DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.11.9

بررسی سازگاری گرده‌افشانی با استفاده از روش‌های بیولوژیکی و مولکولی در برخی از ژنوتیپ‌های برتر آلبالو

صمد علیون نظری[1*]، جعفر حاجی‌لو[1] و مهرشاد زین‌العابدینی[2]

[1] ایران، تبریز، دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی، گروه علوم باغبانی

[2] ایران، کرج، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۱۷

چکیده

در آلبالو همانند سایر گونه‌های جنس پرونوس خودناسازگاری گامتوفیتی وجود دارد. در این پژوهش روابط گرده با مادگی تعداد ۱۰ ژنوتیپ برتر آلبالو با استفاده از روش‌های بیولوژیک و مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. در روش بیولوژیکی، دانه گرده در مرحله بادکنکی (در مرحله D فنولوژیکی) از گل‌ها تهیه و پس از ارزیابی رشد و درصد جوانه‌زنی در محیط کشت، در زمان مناسب اقدام به اخته کردن گل‌ها کرده و گرده‌افشانی به صورت گرده افشانی آزاد، خود و دگر گرده افشانی کنترل شده در باغ صورت گرفت. در روش مولکولی از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای عمومی برای شناسایی آلل‌های S استفاده شد. نتایج نشان داد که بیشترین میزان جوانه‌زنی دانه گرده در سطح کلاله در حالت خودگرده‌افشانی و از نظر تعداد لوله گرده در بخش بالایی و پایینی خامه و درون تخمدان بیشترین مربوط به حالت گرده‌افشانی آزاد بود. نه آلل S (S4، S6، S9، S6m2، S24، S26، S35، S36b و S36a) شناسایی شد که آلل‌های S6/S6m2، S24 و S9 دارای بیشترین فراوانی می‌باشد. مطالعه ما ثابت کرد که تنوع آلل‌های S پایین بوده که نشان دهنده تنوع ژنتیکی پایین در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی می‌باشد. با توجه به رشد لوله گرده در طول خامه و تخمدان در تمامی حالت های گرده‌افشانی در تمامی ژنوتیپ‌ها می‌توان گفت که همه ژنوتیپ‌ها از لحاظ گرده‌افشانی سازگار هستند.

واژه های کلیدی: آلبالو، آغازگرهای عمومی، ناسازگاری، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۱۴۲۵۵۲۵۹۹ ، پست الکترونیکی: Saliyoun66@gmail.com

مقدمه

خودناسازگاری عبارت است از عدم توانایی گیاه دارای گامت نر و ماده فعال برای تولید جنین بوسیله خودگرده افشانی که نقش مهمی را در ایجاد تنوع ژنتیکی بازی می‌کند (۸ و ۱۲). تشخیص وضعیت خودناسازگاری با روش‌های مختلف صورت می‌گیرد، که شامل روش‌های بیولوژیکی و مولکولی می‌باشد (۱۸). در روش بیولوژیکی، گرده‌افشانی، جوانه‌زنی دانه و رشد لوله گرده در شرایط آزمایشگاه و تعیین درصد تشکیل میوه در شرایط مزرعه بررسی می‌شود. در صورتی که در روش‌های مولکولی از الکتروفورز ریبونوکلئازهای خامه و واکنش زنجیره‌ای پلی-مراز با آغازگرهای عمومی و اختصاصی استفاده می‌شود. خودناسازگاری در گونه‌های جنس *Prunus* عموما از نوع گامتوفیتی بوده، که تحت کنترل یک مکان ژنی چند آللی می‌باشد (۲۲). این مکان ژنی دارای دو عامل به هم پیوسته است که شامل عوامل مربوط به S مادگی (S-RNase)و S گرده (*SFB*) می‌باشد. عامل S مادگی یک گلیکوپروتئین اساسی با فعالیت ریبونوکلئازی است که نقش مهمی را در عدم پذیرش دانه‌های گرده خودی بازی می‌کند. ژن S دانه

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.11.9

گرده برای گونه‌های مختلف جنس *Prunus* در چندسال اخیر شناخته شده است که یک پروتئین F-box لینک شده با S آن را کنترل می‌کند (۲۰ و ۳۸). منشاء تنوع آللی مکان S سالیان زیادی است که توجه محققان علم ژنتیک را به خود جلب کرده است، به طوری‌که تاکنون، با استفاده از تکنیک‌های مولکولی آلل‌های S مختلفی در گیلاس (۶ ، ۳۱ و ۳۹) ، بادام (۲۳،۱۷، ۲۴، ۲۵و ۲۸)، زردآلوی ژاپنی (۳۴)، زردآلوی اروپایی (۱۱) و آلوی ژاپنی (۲) شناسایی شده است.

آلبالو (*Prunus cerasus* L.) یک گونه آلوتتراپلوئید است که هیبرید خودبه‌خودی گیلاس (*Prunus avium* L.) (2n=2x=16) و گراند چری (*Prunusfruticosa* Pall.) (2n=4x=32) می‌باشد و لذا منابع ژنتیکی آللی گیلاس و آلبالو دارای همپوشانی می‌باشند. گرده‌افشانی و لقاح گل‌ها برای آلبالو از فاکتورهای مهم و تاثیرگذار برای تشکیل میوه می‌باشد. بر اساس مطالعات، بعضی از ویژگی‌های بیولوژیکی آلبالو نظیر توان باروری پایین ارقام، دوره گرده-افشانی کوتاه و کیفیت پایین دانه گرده که باعث کاهش سطح گرده افشانی می‌گردد می‌تواند دلیلی بر تشکیل کم میوه باشد (۳۳). مطالعات خودسازگاری در آلبالو به خاطر منشا پلی پلوئیدی این گونه به نحوی پیچیده است. تغییراتی که باعث غیرعملکردی شدن هاپلوتایپ‌های S شده اند در برگیرنده تغییراتی در مناطق کد کننده و تنظیمی که شامل جهش‌های در SFB یا S-RNase که موجب ایجاد کدون‌های پایانی نابالغ، الحاق عناصر قابل انتقال در SFB و بالادست ژن S-RNase می‌باشد (۳۶ و ۴۱). تسوکاماتو و همکاران (۲۰۰۸ و ۲۰۱۰) نشانگرهای PCR مفیدی را برای تشخیص هاپلوتایپ‌های S غیرعملکردی طراحی کردند که قابلیت تشخیص بین ژنوتیپ‌های خودسازگار و ناسازگار را داشت. آغازگرهای اختصاصی آلل‌ها و نشانگرهای CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) می‌توانند بین آلل‌های موتانت و نوع وحشی در مواردی مثل $S_1/S_{1'}$؛ $S_{6/S6}m/S_{6m2}$؛ $S_{13}/S_{13m}/S_{13'}$؛ $S_{36}/S_{36a}/S_{36b}/S_{36b2}/S_{36b3}$ تشخیص قایل شود. نشانگرها بر اساس چندشکلی طول و توالی برای تشخیص زودهنگام در مرحله دانهال در آلبالو مفید واقع بشوند که نهایتا باعث کاهش هزینه و صرفه جویی در زمان می‌شوند. عملکرد پایین ارقام و ژنوتیپ‌های بومی از مهمترین عوامل محدود کننده کشت و کار این محصول در ایران می‌باشد و ارقام اصلاح شده خارجی وارد شده هم کیفیت خشکباری ندارند. مطالعات و مشاهدات حاکی از آن است که با وجود گلدهی زیاد و گرده‌افشانی کافی، میزان تشکیل میوه در ژنوتیپ‌های بومی پایین می‌باشد که ممکن است ناشی از وجود ناسازگاری گرده افشانی در ارقام و ژنوتیپ‌های بومی یا مشکلات مربوط به مورفولوژی گل‌ها و فاکتور-های محیطی باشد. این پژوهش با هدف شناسایی آلل‌های ناسازگاری برای تعیین وضعیت سازگاری گرده‌افشانی برخی از ژنوتیپ‌های برتر آلبالو با استفاده از روش‌های گرده‌افشانی کنترل شده در باغ و تکثیر آلل‌ها با آغازگرهای اختصاصی در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام گرفته است.

مواد و روشها

مواد گیاهی: در این پژوهش تعداد ۱۰ ژنوتیپ برتر آلبالو از شهرستان شبستر، استان آذربایجان شرقی (۶ ژنوتیپ از روستای علی بیگلو و ۴ ژنوتیپ از نظرلو) که از نظر زمان گلدهی دارای همپوشانی بودند انتخاب و مورد مطالعه قرار گرفتند. ژنوتیپ های برتر توسط کشاورزان محلی طی سالیان متمادی انتخاب شده بودند. همچنین از دو رقم خارجی سیگانی و بوترمو که ژنوتیپ آلل خودسازگاری آنها قبلا توسط محققین شناسایی و به عنوان ارقام خودسازگار معرفی شده بودند به عنوان شاهد برای مقایسه با ژنوتیپ‌های بومی استفاده گردید. ژنوتیپ‌ها بر اساس نام منطقه جمع آوری نامگذاری شدند.

تعیین درصد جوانه زنی دانه گرده: قبل از انجام گرده-افشانی برای ارزیابی قدرت جوانه‌زنی دانه گرده اقدام به

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.11.9

تهیه گرده کافی و سالم از ژنوتیپ‌های مورد مطالعه شد. برای این منظور شاخه‌های حاوی جوانه‌های گل کافی در مرحله بالونی (D فنولوژیکی) از درختان مورد مطالعه انتخاب و در داخل سطل‌های حاوی آب به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از تورم کامل جوانه ها و ظاهر شدن گلبرگ‌ها، تمامی اعضای گل حذف شده و بساک‌ها از میله پرچم جدا شده و در داخل پتری دیش‌های برچسب دار ریخته شدند. سپس به مدت ۴۸ ساعت در شرایط خشک و در دمای معمولی اتاق جهت خشک شدن و آزاد شدن دانه های گرده از بساک نگه‌داری شدند. بعد از جمع آوری، دانه‌های گرده داخل شیشه‌های کوچک آزمایشگاهی در یخچال در دمای ۵ درجه سانتیگراد تا زمان استفاده در باغ نگه‌داری (حدودا ۵ روز) شدند. پس از تهیه دانه گرده، درصد جوانه‌زنی و طول لوله گرده در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با کشت گرده‌ها در محیط کشت حاوی ۱/۲ ٪ آگار و ۱۵ ٪ ساکارز تعیین شد (۲۳). پس از تهیه محیط کشت و توزیع آن در پتری دیش‌ها، دانه‌های گرده به طور یکنواخت با استفاده از قلم موئی روی محیط کشت پخش شدند. بعد از ۲۴ ساعت فرایند جوانه‌زنی و رشد لوله گرده با اضافه کردن چند قطره کلروفرم متوقف گردید. محاسبه درصد جوانه‌زنی و رشد لوله گرده با میکروسکوپ نوری مجهز به اکولر مدرج در چهار میدان دید مختلف انجام گرفت. برای جلوگیری از اثر توده‌ای شمارش دانه‌های گرده جوانه زده از میان میدان‌های دیدی صورت گرفت که دانه‌های گرده به صورت یکنواخت توزیع شده بودند (۱۰). داده‌های حاصل در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار مورد تجزیه آماری قرار گرفت و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ درصد انجام گرفت.

گرده افشانی کنترل شده در باغ و ردیابی لوله گرده درون مادگی: بدین منظور شاخه‌هایی با تعداد کافی جوانه گل در جهات مختلف جغرافیایی درختان انتخاب و سپس برای جلوگیری از گرده‌افشانی ناخواسته توسط کیسه‌های پارچه‌ای ململ پوشانده شدند. ۲۴ ساعت پس از اخته کردن، گرده‌افشانی گل‌ها با گرده‌های ژنوتیپ‌های مورد نظر به صورت گرده‌افشانی آزاد، خود و دگر گرده‌افشانی با قلم موی انجام شد. دگرگرده‌افشانی با دو ژنوتیپ N01 و N02 انجام شد (شکل ۱) (جدول ۱). ۹۶ ساعت بعد از گرده افشانی مادگی گل های گرده افشانی شده جدا و در محلول FAA (حاوی الکل ۷۰ درصد، فرمالدهید ۴۰ درصد و اسیداستیک گلاسیال با نسبت ۱:۱:۱۸) تثبیت شدند. جهت ردیابی نفوذ لوله گرده در خامه، ابتدا نمونه‌ها به مدت سه ساعت با آب مقطر شستشو و سپس برای نرم شدن در محلول سولفیت سدیم هفت درصد اتوکلاو شدند و در ادامه ۲۴ ساعت پس از رنگ‌آمیزی با محلول آنیلین بلو، روند رشد لوله گرده حداقل در ۱۰ مادگی که تعداد گرده کافی در کلاله آنها دیده می‌شد از هر ترکیب گرده-افشانی بررسی شد (۱۰). بعد از کرک‌زدایی کامل مادگی‌ها با پنس‌های مخصوص و له کردن آنها روی لام، با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت (Olympus BX51) روند رشد لوله‌های گرده در خامه مادگی‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. صفات درصد جوانه‌زنی دانه گرده در سطح کلاله، تعداد لوله گرده در بخش‌های بالایی و پایینی خامه و در درون تخمدان تعیین شدند. تجزیه داده‌های حاصل در قالب آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملا تصادفی با سه تکرار با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ و مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ درصد صورت گرفت.

مطالعات مولکولی: مواد گیاهی: این آزمایش با برداشت نمونه‌های برگی از برگ‌های جوان ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در آزمایشگاه ژنومیکس پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج انجام شد.

استخراج DNA: برای استخراج دی.ان.ای از روش Vroh Bi و همکاران (۱۹۹۶) با کمی تغییر استفاده شد به طوری که مرحله شست و شو با کلروفرم-ایزوآمیل الکل دو بار

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.11.9

انجام گرفت. پس از استخراج برای تعیین کمیت و کیفیت دی.ان.ای از الکتروفورز دی.ان.ای در ژل آگارز ۱ درصد و همچنین برای تعیین غلظت نیز از دستگاه پیکودراپ (PicoDropµlspectrometry, Cambridge, UnitedKingdom) استفاده شد.

جدول ۱- ترکیب گرده‌افشانی انجام شده

خودگرده‌افشانی	گرده افشانی باز	دگرگرده‌افشانی	دگرگرده‌افشانی
A01*A01	A01*OP	A01*N01	A01*N02
A02*A02	A02* OP	A02*N01	A02*N02
A04*A04	A04* OP	A04*N01	A04*N02
A05*A05	A05* OP	A05*N01	A05*N02
A12*A12	A12* OP	A12*N01	A12*N02
A13*A13	A13* OP	A13*N01	A13*N02
N01*N01	N01* OP	N01*N01	N01*N02
N02*N02	N02* OP	N02*N01	N02*N02
N03*N03	N03* OP	N03*N01	N03*N02
N04*N04	N04* OP	N04*N01	N04*N02

OP: گرده آزاد

شکل ۱- **مراحل مختلف انتخاب، اخته کردن، گرده‌افشانی و پوشاندن گل‌ها در مطالعات گرده‌افشانی کنترل شده**

تکثیر آلل‌های خودناسازگاری و توالی یابی آنها: تکثیر آلل‌ها با استفاده از پنج جفت آغازگر عمومی (جدول ۲) مربوط به گیلاس، آلبالو، بادام و سایر گونه‌های جنس *Prunus* انجام شد. واکنش زنجیره ای پلیمراز با واسرشت سازی اولیه دی.ان.ای ژنومی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه آغاز و با ۱۰ چرخه شامل دمای ۹۴

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.11.9

درجه به مدت ۱۰ ثانیه برای واسرشت سازی، اتصال آغازگرها به رشته الگو به مدت ۲ دقیقه (دمای اتصال آغازگرها در جدول ۲آورده شده است)، گسترش رشته جدید به مدت دو دقیقه در دمای ۶۸ درجه و به دنبال آن ۲۵ چرخه شامل دمای ۹۴ درجه برای ۱۰ ثانیه، دو دقیقه برای اتصال آغازگر ها و گسترش نهایی در دمای ۶۸ درجه به مدت ۲دقیقه دنبال شد به طوری که به ازای هر چرخه ۱۰ ثانیه اضافه تا نهایتا دما به ۶۸ درجه برسد. پس از الکتروفورز، قطعات تکثیر شده، جدا سازی و سپس با کیت NucleoSpin® Geland PCR Clean-up (ماخری–نازل، آلمان) خالص سازی انجام گرفت. سپس با استفاده از محصول حاصله از تخلیص دوباره واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگرهای مورد نظر انجام شد تا غلظت نمونه به حد مناسبی برای توالی یابی برسد. پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز محصولات دوباره الکتروفورز شدند تا از صحت انجام واکنش اطمینان پیدا شود. نهایتا نمونه‌ها در تیوپ‌های ۲ میلی لیتری برای توالی یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شدند.

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

آغازگر	توالی آغازگرها از ´۳ به ´۵	نواحی تکثیری	دمای اتصال	منبع
PaConsI-F	(C/A)CTTGTTCTTG(C/G)TTT(T/C)GCTTTCTTC	اینترون اول	۵۵	اسنویلد و همکاران، ۲۰۰۳
PaConsI-R2 new	GCCATTGTTGCACAAATTGA			اسنویلد و همکاران، ۲۰۰۶
Pru-C2	CTATGGCCAAGTAATTATTCAAACC	اینترون دوم	۵۸	تائو و همکاران، ۱۹۹۹
Pru-C4R	GGATGTGGTACGATTGAAGCG			
Pru-C2	CTATGG CCAAGTAATTATTCAAACC	اینترون دوم	۵۸	تائو و همکاران، ۱۹۹۹
PCE-R	TGTTTGTTCCATTCGCYTTCCC			
PaConsII-F	GGCCAAGTAATTATTCAAACC	اینترون دوم	۵۸	اسنویلد و همکاران، ۲۰۰۳
PaConsII-R	CA(T/A)AACAAA(A/G)TACCACTTCATGTAAC			
EM-PC2consFD	TCACMATYCATGGCCTATGG	اینترون دوم	۵۵	اسنویلد و همکاران، ۲۰۰۴
EM-PC5consRD	CAAAATACCACTTCATGTAACARC			

نتایج

جوانه‌زنی و رشد لوله گرده در شرایط درون‌شیشه‌ای: محدوده تغییرات درصد جوانه‌زنی و رشد لوله‌های گرده در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به ترتیب ۲۲/۹-۴۲/۴ درصد و ۳۹۰/۵ – ۵۶۷/۵ میکرون بود. ژنوتیپ‌های A02، N01 و N02 با بیشترین درصد جوانه‌زنی (به ترتیب ۳۷/۳، ۳۶/۴ و ۴۲/۴ ٪) تفاوت معنی‌داری با بقیه ژنوتیپ‌ها داشتند و کمترین درصد جوانه‌زنی نیز متعلق به ژنوتیپ N03 (۲۲/۹ ٪) بود. بیشترین و کمترین رشد لوله گرده به ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های N01 (۵۶۷/۵ میکرون) و A02 (۳۹۰/۵ میکرون) بود (جدول ۳).

گرده‌افشانی کنترل شده و بررسی روند رشد لوله گرده در خامه و تخمدان : گرده‌افشانی دستی باید یک الی دو روز پس از اخته کردن گرده‌افشانی دستی انجام گیرد. در

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.11.9

این مطالعه دو روز پس از اخته کردن گل‌ها گرده‌افشانی دستی صورت گرفت. مطالعات نشان داده برای رسیدن لوله گرده به پایین خامه در گیلاس و آلبالو ۳-۲ روز، و برای رسیدن به تخمدان ۸-۶ روز زمان نیاز است. در آلبالو تا ۴ الی۵ روز پس از گرده افشانی (بسته به رقم) تعداد لوله گرده رسیده به ۱/۳ انتهای خامه افزایش پیدا می‌کند در حالی که در زمان‌های دیرتر تفاوتی مشاهده نمی‌شود. در شرایط مزرعه با میانگین دمای روزانه ۱۱/۲ درجه سانتیگراد ۶ روز زمان لازم است که لوله گرده به تخمدان برسد (۴).

جدول ۳

ژنوتیپ	جوانه زنی دانه گرده (٪)	طول لوله گرده (µm)
A01	۳۵/۸^{ab}	۴۵۶/۸^{abc}
A02	۳۷/۳^{a}	۳۹۰/۵^{c}
A04	۲۹/۳^{cd}	۴۳۲/۵^{abc}
A05	۳۶/۷^{ab}	۴۳۰/۸^{bc}
A12	۲۵/۷^{c}	۴۰۱/۳^{bc}
A13	۲۵/۲^{c}	۴۹۲/۳^{abc}
N01	۳۶/۴^{ab}	۵۶۷/۵^{a}
N02	۴۲/۴^{a}	۵۲۲/۵^{abc}
N03	۲۲/۹^{d}	۴۵۵/۲^{abc}
N04	۳۲/۸^{ab}	۵۳۳/۵^{ab}

حروف مشترک در ستون ها نشانگر عدم تفاوت معنی‌دار بین ژنوتیپ‌ها است.

مطابق جدول ۴ از نظر درصد جوانه‌زنی دانه گرده روی کلاله ژنوتیپ N01 با میانگین ۵۰/۲۴ درصد اختلاف معنی-داری با سایر ژنوتیپ‌ها داشت و ژنوتیپ‌های منطقه نظرلو (N) دارای درصد جوانه‌زنی بالاتری نسبت به علی بیگلو (A) بودند که نتایج حاصل از مطالعات درون‌شیشه‌ای نیز این مطلب را تائید می‌کند (جدول۳). از نظر تعداد لوله گرده در بخش بالایی و پایینی خامه و درون تخمدان نیز در بین تمامی ژنوتیپ‌ها و سطوح گرده‌افشانی تفاوت معنی‌داری مشاهده شد که بیشترین تعداد لوله گرده در بخش بالایی خامه با میانگین ۷/۱۵ عدد، بخش پایینی خامه ۳/۶ عدد و بخش تخمدان ۲/۳ عدد برای تمامی ژنوتیپ‌ها، در حالت گرده‌افشانی باز مشاهده شد. با توجه به نتایج در تمامی سطوح گرده‌افشانی (چهار سطح) لوله‌های گرده به پایین خامه و تخمدان رسیده‌اند که این پدیده نشان دهنده خودسازگاری در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بود. بر اساس گزارش اکثر محققین در صورت توقف رشد لوله گرده در شرایط خودگرده‌افشانی در یک سوم بخش بالایی خامه حالت خوداناسازگاری پیش می‌آید.

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین میزان جوانه-زنی دانه گرده در سطح کلاله در ژنوتیپ A13 در حالت خودگرده‌افشانی با میانگین ۶۶/۲۵ درصد مشاهده شد. از نظر تعداد لوله گرده در بخش بالایی خامه ژنوتیپ A13 با میانگین ۱۷/۵ عدد در حالت خود گرده افشانی بالاترین میزان را به خود اختصاص داد. همچنین در صفات تعداد لوله گرده در بخش پایینی خامه و درون تخمدان ژنوتیپ-های N01 و N02 با میانگین‌های ۶/۵ و ۶ عدد برای صفت بخش پایینی خامه و میانگین ۴/۵ عدد برای صفت درون تخمدان در حالت گرده‌افشانی باز مشاهده شد (جدول ۵). میزان جوانه‌زنی دانه گرده در حالت دگرگرده‌افشانی نسبت به حالت‌های خودگرده‌افشانی و گرده‌افشانی باز پایین‌تر می باشد همچنین در حالت دگرگرده‌افشانی تعداد لوله گرده کمتری در طول خامه و تخمدان مشاهده شد. بنابراین به توجه نتایج می‌توان تائید کرد که ژنوتیپ‌هایی با درصد جوانه زنی بالا، قابلیت تامین رشد لوله‌های گرده بالاتری دارند.

روابط سازگاری ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز: نتایج حاصل از تکثیر جفت آغازگر اختصاصی PaCons I-F/PaCons I-R2new که اینترون اول مکان ژنی آلل S جنس *Prunus* را تکثیر می‌کنند نشان داد که دو قطعه با اندازه تقریبی ۳۶۰ و ۴۵۰ جفت‌باز تکثیر شدند (جدول ۶).

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.11.9

جدول۴- مقایسه میانگین اثرات ساده صفات در خودگرده‌افشانی، گرده‌افشانی باز، دگرگرده‌افشانی در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه آلبالو

ژنوتیپ	جوانه‌زنی دانه گرده روی کلاله (٪)	تعداد لوله گرده در بخش بالایی خامه	تعداد لوله گرده در بخش پایینی خامه	تعداد لوله گرده در تخمدان
A01	۴۴/۱۹^{bc}	۳/۵۰^{b}	۱/۶۲^{abc}	۱/۱۲^{ab}
A02	۳۹/۵۱^{cd}	۳/۶۲^{b}	۱/۸۷^{abc}	۱/۰۶^{ab}
A04	۴۰/۳۳^{cd}	۳/۳۱^{b}	۱/۴۳^{bc}	۰/۹۳^{ab}
A05	۳۷/۰۵^{d}	۳/۸۷^{b}	۱/۵۰^{bc}	۰/۸۷^{b}
A12	۴۳/۲۰^{bc}	۳/۱۸^{b}	۱/۳۷^{c}	۰/۹۳^{ab}
A13	۴۳/۵۰^{bc}	۶/۷۵^{a}	۱/۷۵^{abc}	۱/۳۷^{ab}
N01	۵۰/۲۴^{a}	۵/۳۷^{ab}	۲/۵۶^{ab}	۱/۶۸^{ab}
N02	۴۵/۰۹^{abc}	۵/۴۳^{ab}	۲/۳۷^{abc}	۱/۷۵^{ab}
N03	۴۸/۵۶^{ab}	۵/۷۵^{ab}	۲/۶۸^{a}	۱/۸۱^{a}
N04	۴۶/۳۹^{ab}	۵/۸۱^{ab}	۲/۰۶^{abc}	۱/۰^{ab}
سطوح گرده‌افشانی				
خودگرده افشانی	۵۳/۶۵^{a}	۵/۱۵^{b}	۱/۸۷^{b}	۱/۳۵^{b}
گرده افشانی آزاد	۴۵/۸۱^{b}	۷/۱۵^{a}	۳/۶۰^{a}	۲/۳۰^{a}
دگرگرده افشانی با N01	۳۶/۹۶^{c}	۳/۷۲^{bc}	۱/۲۲^{bc}	۰/۷۵^{bc}
دگرگرده افشانی با N02	۳۸/۷۸^{c}	۲/۶۲^{c}	۱/۰۰^{c}	۰/۶۲^{c}

حروف مشترک در ستون‌ها نشانگر عدم تفاوت معنی‌دار بین ژنوتیپ‌ها است.

جدول ۵- مقایسه میانگین اثرات متقابل خودگرده‌افشانی، گرده‌افشانی باز، دگرگرده‌افشانی با ژنوتیپ‌های مورد مطالعه آلبالو

اثرات متقابل		جوانه‌زنی دانه گرده روی کلاله (٪)	تعداد لوله گرده در بخش بالایی خامه	تعداد لوله گرده در بخش پایینی خامه	تعداد لوله گرده در تخمدان
خودگرده‌افشانی	**A01**	۵۲/۹۵ $^{b-f}$	۳/۲۵ ^{e}	۱/۵۰ ^{de}	۱/۰۰ ^{c}
	A02	۵۳/۱۰ $^{b-f}$	۴/۷۵ ^{cde}	۲/۲۵ ^{cde}	۱/۵۰ ^{c}
	A04	۵۳/۸۸ $^{b-e}$	۳/۲۵ ^{e}	۱/۲۵ ^{de}	۱/۲۵ ^{c}
	A05	۵۳/۲۵ $^{b-f}$	۴/۲۵ ^{de}	۱/۵۰ ^{de}	۱/۲۵ ^{c}
	A12	۵۴/۲۶ ^{bcd}	۱/۷۵ ^{e}	۱/۲۵ ^{de}	۰/۷۵ ^{c}
	A13	۶۶/۲۵ ^{a}	۱۷/۲۵ ^{a}	۲/۲۵ ^{cde}	۲/۰۰ ^{bc}
	N01	۵۷/۱۲ ^{ab}	۴/۷۵ ^{cde}	۱/۵۰ ^{de}	۱/۲۵ ^{c}
	N02	۴۰/۹۳ $^{f-m}$	۲/۵۰ ^{e}	۱/۲۵ ^{de}	۱/۰۰ ^{c}
	N03	۵۵/۵۶ ^{abc}	۶/۵۰ ^{cde}	۴/۰۰ ^{abcd}	۲/۰۰ ^{bc}
	N04	۴۹/۳۴ $^{b-h}$	۳/۲۵ ^{e}	۲/۰۰ ^{de}	۱/۵۰ ^{c}
گرده‌افشانی آزاد	**A01**	۵۳/۲۶ $^{b-f}$	۶/۰۰ ^{cde}	۳/۲۵ ^{bcde}	۲/۰۰ ^{bc}
	A02	۴۲/۳۸ $^{c-l}$	۵/۰۰ ^{cde}	۳/۰۰ ^{cde}	۲/۰۰ ^{bc}
	A04	۳۹/۲۹ $^{g-n}$	۴/۵۰ ^{de}	۲/۵۰ ^{cde}	۱/۵۰ ^{c}

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.11.9

A05	۳۷/۴۳ h-n	۵/۵۰ cde	۲/۵۰ cde	۱/۵۰ c
A12	۴۱/۳۷ e-m	۵/۲۵ cde	۲/۲۵ cde	۱/۵۰ c
A13	۳۴/۷۴ j-o	۳/۲۵ e	۲/۰۰ de	۱/۲۵ c
N01	۵۱/۶۶ b-g	۱۰/۰۰ bcd	۶/۵۰ a	۴/۵۰ a
N02	۵۶/۳۰ abc	۱۲/۰۰ b	۶/۰۰ ab	۴/۵۰ a
N03	۵۷/۱۲ ab	۹/۵۰ bcd	۵/۲۵ abc	۴/۰۰ ab
N04	۴۴/۶۲ b-j	۱۰/۵۰ bc	۲/۷۵ cde	۰/۲۵ c
A01	۳۴/۴۸ j-o	۲/۷۵ e	۱/۰۰ de	۰/۷۵ c
A02	۲۴/۶۴ o	۲/۷۵ e	۱/۲۵ de	۰/۲۵ c
A04	۳۳/۹۲ j-o	۲/۷۵ e	۱/۰۰ de	۰/۵۰ c
A05	۲۷/۳۴ no	۳/۵۰ e	۱/۰۰ de	۰/۵۰ c
A12	۳۱/۷۶ k-o	۳/۵۰ e	۱/۷۵ de	۱/۲۵ c
A13	۲۸/۹۲ mno	۳/۲۵ e	۱/۰۰ de	۰/۷۵ c
N01	۵۷/۱۲ ab	۴/۷۵ cde	۱/۵۰ de	۰/۵۰ c
N02	۴۲/۲۱ c-l	۴/۷۵ cde	۱/۰۰ de	۰/۷۵ c
N03	۴۱/۷۴ d-l	۴/۷۵ cde	۱/۲۵ de	۱/۲۵ c
N04	۴۷/۵۱ b-i	۵/۲۵ cde	۱/۵۰ de	۱/۲۵ c
A01	۳۶/۰۸ i-o	۲/۰۰ e	۰/۷۵ de	۰/۷۵ c
A02	۳۷/۹۱ h-n	۲/۷۵ e	۱/۰۰ de	۰/۵۰ c
A04	۳۴/۲۲ j-o	۲/۷۵ e	۱/۰۰ de	۰/۵۰ c
A05	۳۰/۱۷ l-o	۲/۲۵ e	۱/۰۰ de	۰/۲۵ c
A12	۴۵/۴۶ b-j	۲/۲۵ e	۰/۲۵ e	۰/۲۵ c
A13	۴۴/۱۲ c-k	۲/۰۰ e	۱/۷۵ de	۱/۵۰ c
N01	۳۵/۰۶ i-o	۲/۵۰ e	۰/۷۵ de	۰/۵۰ c
N02	۴۰/۹۳ f-m	۲/۵۰ e	۱/۲۵ de	۰/۷۵ c
N03	۳۹/۸۲ g-n	۲/۲۵ e	۰/۲۵ e	۰/۲۵ c
N04	۴۴/۰۹ c-k	۴/۲۵ de	۲/۰۰ de	۱/۲۵ c

دگرگردهافشانی با N01

دگرگردهافشانی با N02

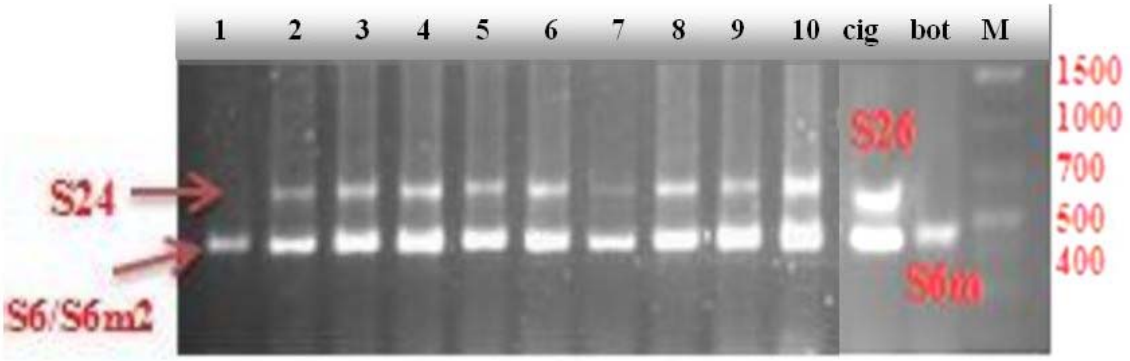
حروف مشترک در ستونها نشانگر عدم تفاوت معنیدار بین ژنوتیپها است

قطعات تکثیر شده بعد از جدا و خالص سازی جهت شناسایی آللهای S توالییابی شدند. نتایج حاصل از بلاست توالی ۳۶۰ جفت بازی نشان داد که قطعه تکثیر شده شباهت بالایی(۹۸ درصد) با توالی نسبی آلل S_9 گیلاس که توسط Sonneveld و همکاران (۲۰۰۳) در پایگاه NCBI ثبت شده بود نشان داد. بلاست توالی ۴۵۰ جفت بازی نشان داد که قطعه تکثیر شده با شباهت ۹۹ درصدی با توالی نسبی S_6 در رقم کرونیو گیلاس (۳۲)، همچنین با شباهت ۹۹ درصدی با توالی کامل آلل S_{6m2} آلبالو (۳۶) که در پایگاه NCBI ثبت شده بودند داشت بنابراین با احتمال بالایی آللهای تکثیر شده همان S_9 ، S_6 یا S_{6m2} میباشند.

با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی اینترون دوم PaConsII-F/PaConsII-R؛ PruC2/PruC4R؛ PruC2/PCE-R و EM-PC2ConsFD/EM-PC5ConsRD یازده نوار در محدوده ۳۷۰ الی ۱۰۰۰ جفت باز در ژنوتیپهای مورد مطالعه تکثیر شدند (جدول ۶). پس ازتوالییابی قطعات و بلاست کردن آنها در پایگاه NCBI وجود آللهای S_{24}، S_9، S_6/S_{6m2}، S_{26}،S_4 و S_{35} ، S_{36a}/S_{36b} در این ژنوتیپها مشخص شد. واکنش زنجیرهای پلیمراز با آغازگر اختصاصی اینترون دوم

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.11.9

PruC2/PruC4R چهار باند با اندازه‌های ۴۴۰، ۴۷۰، ۶۵۰ و ۶۸۰ را تکثیر کرد (شکل ۲). همچنین جفت آغازگر EM-PC2ConsFD/EM-PC5ConsRD توانست قطعه تقریبا ۱۰۰۰ جفت بازی را در همه ژنوتیپ‌ها و دو رقم سیگانی و بوترمو تکثیر کند با توجه به اینکه در رقم سیگانی آلل S_{36b2} و در رقم بوترمو S_{36a} ثابت شده است بنابراین برای تایید اینکه کدام آلل در ژنوتیپ‌های بومی حضور دارد نیاز به تکثیر با آغازگر اختصاصی است که بتواند تفاوت قطعات را نشان دهد. در مطالعه‌ای تائید شد که فراوانی هاپلوتایپ S_{36a} در بین ارقام آلبالو بیشتر از دیگر هاپلوتایپ‌های S_{36} می‌باشد (۳۷ ؛ ۱۵)، بنابراین احتمال حضور این آلل در ژنوتیپ‌های بومی بیشتر است و حضور هر کدام از این آلل‌ها باعث القا خودسازگاری می‌گردد.



شکل ۲- الگوی باندی حاصل از آغازگر اختصاصی Pruc2 – PruC4R پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه (A01 (1)، A02 (2)، A04 (3)، A05 (4)، A12 (5)، A13 (6)، N01 (7)، N02 (8)، N03 (9)، N04 (10)، سیگانی (Cig)، بوترمو (Bot) و سایز مارکر(M)

جدول ۶- آلل‌های S تکثیر شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی اینترون اول و دوم در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

اندازه ژنومی محصول PCR با آغازگرهای اختصاصی (bp)			
آلل S کاندید	اینترون دوم	اینترون اول	ژنوتیپ / رقم
S_6/S_{6m2}, S_9, S_{24}, S_{36a}/S_{36b}	325, 530, 440, 680, 600, 750, 1000, 570, 790	360, 450	**A01**
S_6/S_{6m2}, S_9, S_{24}, S_{36a}/S_{36b}	325, 530, 440, 680, 600, 750, 1000, 570, 790	360	**A02**
S_6/S_{6m2}, S_9, S_{24}, S_{36a}/S_{36b}	325, 530, 440, 680, 600, 750, 1000, 570, 790	360, 450	**A04**
S_6/S_{6m2}, S_9, S_{24}, S_{36a}/S_{36b}	325, 530, 440, 680, 600, 750, 1000, 570, 790	360, 450	**A05**
S_6/S_{6m2}, S_9, S_{24}, S_{36a}/S_{36b}	325, 530, 440, 680, 600, 750, 1000, 570, 790	360, 450	**A12**
S_6/S_{6m2}, S_9, S_{24}, S_{36a}/S_{36b}	325, 530, 440, 680, 600, 750, 1000, 570, 790	360, 450	**A13**
S_6/S_{6m2}, S_9, S_{24}, S_{36a}/S_{36b}	325, 530, 440, 680, 600, 750, 1000, 570, 790	360, 450	**N01**
S_6/S_{6m2}, S_9, S_{24}, S_{36a}/S_{36b}	325, 530, 440, 680, 600, 750, 1000, 570, 790	360, 450	**N02**
S_6/S_{6m2}, S_9, S_{24}, S_{36a}/S_{36b}	325, 530, 440, 680, 600, 750, 1000, 570, 790	360, 450	**N03**
S_6/S_{6m2}, S_9, S_{24}, S_{36a}/S_{36b}	325, 530, 440, 680, 600, 750, 1000, 570, 790	360, 450	**N04**
$S_{6m2}S_9S_{26}S_{36b2}$	325, 530, 600, 750, 1000, 570, 790, 650	360, 450	**سیگانی**
$S_4S_{6m}S_{35}S_{36a}$	325, 600, 1000, 570, 470	450	**بوترمو**

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.11.9

بحث

Bolat and Pirlak (۱۹۹۹) جهت بررسی قوه نامیه، درصد جوانه‌زنی و رشد لوله گرده در ۵ رقم زردآلو، ۴ رقم گیلاس و یک رقم آلبالو، چهار روش ۲-۲-۵- تری فنیل تترازولیوم، یدید پتاسیم، سافرانین و محیط کشت آگار را به کار بردند نتایج نشان داد که قوه نامیه، درصد جوانه‌زنی و رشد لوله گرده بر اساس گونه متفاوت بود و بالاترین درصد جوانه‌زنی و رشد لوله گرده در همه گونه‌ها و ارقام در محیط کشت آگار با ۱۵ درصد ساکارز حاصل شد به طوریکه درصد جوانه‌زنی گرده‌ها در آلبالو ۵۳/۸۲ ٪ گزارش شد. Davarynejad و همکاران (۲۰۰۸) محدوده جوانه زنی دانه گرده را در شرایط آزمایشگاهی در برخی از ارقام خارجی ۲۹/۱۲ – ۶۴/۵۹ درصد گزارش کردند. شرایط آب و هوایی سرد و بارانی در دوره گلدهی به طور معنی‌داری میزان جوانه‌زنی دانه گرده و به تبع آن تشکیل میوه را کاهش می‌دهد. علاوه بر فاکتورهای محیطی، برخی ویژگی‌های بیولوژیکی آلبالو نظیر پتانسیل باروری پایین گل‌ها در ارقام، دوره کوتاه گرده‌افشانی و کیفیت پایین گرده روی کارایی گرده‌افشانی تاثیر منفی گذاشته و میزان تشکیل میوه را کاهش می‌دهند (۱ و ۳۳).

Milatovic and Nicolic (۲۰۰۷) در ارزیابی خود (نا) سازگاری ۳۶ رقم زردآلو به این نتیجه رسیدند که در صورت نفوذ فقط یک لوله گرده به تخمدان، خودسازگار محسوب می‌شود. همچنین در مشاهدات Kamali (۱۳۸۷) تعداد لوله گرده نفوذ کرده در قسمت‌های مختلف خامه در ارقام خودسازگار بالاتر از ارقام خوداناسازگار بادام بوده و حتی در برخی از ارقام خوداناسازگار تعداد زیادی لوله گرده تا میانه خامه رشد می‌کند. در مطالعات Hajilou و همکاران (۲۰۰۶) که خود (نا)سازگاری مهمترین ارقام زردآلو را مورد بررسی قرار داده بودند اختلاف معنی‌داری را بین حالت‌های خودگرده‌افشانی و دگرگرده‌افشانی از لحاظ درصد میوه‌بندی و تعداد لوله گرده در تخمدان مشاهده نکردند.

Khadivi-Khub و همکاران (۲۰۱۴) در بررسی تنوع آلل-های S در ۸ گونه وحشی و دو گونه اهلی (گیلاس و آلبالو) زیرجنس *Cerasus* ثابت کردند که چندشکلی بالایی از لحاظ آلل‌های S در بین گونه‌های مورد مطالعه وجود دارد و آلل S_3 در بین ارقام محلی گیلاس دارای بیشترین فراوانی بود و آلل‌های S_1، S_2،S_7، S_{14}، S_{20} و چندین آلل نامعلوم در گونه‌های وحشی دیده شدند، همچنین گزارش نمودند که آلل های S_6، S_9، S_{13} و S_{27} در ژنوتیپ‌های ایرانی آلبالو مشاهده شد، که در این پژوهش نیز وجود آلل‌های S_6 و S_9در ژنوتیپ‌های بومی تائید شد. در مطالعه دیگری تنوع آلل‌های S در ۱۲۳ نمونه (Accession) گیلاس وحشی مورد بررسی، نتایج نشان داد که هاپلوتایپ‌های S_{14} و S_1 بیشترین و S_{20} کمترین فراوانی را در بین جمعیت‌های گیلاس داشتند (۲۹). مطالعه حاضر نشان داد تنوع زیادی از لحاظ آلل‌های S در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی وجود ندارد ولی هاپلوتایپ‌های S_{24}، S_6، S_9 دارای بیشترین فراوانی بودند. تنوع آلل S برای هر منطقه جغرافیایی خاص همان منطقه است، در ژرم‌پلاسم ایتالیا آلل‌های S_3، S_{13}، S_6 و S_{16} دارای بیشترین فراوانی (۱۹)، و در ارقامی که از جنوب شرق اسپانیا منشا گرفته بودند آلل‌های S_3، S_6، S_{12} و S_{22} غالب بودند (۷). همچنین در مقایسه ژنوتیپ‌های S ارقام اکراینی و جمهوری چک نشان داده شد که آلل‌های S_3، S_1 و S_4 در ارقام جمهوری چک و S_2، S_5، S_6 و S_9 در ارقام اکراینی دارای بیشترین فراوانی بودند (۱۵). در مناطقی که سطح تنوع ژنتیکی بالا بوده خصوصا در مناطقی که منشا گونه‌ها و ارقام محسوب می‌شوند تنوع بالایی در آلل‌های S وجود دارد. بنابراین مکان ژنی S می‌تواند به عنوان یک نشانگر مفید برای مطالعه سطح تنوع ژنتیکی ارقام مختلف به کار برده شود (۱۶).

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.11.9

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که در تمامی ترکیبات تیماری درصد جوانه‌زنی دانه گرده هم در شرایط باغ و هم در شرایط آزمایشگاهی در حد مناسبی صورت گرفته که این امر بیانگر عدم وجود مشکلات جوانه‌زنی دانه گرده در ژنوتیپ‌های مورد بررسی می‌باشد. علاوه بر این نتایج حاصل از روند رشد لوله گرده نشان داد که با توجه به رشد لوله گرده در قسمت‌های مختلف خامه و نهایتا رسیدن به تخمدان در تمامی حالت‌های گرده‌افشانی در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه ناسازگاری وجود ندارد. همچنین نشان داده شد که آغازگرهای عمومی آلل‌های S به تنهایی نمی‌توانند برای تعیین ژنوتیپ S قابل اطمینان باشند، بنابراین برای داشتن اطمینان و جلوگیری از واکنش-های اضافی پیشنهاد می‌شود از تجزیه دو مرحله‌ای در مرحله اول از آغازگرهای عمومی برای پیش غربالگری و سپس استفاده از آغازگرهای تخصصی برای تائید و یا رد آلل‌های که توسط آغازگرهای عمومی تکثیر شدند برای شناسایی آلل‌های S استفاده گردد. با توجه به نتایج آزمایشات گرده‌افشانی کنترل شده و داده‌های مولکولی می-توان نتیجه گرفت که ژنوتیپ‌های مورد بررسی سازگار بوده و دلیل باردهی پایین می‌تواند متاثر از موفولوژی گل‌ها و فاکتور محیطی باشد. مطالعات قبلی ثابت کرده بودند که رابطه مستقیم بین آلل‌های S و درصد تشکیل میوه وجود ندارد و این نشان دهنده این واقعیت است که علاوه بر ژنوتیپ آلل‌های S عوامل دیگری نظیر فاکتورهای محیطی روی میزان تشکیل میوه و باردهی درخت تاثیر می‌گذارند.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر مستخرج از رساله دکتری و با حمایت‌های مادی و معنوی دانشگاه تبریز و پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج انجام گرفته و لذا بر خود لازم می‌دانیم که نهایت تشکر و سپاس را از دانشگاه و پژوهشکده مذکور داشته باشیم.

منابع

1. Akšic, M.F., Rakonjadc, V., Nikolic, D., Colic, S., Milatovic, D., Licina, V., Rahovic, D. 2014. Effective pollination period in ‘oblacinska’ sour cherry clones. Genetika 46 (3), 671-680.
2. Beppu, K., Takemoto, Y., Yamane, H., Yaegaki, H., Yamaguchi, M., Kataoka, I.and Tao, R. 2003. Determination of S-haplotypes of Japanese plum (*Prunussalicina*Lindl.) cultivars by PCR and cross-pollination tests. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 78, 315–318.
3. Bolat, I., Pirlak, L. 1999. An investigation on pollen viability, germination and tube growth in some stone fruits. Turkish Journal of Agriculture and Forestry 23: 383-388.
4. Cerovic, R., Micic, N., Duric, G. 1998. Modelling pollen tube growth and ovule viability in sour cherry. Acta horticulture 621-628.
5. Davarynejad, G.H., Szabo, Z., Nyeki, J., Szabo, T. 2008. Phenological stages, pollen production level, pollen viability and in vitro germination capability of some Sour cherry cultivars. Asian journal of plant sciences 7(7), 672-676.
6. De Cuyper, B., Sonneveld, T., Tobutt, K.R. 2005. Determining self-incompatibility genotypes in Belgian wild cherries. Molecular Ecology14, 945–955.
7. Gisbert, A.D., Badenes, M.L., Tobutt, K.R., Llacer, G., Romero, C. 2015. Determination of the S-allele composition of sweet cherry (*Prunusavium* L.) cultivars grown in the southeast of Spain by PCR analysis. Journal of Horticultural Science & Biotechnology 83, 246–252.
8. Goldberg, E.E., Kohn, J.R., Lande, R., Robertson, K.A., Smith, S.A., Igifa, B. 2010. Species selection maintains self-incompatibility. Science 330(6003), 493–495.
9. Kamali, K. 1387. Using the methods of classical and molecular breeding almond to produce new self-compatible genotypes. Ph.D thesis. University of Tehran.
10. Hajilou, J., Grigorian, V., Mohammadi, S. A., Nazemmieh, A., Romero, C., Vilanova, S., Burgos, L. 2006. Self- and cross-(in) compatibility between important apricot cultivars

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.11.9

in northwest Iran. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 81 (3), 513-517.

11. Halasz, J., Hegedus, A., Herman, R., Stefanovits-Banyai, E., Pedryc, A. 2005. New self-incompatibility alleles in apricot (*Prunusarmeniaca* L.) revealed by stylar ribonuclease assay and S-PCR analysis. Euphytica 145, 57–66.
12. Ivanov, R., Fobis-Loisy, I., Gaude, T. 2010. When no means no: guide to Brassicaceae self-incompatibility. Trends in Plant Science 15(7), 387–394.
13. Khadivi-Khub, A., Zamani, Z., Fatahi, M.R., Wunsch, A. 2014. S-allele diversity in Prunus L. *Cerasus* subgenus from Iran. Biochemical Systematics and Ecology 53, 1–7.
14. Lisek, A., Rozpara, E., Głowacka, A., Kucharska, D., Zawadzka. M. 2015. Identification of S-genotypes of sweet cherry cultivars from Central and Eastern Europe. Hort Science (Prague) 42, 13-21.
15. Lisek, A., Kucharska, D., Głowacka, A., Rozpara, E. 2017. Identification of S-haplotypes of European cultivars of sour cherry. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 92(5), 484-492.
16. Liu, C., Qi, X., Song, L., Li, Y., Li, M. 2018. Species identification, genetic diversity and population structure of sweet cherry commercial cultivars assessed by SSRs and the gametophytic self-incompatibility locus. Scientia Horticulturae 237, 28–35.
17. 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.
18. López, M., Vargas, F.J., Batlle, I. 2006. Self-(in) compatibility almond genotypes: A review. Euphytica 150, 1–16.
19. Marchese, A., Giovannini, D., Leone, A., Mafrica, R., Palasciano, M., Cantini, C., Di Vaio, C., De Salvador, F.R., Giacalone, G., Caruso, T., Marra, F.P. 2017. S-genotype identification, genetic diversity and structure analysis of Italian sweet cherry germplasm. Tree Genetic and Genomes 13, 93.
20. Meng, X., Sun, P., Kao, T.H. 2011. S-RNase-based self-in compatibility in *Petuniainflata*. Annual Botany 108 (4), 637-646.
21. Milatovic, D., Nicolic, D. 2007. Analysis of self-(in) compatibility in apricot cultivars using fluorescence microscopy. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 82, 170-174.
22. Morimoto, T., Akagi, T., Tao, R. 2015. Evolutionary Analysis of Genes for S-RNase-based Self incompatibility Reveals S Locus Duplications in the Ancestral Rosaceae. Horticulture Journal 84(3), 233–242.
23. Mousavi, S. A., Fatahi Moghadam, M. R., Zamani, Z., Imani, A., Ortega, E., Dicenta, F. 2011. Identification of self-incompatibility alleles in Iranian almond cultivars and genotypes using PCR. Iranian Journal of Horticultural sciences 42(2), 169-183 (in Persian).
24. Mousavi, A., R. Fatahi, Z. Zamani, A. Imani, F. Dicenta E. Ortega. 2014. Genetic variation and frequency of S-alleles in Iranian Almond Cultivars. Acta Horticulture 1028, 45-48.
25. Mousavi, A., R. Babadaei, R. Fatahi, Z. Zamani, F. Dicenta 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.
26. Ortega, E., Dicenta, F. 2004. Suitability of four different methods to identify self-compatible seedling in an almond breeding program. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 79 (5), 747-753.
27. Radičević, S., Nikolić, D., RadosavCerović, R., Đorđević, M. 2013. In vitro pollen germination and pollen grain morphology in some sweet cherry (*Prunusavium* L.) cultivars. Romanian Biotechnological Letters 18 (3), 8341- 8349.
28. Rahemi, A. R., Fatahi, R., Ebadi, A., Taghavi, T., Hassani, D., 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.
29. Sharma, K., Korecký, J., Patrizio Soldateschi, E.D., Sedlák, P. 2017. S-Genotype Diversity in Wild Cherry Populations in the Czech Republic. Scientia agriculturaebohemica, 48(1), 92–97.
30. Sonneveld, T., Robbins, T.P., Tobutt, K.R. 2006. Improved discrimination of self-incompatibility S-Rnase alleles in cherry and high throughput genotyping by automated sizing of first intron polymerase chain reaction products. Plant Breeding 125, 305-307.
31. Sonneveld, T., Robbins, T.P., Boskovic, R., Tobutt, K.R. 2001. Cloning of six cherry self-incompatibility alleles and development of

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.11.9

allele-specific PCR detection. Theoretical and Applied Genetics 102, 1046–1055.

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

33. Szpadzik, E., Jadczuk-Tobjasz, E., Łotocka, B. 2008. Preliminary evaluation of pollen quality, fertility relations and fruit set of selected sour cherry cultivars in polish conditions. ActaAgrobotanica 61, 71–77.

34. Tao, R., Habu, T., Namba, A., Yamane, H., Fuyuhiro, F., Iwamoto, K., Sugiura, A. 2002. Inheritance of Sf-RNase in Japanese apricot (*Prunusmume*) and its relation to self-compatibility. Theoretical and Applied Genetics 105, 222-228.

35. Tao, R., Yamane, H., Akira, H. 1999. Cloning of genomic DNA sequences encoding S1-, S3-, S4 and S6-RNases (accessionnos. AB031815, AB031816, AB031817, and AB0311818) from sweet cherry (*Prunusavium* L.). Plant Physiology 121, 1057–1064.

36. Tsukamoto, T, Hauck, N.R., Tao, R., Jiang, N., Iezzoni, A.F. 2006.Molecular characterization of three non-functional S-haplotypesin sour cherry (*Prunuscerasus*). Plant Molecular Biology 62, 371–383.

37. Tsukamoto, T., Hauck, N.R., Tao, R., Jiang, N., Iezzoni, A.F. 2010. Molecular and genetic analyses of four nonfunctional S haplotype variants derived from a common ancestral S haplotype identified in sour cherry (*Prunuscerasus*L.). Genetics 184(2), 411-427.

38. Ushijima, K., Sassa, H., Dandekar, A.M., Gradziel, T.M., Tao, R., Hirano, H. 2003. Structural and transcriptional analysis of the self-incompatibility locus of almond: identification of a pollen-expressed F-box gene with haplotype-specific polymorphism. Plant Cell 15, 771–781.

39. Vaughan, S.P., Boskovic, R.I., Gisbert-Climent, A., Russell, K., Tobutt, K.R., 2008. Charecterization of novel S-alleles from cherry (*Prunusavium* L.). Tree Genet. Genom. 4, 531–541.

40. Vroh Bi, I., Hraventg, L., Chandelier, A., Mergeai, G., Du Jardin, P. 1996. Improved RAPD amplication of recalcitrant plant DNA by use of activated charcoal during DNA extraction. Plant Breeding 115, 205-206.

41. Yamane, H., Ikeda, K., Ushijima, K., Sassa, H., Tao, R. 2003. A pollen-expressed gene for a novel protein with an F-box motif that is very tightly linked to a gene for S-RNase in two species of cherry, *Prunus cerasus* and *P. avium*. Plant and Cell Physiology 44, 764–769.

DOR: 20.1001.1.23832592.1401.35.3.11.9

Assessment of pollination compatibility status in sour cherry superior genotypes using biological and molecular methods

Aliyoun Nazari S.*[1], Hajilou J.[1] and Zeinalabedini M.[2]

[1] **Dept. of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, I.R. of Iran.**

[2] **Agriculture Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, I.R. of Iran.**

Abstract

In sour cherry, as in other species of the genus *Prunus*, there is a gametophytic self-incompatibility (GSI) phenomenon. In this research, relations between pollen and pistil of 10 superior sour cherry genotype were investigated by using biological and molecular methods. In biological methods, pollen grains are prepared in balloon stage (D phenological stage) and then after evaluating the growth and percentage of pollen germination in medium, in suitable time flowers were emasculated, open pollination, controlled self and cross pollination were carried out in the orchard. In the molecular method, PCR-based methods were used to identify S alleles. The results showed that the highest pollen germination was observed on the stigma in self-pollination, and regarding of the number of pollen tube at the upper and lower parts of the pistil and ovary, the highest was related to open pollinating. Nine known S-haplotypes (S4, S6, S9, S6m2, S24, S26, S35, S36b and S36a) were identified, that alleles S6/S6m2, S9, S24 have a high frequency. Our study showed the low diversity of S alleles between studied genotypes. According to the growth of pollen tubes in style and ovary in all cases of pollination all of studied genotypes are compatible.

Key words: Sour cherry, Consensus primers, Incompatibility, Polymerase chain reaction