

## ارزیابی تنوع در مکان ژنی خودناسازگاری و جداسازی اولین آلل این

مکان ژنی در ژنوتیپ‌های بومی درخت به (*Cydonia oblonga* Mill.) ایرانEvaluation of Diversity and Isolation of the First Self-Incompatibility Allele in Indigenous Quince (*Cydonia oblonga* Mill.) Genotypes of Iranزهرا طلایی<sup>۱</sup>، حمید عبداللهی<sup>۲\*</sup>، بهزاد سرخی<sup>۳</sup>، مریم تاتاری<sup>۴</sup>، محمد ترکاشوند<sup>۵</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

۲- دانشیار، پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی،

کرج، ایران

۳- استادیار، بخش ژنتیک و ذخایر توارثی گیاهی، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج

کشاورزی، کرج، ایران

۴- استادیار، بخش تحقیقات نهال و بذر، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج

کشاورزی، اصفهان، ایران

۵- گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

Talaei Z<sup>1</sup>, Abdollahi H<sup>2\*</sup>, Sorkhi B<sup>3</sup>, Tatari M<sup>4</sup>, Torkashvand M<sup>5</sup>

1- MSc Student, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Azad University of Karaj, Karaj, Iran.

2- Associate Professor, Temperate Fruits Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

3- Assistant Professor, Genetic and Plant Resources Department, Seed and Plant Improvement Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

4- Assistant Professor, Horticulture Crops Research Department, Isfahan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension organization (AREEO), Isfahan, Iran

5- Biotechnology Department, Faculty of Agriculture and Natural Science, Science and Research Branch, Azad University, Tehran, Iran.

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: habdollahi@yahoo.it

(تاریخ دریافت: ۹۷/۶/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۵/۱۱)

## چکیده

درخت به (*Cydonia oblonga* Mill.) از نظر سازگاری گروه، گونه‌ای خودسازگار محسوب می‌شود، لیکن سطوح متفاوتی از خودناسازگاری در ارقام و ژنوتیپ‌های آن گزارش شده است. با توجه به عدم بررسی آلل‌های خودناسازگاری مکان ژنی و تنوع احتمالی آللی این مکان ژنی (S) در درخت به و تاثیر آن در میزان خودناسازگاری، در این تحقیق به ارزیابی تنوع در مکان ژنی خودناسازگاری، جداسازی، تعیین توالی و ودیعه‌گذاری اولین آلل خودناسازگاری در شماری از ارقام و ژنوتیپ‌های بومی این درخت پرداخته شد. آغازگرهای مورد استفاده بر اساس نواحی محافظت شده C1 و C5 مکان ژنی S در گونه‌های نزدیک مشتمل بر سیب و گلابی طراحی شدند. ژنوتیپ‌های مورد بررسی مشتمل بر ۵۵ رقم و ژنوتیپ از استان‌های اصفهان، خراسان رضوی، اردبیل و گیلان بودند و تکثیر این مکان ژنی نشان‌دهنده تنوع آن در ژنوتیپ‌ها بود. قطعات تکثیری با طول بین ۵۰۰ تا ۱۱۰۰ باز در ۱۳ اندازه مختلف در ارقام و ژنوتیپ‌ها مشاهده شدند که به صورت *Sq1* تا *Sq13* به صورت مقدماتی کدگذاری شدند. بیشترین فراوانی آللی مربوط به آلل *Sq13* با ۱۷/۷ درصد فراوانی و پس از آن آلل *Sq4* با ۱۴/۴ درصد فراوانی بود. تعیین توالی کامل این مکان ژنی در ژنوتیپ KM1 یا به ترش اصفهان ضمن تشخیص اولین آلل خودناسازگاری این گونه که به صورت *S1* (MF281258) نام‌گذاری و ودیعه‌گذاری شد، بیانگر بالاترین شباهت این آلل با دو آلل خودناسازگاری *S6* گونه سیب *Malus domestica* Borkh. و آلل *S111* (*S111*) گونه گلابی *Pyrus communis* L. به ترتیب با ۹۴ و ۹۳ درصد شباهت نوکلئوتیدی بود.

## واژه‌های کلیدی

آلل S

خودسازگاری

تنوع آللی

پیش‌رانه

درختان میوه دانه‌دار

خانواده گلسرخیان، به دو گروه گونه‌های خودناسازگار<sup>۴</sup> نظیر سیب، گلابی، گیلاس، آلو، زردآلو و گونه‌های خودسازگار<sup>۵</sup> نظیر هلو، شلیل و آلبالو تقسیم می‌شوند (De Hauck et al. 2002). Franceschi et al. 2012). درخت به گرچه بیش‌تر همانند درختان هلو و شلیل به‌عنوان گونه‌ای خودسازگار در خانواده گلسرخیان طبقه‌بندی می‌شود، لیکن (Tatari et al. 2018) سطوح متفاوتی از خودسازگاری را در ارقام و ژنوتیپ‌های این گونه گزارش کردند. همچنین مشاهده شده است که طیفی از ارقام کاملاً خودسازگار تا کاملاً خودناسازگار در این گونه وجود دارد، به‌صورتی که ارقام درخت به در دو گروه خودسازگار و خودناسازگار قابل طبقه‌بندی می‌باشند (Nagy-Déri et al. 2013).

ارزیابی‌های انجام شده نشان‌داده که برخی ارقام درخت به نظیر رقم به کنستانتینوپول<sup>۶</sup> و به گلابی شکل دونابوگدانی<sup>۷</sup> به‌عنوان ارقام کاملاً خودناسازگار و ارقام به آنجرز<sup>۸</sup> و متزوتوری<sup>۹</sup> ارقام کاملاً خودسازگار می‌باشند (Maliga 1966؛ Nyéki 1990؛ Szabó et al. 1999؛ Nyéki et al. 2003؛ Soltész 1998). همچنین بر اساس تجربه میدانی مشاهده شده است که باغ‌های درخت به کشت شده به‌صورت مخلوطی از ارقام و یا ژنوتیپ‌ها، اغلب دارای باردهی بهتری نسبت به باغ‌های یکدست می‌باشند (Tatari et al. 2018).

طی دو دهه اخیر، تحقیقات گسترده‌ای روی ساختارهای ژنتیکی خودسازگاری یا خودناسازگاری گونه‌های خانواده گلسرخیان انجام شده است (De Franceschi et al. 2012؛ de Nettancourt, 1977؛ Broothaerts and Van Nerum 2003؛ Nikzad et al. 2014). Gharehaghaji et al. 2014). بر اساس این بررسی‌ها، اعضای این خانواده دارای سیستم خودناسازگاری گامتوفیتیک با یک مکان ژنی (S-locus)، واجد تعداد زیادی آلل خودناسازگاری (S-allele) می‌باشند. در این سیستم خودناسازگاری، حداقل دو مکان ژنی یکی متعلق به گرده و دیگری متعلق به خامه، عامل شناسایی و ایجاد ناسازگاری گرده می‌باشد (de Nettancourt 1977).

گونه درخت به با نام علمی *Cydonia oblonga* Mill. درخت یا درختچه‌ای با رشد متوسط و از زیرخانواده اسپروایده<sup>۱</sup> متعلق به خانواده گلسرخیان<sup>۲</sup> می‌باشد. این درخت بومی غرب آسیا و به‌ویژه نوحی شمال ایران، ترکمنستان و ناحیه بین دریای خزر تا دریای سیاه در در نواحی قفقاز بوده و ژنوتیپ‌های وحشی آن در جنگل‌های شمال ایران از آستارا تا کتول در استان مازندران پراکنده است (Sabeti 1994؛ Bell and Leitão 2011). درخت به پس از سیب و گلابی سومین درخت میوه در زیرگروه درختان میوه‌دانه‌دار از نظر اهمیت تجاری محسوب شده و مجموع سطح زیرکشت و تولید جهانی آن طبق آخرین آمار ارائه شده توسط سازمان خواروبار جهانی در سال ۲۰۱۶ میلادی، به‌ترتیب در حدود ۸۲ هزارهکتار و ۶۵۰ هزارتن بوده است (FAO, 2018). عمده‌ترین کشورهای تولید کننده میوه به بر اساس این آمار، به‌ترتیب کشورهای ازبکستان، چین، ترکیه و ایران بوده‌اند که به‌نظر می‌رسد در کشور چین، گونه دیگری به‌نام به چینی متعلق به جنس *Pseudocydonia sinensis* sp. به‌عنوان گونه به از دیرباز مد نظر بوده است.

متوسط عملکرد درخت به در بسیاری از کشورهای تولیدکننده این محصول، به‌طور قابل‌توجهی کم‌تر از دیگر درختان میوه دانه‌دار نظیر سیب و گلابی می‌باشد (FAO 2018) و عوامل متعددی نظیر میزان تشکیل میوه<sup>۳</sup>، پتانسیل ژنتیکی رقم، مراقبت‌های باغی و در نهایت وجود و یا عدم وجود گرده‌زا در عملکرد باغ تاثیرگذار می‌باشند. در خانواده گلسرخیان، گرده‌افشانی از طریق حشرات گرده‌افشان صورت گرفته و وجود زنبورعسل و یا دیگر انواع گرده‌افشان‌ها در انتقال دانه‌گرده در هر دو گروه گونه‌های خودسازگار و خودناسازگار، ضروری است (Kleinjans et al. 2012). بر این اساس، حشرات گرده‌افشان به‌منظور جمع‌آوری گرده و یا شهد، نسبت به ویزیت گل‌ها اقدام گرده و سبب انتقال گرده و گرده‌افشانی خواهند شد (Jacobs et al. 2009). از طرفی گونه‌های مختلف درخت میوه مربوط به

<sup>4</sup> Self-Incompatible

<sup>5</sup> Self-Compatible

<sup>6</sup> Constantinople

<sup>7</sup> Pear-shaped Dunabogdány

<sup>8</sup> Angers

<sup>9</sup> Mezőtúri

<sup>1</sup> Spiraeoideae

<sup>2</sup> Rosaceae

<sup>3</sup> Fruit Set

باردهی و یا کاهش چشمگیر عملکرد می‌شود، در این درخت، افت نسبی عملکرد و کاهش راندمان تولید برای تولیدکننده به صورت بخشی از خصوصیت ژنتیکی درخت خودنمایی و کم‌تر جهت رفع و یا بهبود آن اقدام می‌شود. لذا در این تحقیق، به منظور اولین گام در جهت شناسایی و مقایسه مکان ژنی خودناسازگاری در درخت به و بررسی تاثیر آن در سازگاری و باردهی ارقام، به بررسی مقدماتی و اولیه این مکان ژنی در شماری از ارقام بومی و ژنوتیپ‌های این درخت پرداخته شد.

### مواد و روش‌ها

به منظور ارزیابی امکان جداسازی آلل خودناسازگاری و ارزیابی تنوع ژنتیکی این مکان ژنی، جمعاً تعداد ۵۵ رقم و ژنوتیپ درخت به منشاء گرفته از مناطق مختلف کشور مشتمل بر استان‌ها اصفهان، خراسان، اردبیل، تهران و گیلان (جدول ۱) همراه با سه رقم از جمهوری آذربایجان به نام‌های دارناک، بش اولدوز و رجبلی-۱، پنج رقم پایه اروپایی Quince A، Quince B، Quince C، Quince BA29، Quince Adams، رقم بارداک از ترکیه، همراه با به ژاپنی گل قرمز و گل سفید هر دو متعلق به گونه *Chaenomeles japonica*، به چینی متعلق به گونه *Pseudocdonia sinensis* (Thouin) C. K. Schneid. و لیک میوه قرمز یا سرخه و لیک متعلق به گونه *Crataegus atrosanguinea* مورد ارزیابی قرار گرفتند.

(Nikzad Gharehaghaji et al. 2014). بر اساس این مدل، یک یا چند باکس ژنی باروری (F-box) متعلق به هاپلوتایپ گروه و یک ریبونوکلئاز خامه معروف به S-RNase (Broothaerts et al. 1995؛ Nikzad Gharehaghaji et al. 2014) تعیین‌کننده اثر متقابل سازگاری گروه و خامه است. با توجه به اهمیت شناسایی و تعیین آلل‌های خودناسازگاری در هر رقم یا ژنوتیپ، در کنار شناسایی ساختارهای ژنتیکی خودناسازگاری، تلاش‌های متعددی در رابطه با جداسازی و تعیین نوع آلل‌های خودناسازگاری در هر رقم از درختان میوه دانه‌دار نظیر سیب آلل *SI* تا *S47* (Broothaerts and Van Nerum 2003) و گلابی از آلل *SI01* تا *SI28* (Nikzad Gharehaghaji et al. 2014؛ Sanzoli 2009a,b) انجام شده است. از طرفی با توجه به سطح زیرکشت کم‌تر درخت به در مقایسه با درخت سیب و گلابی از یکسو، و از سوی دیگر عدم استفاده از این گونه در بسیاری از کشورهای اروپایی به منظور تولید میوه، و در نهایت خودسازگاری قابل‌توجه تعداد زیادی از ارقام و ژنوتیپ‌های این درخت، تاکنون تحقیقات منسجمی روی شناسایی ساختارهای ژنتیکی این مکان ژنی در درخت به انجام نشده است.

استفاده از پتانسیل‌های کامل ژنتیکی یک محصول با هدف تولید کافی و اقتصادی آن دارای اهمیت است؛ بر این اساس، وجود سطوح اندکی از خودناسازگاری در درخت به، سبب می‌شود تا تولید و عملکرد باغ‌های این محصول کاهش یابد و بر خلاف دیگر درختان میوه دانه‌دار که عدم کشت رقم‌گرده‌زا سبب توقف

جدول ۱- ارقام و ژنوتیپ‌های درخت به مناطق مختلف مورد مطالعه به منظور ارزیابی مکان ژنی خودناسازگاری همراه با منشاء جغرافیایی رقم و یا ژنوتیپ مورد استفاده.

منشاء	نام تجاری ارقام و کد ژنوتیپ‌ها و منشاء آنها
Iran-Esfahan Province	ET1 (Esfahan) <sup>1</sup> , KM1 (Kalishad), Viduja (Kashan), KVD2 (Kashan), Esfahan (Esfahan plateau), KVD4 (Kashan), NB2 (Natanz), NB3 (Natanz), NB4 (Natanz), PH2 (Felaverjan), PK2 (Felaverjan), SHA1 (Shahreza), SVS1 (Semirom), SVS2 (Semirom), Chimeh Kashan
Iran-Khorasan Province	M1 (Torsh) (Mashhad), M2 (Moghavem 2) (Mashhad), M3 (Esfahan Oghaf)(Mashhad), M4 (Moghavem 1) (Mashhad), M5 (Gardan Dar) (Mashhad), M6 (Khosro) (Mashhad), M7 (Sahel Borj) (Mashhad), M8 (Dizbad) (Mashhad)
Iran-Guilan Province	AS1 (Astara), AS2 (Astara), ASM1 (Astara), ASM2 (Astara), ASM3 (Astara), ASP1 (Astara), ASP2 (Astara), Unkown 1
Iran-Ardabil Province	Ardabil 1 (Ardabil), Ardabil 2 (Ardabil), Ardabil 3 (Ardabil), Ardabil 4 (Ardabil), Ardabil 5 (Ardabil), Ardabil 6 (Ardabil), Ardabil 7 (Ardabil), Haj Agh Kishi (Kowsar), Amroudi Kowsar (Kowsar)
Iran-Azərbayjan Province	Torsh Azarbaijan
Iran-Tehran Province	LA1 (Lavasan); LA3 (Lavasan)
Europe	Quince A (England), Quince Adams (Belgium), Quince B (England), Quince C (England), Quince PQBA29 (France)
Republic of Azerbaijan	Besh Olduz, Darnak, Rajabli 1
Turkey	Bardak
Related Species	<i>Chanemoleles japonica</i> var. White, <i>Chaenomeles japonica</i> var. Pink, <i>Crataegus atrosanguinea</i> , <i>Pseudocdonia sinensis</i> (Chinese quince),

<sup>1</sup> منشاء جغرافیایی ارقام و ژنوتیپ‌ها داخل پرانتز نشان داده شده است.

همکاران (۲۰۰۷) و جفت آغازگرهای FB، ارائه شده توسط Babaei et al. (2012) بودند. از بین آغازگرها، جفت آغازگر Sall-F (5'-TTTACGCAGCAATATCAGC-3') و FB-R1 (5'-GCATTTTCAATATCCA(C/A)CAG-3') که از نظر طول، حداکثر طول قطعه تکثیری را تولید می‌کردند، انتخاب شدند (جدول ۲). پس از هم‌ردیفی این آغازگرها با توالی‌های هدف، مشخص شد که آغازگر پیشرو گزینش شده در منطقه C1 و آغازگر پیرو آن در ناحیه نیمه‌حفاظت شده ۵۳ نوکلئوتید پایین دست انتهای منطقه حفاظت شده RC4 قرار دارد که گستره قابل توجهی از کلیه آلل‌ها را پوشش می‌دهد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی (PCR) با استفاده از دستگاه ترموسایکلر اپندورف (Eppendorf) مدل MasterCycler-Gradient روی DNA ارقام و ژنوتیپ‌های درخت به انجام گرفت. به‌منظور تعیین آلل‌های خود ناسازگاری از روش توالی‌یابی محصولات حاصل استفاده شد. جفت آغازگر مورد استفاده از شرکت متابیون (Metabion) تهیه و رقیق‌سازی آن‌ها با آب مقطر دی‌یونیزه و براساس OD ارائه شده آغازگر در غلظت ۱۰ میکرومولار انجام شد. سایر مواد مورد نیاز واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل ۲۰ پیکومول  $MgCl_2$ ، ۱۰۰ نانوگرم DNA بوده و هم‌چنین در هر واکنش، غلظت هر آغازگر ۵ واحد به ازاء هر واکنش ۲۵ میکرولیتری در نظر گرفته شد. سایر اجزاء ثابت واکنش PCR، به‌میزان ۰/۵ میکرولیتر بافر واکنش ۱۰ برابر غلظت (10X)، یک واحد آنزیم DNA پلی‌مرز و ۰/۵ میکرولیتر از محلول مادری dNTPs با غلظت ۱۰ میلی‌مولار بود. به‌منظور مشاهده و اندازه‌گیری وزن باندهای حاصل، از دستگاه الکتروفورز افقی با ژل آگارز یک درصد استفاده و با ولتاژ ۸۵ ولت باندها تفکیک شدند.

ارقام و ژنوتیپ‌های مورد استفاده همگی از کلکسیون درخت به پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری موسسه تحقیقات علوم باغبانی دریافت شدند. با توجه به عدم وجود اطلاعات در بانک‌های اطلاعاتی در رابطه با مکان ژنی خودناسازگاری در گونه به، برای طراحی آغازگرهای مورد نیاز، کامل‌ترین توالی آلل‌های خودناسازگاری و دیعه گذاشته‌شده در بانک اطلاعاتی متعلق به گونه‌های نزدیک شامل گونه‌های سیب و گلابی (*Pyrus spp.*) و ترجیحاً واجد بخشی از پیشرانه، با استفاده از تارنمای مرکز ملی اطلاعات زیست‌فن‌آوری (National Center for Biotechnology Information-NCBI) انتخاب شدند. سپس با استفاده از خطی کردن (Alignment)، پنج ناحیه حفاظت‌شده C1 تا C5 مکان ژنی S روی توالی نوکلئوتیدی آن‌ها شناسایی و مشخص شد. خطی کردن توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار تحت وب مولتالین (MultAlin) (Corpet 1988) و ارزیابی پیشرانه با نرم‌افزار Plant-Care انجام شد. آغازگرهای مورد استفاده بر اساس امکان تکثیر بیش‌ترین طول ژن روی نواحی خطی شده و حفاظت شده مکان‌های ژنی گونه‌های نزدیک طراحی شد.

استخراج DNA ژنومی روی برگ‌های جوان با سطح کلروفیل کم و طول کمتر از ۴ سانتی‌متر با روش ترکیبی CTAB و SDS انجام شد (Khoramdel Azad et al. 2008). ارزیابی غلظت و میزان خلوص DNA استخراج شده، با استفاده از روش اسپکتروفتومتریک، به‌صورت ارزیابی میزان جذب در طول موج‌های ۲۳۰ و ۲۶۰ نانومتر انجام شد. گزینش آغازگرهای مورد استفاده بر اساس حداکثر طول تکثیر مکان ژنی، هدف قرار گرفت و با بررسی در منابع مختلف، سه جفت آغازگر انتخاب شدند. این آغازگرها شامل جفت آغازگر Sall، ارائه شده توسط موتا و

جدول ۲- توالی‌های نوکلئوتیدی آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق برای تکثیر آلل‌های مکان ژنی S در ارقام و ژنوتیپ‌های درخت به

منبع	توالی نوکلئوتیدی	آغازگرها
Mota et al. 2007	5' - TTTACGCAGCAATATCAGC -3'	Sall-F
Mota et al. 2007	5' - TTTTG(T/C)TTC(T/C)(T/G/C)GGT(G/A)TGAC -3'	Sall-R
Babei et al. 2012	5' - GATCCT(C/A)CTGACAA(G/A)TTGTT(T/C)AC -3'	FB-F
Babei et al. 2012	5' - GCATTTTCAATATCCA(C/A)CAG -3'	FB-R1
Babei et al. 2012	5' - CCAATAATT(T/A)(C/T/G)CA(A/G)CTG(T/G)G -3'	FB-R2

خودسازگاری بالاتری نسبت به خودناسازگاری وجود داشته و احتمالاً تعداد زیادتری از بذره‌های تولید شده در طی تکامل ارقام و ژنوتیپ‌های طی دوره‌های گذشته، در اثر خودباروری ایجاد شده است.

Khoramdel Azad et al. (2013) نسبت به بررسی جمعیت‌های مختلف درخت به منشأ گرفته از مناطق مختلف ایران با استفاده از نشانگرهای SSR سیب و گلابی پرداختند و مشاهده کردند که این جمعیت‌ها به صورت مستقل قابل خوشه‌بندی هستند. بر این اساس این امکان وجود دارد که اندازه قطعات تکثیری با استفاده از آغازگرهای این تحقیق تا اندازه‌ای تابع جمعیت مورد بررسی بوده، به این معنی که فراوانی یک یا چند آلل در ژنوتیپ‌های منشأ گرفته از یک ناحیه بیش‌تر باشد. ارزیابی نتایج نشان داد که در ژنوتیپ‌های منشأ گرفته از استان اردبیل قطعات تکثیری بین ۵۰۰ تا ۱۱۰۰ باز، در ژنوتیپ‌های منشأ گرفته از اروپا قطعات تکثیری بین ۸۵۰ تا ۱۱۰۰ باز، در ژنوتیپ‌های منشأ گرفته از استان اصفهان قطعات تکثیری بین ۵۵۰ تا ۱۱۰۰ باز، در ژنوتیپ‌های منشأ گرفته از جمهوری آذربایجان اردبیل قطعات تکثیری بین ۷۰۰ تا ۹۵۰ باز، در ژنوتیپ‌های منشأ گرفته از استان خراسان رضوی قطعات تکثیری بین ۵۵۰ تا ۱۱۰۰ باز و در ژنوتیپ‌های منشأ گرفته از استان گیلان نیز قطعات تکثیری بین ۶۰۰ تا ۱۱۰۰ باز بودند که نفی‌کننده فرضیه امکان برقراری ارتباط بین طول باند با منشأ رقم یا ژنوتیپ است (جدول ۳). لیکن بر خلاف مطلب فوق، ژنوتیپ‌ها و ارقام دارای دو آلل تکثیری در جمعیت‌های اکثر مناطق مشاهده شد، به غیر از پایه‌های منشأ گرفته از جمعیت اروپا که در تمامی آنها تنها یک باند تکثیر شد. این امر بیانگر احتمال وجود سطح بالاتری از خودناسازگاری در ژنوتیپ‌های درخت به اروپا در مقایسه با ارقام و ژنوتیپ‌های مختلف ایران می‌باشد و با نتایج Nagy-Déri et al. (2013) که به آنجرز فرانسه را کاملاً خودسازگار ارزیابی کرده بود در انطباق است. قطعات تکثیری مربوط به مکان ژنی خودناسازگاری بر اساس طول به صورت فرضی<sup>۱</sup> از ۱ تا ۱۳ نامگذاری شدند بر این اساس قطعه ۵۰۰ بازی آلل *Sq1* و

به‌منظور شناسایی نوع آلل‌های خودناسازگاری تکثیر شده، محصولات PCR توسط کمپانی بایونیرکره جنوبی توالی‌یابی شدند. توالی‌های به‌دست آمده، در نرم‌افزار بیو ادیت (BioEdit) ویرایش و میزان تشابه توالی‌های شناسای شده با آلل‌های مختلف، در نرم‌افزار بلاست بررسی شد.

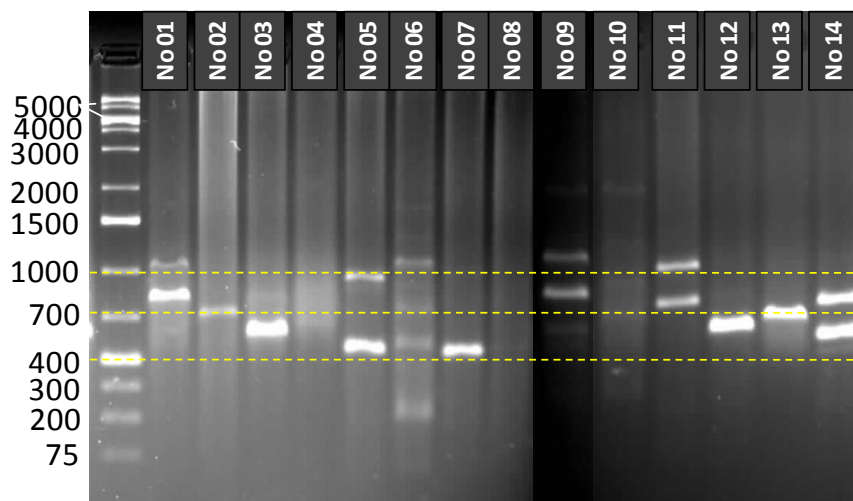
## نتایج و بحث

تکثیر DNA بیانگر امکان تولید باند با استفاده از آغازگرهای مورد استفاده در ۴۵ رقم، ژنوتیپ و گونه مورد بررسی بود و در ۱۰ ژنوتیپ هیچ باندهایی تکثیر نشد، که دلیل این امر می‌تواند وجود تنوع خفیف در مکان‌های در نظر گرفته شده برای طراحی آغازگرها بین گونه سیب و گلابی و گونه مورد استفاده در این تحقیق باشد. باندهای تکثیری همچنین در محدوده ۵۰۰ تا ۱۱۰۰ باز بوده و در ۱۳ اندازه مختلف مشتمل بر ۵۰۰، ۵۵۰، ۵۸۰، ۶۰۰، ۶۵۰، ۷۰۰، ۷۵۰، ۸۰۰، ۸۵۰، ۹۰۰، ۹۵۰، ۱۰۰۰ و ۱۱۰۰ نوکلئوتید طبقه‌بندی شدند (شکل ۱، جدول ۳). همچنین در ۱۳ ژنوتیپ از ۵۵ ژنوتیپ مورد بررسی، تعداد دو آلل خودناسازگاری تکثیر شد و در سایر ۳۲ ژنوتیپ و رقم تنها یک آلل توسط آغازگرها تکثیر شد (جدول ۳، شکل ۱). ارزیابی توالی آلل‌های تکثیری تنها با آغازگر FB-F و بررسی میزان شباهت آن‌ها، تایید‌کننده تکثیر مکان ژنی خودناسازگاری در ارقام، ژنوتیپ‌ها و گونه‌ها بود. (Tatari et al. 2018) سطوح متفاوتی از خودسازگاری را در ارقام و ژنوتیپ‌های درخت به گزارش کردند و همچنین ارقام کاملاً خودسازگار تا کاملاً خودناسازگار در این گونه توسط Nagy-Déri et al. (2013) مورد توجه قرار گرفته است. بر اساس نتایج Tatari et al. (2018) و Nagy-Déri et al. (2013) و با توجه به امکان خودسازگاری نسبی یا کامل در برخی ارقام و ژنوتیپ‌های به، بر خلاف درختان سیب و گلابی که به دلیل ناسازگاری شدید امکان مشاهده ارقام یا ژنوتیپ‌های هموزیگوت در این مکان ژنی بسیار ناچیز است، این ارزیابی نشان داد که احتمالاً ۷۶/۴ درصد از ژنوتیپ‌های مورد بررسی از نظر مکان ژنی مورد نظر هموزیگوت بودند. وجود سطح بالایی از هموزیگوسیته در این مکان ژنی نشان می‌دهد که در درخت به، احتمال

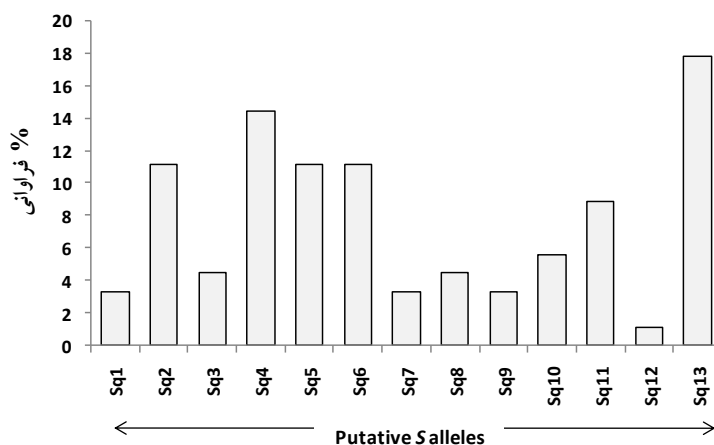
<sup>1</sup> Putative

آللی مربوط به آلل *Sq13* با ۱۷/۷ فراوانی و پس از آن آلل *Sq4* با ۱۴/۴ فراوانی بود. همچنین آلل‌های *Sq2*، *Sq5* و *Sq6* هر یک دارای فراوانی ۱۱/۱ درصد بودند (شکل ۲).

به ترتیب قطعات ۵۵۰، ۵۸۰، ۶۰۰، ۶۵۰، ۷۰۰، ۷۵۰، ۸۰۰، ۸۵۰، ۹۰۰، ۹۵۰، ۱۰۰۰ و ۱۱۰۰ بازی به ترتیب *Sq2*، *Sq3*، *Sq4*، *Sq5*، *Sq6*، *Sq7*، *Sq8*، *Sq9*، *Sq10*، *Sq11*، *Sq12* و در نهایت *Sq13* نام‌گذاری شدند. نتایج نشان‌دهنده این بود که بیش‌ترین فراوانی



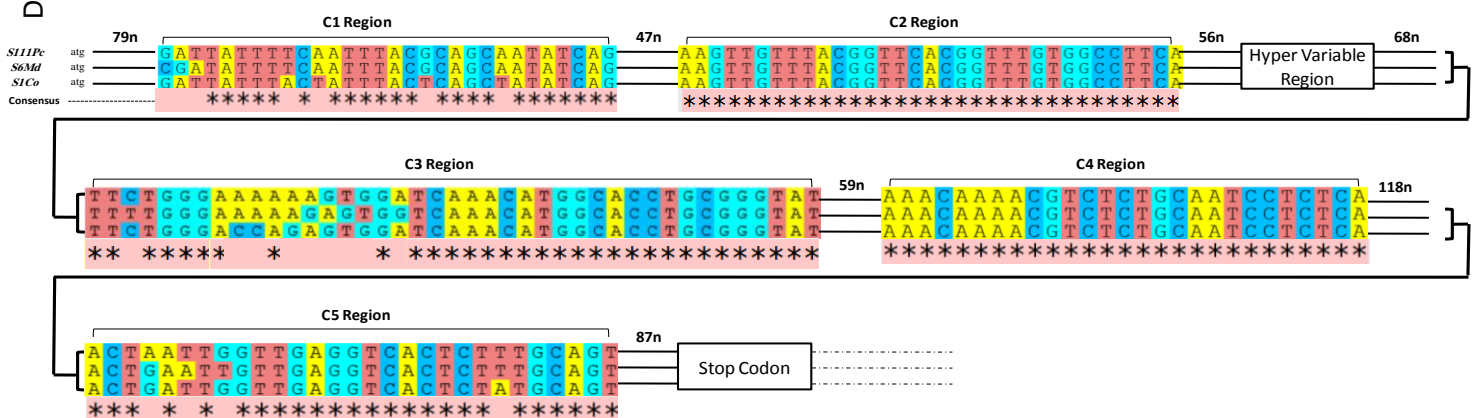
شکل ۱- الگوی تکثیری باندهای مکان ژنی خودناسازگاری در ارقام و ژنوتیپ‌های درخت به (*Cydonia oblonga* Mill.) با استفاده از آغازگرهای FB-F و FB-R2. الگوی باندهای به ترتیب متعلق به ژنوتیپ اصفهان اوقاف (۱)؛ AS1 (۲)؛ KVD2 (۳)؛ ترش (M1) (۴)؛ اردبیل ۴ (۵)؛ گردن‌دار (۶)؛ اردبیل ۵ (۷)؛ خسرو (۸)؛ NB4 (۹)؛ ساحل‌برج (۱۰)؛ حاج‌آقاکیشی (۱۱)؛ بارداک (۱۲)؛ بش‌اولدوز (۱۳)؛ به‌ترش آذربایجان (۱۴).



شکل ۲- درصد فراوانی آلل‌های مفروض تکثیری در ارقام، ژنوتیپ‌های به (*Cydonia oblonga* Mill.) و گونه‌های مرتبط شامل *Pseudocydonia sinensis*، *Chaenomeles japonica* و *Crataegus atrosanguinea* مورد بررسی بر اساس طول باند تکثیری.

جدول ۳- آل‌های تکثیری مربوط به مکان ژنی خودناسازگاری در ارقام و ژنوتیپ‌های درخت به (*Cydonia oblonga* Mill.) و شماری از گونه‌های نزدیک مشتمل بر به ژاپنی، به چینی و ولیک و هم‌چنین ژنوتیپ مفروض (Putative Genotype) مکان ژنی بر اساس الگوی بانندی حاصل از تکثیر مکان ژنی.

ردیف	ژنوتیپ	آل اول	آل دوم	ژنوتیپ مفروض	ردیف	ژنوتیپ	آل اول	آل دوم	ژنوتیپ مفروض	ردیف
۱	ET1	---	---	Undetermined	۲۹	ASP2	۷۵۰	۱۱۰۰	Sq7Sq13	۱
۲	KM1	۵۵۰	۷۰۰	Sq2 Sq6	۳۰	نامشخص	---	---	Sq2Sq2	۲
۳	Viduja	۵۵۰	۸۰۰	Sq2 Sq8	۳۱	Ardabil 1	---	---	؟؟؟	۳
۴	KVD2	۶۵۰	---	Sq5Sq5	۳۲	Ardabil 2	۵۸۰	---	Sq3Sq3	۴
۵	Esfahan	۶۵۰	---	Sq5Sq5	۳۳	Ardabil 3	---	---	؟؟؟	۵
۶	KVD4	۹۰۰	---	Sq10Sq10	۳۴	Ardabil 4	۵۰۰	۱۰۰۰	Sq1Sq12	۶
۷	NB2	۶۰۰	۱۱۰۰	Sq4Sq13	۳۵	Ardabil 5	۵۰۰	---	Sq1Sq1	۷
۸	NB4	۸۵۰	۱۱۰۰	Sq9Sq13	۳۶	Ardabil 6	---	---	؟؟؟	۸
۹	PH2	۷۰۰	---	Sq6 Sq6	۳۷	Ardabil 7	۶۰۰	---	Sq4Sq4	۹
۱۰	PK2	---	---	Undetermined	۳۸	Haj Agh Kishi	۸۰۰	۱۱۰۰	Sq8Sq13	۱۰
۱۱	SHA1	۷۰۰	---	Sq6 Sq6	۳۹	Amroudi Kosari	۷۰۰	---	Sq6Sq6	۱۱
۱۲	SVS1	۹۵۰	---	Sq11 Sq11	۴۰	LA1	۱۱۰۰	---	Sq13Sq13	۱۲
۱۳	SVS2	۶۵۰	---	Sq5Sq5	۴۱	LA3	۶۵۰	---	Sq5Sq5	۱۳
۱۴	Chimeh Kashan	۶۰۰	---	Sq4 Sq4	۴۲	Quince A	۱۱۰۰	---	Sq13Sq13	۱۴
۱۵	M1 (Torsh)	---	---	Undetermined	۴۳	Quince B	۱۱۰۰	---	Sq13Sq13	۱۵
۱۶	M2 (Moghavem 2)	۵۵۰	---	Sq2 Sq2	۴۴	Quince C	۸۵۰	---	Sq9Sq9	۱۶
۱۷	M3 (Esfahan Oghaf)	۸۰۰	۱۱۰۰	Sq8 Sq13	۴۵	Quince Adams	۹۵۰	---	Sq11Sq11	۱۷
۱۸	M4 (Moghavem 1)	۶۰۰	۱۱۰۰	Sq4 Sq13	۴۶	Quince PQBA29	۱۱۰۰	---	Sq13Sq13	۱۸
۱۹	M5 (Gardan Dar)	---	---	Undetermined	۴۷	Besh Olduz	۷۰۰	---	Sq7 Sq7	۱۹
۲۰	M6 Khosro)	---	---	Undetermined	۴۸	Rajabli 1	۹۵۰	---	Sq11Sq11	۲۰
۲۱	M7 (Sahel Borj)	---	---	Undetermined	۴۹	Darnak	۹۵۰	---	Sq11Sq11	۲۱
۲۲	M8 (Dizbad)	۵۵۰	---	Sq2 Sq2	۵۰	Bardak	۶۰۰	---	Sq4Sq4	۲۲
۲۳	AS1	۷۰۰	---	Sq6Sq6	۵۱	<i>Chanemoleles japonica</i> var. White	۶۵۰	---	Sq5Sq5	۲۳
۲۴	AS2	۶۰۰	---	Sq4 Sq4	۵۲	<i>Chaenomeles japonica</i> var. Pink	۵۵۰	---	Sq2Sq2	۲۴
۲۵	ASM1	۹۰۰	۱۱۰۰	Sq10 Sq13	۵۳	<i>Crataegus atrosanguinea</i>	۵۸۰	---	Sq3Sq3	۲۵
۲۶	ASM2	---	---	Undetermined	۵۴	<i>Pseudocydonia sinensis</i> (Chinese quince)	۶۰۰	---	Sq4Sq4	۲۶
۲۷	ASM3	۷۰۰	۹۰۰	Sq6Sq10	۵۵	Torsh Azarbaijan	۶۰۰	۸۰۰	Sq4Sq8	۲۷
۲۸	ASP1	۹۰۰	۱۱۰۰	Sq10 Sq13	۵۶					۲۸



شکل ۳- مقایسه ساختارهای نواحی حفاظت شده C1 تا C5 در آل خودناسازگاری *S1* گونه به (*Cydonia oblonga* Mill.) مشخص شده با کد *S1Co* و مقایسه توالی این نواحی با نزدیک‌ترین آل‌های موجود در بانک اطلاعاتی مشتمل بر آل خودناسازگاری *S111* (Ss) گلابی گونه *Pyrus communis* L. (*S111Pc*) و آل خودناسازگاری *S6* گونه سیب *Malus domestica* Borkh. (*S6Md*).

Cggttgtagcaaatatgatcccatctgctacgctacggaaaaattagaataattca → atg 78 b C1 Region

### Promoter region (from -57 to 0 base of start codon)

شکل ۴- آنالیز ناحیه پیشرانه‌ای آل S1 در رقم به ترش اصفهان (KM1) گونه به *Cydonia oblonga* Mill. در ناحیه صفر تا ۵۷- باز از کدون شروع. دو ناحیه caat و باکس با ناحیه فرمز مشخص شده است.

جدول ۴- مقایسه توالی پلی‌پپتیدی نواحی حفاظت شده پنج‌گانه C1 تا C5 مکان ژنی خودناسازگاری در اولین آل خودناسازگاری (S1) در گونه به *Cydonia oblonga* Mill. (S1Co) با شبیه‌ترین آل‌های خودناسازگاری شامل آل خودناسازگاری S6 گونه سیب *Malus domestica* Borkh. (S6Md) و آل Ss (S111) گونه گلابی *Pyrus communis* L. (S111Pc).

آل	ناحیه حفاظت شده C1	ناحیه حفاظت شده C2	ناحیه حفاظت شده C3	ناحیه حفاظت شده RC4	ناحیه حفاظت شده C5
S111Pc	DYFQFTQQYQ	KLFTVHGLWPS	FWEKSGSNMAPAG	KQNVSAILS	TNWLRSLFA
S6Md	RYFQFTQQYQ	KLFTVHGLWPS	FWEKEWSNMAPAG	KQNVSAILS	TELLRSLFA
S1Co	DYLLFTQLYQ	KLFTVHGLWPS	FWDQSGSNMAPAG	KQNVSAILS	TDWLRSLYA
Consensus	dYfQFTQqYQ	KLFTVHGLWPS	FWeKsgSNMAPAG	KQNVSAILS	T.wLRSLfa

گسترش کم‌تر کرده رقم یا ژنوتیپ سازگار از مناطق دورتر، سبب افت عملکرد و کاهش تولید شود. لذا در ادامه تحقیق اخیر لازم است به شناسایی دقیق آل‌های خودناسازگاری در ارقام و ژنوتیپ‌های این گونه پرداخته شود و ارتباط نوع آل با میزان شدت خودناسازگاری در بین ژنوتیپ‌ها به نحو روشن‌تری مورد بررسی قرار گیرد. هم‌چنین، به‌منظور تایید نهایی نقش این مکان ژنی در بروز خودناسازگاری یا خودسازگاری لازم است نتایج حاصل از بررسی‌های مولکولی، در بررسی باغی و با استفاده از گرده‌افشانی دستی شکوفه ارقام و ژنوتیپ‌ها ارزیابی شوند.

از سوی دیگر تجربه میدانی در رابطه با احداث باغ‌های به نشان داده است که استفاده از رقم متفاوت و سازگار سبب افزایش باروری باغ خواهد شد. هم‌چنین نتایج (2018) Tatari et al. نشان داد که تفاوت قابل توجهی بین میزان تشکیل میوه و تلقیح در صورت استفاده از ارقام متفاوت به‌عنوان رقم گرده‌زا روی رقم تجاری به اصفهان مشاهده می‌شود. این نتایج بیانگر وجود نوعی خودناسازگاری نسبی در ارقام و ژنوتیپ‌های به است که گرچه به‌صورت یک مانع جدی برای تشکیل میوه محسوب نمی‌شود، لیکن در برخی سال‌ها و در برخی شرایط به‌دلیل فعالیت کم‌تر زنبور و حیطة محدودتر پرواز حشرات گرده‌افشان، به‌دلیل

### منابع

Bell LR, Leitão JM. (2011) *Cydonia*. In: Kole C (Ed.) Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, Temperate Fruits. Springer-Verlag Press. Heidelberg, Germany 1-16.

Broothaerts W, Van Nerum I (2003). Apple self-incompatibility genotypes: an overview. *Acta Horticulturae* 622: 379-387.

Broothaerts W, Janssens GA, Proost P, Broekaert F (1995) cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. *Plant Molecular Biology* 27: 499-511.

Corpet F (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering *Nucleic Acids Research* 16: 10881-10890.

De Franceschi P, Dondini L, Sanzol J (2012) Molecular bases and evolutionary dynamics of self-incompatibility in the *Pyrinae* (*Rosaceae*). *Journal of Experimental Botany* 63:4015-4032.

De Nettancourt D (1977) Incompatibility in angiosperms. In: Frankel R, Gall GAE, Linskens HF (Eds.) *Monographs in Theoretical and Applied Genetics*, Vol 3. Springer, Berlin Heidelberg, New York, USA 1-27.

FAO (2018). *Statistical Year Book of Food and Agriculture Organization*. FAO, Rome, Italy.

Hauck RN, Yamane H, Tao R, Iezzoni AF (2002) Self-compatibility and incompatibility in tetraploid sour cherry (*Prunus cerasus* L.). *Sexual Plant Reproduction* 15: 39-46.

Jacobs JH, Clark SJ, Denholm I, Goulson D, Stoate C, Osborne JL (2009) Pollination biology of fruit-bearing hedgerow plants and the role of flower-visiting insects in fruit-set. *Annals of Botany* 104:1397-1404.

Khoramdel Azad M, Abdollahi H, Taeb M (2008) Optimization of DNA extraction from Iranian quince (*Cydonia oblonga* Mill.) genotypes. In: *The 2<sup>nd</sup> International Student Conference of Biotechnology*. University of Tehran, 5 (In Farsi).



- Khoramdel Azad M, Nassiri J, Abdollahi H (2013) Genetic diversity of selected Iranian quinces using SSRs from apples and pears. *Biochemical Genetics* 51: 426-442.
- Kleinjans HAW, van Keulen SJ, Blacquièrre T, Booij CJH, Hok-A-Hin CH, Cornelissen ACM, van Dooremalen JA (2012) The possible role of honey bees in the spread of pollen from field trials. *Plant Research International, Wageningen University & Research Centre, The Netherlands*. 87.
- Maliga P (1966) Birs termékenyülési vizsgálatok. *Szőlő-és Gyümölcstermesztés*. 1: 115-131.
- Nagy-Déri H, Orosz-Kovács Z, Farkas A (2013) Comparative studies on nectar from two self-fertile and two self-sterile cultivars of quince (*Cydonia oblonga* Mill.) and their attractiveness to honeybees. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 88: 776-782
- Nikzad Gharehaghaji A, Arzani K, Abdollahi H, Shojaeian A, Dondini L, De Franceschi P (2014) Genomic characterization of self-incompatibility ribonucleases in the Central Asian pear germplasm and introgression of new alleles from other species of the genus *Pyrus*. *Tree Genetics and Genomics* 10: 411-428.
- Nyéki J (1990) Birstermesztés. In: Gyuró F (Ed). *Gyümölcstermesztés*. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, Hungary 354-367.
- Nyéki J, Soltész M, Szabó Z (2003) Quince. In: Kozma P, Nyéki J, Soltész M, Szabó Z (Eds.) *Floral Biology, Pollination and Fertilisation in Temperate Zone Fruit Species and Grape*. Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary. 333-339.
- Sabeti H (1994) *Trees and Shrubs of Iran*. Yazd University Publication, Yazd, Iran. 810 pp. (In Farsi).
- Sanzol J (2009a) Genomic characterization of self-incompatibility ribonucleases (*S-RNases*) in European pear cultivars and development of PCR detection for 20 alleles. *Tree Genetics and Genomics* 5:393-405.
- Sanzol J (2009b) Pistil-function breakdown in a new *S*-allele of European pear, *S21*, confers self-compatibility. *Plant Cell Reports* 28: 457-467.
- Soltész M (1998) Birs. In: Soltész M (Ed.) *Gyümölcsfajta Ismeret és -Használat*. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, Hungary 187-195. (In Hungarian).
- Szabó T, Nyéki J, Soltész M, Szabó Z, Tóth T (1999) Time of flowering and fertilization of quince varieties. *International Journal of Horticultural Science* 5: 9-15.
- Tatari M, Abdollahi H, Mousavi A (2018) Effect of pollination on dropping of flowers and fruits in new quince (*Cydonia oblonga* Mill.) cultivar and promising genotypes. *Scientia Horticulturae* 231: 126-132.