. Zeinalabedini, M., Khayamnekue, M., Imani, F. & Majidian, P. (2012). Identification of self-compatibility and self-incompatibility genotypes in almond and some *Prunus* species using molecular markers. *Iranian Journal of Seed and Plant Improvement*, 28(1), 227-238. (in Farsi).