

## شناسایی و تعیین ویژگی‌های ژنومی آلل‌های خودناسازگاری در گونه‌های وحشی گلابی

اعظم نیکزاد قره‌آغاجی<sup>۱\*</sup>، کاظم ارزانی<sup>۲\*\*</sup>، حمید عبداللهی<sup>۳</sup>،  
عبدالعلی شجاعیان<sup>۴</sup>، لوکا دوندینی<sup>۵</sup> و پاولو دفرانچسکی<sup>۶</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۶/۱۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۹/۱۱)

### چکیده

گونه‌های گلابی، سیستم خودناسازگاری گامتوفیتی نشان می‌دهند که به طور گسترده در میان گیاهان گل دار وجود دارد. این سیستم، از طریق مکانیزم شناسایی دانه گرده - مادگی از خودباروری جلوگیری می‌کند. تنوع آلل‌های خودناسازگاری یافته شده در ژنوتیپ‌های ایرانی نشان‌دهنده ردبای ترکیب ژنتیکی معنی دار گونه‌های دیگر است؛ بنابراین، ژرمپلاسم ایران به عنوان بهترین منبع تنوع برنامه‌های بهزیادی است. بدین منظور، در این مطالعه، آلل‌های خودناسازگاری ۶۴ ژنوتیپ از چهار گونه گلابی؛ *Pyrus salicifolia*, *Pyrus communis*, *Pyrus syriaca* و *Pyrus ussuriensis*، از ایران و اروپا با استفاده از آغازگرهای عمومی و اختصاصی به روش مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز شناسایی شد. نتایج، آلل خودناسازگاری شامل  $\text{PcS}_{101}$ - $\text{PcS}_{125}$  را مشخص کرد و وجود آلل جدید  $\text{PcS}_{127}$  در تعدادی از ژنوتیپ‌های وحشی گونه *P. communis* از ایران و همچنین حضور آلل  $\text{S}_8$  را در گونه *P. pyrifolia syn. P. serotina* از ایران و همچنین حضور آلل  $\text{S}_8$  را در گونه *P. pyrifolia syn. P. serotina* از ایرانی دارای ترکیب آللی متفاوتی از ارقام و ژنوتیپ‌های اروپایی است چرا که در ژنوتیپ‌های ایرانی ردبای آلل‌های خودناسازگاری گونه‌های مختلف جنس گلابی، یافته شده است. همچنین، کاربرد این روش در ۲۱ رقم با S - آلل‌های شناسایی شده، امکان شناسایی مجدد ترکیب آللی S - و ژنوتیپ‌های خودناسازگاری رقم وردی، با S - آلل‌های  $\text{PcS}_{101}$ / $\text{PcS}_{104}$  و رقم کونسیلر آلاکوثر با S - آلل‌های  $\text{PcS}_{103}$ / $\text{PcS}_{123}$ / $\text{PcS}_{105}$  را فراهم کرد.

واژه‌های کلیدی: گونه‌های گلابی، آلل‌های S، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، آلل‌های اختصاصی

۱ و ۴. بهترتب دانشجوی فارغ التحصیل دکتری، استاد و استادیار گروه علوم باگبانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳. دانشیار موسسه تحقیقات اصلاح و تهییه نهال و بذر، کرج، ایران

۵ و ۶. بهترتب استادیار و پسادکتری گروه علوم کشاورزی، دانشگاه بولونیا، بولونیا، ایتالیا

\*. مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: arzani\_k@modares.ac.ir

## مقدمه

ناحیه با تنوع بالا (RHV: Hyper-Variable Region) متمرکز شده‌اند؛ از طرف دیگر، مکانژنی - S دارای پنج ناحیه حفاظت شده عمومی (C1، C2، C3، C4 و C5) و یک ناحیه بسیار حفاظت شده هگزابیتیدی استاندارد (IIWPNW) است که دقیقاً پایین RHV قرار گرفته است که برای طراحی جفت آغازگر عمومی بهمنظور تکثیر ناحیه بزرگی از آلل‌ها به کار می‌رود (۲۲). آخرین گزارش برای تعیین آلل‌های خودناسازگاری گلابی‌های کشت شده توسط سانزول و روپیز انجام شد (۲۲ و ۲۳). این محققان روشی مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از آغازگرهای عمومی و اختصاصی را به‌منظور ثبت ژنومی آلل‌های خودناسازگاری در ارقام گلابی اروپایی به کار برداشتند. علاوه بر این، ولکو و همکاران، به‌دلیل پتانسیل معنی‌دار گلابی‌های وحشی به عنوان منبع ژن برای غنی کردن ویژگی‌های گونه‌های کشت شده، ویژگی‌های ژنومی آلل‌های خودناسازگاری هفت گلابی وحشی از گونه *P. pyraster* را بررسی کردند (۳۵) و گزارش نمودند که آلل‌های خودناسازگاری یافت شده در گونه *P. pyraster* دارای شباهت با آلل‌های S- گونه *P. communis* هستند اما یکسان نیستند و انتقال آنها از سال‌ها پیش اتفاق افتاده است. تنوع بالای آلل‌های S- ممکن است به‌دلیل میزان مهاجرت بالای آلل‌های S- جدید، ایجاد شده باشد. هرچند ایجاد موتاسیون در ترکیب توالی آلل‌های خودناسازگاری، که منجر به تنوع آللی می‌گردد، را نیز نباید از نظر دور داشت. از طرفی دیگر، در جمعیت‌های وحشی، مکانژنی - S موضوع اصلی انتخاب وابسته به کثرت است. به عبارتی دیگر، دانه گرده دربردارنده ویژگی نادری است که تغییرات جفت‌گیری را افزایش می‌دهد، زیرا تنها قسمت کوچکی از گیاهان آن را پذیرش نخواهند کرد؛ بنابراین، فراوانی این ویژگی را در طول نسل افزایش می‌دهد (۳۶). بر عکس، فراوانی ویژگی S به تدریج تمایل به کاهش شیوع آن در جمعیت دارد. اما، این نوع از انتخاب، باعث حفظ تعداد بالایی از هaplotype‌های S در جمعیت برای مدت زمان بسیار طولانی می‌شود. تجزیه آلل‌های خودناسازگاری در گونه‌های

گونه‌های گلابی متعلق به جنس گلابی، زیر طایفة Pyrinae، زیر خانواده Maloideae (Maloideae) از خانواده رزاسه (Rosaceae) است. گونه‌های گلابی دارای سیستم خودناسازگاری هستند که با سیستم گامتوفیتی تک فاکتوری هم‌ریخت کنترل می‌گردد. این سیستم، از طریق مکانیزم شناسایی دانه گرده - مادگی از خودباروری جلوگیری می‌کند. بنابراین، رشد لوله گرده خودی روی مادگی امکان‌پذیر نبوده و این در حالی است که لوله گرده غیرخودی و سازگار، داخل مادگی رشد کرده و به تخدمان می‌رسد (۵). ویژگی شناسایی خودی / غیر خودی به‌طور ژنتیک توسط تک مکانژنی - S (S-locus؛ در مادگی با چندین آلل که S-RNase نامیده می‌شود (۳) و چندین آلل در SFBB: S-locus F-Box Brother؛ کنترل می‌گردد، که به ترتیب، تعیین کننده فعالیت ماده و نر است. علاوه بر جلوگیری از خودباروری، ترکیب آللی در S-locus، دگرباروری بین ارقام را تعیین می‌کند؛ بنابراین دانش ثبت ژنومی آلل‌های خودناسازگاری یا ژنتوپ خودناسازگاری ارقام برای تضمین دگرگرده‌افشانی در انتخاب رقم گردهزا و ترکیب مناسب ارقام گلابی در باغ‌های گلابی و هم‌چنین انتخاب والدین برای برنامه‌های به‌نژادی بسیار مهم است.

سیستم خودناسازگاری در ارقام و ژنتوپ‌های گلابی موضوع مطالعات بسیاری است. اولین آلل خودناسازگاری خانواده وردسانان توسط ساسا و همکاران در گلابی ژاپنی شناسایی شد (۲۵)، ویژگی‌های بعدی آلل‌های خودناسازگاری در گلابی ژاپنی (۱۱، ۱۵، ۲۰ و ۲۴) و گلابی اروپایی (۱۰، ۱۹، ۲۱، ۲۲ و ۳۸) توسط همسانه‌سازی cDNA و توالی یابی ژنومی، ثبت ژنومی آلل‌های خودناسازگاری و برنامه‌های به‌نژادی را آسان‌تر کرد. مکانژنی - S، هتروآللی (۸ و ۳۱)، دارای چند شکل بالا و ویژه برای هر هaplotype می‌باشد که نشان دهنده تنوع کافی برای توسعه نشانگرهای مولکولی به‌منظور ثبت ژنومی آلل‌های خودناسازگاری است (۱۰). اکثر چند شکل‌ها در

(WANRC) و مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع (RIFR) در ایران و گروه علوم کشاورزی دانشگاه بولونیا - ایتالیا (DIPSA) و مرکز تحقیقات و تکنولوژی کشاورزی آرگون - اسپانیا (CITA)، جمع‌آوری شدند. برگ‌ها بعد از برداشت، در فریزر  $80^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد زیر صفر کاملاً فریز شدند و در دستگاه خشک‌کن انجمادی صفر کاملاً (HITO-SICC, Heto-Holten A/S, Denmark) خشک شدند.

#### استخراج DNA

برای استخراج DNA ژنومی، مقدار  $50\text{ میلی‌گرم}$  از برگ‌های خشک شده هر ژنوتیپ، با استفاده از دستگاه آسیاب مکانیکی (Mixer Mill MM 300, Retsch GmbH & Co. KG) کاملاً پودر شدند. DNA ژنومی با استفاده از روش CTAB تغییر یافته استخراج شدند ( $18^{\circ}\text{C}$ ). DNA های استخراج شده با استفاده (NanoDrop Technology, Rockland, DE) مورد ارزیابی کمیت و کیفیت قرار گرفتند. برای استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، نمونه‌های DNA با غلظت  $25\text{ نانوگرم}$  رقیق گردیدند.

#### توسعه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

واکش زنجیره‌ای پلی‌مراز در ابتدا با استفاده از جفت آغازگر عمومی؛ PycomC1F1(5'ATTTCAATTACGCAGCAATATCAGC3') و PycomC5R1(5'CTGCAAAGGACCTAACCAATTG3') تحت شرایط؛  $25\text{ نانوگرم}$  DNA ژنومی، بافر واکنش PCR (1X)،  $2\text{ میلی‌مولار}$  کلرید منزیم ( $1/8$  میکرولیتر)،  $0/6$  واحد Tag DNA (Applied biosystem, Amplitaq Gold DNA Polymerase پلی‌مراز) ( $1/10$  میکرولیتر)،  $0/2$  میلی‌مولار dNTPs ( $0/4$  میکرولیتر) و  $0/6$  میکرومولار از هر آغازگر ( $0/9$  میکرولیتر از هر آغازگر) تهیه شد و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Applied Biosystems 2720, USA) پلی‌مراز، تحت برنامه؛ یک‌چرخه در  $10^{\circ}\text{C}$  دقیقه -  $94^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد،  $25$  چرخه سه مرحله‌ای شامل  $30\text{ ثانیه}$  -  $94^{\circ}\text{C}$  درجه

Pyrinae به طور واضح، نشان دهنده تأثیر انتخاب وابسته به کثرت در آنها است (۳۳). هم‌چنین، تکامل نژادی (Phylogeny) آلل‌های خودناسازگاری گونه‌های Pyrinae مختلف، شواهدی از به اشتراک گذاشتن چند شکل‌های اجدادی را ارائه می‌دهد ( $2, 6$  و  $24^{\circ}\text{C}$ )، به این معنی که؛ یک آلل از یک گونه اغلب ارتباط نزدیکی با آلل‌های گونه‌ها یا جنس‌های دیگر دارد و این در حالی است که ارتباط نزدیکی با آلل‌های دیگر گونه‌های یکسان ندارد، این موضوع پیشنهاد دهنده تنوع مکان‌ژنی - S در زیرطایفه نسبت به زمان انشعاب جنس‌ها می‌باشد (۱۴). بنابراین احتمال دارد که بیشترین تنوع مولکولی مربوط به گسترش آلل‌های خودناسازگاری گونه‌های Pyrinae منشاء گرفته از اجداد مشترک باشد (۵).

ایران به دلیل قرارگیری در آسیای مرکزی و به عنوان کشوری روی جاده ابریشم، یکی از مناطق دورگ‌گیری P. korshinskyi, P. bretschneideri, P. communis و P. pyrifolia syn. P. serotina می‌باشد (۱۶). ایران یکی از مهم‌ترین مراکز اصلی تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم‌های گلابی است. به این دلیل، این مطالعه با هدف، ثبت ژنومی آلل‌های خودناسازگاری ۴۳ ژنوتیپ وحشی و  $22^{\circ}\text{C}$  رقم به عنوان کترل با استفاده از آلل‌های عمومی و اختصاصی بررسی گردید.

#### مواد و روش‌ها

##### مواد‌گیاهی

مواد‌گیاهی شامل  $43$  ژنوتیپ؛  $36$  ژنوتیپ از گونه P. communis از ایران و انگلستان، یک ژنوتیپ از گونه P. salicifolia از ژنوتیپ از گونه P. ussuriensis دو ژنوتیپ از گونه P. syriaca و  $21$  رقم از گونه P. communis (جدول ۱) در این پژوهش برای ثبت ژنومی آلل‌های PC<sub>S101</sub> تا PC<sub>S125</sub> مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های برگ‌های سالم از سرشارخه‌های جوان ارقام و ژنوتیپ‌های گلابی از کلکسیون‌های موسسه اصلاح نهال و بذر کرج - ایران (SPII)، مراکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گیلان (GANRC) و آذربایجان غربی

جدول ۱. ارقام و ژنوتیپ‌های مورد بررسی در این مطالعه

گونه	محل جمع آوری	نام رقم/ژنوتیپ	گونه	محل جمع آوری	نام رقم/ژنوتیپ
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	(Accession72) ۷۲	<i>P. communis</i>	Italy.DIPSA	وردی (Veerdi/Sweet Blush)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	(Accession73) ۷۳	<i>P. communis</i>	Italy.DIPSA	اوید (Ovid)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	(Accession74) ۷۴	<i>P. communis</i>	Italy.DIPSA	کونسیلر آلاکوئر (Conseiller a la Coeur)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	(Accession75) ۷۵	<i>P. communis</i>	Italy.DIPSA	ریمار رد (Reimer red)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	(Accession76) ۷۶	<i>P. communis</i>	Italy.DIPSA	دوینه دوکومیس (Doyenné du Comice)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	(Accession77) ۷۷	<i>P. communis</i>	Italy.DIPSA	آنگلس (Angelus)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	(Accession78) ۷۸	<i>P. communis</i>	Italy.DIPSA	بوره گیفارد (Beurré Giffard)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	(Accession79) ۷۹	<i>P. communis</i>	Italy.DIPSA	فرتیلیتی (Fertility)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	(Accession80) ۸۰	<i>P. communis</i>	Italy.DIPSA	کفرانس (Conference)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	(Accession81) ۸۱	<i>P. communis</i>	Spain.CITA	دلبارد پرمیر (Delbard première)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	(Accession82) ۸۲	<i>P. communis</i>	Italy.DIPSA	پرزیدنت هرون (President Heron)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	(Accession83) ۸۳	<i>P. communis</i>	Italy.DIPSA	ویلدر (Wilder)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	(Accession84) ۸۴	<i>P. communis</i>	Italy.DIPSA	بوره کلایر گو (Beurré Clairgeau)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	(Accession85) ۸۵	<i>P. communis</i>	Italy.DIPSA	اولدھوم (Old Home)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	(Accession86) ۸۶	<i>P. communis</i>	Spain.CITA	مونچالارد (Monchallard)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	(Accession87) ۸۷	<i>P. communis</i>	Italy.DIPSA	روزماری (Rosmarie)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	(Accession88) ۸۸	<i>P. communis</i>	Italy.DIPSA	بلا دی گیونیو (Bella di Giugno)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	(Accession89) ۸۹	<i>P. communis</i>	Italy.DIPSA	کفر (Kieffer)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	(Accession90) ۹۰	<i>P. communis</i>	Spain.CITA	دوینه دهیور (Doyenné d'hiver)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	(Accession91) ۹۱	<i>P. communis</i>	Spain.CITA	گرین سامر (Green Summer)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	(Accession92) ۹۲	<i>P. communis</i>	Iran.Kurdistan	سرمانیو (Ceremeño)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	(Accession93) ۹۳	<i>P. communis</i>	Iran.Kurdistan	ژنوتیپ ۳۹ (Accession39)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	(Accession94) ۹۴	<i>P. communis</i>	Iran.Kurdistan	ژنوتیپ ۴۰ (Accession40)
<i>P. communis</i>	UK.RIFR-Kew	(Accession95) ۹۵	<i>P. communis</i>	Iran.Kurdistan	ژنوتیپ ۴۱ (Accession41)
<i>P. salicifolia</i>	Iran.SPII	(Accession96) ۹۶	<i>P. communis</i>	Iran.Kurdistan	ژنوتیپ ۴۲ (Accession42)
<i>P. syriaca</i>	Iran.WANRC	(Accession97) ۹۷	<i>P. communis</i>	Iran.Kurdistan	ژنوتیپ ۴۳ (Accession43)
<i>P. syriaca</i>	Iran.WANRC	(Accession98) ۹۸	<i>P. communis</i>	Iran.Kurdistan	ژنوتیپ ۴۴ (Accession44)
<i>P. ussuriensis</i>	UK.RIFR-Kew	(Accession99) ۹۹	<i>P. communis</i>	Iran.Kurdistan	ژنوتیپ ۴۵ (Accession45)
<i>P. ussuriensis</i>	UK.RIFR-Kew	(Accession100) ۱۰۰	<i>P. communis</i>	Iran.Kurdistan	ژنوتیپ ۴۶ (Accession46)
<i>P. ussuriensis</i>	UK.RIFR-Kew	(Accession101) ۱۰۱	<i>P. communis</i>	Iran.WANRC	ژنوتیپ ۴۷ (Accession47)
<i>P. ussuriensis</i>	UK.RIFR-Kew	(Accession102) ۱۰۲	<i>P. communis</i>	Iran.WANRC	ژنوتیپ ۶۱ (Accession61)
			<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	ژنوتیپ ۶۲ (Accession62)
			<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	ژنوتیپ ۷۱ (Accession71)

آغازگرهای اختصاصی طراحی شده با نرم‌افزار Primer3 (http://primer3.wi.mit.edu/), در این مطالعه، برای تکثیر آل‌های *PcS<sub>125</sub>* تا *PcS<sub>101</sub>* انجام گرفت. هم‌چنین، برای شناسایی آل‌های خودناسازگاری در گلابی‌های ژاپنی از آغازگرهای اختصاصی

سانتی گراد، ۴۵ ثانیه - ۵۷ درجه سانتی گراد، ۲ دقیقه - ۷۲ درجه سانتی گراد، و در نهایت مرحله گسترش نهایی: ۷ دقیقه - ۷۲ درجه سانتی گراد، انجام گرفت. سپس شرایط واکنش و تکثیر با جفت آغازگرهای توصیف شده توسط سانزول (۲۲) به علاوه

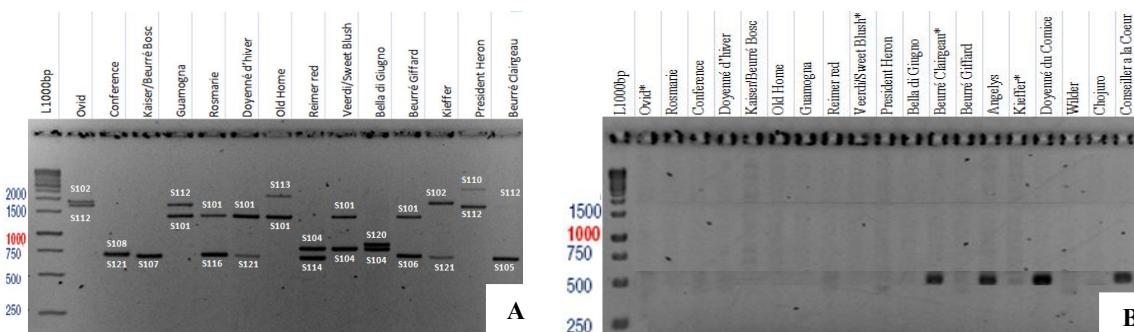
جدول ۲. نام و توالی آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده در این پژوهش

منابع	غلظت آغازگر ( $\mu\text{M}$ )	توالی ( $5' \rightarrow 3'$ )	نام آغازگر	S-RNase
( Sanzol, 2009)	0.3	AGAACATTTGATAATTAGGACCAT	B39S3F1 forward	PcS <sub>103</sub>
( Sanzol, 2009)		GGTTTCTTATAGTCGATACCTG	B40S3R1 reverse	
( Sanzol, 2009)	0.3	ACGGTATGTGGCCTCAAACAGCTC	A55S5F1 forward	PcS <sub>105</sub>
( Sanzol, 2009)		GATTGTCGTTCTGTATTGCGGGTCG	A57S5R2 reverse	
( Sanzol, 2009)	0.3	ATTTCAATTACGCAGCAATATCAGC	PycomC1F1 forward	PcS <sub>106</sub>
( Sanzol, 2009)		GCGTGTGTTCAATTTCGTC	PycomS6R reverse	
( Sanzol, 2009)	0.4	CGACCCGGAATTGCAAGATAAGG	A60S7F1 forward	PcS <sub>107</sub>
( Sanzol, 2009)		GGCATTTCATGTCACCAGCACT	A63S7R3 reverse	
( Sanzol, 2009)	0.3	CTTGTAACTGATCGTCTGAACAA	PycomS8F forward	
( Sanzol, 2009)		CCTCAACTAATTTCAGTCGTC	PycomS8R reverse	PcS <sub>108</sub>
( Sanzol, 2009)	0.4	TTTGAATGGACCTCACCTGC	B47S9F2 forward	
( Sanzol, 2009)		TATCTACCAGTGGCCTTTCAA	B48S9R3 reverse	
( Sanzol, 2009)	0.6	CAGAAAAATGTAAGACTACAGCTC	A68S11F1 forward	PcS <sub>111</sub>
( Sanzol, 2009)		TTGTCGGTCTCGGTGAATAGC	PycomS11R reverse	
( Sanzol, 2009)	0.3	GCTTGTAGTTAGTTAATGACAG	B41S12F1 forward	PcS <sub>112</sub>
( Sanzol, 2009)		GGTTCTTATCGTCGGTACACT	B51S12R3 reverse	
( Sanzol, 2009)	0.3	TGGTTGTGGCCTTCAGAGTC	B36S14F2 forward	PcS <sub>114</sub>
( Sanzol, 2009)		GTCGCTTATCATCGGTACTTGG	A71S14R4 reverse	
( Sanzol, 2009)	0.6	TGGCCTTCAAACGTGACTTATCC	A83SmF1 forward	PcS <sub>115</sub>
( Sanzol, 2009)		ATGTACATTGATAACAGTCCG	B37SmR2 reverse	
Designed in this study	0.4	GCCAGCTGTCGCAACTCC	PcS16 forward	PcS <sub>116</sub>
Designed in this study		GTCGTTCTTATTCGCGGATAC	PcS16 reverse	
( Sanzol, 2009)	0.3	TCACCCAGAAAATGACGGAC	B52S21F2 forward	PcS <sub>121</sub>
( Sanzol, 2009)		TTTGTTTCTTATTGTTGATGCTC	B53S21R2 reverse	
( Sanzol, 2009)	0.6	CACCGTAGGACCTGACCCGAGT	A84S22F1 forward	PcS <sub>122</sub>
( Sanzol, 2009)		CTAGAGACGTTTGTGTTCTGCAG	A89S22R1 reverse	
( Sanzol, 2009)	0.3	CAGCACAGGAAATGACCCAAGAT	A88S23F1 forward	PcS <sub>123</sub>
( Sanzol, 2009)		AATTCACTCTGAGTATAGT	B38S23R2 reverse	
( Sanzol, 2009)	0.6	TCTGTGGCCTTCAAACGGATACT	A85S24F1 forward	PcS <sub>124</sub>
( Sanzol, 2009)		GTTGGTACTAATGAGTATGGCAGC	A86S24F2 reverse	
( Sanzol, 2009)	0.4	ATTTCAATTACGCAGCAATATCAGC	PycomC1F1 forward	PcS <sub>125</sub>
Designed in this study		GATTGGTCTTACTCACGGT	PcS25 reverse	
Designed in this study	0.4	TCAAATTCTCCCCAGAAAC	PpS <sub>2</sub> forward	PpS <sub>2</sub>
Designed in this study		CGTCATCACACACACTTC	PpS <sub>2</sub> reverse	
Designed in this study	0.4	TCAACATAGATTTCATGCACAC	PpS <sub>3</sub> forward	PpS <sub>3</sub>
Designed in this study		GATATTGTTGGTGGGGCAAT	PpS <sub>3</sub> _5 reverse	
( Sanzol, 2009)	0.4	ATTTCAATTACGCAGCAATATCAGC	PycomC1F1 forward	PpS <sub>4</sub>
Designed in this study		TGCATGAAAATCATGTCGAGC	PpS <sub>4</sub> reverse	
Designed in this study	0.4	TCAACATAGATTTCATGCACGT	PpS <sub>5</sub> forward	PpS <sub>5</sub>
Designed in this study		GATATTGTTGGTGGGGCAAT	PpS <sub>5</sub> _5 reverse	
Designed in this study	0.6	GC GTGTGCAAATTACAAATTG	PpS <sub>6</sub> forward	PpS <sub>6</sub>
( Sanzol, 2009)		CTGCAAAGGACCTCAACCAATT	PycomC5R1 reverse	
Designed in this study	0.4	TCAACATCTTCGCGACTG	PpS <sub>8</sub> forward	PpS <sub>8</sub>
( Sanzol, 2009)		CTGCAAAGGACCTCAACCAATT	PycomC5R1 reverse	
Designed in this study	0.4	CTCAATCGAAGGGCAAATGT	PpS <sub>9</sub> forward	PpS <sub>9</sub>
Designed in this study	0.3	TTATTGGTGGGGCAGAAAAA	PpS <sub>9</sub> reverse	

پلی‌مراز حاصل از آغازگر عمومی با اندازه حدود ۷۰۰ - ۶۵۰ گفت باز تولید کردند. برای همسانه‌سازی، تعدادی از این محصول‌ها به طور مستقیم در pGEM-T Easy Vector System (Promega, Madison, WI, USA) و با استفاده از سلول‌های Escherichia coli DH5 $\alpha$  استفاده شد. محصول‌های واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز همسانه‌سازی شده، توسعه یافته‌ند و با آنزیم برشی MseI/Tru1I به منظور تمایز آلل‌های مختلف از محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز اولیه برش داده شدند. دو

طراحی شده برای آلل‌های PpS<sub>6</sub> و PpS<sub>8</sub> و PpS<sub>2</sub>-PpS<sub>9</sub> و استفاده گردید. در حالی‌که، برای شناسایی آلل‌های PpS<sub>1</sub> و PpS<sub>7</sub> به دلیل شباهت بالای توالی، به ترتیب، به آلل‌های PpS<sub>111</sub> و PpS<sub>116</sub> گلابی اروپایی، از جفت آغازگر عمومی و اختصاصی PpS<sub>116</sub> استفاده شد (جدول ۲).

همسانه‌سازی و توالی بایی  
اکثر آلل‌های خودناسازگاری، محصول واکنش زنجیره‌ای



شکل ۱. باندهای حاصل از تکثیر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز DNA ژنومی روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد

A: باندهای حاصل از تکثیر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ارقام اروپایی با استفاده از جفت آغازگرهای عمومی

B: باندهای حاصل از تکثیر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با جفت آغازگرهای اختصاصی *PcS<sub>105</sub>*

شد. توالی‌های اسید آمینه پیش‌بینی شده تمامی توالی‌های CDS با استفاده از Clustal W (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) هم‌تراز شدند. توالی‌های اسید آمینه برای ساخت درخت MEGA5 Software با استفاده از نرم‌افزار (http://www.megasoftware.net/)، از طریق روش Neighbor-Joining Tree تجزیه Poisson correction method به کار رفتند (۲۸).

## نتایج و بحث

تمامی ارقام و ژنوتیپ‌ها، ابتدا با یک جفت آغازگر عمومی و سپس با ۲۳ جفت آغازگر اختصاصی مورد آزمایش قرار گرفت؛ نتایج تکثیر با استفاده از آغازگرهای عمومی و اختصاصی در جدول ۳ خلاصه شده است. برای اکثر ژنوتیپ‌ها دو آلل شناسایی شد (شکل ۱)، در حالی‌که برای رقم کونسیلر آلکوئر و ژنوتیپ ۸۷ سه آلل شناسایی شد که تری‌پلوئیدی را نشان می‌دهد. برای ۱۱ ژنوتیپ فقط یک آلل شناسایی شد. روش توالی‌یابی برای آلل‌های ژنوتیپ‌های انجام شده، حضور آلل‌های جدید در اکثر ژنوتیپ‌های ایران را تأیید کرد. تکثیر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با آغازگرهای عمومی برای نه ژنوتیپ؛ ۳۹، ۴۳، ۴۷، ۷۸، ۸۱، ۸۴، ۸۶، ۹۳ و ۹۴ تولید قطعه‌ای با اندازه تقریبی ۷۶۰ جفت باز کرد، که از اندازه موردنظر برای آلل

پلاسمید با الگوی برشی متفاوت از هر ژنوتیپ برای توالی‌یابی انتخاب شدند. برای توالی‌یابی، قطعه وارد شده با استفاده از آغازگرهای M13 – پیش‌رو و SP6 – پس‌رو انجام گرفت و محصول‌های تکثیر یافته با استفاده از ExoSAP-IT<sup>TM</sup> محصول خالص‌سازی شده با MegabACE 1000 capillary sequencer (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) استفاده از دستگاه است. جهت پیش‌رو و پس‌رو توالی‌یابی شدند. هم‌چنین، تعدادی از آلل‌ها، که محصول‌هایی با اندازه بیشتر از ۱۰۰۰ باز تولید کردند، بر روی ژل آگاروز ۱/۲ درصد الکتروفوروز شدند و باندهای برش یافته از روی ژل آگاروز با استفاده (Sigma-Aldrich) GenElute<sup>TM</sup> Gel Extraction Kit از خالص‌سازی شدند و با جفت آغازگر عمومی در دو جهت پیش‌رو و پس‌رو توالی‌یابی شدند. توالی‌ها با استفاده از FinchTV (www.geospiza.com) ویرایش شدند، برای هر آلل، کل توالی با استفاده از هم‌ردیف کردن توالی‌های پیش‌رو و پس‌رو با نرم‌افزار Lalign (http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN\_form.htm) (۱) و ApE (www.ape-a-plasmid-editor) (۲) به دست آمد. توالی‌های CDS با مقایسه توالی‌های S-RNase Pyrinae موجود در NCBI بعد از هم‌ردیفی (BLAST) توالی‌ها (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) تعیین

جدول ۳. اندازه و ترکیب آلل خودناسازگاری ژنتیپ‌های وحشی کلابی ایران با استفاده از آغازکرهاي عمومي و اختصاصي

رقم و ژنتیپ	ارقام کنترل	اندازه باند (bp) - عمومي PCR	اندازه باند PCR - اختصاصي	ژنتیپ خودناسازگاري S-genotype
وردي	PcS <sub>101</sub> PcS <sub>104</sub>	PcS <sub>104</sub>	PcS <sub>101</sub>	750/1,300
اويد	PcS <sub>102</sub> PcS <sub>112</sub>	PcS <sub>112</sub>	PcS <sub>102</sub>	1,600/1,700
کونسیلر آلاکوئر	PcS <sub>103</sub> PcS <sub>125</sub> PcS <sub>105</sub>	PcS <sub>105</sub>	PcS <sub>123</sub>	650/ 650/1,600
ریمار رد	PcS <sub>104</sub> PcS <sub>114</sub>	PcS <sub>114</sub>	PcS <sub>104</sub>	650/750
دوینه دو کومیس	PcS <sub>104</sub> PcS <sub>105</sub>	PcS <sub>105</sub>	PcS <sub>104</sub>	650/750
آنگلس	PcS <sub>105</sub> PcS <sub>121</sub>	PcS <sub>121</sub>	PcS <sub>105</sub>	650/650
بوره گیفارد	PcS <sub>101</sub> PcS <sub>106</sub>	PcS <sub>106</sub>	PcS <sub>101</sub>	670/1,300
فرتیلیتی	PcS <sub>107</sub> PcS <sub>112</sub>	PcS <sub>112</sub>	PcS <sub>107</sub>	650/1,600
کنفرانس	PcS <sub>108</sub> PcS <sub>121</sub>	PcS <sub>121</sub>	PcS <sub>108</sub>	650/675
دلبارد پرمیر	PcS <sub>101</sub> PcS <sub>109</sub>	PcS <sub>109</sub>	PcS <sub>101</sub>	650/1,300
پرزیدنت هرون	PcS <sub>110</sub> PcS <sub>112</sub>	PcS <sub>112</sub>	PcS <sub>110</sub>	1,600/2,200
ویلدر	PcS <sub>101</sub> PcS <sub>111</sub>	PcS <sub>111</sub>	PcS <sub>101</sub>	675/1,300
بوره کلابر گو	PcS <sub>105</sub> PcS <sub>112</sub>	PcS <sub>112</sub>	PcS <sub>105</sub>	650/1,600
اولدھوم	PcS <sub>101</sub> PcS <sub>113</sub>	PcS <sub>113</sub>	PcS <sub>101</sub>	1,300/1,900
مونچالارد	PcS <sub>104</sub> PcS <sub>115</sub>	PcS <sub>115</sub>	PcS <sub>104</sub>	650/750
روزماری	PcS <sub>101</sub> PcS <sub>116</sub>	PcS <sub>116</sub>	PcS <sub>101</sub>	670/1,300
بلا دي گيونيو	PcS <sub>104</sub> PcS <sub>120</sub>	PcS <sub>120</sub>	PcS <sub>104</sub>	750/800
کیفر	PcS <sub>102</sub> PcS <sub>121</sub>	PcS <sub>121</sub>	PcS <sub>102</sub>	650/1,700
دوینه دھیور	PcS <sub>101</sub> PcS <sub>121</sub>	PcS <sub>121</sub>	PcS <sub>101</sub>	650/1,300
گرین سامر	PcS <sub>122</sub> PcS <sub>124</sub>	PcS <sub>124</sub>	PcS <sub>122</sub>	650/675
سرمانیو	PcS <sub>121</sub> *PcS <sub>125</sub>	PcS <sub>125</sub>	PcS <sub>121</sub> *	1200/>2,000
ژنتیپ‌های ایرانی				
۳۹	PcS <sub>104</sub> Pcs <sub>127</sub>	PcS <sub>127</sub>	PcS <sub>104</sub>	750/760
۴۰	PcS <sub>116</sub>	-	PcS <sub>116</sub>	670
۴۱	PcS <sub>115</sub>	-	PcS <sub>115</sub>	650
۴۲	PcS <sub>104</sub>	-	PcS <sub>104</sub>	700/750
۴۳	PcS <sub>104</sub> Pcs <sub>127</sub>	PcS <sub>127</sub>	PcS <sub>104</sub>	750/760
۴۴	PcS <sub>121</sub>	-	PcS <sub>121</sub>	650
۴۵	PcS <sub>103</sub> PcS <sub>122</sub>	PcS <sub>122</sub>	PcS <sub>103</sub>	675/1,600
۴۶	PcS <sub>122</sub>	-	PcS <sub>122</sub>	675
۴۷	PcS <sub>104</sub> Pcs <sub>127</sub>	PcS <sub>127</sub>	PcS <sub>104</sub>	750/760
۶۱	PcS <sub>104</sub> PcS <sub>115</sub>	PcS <sub>115</sub>	PcS <sub>104</sub>	650/750
۶۲	PcS <sub>124</sub>	-	PcS <sub>124</sub>	650
۷۱	PcS <sub>124</sub> PpS <sub>8</sub>	PpS <sub>8</sub>	PcS <sub>124</sub>	650/750
۷۲	PcS <sub>113</sub> PcS <sub>121</sub>	PcS <sub>121</sub>	PcS <sub>113</sub>	650/1,900
۷۳	PcS <sub>122</sub> PcS <sub>124</sub>	PcS <sub>124</sub>	PcS <sub>122</sub>	650/675
۷۴	PcS <sub>104</sub> PcS <sub>124</sub>	PcS <sub>124</sub>	PcS <sub>104</sub>	650/750
۷۵	PcS <sub>124</sub> PpS <sub>8</sub>	PpS <sub>8</sub>	PcS <sub>124</sub>	650/750

## ادامه جدول ۳

PcS <sub>108</sub> PcS <sub>121</sub>	PcS <sub>121</sub>	PcS <sub>108</sub>	650/675	۷۶ ژنوتیپ
PcS <sub>107</sub> PcS <sub>124</sub>	PcS <sub>124</sub>	PcS <sub>107</sub>	650/650	۷۷ ژنوتیپ
PpS <sub>8</sub> PcS <sub>127</sub>	PcS <sub>127</sub>	PpS <sub>8</sub>	650/760	۷۸ ژنوتیپ
PcS <sub>104</sub> PcS <sub>108</sub>	PcS <sub>108</sub>	PcS <sub>104</sub>	675/750	۷۹ ژنوتیپ
PcS <sub>108</sub> PcS <sub>124</sub>	PcS <sub>124</sub>	PcS <sub>108</sub>	650/675	۸۰ ژنوتیپ
PpS <sub>8</sub> PcS <sub>127</sub>	PcS <sub>127</sub>	PpS <sub>8</sub>	750/760	۸۱ ژنوتیپ
PcS <sub>122</sub> PcS <sub>124</sub>	PcS <sub>124</sub>	PcS <sub>122</sub>	650/675	۸۲ ژنوتیپ
PcS <sub>101</sub> PcS <sub>108</sub>	PcS <sub>108</sub>	PcS <sub>101</sub>	675/1300	۸۳ ژنوتیپ
PpS <sub>8</sub> PcS <sub>127</sub>	PcS <sub>127</sub>	PpS <sub>8</sub>	750/760	۸۴ ژنوتیپ
PcS <sub>105</sub> PcS <sub>124</sub>	PcS <sub>124</sub>	PcS <sub>105</sub>	650/650	۸۵ ژنوتیپ
PcS <sub>102</sub> PcS <sub>122</sub>	PcS <sub>102</sub>	PcS <sub>122</sub>	675/1700	۸۶ ژنوتیپ
PcS <sub>105</sub> PcS <sub>122</sub> PcS <sub>124</sub>	PcS <sub>124</sub>	PcS <sub>105</sub>	650/650/675	۸۷ ژنوتیپ
PpS <sub>8</sub> PcS <sub>127</sub>	PcS <sub>127</sub>	PpS <sub>8</sub>	750/760	۸۸ ژنوتیپ
PcS <sub>102</sub> PcS <sub>108</sub>	PcS <sub>102</sub>	PcS <sub>108</sub>	675/1,700	۸۹ ژنوتیپ
PcS <sub>128</sub> PcS <sub>102</sub>	PcS <sub>102</sub>	PcS <sub>128</sub>	650/1,700	۹۰ ژنوتیپ
PcS <sub>105</sub> PcS <sub>121</sub>	PcS <sub>121</sub>	PcS <sub>105</sub>	650/650	۹۱ ژنوتیپ
PcS <sub>101</sub> PcS <sub>102</sub>	PcS <sub>102</sub>	PcS <sub>101</sub>	1300/1700	۹۲ ژنوتیپ
PpS <sub>8</sub> PcS <sub>127</sub>	PcS <sub>127</sub>	PpS <sub>8</sub>	750/760	۹۳ ژنوتیپ
PpS <sub>8</sub> PcS <sub>127</sub>	PcS <sub>127</sub>	PpS <sub>8</sub>	750/760	۹۴ ژنوتیپ
PcS <sub>106</sub> PcS <sub>121</sub>	PcS <sub>121</sub>	PcS <sub>106</sub>	650/670	۹۵ ژنوتیپ
PcS <sub>120</sub> PcS <sub>125</sub>	PcS <sub>125</sub>	PcS <sub>120</sub>	800/>2,000	۹۶ ژنوتیپ
PsS <sub>5</sub>	-	PsS <sub>5</sub>	650	۹۷ ژنوتیپ
PsS <sub>3</sub>	-	PsS <sub>3</sub>	650	۹۸ ژنوتیپ
PuS <sub>30</sub>	-	PuS <sub>30</sub>	650	۹۹ ژنوتیپ
PuS <sub>30</sub>	-	PuS <sub>30</sub>	650	۱۰۰ ژنوتیپ
PuS <sub>37</sub> PuS <sub>40</sub>	PuS <sub>40</sub>	PuS <sub>37</sub>	650/675	۱۰۱ ژنوتیپ
PuS <sub>30</sub>	-	PuS <sub>30</sub>	650	۱۰۲ ژنوتیپ

[ DOR: 20.1001.1.22518517.1394.5.17.19.2 ] [ DOI: 10.18869/acadpub.jcpp.5.17.239 ]

و ژنوتیپ‌های دیگر؛ ۷۱، ۷۵ قطعه‌ای با اندازه ۹۴، ۹۳، ۸۸، ۸۴ تقریبی ۷۵۰ جفت باز با محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با آغازگرهای عمومی نشان داد، که توالی یابی آن تطابق کامل آلل را با آلل PsS<sub>8</sub> (Acc. AB104908.1) اثبات کرد. تجزیه آلل جدید، پنج ناحیه عمومی حفاظت شده (C1، C2، C3، RC4 و C5) و یک ناحیه بسیار متغیر (RHV) مخصوص Pyrinae-RNase‌های Dr پایگاه اطلاعاتی Genbank با شماره الحاقی KF588568 در پایگاه اطلاعاتی Genbank ثبت شد. دانش ثبت ژنومی آلل‌های خودناسازگاری برای بهنژادگران و پرورش دهنده‌گان ارقام

۷۵۴ (جفت باز) بزرگ‌تر بود. این آلل از دو ژنوتیپ ۴۷ و ۷۸ توالی یابی شد و پیشنهاد شد که با نام آلل S<sub>127</sub> نام‌گذاری شود. این آلل تقریباً با آلل S<sub>19</sub> از EF643638؛ PbS<sub>19</sub> یکسان بود (Acc. EF643638؛ PbS<sub>19</sub>). اما از PbS<sub>19</sub> توسط جایگزینی تک نوکلئوتید در اگزون دوم تفاوت داشت، که تغییری در کدون ایجاد نمی‌کرد؛ در سطح اسید آمینه، آلل جدید ۱۰۰ درصد تطابق با PbS<sub>19</sub> داشت. نزدیکترین آلل از P. pyrifolia syn. P. serotina (Acc. Ab426604) بود که ۹۵ درصد تطابق در سطح اسید آمینه نشان داد. آلل - S دوم تعدادی از این ژنوتیپ‌ها؛ ۸۱، ۷۸

	Signal peptide	C1	C2	HVR	C3
PcS101_AB236428	MGITGMIVMTMVAFLSILVLILSSSTMGYDVFQFTQQYQPAACNSNPTECPKDPTEKLFVGLWPSNSNGDPVNPCKPTKVPQAQPIDEKSLKPQELEIIPNPNVNFRADNESEFWNKQWDKH	120			
PcS102_AB236425	MGITGMIVMTMVFSLIVLILSSSAKYDYLFQFTQQYQPAACKFHTPCKPDLKLFVHGWLWPSNFNGDPENCKVK---PTASQTIDTSLKPKOLEIIPNPNVNFRADHESEFWOKQWDKH	117			
PcS103_AB236432	MGITGMIVMTMVFSLIVLILSSSAVAKDFYQFTQQYQPAVCNSNPTECPKDPDKLFTVHGWLWPSNVNGDPKCKCAT---ILNEQTIT-DLKQALEIIPNPNVLNRKAHVREWKRQWRKH	116			
PcS104_AB236429	-MGTGMIVMTMVFSLIVLILSSSTVGFDFQFTQQYQPAVCNSNPTECPKDPDKLFTVHGWLWPSDNNGDPKCYKAP---PYQT--MKILEPHHLVIIPNPNLNRNDEHEFWRKQWRKH	113			
PcS105_AB236430	MGITGMIVMTMVFLLIVLILPSPTVGDXFQFTQQYQLVAVCHFNPTCCKDPDKLFTVHGWLWPSNSTGNDDPMYCCKNT---TLNSTKLA-NLTQALEIIPNPNVLRLTDHIEFWKNKWNKH	116			
PcS106_AB258361	MGITGMIVMTMVFLLIVLILPSPTVGDXFQFTQQYQPAVCNSRPTPCCKDPDKLFTVHGWLWPSNLNGHPHENCTNA---TVNSHRIKNIQAOQLIIPNPNVLRLRTNHGEFWNKQWNKH	116			
PcS107_AB236431	MGITGMIVMTMVFLLIVLILPSPTVGDXFQFTQQYQPAVCNSRPTPCCKDPDKLFTVHGWLWPSNLNGHPHENCTNA---TVNSHRIKNIQAOQLIIPNPNVLRLRTNHGEFWNKQWNKH	115			
PcS108_AB236427	MGITGMIVMTMVFSLIVLILSSSTMGYDVFQFTQQYQPAVCNSNPTECPKDPDKLFTVHGWLWPSNKGFDPKCKNIR--QMNSQRIG-NAAAQLEIIPNPNVLRLRTDHGVFWEREWLKH	116			
PcS109_AB258364	MGITGMIVMTMVFSLIVLILSSSTMGYDVFQFTQQYQPAVCNSNPTECPKDPDKLFTVHGWLWPSNLNGHPHENCTNA---TVNSHRIKNIQAOQLIIPNPNVLRLRTNHGEFWNKQWNKH	116			
PcS110_AB258360	MGITGMIVMTMVFSLIVLILSSSTMGYDVFQFTQQYQPAVCNSRPTPCCKDPDKLFTVHGWLWPSDNNGDPFCKT---TLDSVTKIG-NLQAOQLDIIIPNPNVYDRNNVNGFWWSKQWAKH	116			
PcS111_AB258365	MGITGMIVMTMVFLLIVLILPSPTVGDXFQFTQQYQPAVCNSRPTPCCKDPDKLFTVHGWLWPSLNNGDPFCKT---ILKLPRTIR-NLKAQLEIIPNPNVLRLRTNHGEFWNKQWNKH	116			
PcS112_AB236424	MGITGMIVMTMVFLLIVLILPSPTVGDXFQFTQQYQPAVCNSRPTPCCKDPDKLFTVHGWLWPSLNNGDPFCKT---ILKLPRTIR-NLKAQLEIIPNPNVLRLRTNHGEFWNKQWNKH	116			
PcS113_AB258366	MGITGMIVMTMVFLLIVLILPSPTVGDXFQFTQQYQPAVCNSRPTPCCKDPDKLFTVHGWLWPSLNNGDPFCKT---ILKLPRTIR-NLKAQLEIIPNPNVLRLRTNHGEFWNKQWNKH	117			
PcS114_AB258359	MGITGMIVMTMVFLLIVLILPSPTVGDXFQFTQQYQPAVCNSRPTPCCKDPDKLFTVHGWLWPSLNNGDPFCKT---PVQSQTIT-DLKQALEIIPNPNVLRLRTNHGEFWNKQWNKH	116			
PcS115_AB258362	MGITGMIVMTMVFLLIVLILPSPTVGDXFQFTQQYQPAVCNSRPTPCCKDPDKLFTVHGWLWPSLNNGDPFCKT---TITFOOGI-HIAQLEIIPNPNVLRLRTNHGEFWNKQWNKH	116			
PcS116_AB258363	MGITGMIVMTMVFLLIVLILPSPTVGDXFQFTQQYQPAVCNSRPTPCCKDPDKLFTVHGWLWPSLNNGDPFCKT---TITFOOGI-HIAQLEIIPNPNVLRLRTNHGEFWNKQWNKH	116			
PcS117_AY261994	--ETQQYQPAVCNSNPTECPKDPDKLFTVHGWLWPSLNNGDPFCKT---AVCNFTPTCPKDPDKLFTVHGWLWPSLNNGDPFCKT---KQYQ-MOILEPOLEIIPNPNVYDRNTEHEFWRKQWRKH	84			
PcS120_EU118758	--AVCNFTPTCPKDPDKLFTVHGWLWPSLNNGDPFCKT---AVCNFTPTCPKDPDKLFTVHGWLWPSLNNGDPFCKT---AVCNFTPTCPKDPDKLFTVHGWLWPSLNNGDPFCKT---	75			
PcS121_EU477839	MGITGMIVHITMVFSLIVLILSSSTMGYDVFQFTQQYQPAVCNSRPTPCCKDPDKLFTVHGWLWPSLNNGDPFCKT---TITFOOGI-HIAQLEIIPNPNVLRLRTNHGEFWNKQWNKH	116			
PcS122_EU118760	--AVCNFTPTCPKDPDKLFTVHGWLWPSLNNGDPFCKT---AVCNFTPTCPKDPDKLFTVHGWLWPSLNNGDPFCKT---AVCNFTPTCPKDPDKLFTVHGWLWPSLNNGDPFCKT---	76			
PcS123_EU118761	--AACNSNPTECPKDPDKLFTVHGWLWPSLNNGDPFCKT---AVCNFTPTCPKDPDKLFTVHGWLWPSLNNGDPFCKT---AACNSNPTECPKDPDKLFTVHGWLWPSLNNGDPFCKT---	77			
PcS124_EU118762	--AVCNFTPTCPKDPDKLFTVHGWLWPSLNNGDPFCKT---AVCNFTPTCPKDPDKLFTVHGWLWPSLNNGDPFCKT---AVCNFTPTCPKDPDKLFTVHGWLWPSLNNGDPFCKT---	76			
PcS125_EU855799	--AVCNFTPTCPKDPDKLFTVHGWLWPSLNNGDPFCKT---AVCNFTPTCPKDPDKLFTVHGWLWPSLNNGDPFCKT---AVCNFTPTCPKDPDKLFTVHGWLWPSLNNGDPFCKT---	75			
PcS127					

## RC4

PcS101_AB236428	GTCGYPTIKDKNHYLQTIVKMYITQKQNVSIQLSKANINPDGIGRTRKLIENIAIRNGTNDEKEPLKLCQK--NNGTIELVEVS--LCSNYLGHFIFCPNPKIPOQGSRYFCPIKDIQY	232
PcS102_AB236425	GTGCGSP11DKDNYHPTQVIRMAYTICKNQVSYISYLSKANINPDGKGTRRKTQKQIATRNSNDTNCNPKLKCQ-TKGNTIELVEVS--LCSNYLGHFNFICCPNPKTGPKTRYSCPTNDIHY	229
PcS103_AB236432	GACGYPTIADMMHYFYSTVEMIYTICKNQVSEISLSKANIKPEGRFRTRDVINAIASPDYIJKPKLCKC1-NNQTTVEVEG--LCSDSNNLTQFICNPFFPGSPYFCPTNNIQY	228
PcS104_AB236429	GSCASSPPIQNQTHYFPTVEMIYTICKNQVSEISLSKANIKPEGRFRTRDVINAIASPDYIJKPKLCKC1-NNQTTVEVEG--LCSDSNNLTQFICNPFFPGSPYFCPTNNIQY	226
PcS105_AB236430	GSCGRPA1QNDMHYLQITKQNVSEISLSKAKIEPVGFRFTQKEIEKARLGKNNKEPLKLCQ-R-NTQGTEVEVET--LCSDRNLKQFIDCPRPLINLGSRYYFCPTNNILY	228
PcS106_AB258361	GSCGNPMPNDTHYFPTVEMIYTICKNQVSEISLSKAKIEPVGFRFTQKEIEKARLGKNNKEPLKLCQ-R-NTQGTEVEVET--LCSDRNLKQFIDCPRPLINLGSRYYFCPTNNILY	227
PcS107_AB236431	GACGYPTIIONENDYFETVIMKYM1TCKQNVSIQLSKAKIEPDKGSRA1DVIENAIRNGTNKLPLKLCQ-KTRVTEVEIT--LCSDRNLKQFIDCPNPFPLGSPYLCPPNSIHY	227
PcS108_AB236427	GTCGYPTIDDMHMLYFPTVEMIYTICKNQVSEISLSKAKIEPVGFRFTQKEIEKARLGKNNKEPLKLCQ-KTRVTEVEIT--LCSDRNLKQFIDCPNPFPLGSPYLCPPNSIHY	227
PcS109_AB258362	GTCGYPTIDDMHMLYFPTVEMIYTICKNQVSEISLSKAKIEPVGFRFTQKEIEKARLGKNNKEPLKLCQ-KTRVTEVEIT--LCSDRNLKQFIDCPNPFPLGSPYLCPPNSIHY	227
PcS110_AB258364	GACGYPTIADMMHYFPTVEMIYTICKNQVSEISLSKAKIEPVGFRFTQKEIEKARLGKNNKEPLKLCQ-KTRVTEVEIT--LCSDRNLKQFIDCPNPFPLGSPYLCPPNSIHY	228
PcS111_AB258365	GTCGYPTIDDMHMLYFPTVEMIYTICKNQVSEISLSKAKIEPVGFRFTQKEIEKARLGKNNKEPLKLCQ-KTRVTEVEIT--LCSDRNLKQFIDCPNPFPLGSPYLCPPNSIHY	228
PcS112_AB236424	GTCGYPTIDDMHMLYFPTVEMIYTICKNQVSEISLSKAKIEPVGFRFTQKEIEKARLGKNNKEPLKLCQ-KTRVTEVEIT--LCSDRNLKQFIDCPNPFPLGSPYLCPPNSIHY	228
PcS113_AB258366	GTCGYPTIADMMHYFPTVEMIYTICKNQVSEISLSKAKIEPVGFRFTQKEIEKARLGKNNKEPLKLCQ-KTRVTEVEIT--LCSDRNLKQFIDCPNPFPLGSPYLCPPNSIHY	229
PcS114_AB258359	GTCGYPTIADMMHYFPTVEMIYTICKNQVSEISLSKAKIEPVGFRFTQKEIEKARLGKNNKEPLKLCQ-KTRVTEVEIT--LCSDRNLKQFIDCPNPFPLGSPYLCPPNSIHY	228
PcS115_AB258362	GCCGYTTINDEQYFETVIMKYM1TCKQNVSIQLSKAKIEPVGFRFTQKEIEKARLGKNNKEPLKLCQ-KTRVTEVEIT--LCSDRNLKQFIDCPNPFPLGSPYLCPPNSIHY	228
PcS116_AB258363	GSCGYTA1QNDMHYLQITKQNVSIQLSKAKIEPVGFRFTQKEIEKARLGKNNKEPLKLCQ-KTRVTEVEIT--LCSDRNLKQFIDCPNPFPLGSPYLCPPNSIHY	226
PcS117_AY261994	GACGYPTIADMMHYFPTVEMIYTICKNQVSEISLSKAKIEPVGFRFTQKEIEKARLGKNNKEPLKLCQ-KTRVTEVEIT--LCSDRNLKQFIDCPNPFPLGSPYLCPPNSIHY	179
PcS120_EU118758	GSCASLP1QNQTHYFPTVEMIYTICKNQVSEISLSKAKIEPVGFRFTQKEIEKARLGKNNKEPLKLCQ-KTRVTEVEIT--LCSDRNLKQFIDCPNPFPLGSPYLCPPNSIHY	148
PcS121_EU477839	GSCGNPMPNDTHYFPTVEMIYTICKNQVSEISLSKAKIEPVGFRFTQKEIEKARLGKNNKEPLKLCQ-KTRVTEVEIT--LCSDRNLKQFIDCPNPFPLGSPYLCPPNSIHY	227
PcS122_EU118760	GTCGYPTIDNEHNYFETVIMKYM1TCKQNVSIQLSKAKIEPVGFRFTQKEIEKARLGKNNKEPLKLCQ-KTRVTEVEIT--LCSDRNLKQFIDCPNPFPLGSPYLCPPNSIHY	150
PcS123_EU118761	GSCGHPA1QNDMHYLQITKQNVSIQLSKAKIEPVGFRFTQKEIEKARLGKNNKEPLKLCQ-KTRVTEVEIT--LCSDRNLKQFIDCPNPFPLGSPYLCPPNSIHY	151
PcS124_EU118762	GSCGYRTINDEQYFETVIMKYM1TCKQNVSIQLSKAKIEPVGFRFTQKEIEKARLGKNNKEPLKLCQ-KTRVTEVEIT--LCSDRNLKQFIDCPNPFPLGSPYLCPPNSIHY	151
PcS125_EU855799	GTCGYPTIIONENDYFETVIMKYM1TCKQNVSIQLSKAKIEPVGFRFTQKEIEKARLGKNNKEPLKLCQ-KTRVTEVEIT--LCSDRNLKQFIDCPNPFPLGSPYLCPPNSIHY	150
PcS127	GSCASSPPIQNQHDFTVIMKYM1TCKQNVSEISLSKAKIEPVGFRFTQKEIEKARLGKNNKEPLKLCQ-KTRVTEVEIT--LCSDRNLKQFIDCPNPFPLGSPYLCPPNSIHY	151

شکل ۲. هم‌تراز سازی توالی‌های پروتئین (PcS<sub>101</sub>–PcS<sub>125</sub>) S-RNase (گلابی اروپایی) و آلل جدید پیشنهادی (PcS<sub>127</sub>) پرینگ شده است. پنج ناحیه عمومی حفاظت شده (RC4، C3، C2، C1 و RC4) و یک ناحیه بسیار متغیر (RHV) پرینگ شده است.

از آغازگرهای عمومی و اختصاصی ارائه شده توسط سانزوول (۲۲) برای ثبت ژنومی آلل‌های خودناسازگاری در ژنوتیپ‌های ایرانی استفاده شد. شش آلل-S، PcS<sub>101</sub>، PcS<sub>102</sub>، PcS<sub>104</sub>، PcS<sub>105</sub>، PcS<sub>106</sub> و PcS<sub>107</sub> براساس اندازه باندهای تولید شده توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز عمومی شناسایی شد، ۱۴ آلل دیگر؛ PcS<sub>109</sub>، PcS<sub>110</sub>، PcS<sub>103</sub>، PcS<sub>108</sub>، PcS<sub>105</sub>، PcS<sub>107</sub>، PcS<sub>106</sub>، PcS<sub>102</sub>، PcS<sub>121</sub>، PcS<sub>115</sub>، PcS<sub>112</sub>، PcS<sub>111</sub> و PcS<sub>124</sub> با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز اختصاصی شناسایی شد. آغازگرهای اختصاصی دیگر برای تکثیر آلل‌های S- شناخته شده در گلابی اروپایی توسعه یافته‌اند. علاوه بر این، در این آزمایش از آغازگرهای اختصاصی، برای شناسایی آلل‌های

گلابی بسیار حائز اهمیت است، چرا که؛ اطمینان از انتخاب ترکیبات سازگار در باغها و انتخاب والدین مناسب برای تلاقی‌های کنترل شده را تضمین می‌کند. در حالی که ثبت ژنومی آلل‌های خودناسازگاری برای اکثر ارقام و ژنوتیپ‌های اروپایی انجام گرفته است، گزارش‌هایی در رابطه با ارقام و ژنوتیپ‌های ایرانی وجود ندارد. در حال حاضر، ۲۳ آلل خودناسازگاری متفاوت در گلابی اروپایی گزارش شده است؛ این آلل‌ها به صورت PcS<sub>101</sub> تا PcS<sub>125</sub>، به‌منظور جلوگیری از تداخل اسمی با گلابی ژاپنی، نام‌گذاری شده‌اند (۱۰). قابل ذکر است که، آلل با PcS<sub>112</sub> یکسان است و آلل با PcS<sub>119</sub> نوترکیب یا محصول مصنوعی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز است. در این پژوهش، روش مبنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده

PcS<sub>103</sub>/PcS<sub>104</sub> نباید به عنوان والدین برای برنامه‌های به نژادی و یا کاشت در یک باغ به کار رود چرا که از نظر ژنتیکی دگر ناسازگار بوده و قادر به گردahaافشانی هم‌دیگر نبوده و به کاهش میوه و عملکرد در باغ می‌انجامد.

آلل جدید شناسایی شده در نه ژنوتیپ ایرانی از گونهٔ (PcS<sub>127</sub>) *P. communis* در سطح اسیدآمینه با آلل S<sub>19</sub> گونهٔ *P. bretschneideri* × *P. communis* است. در تغوری، این آل جدید یا در گونهٔ *P. communis* تکامل یافته و یا در این گونه از طریق دورگ‌گیری طبیعی وارد شده است. به‌هرحال، در گونهٔ گلابی اطمینان کامل از منشاء آلل در گونه به‌دلیل وجود خودناسازگاری گامتووفیتی بسیار بالا و توانایی تلاقی‌های بین گونه‌ای، امکان‌پذیر نیست. در پژوهش‌های جریانات ژنی در محصول‌ها، معمولاً جمعیت‌های طبیعی خالص (Pure) به عنوان مواد استاندارد و کنترل در نظر گرفته می‌شوند، اما با توجه به اینکه در گلابی مانع برای دورگ‌گیری به‌دلیل خودناسازگاری بالا و توانایی تلاقی‌های بین گونه‌ای وجود ندارد، یافتن جمعیت‌های خالص امکان‌پذیر نیست (۱۲). علاوه بر این، شباهت زیاد توالی با آلل‌های جنس‌های دیگر نمی‌تواند ضرورتاً تأیید کننده این موضوع باشد که این آلل‌ها در جنس *P. communis* از طریق دورگ‌گیری وارد شده‌اند، در حقیقت؛ ژن‌های S-locus تحت تأثیر انتخاب طولانی مدت متعادل وابسته به تکرار (۳۶) و پدیدهٔ تکامل درون گونه‌ای (۱۳) هستند. بدین معنی که، یک آل اجدادی در گونه‌های متفاوت و حتی جنس برای مدت طولانی بعد از تفرق، تقریباً ماهیت خود را حفظ می‌کند و قابل شناسایی است و در نتیجه، تشابه بین آلل‌های گونه‌های موجود در مقایسات بین گونه‌ای بیشتر از درون گونه‌ای است (۶). بنابراین؛ یافتن آلل‌های خودناسازگاری مشابه یا تقریباً مشابه در گونه‌های متفاوت اما مرتبط غیر معمول نیست. برای تأیید وجود آلل جدید PcS<sub>127</sub> پیشنهاد می‌شود آزمایش‌های دگر گردahaافشانی بین ارقام و ژنوتیپ‌های دارای آلل S<sub>19</sub> این پژوهش با رقم *P. bretschneideri* × *P. communis* دارای آلل PcS<sub>127</sub> برای بررسی نتایج ترکیبات سازگار و دگر سازگار انجام گیرد.

PpS<sub>8</sub> تا PpS<sub>1</sub> در گلابی ژاپنی به کار رفت، زیرا گلابی ژاپنی ردپای معنی‌داری در ژرم‌پلاسم گلابی‌های ایرانی به جای گذاشته است (۹). براساس روش مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی مراز، ثبت ژنومی آلل‌های خودناسازگاری ۶۴ ژنوتیپ شامل؛ ۴۳ ژنوتیپ وحشی و ۲۱ رقم اروپایی به عنوان کنترل با آغازگرهای عمومی و اختصاصی بررسی شد. آغازگرهای طراحی شده و مورد استفاده در این مطالعه قادر به تکثیر آلل‌های S-اختصاصی در ارقام کنترل بودند که نشان‌دهندهٔ کارایی بالا و موفقیت‌آمیز این روش در شناسایی S-RNase ها است. در میان ارقام کنترل، دو مورد با گزارشات قبلی مطابقت نداشت یکی در رقم وردی بود که در ابتدا با S-آلل‌های PcS<sub>101</sub>/PcS<sub>119</sub> گزارش شده بود (۱۰ و ۲۷)، بعداً فرض شد که PcS<sub>119</sub> محصول مصنوعی واکنش زنجیره‌ای پلی مراز و یا آلل نوترکیب است (۲۱). براساس نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر، این رقم دارای ترکیب آللی PcS<sub>101</sub>/PcS<sub>104</sub> است و دیگری رقم کونسیلر آلاکوئر بود که در گزارشات قبلی دارای آلل‌های PcS<sub>103</sub>/PcS<sub>123</sub> است (۲۲) اما نتایج این پژوهش نشان داد که این رقم دارای آلل سوم PcS<sub>105</sub> است. این نتایج با تجزیه‌های سیتوولوژی سال ۱۹۶۰ (۳۰ و ۳۷) که این رقم را تری‌بلوئید معرفی کرده است، مطابقت دارد.

آلل‌های خودناسازگاری در ژنوتیپ‌های ایرانی دارای ترکیب آللی متفاوتی از ارقام و ژنوتیپ‌های اروپایی است و نشان دهندهٔ ردپای ترکیب ژنتیکی معنی‌دار گونه‌های دیگر است. در هشت ژنوتیپ، حضور آلل گلابی ژاپنی (PpS<sub>8</sub>) نشان داده شد؛ علاوه بر این، آلل PcS<sub>127</sub> که قبلاً گزارش نشده بود در ژرم‌پلاسم ایرانی یافت شد. این مطالعه به عنوان اولین گزارش در ثبت ژنومی آلل‌های خودناسازگاری ژنوتیپ‌های گلابی ایران، اطلاعات مهمی را برای پژوهش دهنده‌گان و به نژادگران گلابی فراهم می‌سازد. براساس نتایج این پژوهش، تعدادی از ترکیبات دگر ناسازگار که دارای ترکیبات S-آلل یکسانی هستند PcS<sub>104</sub>/PcS<sub>127</sub> ۳۹ و ژنوتیپ ۴۳ با ترکیب آللی مانند؛ ژنوتیپ ۷۳ و ژنوتیپ ۸۲ با ترکیب آللی و PcS<sub>122</sub>/PcS<sub>124</sub> هم‌چنین لوئیس بونه دجرسی و کوشیا با ترکیب آللی

فرض شود حتی آلل جدید  $PcS_{127}$  از طریق *P. pyrifolia syn.* *P. serotina* ایجاد شده است؛ این آلل به نظر می‌رسد که کاملاً در جمعیت وحشی گسترش یافته است. قابل توجه است که در اکثر ژنوتیپ‌ها این آلل با آلل دوم  $PpS_8$  همراه است که نشان می‌دهد این گیاهان از زیر گروه یا جمعیتی حاصل شده‌اند که سهم *P. pyrifolia syn.* *P. serotina* در دورگ‌گیری بسیار بر جسته بوده است.

### نتیجه‌گیری

هدف این تحقیق، تعیین ترکیب تکمکان ژنی - S در ژنوتیپ‌های ایرانی و ارزیابی میزان مشارکت گونه‌های گلابی روی آلل‌های - S ژنوتیپ‌های *P. communis* است. اطلاعات ژنتیکی به دست آمده از تجزیه آلل‌های خودناسازگاری ژنوتیپ‌های وحشی ایران، فرضیه دورگ‌گیری را به عنوان اصلی‌ترین مکانیزم در ایجاد ترکیب ژنتیکی متفاوت این ناحیه تقویت می‌کند. به نظر می‌رسد موقعیت جغرافیایی و تاریخی ایران باعث ایجاد ژرمپلاسمی است که در غنی‌سازی ژنوم گلابی اروپایی توسط ترکیب گلابی‌های آسیایی شرق و گونه‌های آسیایی مرکزی مؤثر بوده است. به خاطر تنوع ژنتیکی بالا وجود آلل‌های جدید، ژرمپلاسم ایران به عنوان مناسب‌ترین منبع تنوع برنامه‌های بهثادی است.

### سپاسگزاری

نویسنده‌گان مایل هستند از ذکر سازنده، دکتر محمد نقی پاداشت و مهندس مهشید هناره به دلیل فراهم کردن نمونه برگ تعدادی از ژنوتیپ‌ها تشکر کنند. هم‌چنین از حمایت مالی نویسنده اول توسط دانشگاه تربیت مدرس در خصوص انجام این پژوهش و هم‌چنین از دانشگاه بولونیا - ایتالیا در خصوص امکانات و هزینه‌های آزمایشگاهی این پژوهش قدردانی می‌شود.

به‌حال، شواهدی فرضیه دورگ‌گیری را به عنوان منشاء آلل  $PcS_{127}$  در ژنوتیپ‌های ایرانی *P. communis* گزارش می‌کند؛ ایران روی مسیر اصلی جاده ابریشم قرار گرفته است که از چین در طول آسیای مرکزی، افغانستان گذشته و از ایران به سواحل شرقی دریای مدیترانه و بعد از آن مراکز تجاری شرق نزدیک و اروپا پیوند می‌خورد. جاده ابریشم به طور تاریخی مرکز تبادل محصول‌ها و تکنولوژی کشاورزی، طی دوره تبادل تجارت و فرهنگ بین چین قدیم و آسیای غرب و مرکزی، است (۳۴). بدین ترتیب؛ ایران کشوری است که نمونه‌های *P. communis* وارد شده از اروپا با ژنوتیپ‌های کشورهای آسیای شرقی در ارتباط بودند.

در کل، ایران یکی از مناطق دورگ‌گیری *P. communis* با *P. pyrifolia syn.* *P. korshinskyi* *P. × bretschneideri* *serotina* می‌باشد (۱۶). به‌این دلیل انتظار می‌رود که دورگ‌گیری با گلابی‌های آسیای شرق و جریانات ژنی نقش مهمی در ایجاد تنوع در آلل‌های S-ژرمپلاسم گلابی ایران گذاشته است؛ به‌طوری‌که، ترکیب ژنتیکی گلابی ژاپنی در ژرمپلاسم ایران با شناسایی آلل  $S_8$  گونه *P. pyrifolia syn.* *P. serotina* واضح ثابت شد. هم‌چنین، توالی آلل جدید  $PcS_{127}$ ، با آلل  $S_{19}$  *P. × bretschneideri* مطابقت داشت، این گونه ابتدا *P. pyrifolia syn.* *P. serotina* می‌شد که از دورگ‌گیری *P. betulaefolia* *P. ussuriensis* یا *P. pyrifolia syn.* *P. serotina* ناشی شده است (۳۲). تجزیه‌های اخیر با نشانگرهای مولکولی، خویشاوندی نزدیک گلابی‌های ژاپنی و چینی را نشان داده است، بنابراین به نویسنده‌گان این امکان را می‌دهد که *P. × breteschneideri* را به عنوان زیر گونه *P. pyrifolia syn.* *P. serotina* دانسته و نام آن را به *P. serotina var. sinensis* تغییر دهنده (۱ و ۲۹). البته قضایت تنها براساس آلل‌های خودناسازگاری قطعیت ندارد و حتماً باید براساس نشانگرهای اختصاصی و انگشت نگاری ژنتیکی مثل ریزماهواره‌ها اثبات گردد. بنابراین منطقی است که

## منابع مورد استفاده

- Bao, L., K. Chen, D. Zhang, Y. Cao, T. Yamamoto and Y. Teng. 2007. Genetic diversity and similarity of pear (*Pyrus L.*) cultivars native to East Asia revealed by SSR (simple sequence repeat) markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 54: 959–971.
- Bokszezanin, K., L. Dondini and A. Przybyla. 2009. First report on the presence of fire blight resistance in linkage group 11 of *Pyrus ussuriensis maxim.* *Journal of Applied Genetics* 50: 99–103.
- Broothaerts, W., G. A. Janssens, P. Proost and W. F. Broekaert. 1995. cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. *Plant Molecular Biology* 27(3): 499–511.
- Challice J. S. and M. N. Westwood. 1973. Numerical taxonomic studies of the genus *Pyrus* using both chemical and botanical characters. *Botanical Journal of the Linnean Society* 67(2): 121–148.
- De Franceschi, P., L. Dondini and J. Sanzol. 2012. Molecular bases and evolutionary dynamics of self-incompatibility in the Pyrinae (*Rosaceae*). *Journal of Experimental Botany* 63(11): 4015–32.
- De Franceschi, P., L. Pierantoni, L. Dondini, M. Grandi, S. Sansavini and J. Sanzol. 2011. Evaluation of candidate F-box genes for the pollen S of gametophytic self-incompatibility in the Pyrinae (*Rosaceae*) on the basis of their phylogenomic context. *Tree Genetics and Genomes* 7(4): 663–683.
- Dugan, K. A., H. S. Lawrence, D. R. Hares, C. L. Fisher and B. Budowle. 2002. An improved method for post-PCR purification for mtDNA sequence analysis. *Journal of Forensic Sciences* 47(4), 811–8.
- Entani, T., S. Takayama and A. Isogai. 2003. Molecular mechanism of the S-RNase mediated self-incompatibility system. *Plant and Cell Physiology* 44: 20–120.
- Erfani, J., A. Ebadi, H. Abdollahi and R. Fatahi. 2012. Genetic diversity of some pear cultivars and genotypes using simple sequence repeat (SSR) markers. *Plant Molecular Biology Reporter* 30(5): 1065–1072.
- Goldway, M., T. Takasaki-Yasuda, J. Sanzol, M. Mota, A. Zisovich, R. A. Stern and S. Sansavini. 2009. Renumbering the S-RNase alleles of European pears (*Pyrus communis L.*) and cloning the S109 RNase allele. *Scientia Horticulturae* 119(4): 417–422.
- Gu, Q., Q. Zhang, H. Hu, Q. Chen and Z. Luo. 2009. Identification of self-Incompatibility genotypes in some sand pears (*Pyrus pyrifolia Nakai*) by PCR-RFLP analysis. *Agricultural Sciences in China* 8(2): 154–160.
- Iketani, H., T. Manabe, N. Matsuta, T. Akihama and T. Hayashi. 1998. Incongruence between RFLPs of chloroplast DNA and morphological classification in east Asian pear (*Pyrus spp.*). *Genetic Resources and Crop Evolution* 45: 533–539.
- Ioerger, T. R., A. G. Clark and T. H. Kao. 1990. Polymorphism at the self-incompatibility locus in *Solanaceae* predates speciation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87(24): 9732–9735.
- Ishimizu, T., T. Endo, K. Y. Yamaguchi, K. T. Nakamura, F. Sakiyama and S. Norioka. 1998. Identification of regions in which positive selection may operate in S-RNase of *Rosaceae*: Implication for S-allele-specific recognition sites in S-RNase. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 440: 337–342.
- Kim, H. T., Y. Hirata, H. Kim and I. Nou. 2006. The presence of a new S-RNase allele (S10) in Asian pear (*Pyrus pyrifolia* (Burm; Nakai)). *Genetic Resources and Crop Evolution* 53(7): 1375–1383.
- Kole, C. 2011. Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources Temperate Fruits. Springer Heidelberg Dordrecht. Berlin.
- Kubo, K., T. Entani, A. Takara, N. Wang, A. M. Fields, Z. Hua and S. Takayama. 2010. Collaborative non-self recognition system in S-RNase-based self-incompatibility. *Science* 330(6005), 796–799.
- Maguire, T. L., G. G. Collins and M. Sedgley. 1994. A modified CTAB DNA extraction procedure for plants belonging to the family proteaceae. *Plant Molecular Biology Reporter* 12(2): 106–109.
- Moriya, Y., K. Yamamoto, K. Okada, H. Iwanami, H. Bessho, T. Nakanishi and T. Takasaki. 2007. Development of a CAPS marker system for genotyping European pear cultivars harboring 17 S alleles. *Plant Cell Reports* 26(3): 345–354.
- Saito, T., Y. Sato, Y. Sawamura, M. Shoda, T. Takasaki-Yasuda and K. Kotobuki. 2011. Dual recognition of S<sub>1</sub> and S<sub>4</sub> pistils by S<sub>4</sub><sup>sm</sup> pollen in self-incompatibility of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia Nakai*). *Tree Genetics and Genomes* 8(4): 689–694.
- Sanzol, J., B. G. Sutherland and T. P. Robbins. 2006. Identification and characterization of genomic DNA sequences of the S-ribonuclease gene associated with self-incompatibility alleles S 1 to S 5 in European pear. *Plant Breeding* 125(5): 513–518.
- Sanzol, J. 2009. Genomic characterization of self-incompatibility ribonucleases (S-RNases) in European pear cultivars and development of PCR detection for 20 alleles. *Tree Genetics and Genomes* 5(3): 393–405.
- Sanzol, J. and T. P. Robbins. 2008. Combined analysis of S-Alleles in European pear by pollinations and PCR-

- based S-Genotyping; correlation between S-Phenotypes and S-RNase genotypes. *Jornal of American Society Horticultural Science* 133(2): 213–224.
- 24. Sassa, H., T. Nishio, Y. Kowyama, H. Hirano, T. Koba and H. Ikehashi. 1996. Self-incompatibility (S) alleles of the Rosaceae encode members of a distinct class of the T2/S ribonuclease superfamily. *Molecular and General Genetics* 250(5): 547–557.
  - 25. Sassa, H., H. Hirano and H. Ikehashi. 1992. Self-Incompatibility-Related RNases in styles of Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd.). *Plant Cell Physiology* 33(6): 811–814.
  - 26. Sassa, H., H. Kakui, M. Miyamoto, Y. Suzuki, T. Hanada, K. Ushijima and T. Koba. 2007. S locus F-box brothers: multiple and pollen-specific F-box genes with S haplotype-specific polymorphisms in apple and Japanese pear. *Genetics* 175(4): 1869–81.
  - 27. Takasaki, T., Y. Moriya, T. Nakanishi, H. Iwanami and H. Bessho. 2007. S-genotype assignment of European pear cultivars using S-RNase specific CAPS marker. *Acta Horticulturae* 800(1): 391–399.
  - 28. Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28(10): 2731–2739.
  - 29. Teng, Y., K. Tanabe, F. Tamura and A. Itai. 2002. Genetic relationships of *Pyrus* species and cultivars native to East Asia revealed by randomly amplified polymorphic DNA markers. *Journal of American Society of Horticultural Science* 127(2): 262–270.
  - 30. Uhlik, J. A. N. 1961. The cytological evaluation of some pear-sorts cultivated in Czechoslovakia. *Biologia Plantarum* 3(3): 205–214.
  - 31. Ushijima, K., H. Sassa, A. M. Dandekar, T. M. Gradziel, R. Tao and H. Hirano. 2003. Structural and transcriptional analysis of the self-incompatibility locus of almond: identification of a pollen-expressed F-box gene with haplotype-specific polymorphism. *The Plant Cell* 15(3): 771–781.
  - 32. Vavilov, N. I. 1951. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. *Soil Science* 72(6): 433–434.
  - 33. Vieira, J., H. R. Morales, R. A. M. Santos and C. P. Vieira. 2007. Different positively selected sites at the gametophytic self-incompatibility pistil S-RNase gene in the Solanaceae and Rosaceae (*Prunus*, *Pyrus*, and *Malus*). *Journal of Molecular Evolution* 65: 175–185.
  - 34. Wei, H., J. Li, Z. Peng, B. Lu, Z. Zhao and W. Yang. 2008. Relationships of aegilops tauschii revealed by DNA fingerprints: The evidence for agriculture exchange between China and the West. *Natural Science* 18(12): 1525–1531.
  - 35. Wolko, Ł., W. Antkowiak, M. Sips and R. Słomski. 2010. Self-incompatibility alleles in Polish wild pear (*Pyrus pyraster* (L.) Burgsd.): a preliminary analysis. *Journal of Applied Genetics* 51(1): 33–35.
  - 36. Wright, S. 1939. The distribution of self-sterility alleles in populations. *Genetics* 24, 538–552.
  - 37. Zielinski, Q. B. and M. Thompson. 1967. Speciation in *Pyrus*: chromosome number and meiotic behavior. *Botanical Gazette Journal* 128(2): 109–112.
  - 38. Zuccherelli, S., P. Tassinari, W. Broothaerts, S. Tartarini, L. Dondini and S. Sansavini. 2002. S-Allele characterization in self-incompatible pear (*Pyrus communis* L.). *Sexual Plant Reproduction* 15(3): 153–158.