

شناسایی و تعیین ویژگی‌های ژنومی آلل‌های خودناسازگاری در گونه‌های وحشی گلابی

اعظم نیک‌زاد قره‌آغاجی^۱، کاظم ارزانی^{۲*}، حمید عبداللهی^۳،
عبدالعلی شجاعیان^۴، لوکا دوندینی^۵ و پاولو دفرانچسکی^۶

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

چکیده

گونه‌های گلابی، سیستم خودناسازگاری گامتوفیتی نشان می‌دهند که به‌طور گسترده در میان گیاهان گل‌دار وجود دارد. این سیستم، از طریق مکانیزم شناسایی دانه‌گرده - مادگی از خودباروری جلوگیری می‌کند. تنوع آلل‌های خودناسازگاری یافت شده در ژنوتیپ‌های ایرانی نشان‌دهنده ردپای ترکیب ژنتیکی معنی‌دار گونه‌های دیگر است؛ بنابراین، ژرم پلاسم ایران به‌عنوان بهترین منبع تنوع برنامه‌های به‌نژادی است. بدین منظور، در این مطالعه، آلل‌های خودناسازگاری ۶۴ ژنوتیپ از چهار گونه گلابی؛ *Pyrus salicifolia*، *Pyrus communis* و *Pyrus ussuriensis* و *Pyrus syriaca* از ایران و اروپا با استفاده از آغازگرهای عمومی و اختصاصی به روش مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز شناسایی شد. نتایج، ۲۳ آلل خودناسازگاری شامل PcS₁₀₁-PcS₁₂₅ را مشخص کرد و وجود آلل جدید PcS₁₂₇ در تعدادی از ژنوتیپ‌های وحشی گونه *P. communis* از ایران و هم‌چنین حضور آلل S₈ را در گونه *P. pyrifolia* syn. *P. serotina* آشکار نمود. در اکثر ژنوتیپ‌ها آلل جدید PcS₁₂₇ با آلل دوم PpS₈ همراه بود که نشان می‌دهد این گیاهان از زیرگروه یا جمعیتی حاصل شده‌اند که سهم ایرانی دارای ترکیب آلی متفاوتی از ارقام و ژنوتیپ‌های اروپایی است چرا که در ژنوتیپ‌های ایرانی ردپای آلل‌های خودناسازگاری گونه‌های مختلف جنس گلابی، یافت شده است. هم‌چنین، کاربرد این روش در ۲۱ رقم با S - آلل‌های شناسایی شده، امکان شناسایی مجدد ترکیب آلی - S و ژنوتیپ‌های خودناسازگاری رقم وردی، با S - آلل‌های PcS₁₀₁/PcS₁₀₄ و رقم کونسیلر آلاکوئر با S - آلل‌های PcS₁₀₃/PcS₁₂₃/PcS₁₀₅ را فراهم کرد.

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

۱، ۲ و ۴. به‌ترتیب دانشجوی فارغ‌التحصیل دکتری، استاد و استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

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

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

*. مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: arzani_k@modares.ac.ir

مقدمه

گونه‌های گلابی متعلق به جنس گلابی، زیر طایفه *Pyrinae* زیر خانواده مالوئیده (*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 دانه‌گرده - مادگی از خودباروری جلوگیری می‌کند. بنابراین، رشد لوله‌گرده خودی روی مادگی امکان‌پذیر نبوده و این در حالی است که لوله‌گرده غیرخودی و سازگار، داخل مادگی رشد کرده و به تخمدان می‌رسد (۵). ویژگی شناسایی خودی / غیر خودی به‌طور ژنتیک توسط تک مکان ژنی - S (S-locus)؛ در مادگی با چندین آلل که S-RNase نامیده می‌شود (۳) و چندین آلل در دانه‌گرده؛ که دو مین F-box نامیده می‌شود (S-locus: SFBB; S-locus F-Box Brother؛ (۲۶))، کنترل می‌گردد، که به‌ترتیب، تعیین‌کننده 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 ژنوتیپ 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 ژنوتیپ‌های 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 توالی‌یابی ژنومی، ثبت ژنومی آلل‌های خودناسازگاری و برنامه‌های به‌نژادی را آسان‌تر کرد. مکان ژنی - S، هتروآللی (۸ و ۳۱)، دارای چند شکل بالا و ویژه برای هر هاپلو تیپ می‌باشد که نشان دهنده تنوع کافی برای توسعه نشانگرهای مولکولی به‌منظور ثبت ژنومی آلل‌های خودناسازگاری است (۱۰). اکثر چند شکل‌ها در

ناحیه با تنوع بالا (RHV: Hyper-Variable Region) متمرکز شده‌اند؛ از طرف دیگر، مکان ژنی - S دارای پنج ناحیه حفاظت شده عمومی (C1، C2، C3، RC4 و C5) و یک ناحیه بسیار حفاظت شده هگزاپتیدی استاندارد (IIWPNW) است که دقیقاً پایین RHV قرار گرفته است که برای طراحی جفت آغازگر عمومی به‌منظور تکثیر ناحیه بزرگی از آلل‌ها به‌کار می‌رود (۲۲). آخرین گزارش برای تعیین آلل‌های خودناسازگاری گلابی‌های کشت شده توسط سانزول و روبینز انجام شد (۲۲ و ۲۳). این محققان روشی مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با استفاده از آغازگرهای عمومی و اختصاصی را به‌منظور ثبت ژنومی آلل‌های خودناسازگاری ۲۰ آلل خودناسازگاری در ارقام گلابی اروپایی به‌کار بردند. علاوه بر این، ولکو و همکاران، به‌دلیل پتانسیل معنی‌دار گلابی‌های وحشی به‌عنوان 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، مکان ژنی - S موضوع اصلی انتخاب وابسته به کثرت است. به‌عبارتی دیگر، دانه‌گرده 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). برعکس، فراوانی ویژگی S به‌تدریج تمایل به کاهش شیوع آن در جمعیت دارد. اما، این نوع از انتخاب، باعث حفظ تعداد بالایی از هاپلو تیپ‌های S در جمعیت برای مدت زمان بسیار طولانی می‌شود. تجزیه آلل‌های خودناسازگاری در گونه‌های

(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 ۸۰ درجه سانتی‌گراد زیر صفر کاملاً فریز شدند و در دستگاه خشک‌کن انجمادی (HITOSICC, Heto-Holten A/S, Denmark) خشک شدند.

استخراج DNA

برای استخراج DNA ژنومی، مقدار ۵۰ 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 (۱۸). DNA های استخراج شده با استفاده از دستگاه نانو اسپکتروفتومتر (NanoDrop Technology, Rockland, DE) مورد ارزیابی کمیت و کیفیت قرار گرفتند. برای استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، نمونه‌های DNA با غلظت ۲۵ نانوگرم رقیق گردیدند.

توسعه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در ابتدا با استفاده از جفت آغازگر عمومی؛
 PycomC1F1(5' ATTTCAATTTACGCAGCAATATCAGC3')
 و PycomC5R1(5' CTGCAAAGGACCTCAACCAATTC3')
 تحت شرایط؛ ۲۵ نانوگرم DNA ژنومی، بافر واکنش PCR (X)،
 ۲ میلی‌مولار کلرید منیزیم (۱/۸ میکرولیتر)، ۰/۶ واحد Tag DNA
 پلی‌مراز (Applied biosystem, Amplitaq Gold DNA Polymerase)
 (۰/۱ میکرولیتر)، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs (۰/۴ میکرولیتر) و
 ۰/۶ میکرومولار از هر آغازگر (۰/۹ میکرولیتر) از هر
 آغازگر) تهیه شد و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر
 (Applied Biosystems 2720, USA)، تکثیر واکنش زنجیره‌ای
 پلی‌مراز، تحت برنامه؛ یک چرخه در ۱۰ دقیقه - ۹۴ درجه
 سانتی‌گراد، ۳۵ چرخه سه مرحله‌ای شامل ۳۰ ثانیه - ۹۴ درجه

Pyrinae، به‌طور 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 (۲، ۶ و ۲۴)، 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 به‌دلیل قرارگیری در آسیای مرکزی و به‌عنوان کشوری روی جاده ابریشم، یکی از مناطق دورگ‌گیری *P. communis* با *P. korshinskyi*، *P. bretschnideri* و *P. pyrifolia syn. P. serotina* می‌باشد (۱۶). ایران یکی از مهم‌ترین مراکز اصلی تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسماهای گلابی است. به این دلیل، این مطالعه با هدف، ثبت ژنومی آلل‌های خودناسازگاری ۴۳ ژنوتیپ وحشی و ۲۲ رقم به‌عنوان کنترل با استفاده از آلل‌های عمومی و اختصاصی بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

مواد گیاهی شامل ۴۳ ژنوتیپ؛ ۳۶ ژنوتیپ از گونه *P. communis* از ایران و انگلستان، یک ژنوتیپ از گونه *P. salicifolia*، چهار ژنوتیپ از گونه *P. ussuriensis*، دو ژنوتیپ از گونه *P. syriaca* و ۲۱ رقم از گونه *P. communis* به‌عنوان کنترل (جدول ۱) در این پژوهش برای ثبت ژنومی آلل‌های PcS₁₀₁ تا PcS₁₂₅ مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های برگ‌های سالم از سرشاخه‌های 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 جمع‌آوری	نام رقم/ژنوتیپ	گونه	محل جمع‌آوری	نام رقم/ژنوتیپ
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	ژنوتیپ ۷۲ (Accession72)	<i>P. communis</i>	Italy.DIPSA	وردی (Veerdi/Sweet Blush)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	ژنوتیپ ۷۳ (Accession73)	<i>P. communis</i>	Italy.DIPSA	اوید (Ovid)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	ژنوتیپ ۷۴ (Accession74)	<i>P. communis</i>	Italy.DIPSA	کونسیلر آلاکوتر (Conseiller a la Coeur)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	ژنوتیپ ۷۵ (Accession75)	<i>P. communis</i>	Italy.DIPSA	ریمار رد (Reimer red)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	ژنوتیپ ۷۶ (Accession76)	<i>P. communis</i>	Italy.DIPSA	دوینه دوکومیس (Doyenné du Comice)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	ژنوتیپ ۷۷ (Accession77)	<i>P. communis</i>	Italy.DIPSA	آنگلس (Angelys)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	ژنوتیپ ۷۸ (Accession78)	<i>P. communis</i>	Italy.DIPSA	بوره گیفارد (Beurré Giffard)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	ژنوتیپ ۷۹ (Accession79)	<i>P. communis</i>	Italy.DIPSA	فرتیلیتی (Fertility)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	ژنوتیپ ۸۰ (Accession80)	<i>P. communis</i>	Italy.DIPSA	کنفرانس (Conference)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	ژنوتیپ ۸۱ (Accession81)	<i>P. communis</i>	Spain.CITA	دلبارد پرمیر (Delbard première)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	ژنوتیپ ۸۲ (Accession82)	<i>P. communis</i>	Italy.DIPSA	پرزیدنت هرون (President Heron)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	ژنوتیپ ۸۳ (Accession83)	<i>P. communis</i>	Italy.DIPSA	ویلدر (Wilder)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	ژنوتیپ ۸۴ (Accession84)	<i>P. communis</i>	Italy.DIPSA	بوره کلایرگو (Beurré Clairgeau)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	ژنوتیپ ۸۵ (Accession85)	<i>P. communis</i>	Italy.DIPSA	اولدهوم (Old Home)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	ژنوتیپ ۸۶ (Accession86)	<i>P. communis</i>	Spain.CITA	مونچالارد (Monchallard)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	ژنوتیپ ۸۷ (Accession87)	<i>P. communis</i>	Italy.DIPSA	روزماری (Rosmarie)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	ژنوتیپ ۸۸ (Accession88)	<i>P. communis</i>	Italy.DIPSA	بلا دی گیونو (Bella di Giugno)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	ژنوتیپ ۸۹ (Accession89)	<i>P. communis</i>	Italy.DIPSA	کیفر (Kieffer)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	ژنوتیپ ۹۰ (Accession90)	<i>P. communis</i>	Italy.DIPSA	دوینه دهیور (Doyenné d'hiver)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	ژنوتیپ ۹۱ (Accession91)	<i>P. communis</i>	Spain.CITA	گرین سامر (Green Summer)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	ژنوتیپ ۹۲ (Accession92)	<i>P. communis</i>	Spain.CITA	سرمانیو (Ceremeño)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	ژنوتیپ ۹۳ (Accession93)	<i>P. communis</i>	Iran.Kurdistan	ژنوتیپ ۳۹ (Accession39)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	ژنوتیپ ۹۴ (Accession94)	<i>P. communis</i>	Iran.Kurdistan	ژنوتیپ ۴۰ (Accession40)
<i>P. communis</i>	Iran.GANRC	ژنوتیپ ۹۵ (Accession95)	<i>P. communis</i>	Iran.Kurdistan	ژنوتیپ ۴۱ (Accession41)
<i>P. salicifolia</i>	Iran.SPII	ژنوتیپ ۹۶ (Accession96)	<i>P. communis</i>	Iran.Kurdistan	ژنوتیپ ۴۲ (Accession42)
<i>P. syriaca</i>	Iran.WANRC	ژنوتیپ ۹۷ (Accession97)	<i>P. communis</i>	Iran.Kurdistan	ژنوتیپ ۴۳ (Accession43)
<i>P. syriaca</i>	Iran.WANRC	ژنوتیپ ۹۸ (Accession98)	<i>P. communis</i>	Iran.Kurdistan	ژنوتیپ ۴۴ (Accession44)
<i>P. ussuriensis</i>	UK.RIFR-Kew	ژنوتیپ ۹۹ (Accession99)	<i>P. communis</i>	Iran.Kurdistan	ژنوتیپ ۴۵ (Accession45)
<i>P. ussuriensis</i>	UK.RIFR-Kew	ژنوتیپ ۱۰۰ (Accession100)	<i>P. communis</i>	Iran.Kurdistan	ژنوتیپ ۴۶ (Accession46)
<i>P. ussuriensis</i>	UK.RIFR-Kew	ژنوتیپ ۱۰۱ (Accession101)	<i>P. communis</i>	Iran.Kurdistan	ژنوتیپ ۴۷ (Accession47)
<i>P. ussuriensis</i>	UK.RIFR-Kew	ژنوتیپ ۱۰۲ (Accession102)	<i>P. communis</i>	Iran.WANRC	ژنوتیپ ۶۱ (Accession61)
			<i>P. communis</i>	Iran.WANRC	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_{101} تا PcS_{125} انجام گرفت. هم‌چنین، برای شناسایی آل‌های خودسازگاری در گلابی‌های ژاپنی از آغازگرهای اختصاصی

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

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

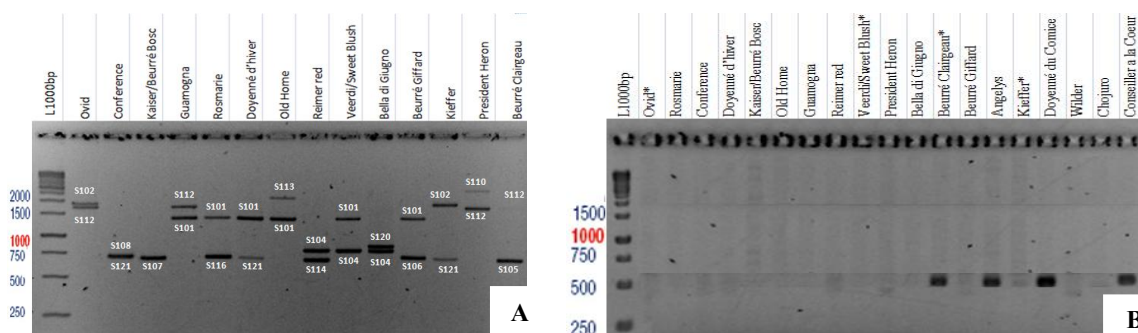
منابع	غلظت آغازگر (μM)	توالی (3'→5')	نام آغازگر	S-RNase
(Sanzol, 2009)	0.3	AGAACATGATAATTAGGACCAT	B39S3F1 forward	PcS ₁₀₃
(Sanzol, 2009)		GGTTTCTTATAGTCGATACCTG	B40S3R1 reverse	
(Sanzol, 2009)	0.3	ACGGTATGTGGCCTCAAACAGCTC	A55S5F1 forward	PcS ₁₀₅
(Sanzol, 2009)		GATTGTCGTTCTGTATTGCGGGTCG	A57S5R2 reverse	
(Sanzol, 2009)	0.3	ATTTTCAATTTACGCAGCAATATCAGC	PycomC1F1 forward	PcS ₁₀₆
(Sanzol, 2009)		GCGTGTGCTTCATTATTTCGC	PycomS6R reverse	
(Sanzol, 2009)	0.4	CGACCCGGAATATTGCAAGATAAGG	A60S7F1 forward	PcS ₁₀₇
(Sanzol, 2009)		GGCATTTCATGTCACCAGCACT	A63S7R3 reverse	
(Sanzol, 2009)	0.3	CTGTAAACGATCGCTGAACAA	PycomS8F forward	PcS ₁₀₈
(Sanzol, 2009)		CCTCAACTAATTCAGTCGTCGTC	PycomS8R reverse	
(Sanzol, 2009)	0.4	TTTGAATGGACCTCACCTGC	B47S9F2 forward	PcS ₁₀₉
(Sanzol, 2009)		TATCTACCAGTGGCCTTTTCAA	B48S9R3 reverse	
(Sanzol, 2009)	0.6	CAGAAAAATGTAAGACTACAGCTC	A68S11F1 forward	PcS ₁₁₁
(Sanzol, 2009)		TTGTCCCGTTCGGTTGAATAGC	PycomS11R reverse	
(Sanzol, 2009)	0.3	GCTTTGTTTAGTTTTAATGACACG	B41S12F1 forward	PcS ₁₁₂
(Sanzol, 2009)		GGTTCCTTATCGTCGGTACACT	B51S12R3 reverse	
(Sanzol, 2009)	0.3	TGGTTTGTGGCCTTCAGAGTC	B36S14F2 forward	PcS ₁₁₄
(Sanzol, 2009)		GTCGCTTATCATCGGTACTTGG	A71S14R4 reverse	
(Sanzol, 2009)	0.6	TGGCCTTCAAAGTGGTACTTATCC	A83SmF1 forward	PcS ₁₁₅
(Sanzol, 2009)		ATGTACATTTTGTAAACAGTTCCG	B37SmR2 reverse	
Designed in this study	0.4	GCCAGCTGTCTGCAACTCC	PcS16 forward	PcS ₁₁₆
Designed in this study		GTCGTTTCAATTATGCGGGATAC	PcS16 reverse	
(Sanzol, 2009)	0.3	TCACCCAGAAAATGCACGGAC	B52S21F2 forward	PcS ₁₂₁
(Sanzol, 2009)		TTTGGTTTCTTATTGTTGATGCTC	B53S21R2 reverse	
(Sanzol, 2009)	0.6	CACGCTAGGACCTGACCCGAGT	A84S22F1 forward	PcS ₁₂₂
(Sanzol, 2009)		CTAGAGACGTTTTGTTTCTTGCAG	A89S22R1 reverse	
(Sanzol, 2009)	0.3	CAGCACAGAAATGACCCAAGAT	A88S23F1 forward	PcS ₁₂₃
(Sanzol, 2009)		AATTCAGTCCTCTGAGTATAGT	B38S23R2 reverse	
(Sanzol, 2009)	0.6	TCTGTGGCCTCAAAGTGGATACT	A85S24F1 forward	PcS ₁₂₄
(Sanzol, 2009)		GTTGGTACTAATGAGTATGGCAGC	A86S24F2 reverse	
(Sanzol, 2009)	0.4	ATTTTCAATTTACGCAGCAATATCAGC	PycomC1F1 forward	PcS ₁₂₅
Designed in this study		GATTTCCGGTCTTACTCACGGT	PcS25 reverse	
Designed in this study	0.4	TCAAATTCCTCCCAGCAAAC	PpS2 forward	PpS ₂
Designed in this study		CGTCCATCACACACTTCC	PpS2 reverse	
Designed in this study	0.4	TCAAACATAGATTTTCATGCACAC	PpS3 forward	PpS ₃
Designed in this study		GATATTGTTGGTGGGGCAAT	PpS3_5 reverse	
(Sanzol, 2009)	0.4	ATTTTCAATTTACGCAGCAATATCAGC	PycomC1F1 forward	PpS ₄
Designed in this study		TGCATGAAAATCTATGCTGAGC	PpS4 reverse	
Designed in this study	0.4	TCAAACATAGATTTTCATGCACGT	PpS5 forward	PpS ₅
Designed in this study		GATATTGTTGGTGGGGCAAT	PpS3_5 reverse	
Designed in this study	0.6	GCGTGTGCAAATATTACAATTGT	PpS6 forward	PpS ₆
(Sanzol, 2009)		CTGCAAAGGACCTCAACCAATTC	PycomC5R1 reverse	
Designed in this study	0.4	TCAACATCTTTTCGCGACTG	PpS8 forward	PpS ₈
(Sanzol, 2009)		CTGCAAAGGACCTCAACCAATTC	PycomC5R1 reverse	
Designed in this study	0.4	CTCAATCGAAGGGCAAATGT	PpS9 forward	PpS ₉
Designed in this study	0.3	TTATTGGTGGGGCAGAAAAA	PpS9 reverse	

پلی‌مرز حاصل از آغازگر عمومی با اندازه حدود ۷۰۰ - ۶۵۰ جفت باز تولید کردند. برای همسانه‌سازی، تعدادی از این محصول‌ها به‌طور مستقیم در pGEM-T Easy Vector System (Promega, Madison, WI, USA) و با استفاده از سلول‌های مستعد *Escherichia coli* DH5α استفاده شد. محصول‌های واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز همسانه‌سازی شده، توسعه یافتند و با آنزیم برشی *MseI/TruII* به‌منظور تمایز آلل‌های مختلف از محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز اولیه برش داده شدند. دو

طراحی شده برای آلل‌های PpS₂-PpS₆ و PpS₈ و PpS₉ استفاده گردید. درحالی‌که؛ برای شناسایی آلل‌های PpS₁ و PpS₇ به‌دلیل شباهت بالای توالی، به‌ترتیب، به آلل‌های PpS₁₁₁ و PpS₁₁₆ گلابی اروپایی، از جفت آغازگر عمومی و اختصاصی PpS₁₁₆ استفاده شد (جدول ۲).

همسانه‌سازی و توالی‌یابی

اکثر آلل‌های خودناسازگاری، محصول واکنش زنجیره‌ای



شکل ۱. باندهای حاصل از تکثیر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز DNA ژنومی روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد
 A: باندهای حاصل از تکثیر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز ارقام اروپایی با استفاده از جفت آغازگرهای عمومی
 B: باندهای حاصل از تکثیر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با جفت آغازگرهای اختصاصی PcS₁₀₅

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 فیلوژنتیک با استفاده از نرم‌افزار MEGA5 Software (http://www.megasoftware.net/), از طریق روش Neighbor-Joining Tree و برای تخمین فواصل ژنتیک از طریق تجزیه Poisson correction method به‌کار 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)، درحالی‌که برای رقم کونسیلر آلاکوئر 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 پلی‌مرز با آغازگرهای عمومی برای نه ژنوتیپ؛ ۳۹، ۴۳، ۴۷، ۷۸، ۸۱، ۸۴، ۸۸، ۹۳ و ۹۴ تولید قطعه‌ای با اندازه تقریبی ۷۶۰ جفت باز کرد، که از اندازه موردانتظار 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™ خالص‌سازی شدند (۷). محصول خالص‌سازی شده با استفاده از دستگاه MegaBACE 1000 capillary sequencer (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) در دو 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 از GenElute™ Gel Extraction Kit (Sigma-Aldrich) خالص‌سازی شدند و با جفت آغازگر عمومی در دو جهت پیش‌رو و پس‌رو توالی‌یابی شدند. توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار 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) و ApE (www.ape-a-plasmid-editor) به‌دست 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 آللی خودناسازگاری ژنوتیپ‌های وحشی گلابی ایران با استفاده از آغازگرهای عمومی و اختصاصی

ژنوتیپ خودناسازگاری S-genotype	اندازه باند PCR - اختصاصی		اندازه باند PCR - عمومی (bp)	رقم و ژنوتیپ
				ارقام کنترل
PcS ₁₀₁ PcS ₁₀₄	PcS ₁₀₄	PcS ₁₀₁	750/1,300	وردی
PcS ₁₀₂ PcS ₁₁₂	PcS ₁₁₂	PcS ₁₀₂	1,600/1,700	اوید
PcS ₁₀₃ PcS ₁₂₃ PcS ₁₀₅	PcS ₁₀₅	PcS ₁₂₃	650/ 650/1,600	کونسیلر آلاکوثر
PcS ₁₀₄ PcS ₁₁₄	PcS ₁₁₄	PcS ₁₀₄	650/750	ریمار رد
PcS ₁₀₄ PcS ₁₀₅	PcS ₁₀₅	PcS ₁₀₄	650/750	دوینه دوکومیس
PcS ₁₀₅ PcS ₁₂₁	PcS ₁₂₁	PcS ₁₀₅	650/650	آنجلس
PcS ₁₀₁ PcS ₁₀₆	PcS ₁₀₆	PcS ₁₀₁	670/1,300	بوره گیفارد
PcS ₁₀₇ PcS ₁₁₂	PcS ₁₁₂	PcS ₁₀₇	650/1,600	فرتیلیتی
PcS ₁₀₈ PcS ₁₂₁	PcS ₁₂₁	PcS ₁₀₈	650/675	کنفرانس
PcS ₁₀₁ PcS ₁₀₉	PcS ₁₀₉	PcS ₁₀₁	650/1,300	دلبارد پرمیر
PcS ₁₁₀ PcS ₁₁₂	PcS ₁₁₂	PcS ₁₁₀	1,600/2,200	پرزیدنت هرون
PcS ₁₀₁ PcS ₁₁₁	PcS ₁₁₁	PcS ₁₀₁	675/1,300	ویلدر
PcS ₁₀₅ PcS ₁₁₂	PcS ₁₁₂	PcS ₁₀₅	650/1,600	بوره کلایرگو
PcS ₁₀₁ PcS ₁₁₃	PcS ₁₁₃	PcS ₁₀₁	1,300/1,900	اولدهوم
PcS ₁₀₄ PcS ₁₁₅	PcS ₁₁₅	PcS ₁₀₄	650/750	مونچالارد
PcS ₁₀₁ PcS ₁₁₆	PcS ₁₁₆	PcS ₁₀₁	670/1,300	روزماری
PcS ₁₀₄ PcS ₁₂₀	PcS ₁₂₀	PcS ₁₀₄	750/800	بلا دی گیونیو
PcS ₁₀₂ PcS ₁₂₁	PcS ₁₂₁	PcS ₁₀₂	650/1,700	کیفر
PcS ₁₀₁ PcS ₁₂₁	PcS ₁₂₁	PcS ₁₀₁	650/1,300	دوینه دهیور
PcS ₁₂₂ PcS ₁₂₄	PcS ₁₂₄	PcS ₁₂₂	650/675	گرین سامر
PcS ₁₂₁ *PcS ₁₂₅	PcS ₁₂₅	PcS ₁₂₁ *	1200/>2,000	سرمانیو
				ژنوتیپ‌های ایرانی
PcS ₁₀₄ PcS ₁₂₇	PcS ₁₂₇	PcS ₁₀₄	750/760	ژنوتیپ ۳۹
PcS ₁₁₆	-	PcS ₁₁₆	670	ژنوتیپ ۴۰
PcS ₁₁₅	-	PcS ₁₁₅	650	ژنوتیپ ۴۱
PcS ₁₀₄	-	PcS ₁₀₄	700/750	ژنوتیپ ۴۲
PcS ₁₀₄ PcS ₁₂₇	PcS ₁₂₇	PcS ₁₀₄	750/760	ژنوتیپ ۴۳
PcS ₁₂₁	-	PcS ₁₂₁	650	ژنوتیپ ۴۴
PcS ₁₀₃ PcS ₁₂₂	PcS ₁₂₂	PcS ₁₀₃	675/1,600	ژنوتیپ ۴۵
PcS ₁₂₂	-	PcS ₁₂₂	675	ژنوتیپ ۴۶
PcS ₁₀₄ PcS ₁₂₇	PcS ₁₂₇	PcS ₁₀₄	750/760	ژنوتیپ ۴۷
PcS ₁₀₄ PcS ₁₁₅	PcS ₁₁₅	PcS ₁₀₄	650/750	ژنوتیپ ۶۱
PcS ₁₂₄	-	PcS ₁₂₄	650	ژنوتیپ ۶۲
PcS ₁₂₄ PpS ₈	PpS ₈	PcS ₁₂₄	650/750	ژنوتیپ ۷۱
PcS ₁₁₃ PcS ₁₂₁	PcS ₁₂₁	PcS ₁₁₃	650/1,900	ژنوتیپ ۷۲
PcS ₁₂₂ PcS ₁₂₄	PcS ₁₂₄	PcS ₁₂₂	650/675	ژنوتیپ ۷۳
PcS ₁₀₄ PcS ₁₂₄	PcS ₁₂₄	PcS ₁₀₄	650/750	ژنوتیپ ۷۴
PcS ₁₂₄ PpS ₈	PpS ₈	PcS ₁₂₄	650/750	ژنوتیپ ۷۵

ادامه جدول ۳

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

۸۴، ۸۸، ۹۳، ۹۴ و ژنوتیپ‌های دیگر؛ ۷۱، ۷۵ قطعه‌ای با اندازه تقریبی ۷۵۰ جفت باز با محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با آغازگرهای عمومی نشان داد، که توالی‌یابی آن تطابق کامل آلل را با آلل PsS₈ (Acc. AB104908.1) اثبات کرد. تجزیه آلل جدید، پنج ناحیه عمومی حفاظت‌شده (C1، C2، C3، C4، RC4 و C5) و یک ناحیه بسیار متغییر (RHV) مخصوص Pyrinae-RNase‌های Pyrinae را نشان داد (شکل ۲). توالی آلل جدید PcS₁₂₇ در پایگاه اطلاعاتی Genbank با شماره الحاقی KF588568 ثبت شد. دانش ثبت ژنومی آلل‌های خودسازگاری برای به‌زادگران و پرورش دهندگان ارقام

PcS₁₀₄ (۷۵۴ جفت باز) بزرگ‌تر بود. این آلل از دو ژنوتیپ ۴۷ و ۷۸ توالی‌یابی شد و پیشنهاد شد که با نام آلل PcS₁₂₇ نام‌گذاری شود. این آلل تقریباً با آلل S₁₉ از *P. bretschneideri* یکسان بود (PbS₁₉; Acc. EF643638). اما PcS₁₂₇ از PbS₁₉ توسط جایگزینی تک نوکلئوتید در آگرون دوم تفاوت داشت، که تغییری در کدون ایجاد نمی‌کرد؛ در سطح اسید آمینه، آلل جدید ۱۰۰ درصد تطابق با PbS₁₉ داشت. نزدیک‌ترین آلل از *P. pyrifolia syn. P. serotina* از PpS₁₂ (Acc. Ab426604) بود که ۹۵ درصد تطابق در سطح اسید آمینه نشان داد. آلل S- دوم تعدادی از این ژنوتیپ‌ها؛ ۷۸، ۸۱

	Signal peptide	C1	C2	HVR	C3	
PcS101	AB236428	MGITRMIYMTVMAFSLIVLILSSSTMGDYDFQFTQQYQPAACNSNPTCKDPTKLEFVHGLWPSNNGPDPVNC	KPKTKVPAQAQIDPSLKP	OLEIIWPNVFN	FRADNESF	WVNRQWDKH 120
PcS102	AB236425	MGITGMIYMTVMSLIVLILSSSAAYKDYDFQFTQQYQPAACCKFHHTPCCKDPLDKLEFVHGLWPSNNGPDPVNC	KPKTKVPAQAQIDPSLKP	OLEIIWPNVFN	FRADNESF	WVNRQWDKH 117
PcS103	AB236432	MGITGMIYMTVMSLIVLILSSSAVKFDYDFQFTQQYQPAACNSNPTCKDPPDKLEFVHGLWPSNNGSDPKKCKAT	---	ILNPQIT-DLKAQLEIIWPNVFN	NRKAHVSF	WRKQWRKH 116
PcS104	AB236429	---MGITGMIYMTVMSLIVLILSSSTVGFDFYDFQFTQQYQPAACNSNPTCKDPPDKLEFVHGLWPSNNGSDPKKCKAT	---	ILNPQIT-DLKAQLEIIWPNVFN	NRKAHVSF	WRKQWRKH 113
PcS105	AB236430	MGITGMIYMTVMSLIVLILSSSTVGFDFYDFQFTQQYQPAACNSNPTCKDPPDKLEFVHGLWPSNNGSDPKKCKAT	---	ILNPQIT-DLKAQLEIIWPNVFN	NRKAHVSF	WRKQWRKH 116
PcS106	AB258361	MGITGMIYMTVMSLIVLILSSSTVGFDFYDFQFTQQYQPAACNSNPTCKDPPDKLEFVHGLWPSNNGSDPKKCKAT	---	ILNPQIT-DLKAQLEIIWPNVFN	NRKAHVSF	WRKQWRKH 116
PcS107	AB236431	MGITGMIYMTVMSLIVLILSSSTVGFDFYDFQFTQQYQPAACNSNPTCKDPPDKLEFVHGLWPSNNGSDPKKCKAT	---	ILNPQIT-DLKAQLEIIWPNVFN	NRKAHVSF	WRKQWRKH 115
PcS108	AB236427	MGITGMIYMTVMSLIVLILSSSTVGFDFYDFQFTQQYQPAACNSNPTCKDPPDKLEFVHGLWPSNNGSDPKKCKAT	---	ILNPQIT-DLKAQLEIIWPNVFN	NRKAHVSF	WRKQWRKH 116
PcS109	AB258364	MGITGMIYMTVMSLIVLILSSSTVGFDFYDFQFTQQYQPAACNSNPTCKDPPDKLEFVHGLWPSNNGSDPKKCKAT	---	ILNPQIT-DLKAQLEIIWPNVFN	NRKAHVSF	WRKQWRKH 116
PcS110	AB258360	MGITGMIYMTVMSLIVLILSSSTVGFDFYDFQFTQQYQPAACNSNPTCKDPPDKLEFVHGLWPSNNGSDPKKCKAT	---	ILNPQIT-DLKAQLEIIWPNVFN	NRKAHVSF	WRKQWRKH 116
PcS111	AB258365	MGITGMIYMTVMSLIVLILSSSTVGFDFYDFQFTQQYQPAACNSNPTCKDPPDKLEFVHGLWPSNNGSDPKKCKAT	---	ILNPQIT-DLKAQLEIIWPNVFN	NRKAHVSF	WRKQWRKH 116
PcS112	AB236424	MGITGMIYMTVMSLIVLILSSSAVKFDYDFQFTQQYQPAACNSNPTCKDPPDKLEFVHGLWPSNNGSDPKKCKAT	---	ILNPQIT-DLKAQLEIIWPNVFN	NRKAHVSF	WRKQWRKH 116
PcS113	AB258366	MGITGMIYMTVMSLIVLILSSSAAYKDYDFQFTQQYQPAACNSNPTCKDPPDKLEFVHGLWPSNNGSDPKKCKAT	---	ILNPQIT-DLKAQLEIIWPNVFN	NRKAHVSF	WRKQWRKH 117
PcS114	AB258359	MGITGMIYMTVMSLIVLILSSSAAYKDYDFQFTQQYQPAACNSNPTCKDPPDKLEFVHGLWPSNNGSDPKKCKAT	---	ILNPQIT-DLKAQLEIIWPNVFN	NRKAHVSF	WRKQWRKH 116
PcS115	AB258362	MGITGMIYMTVMSLIVLILSSSTVGFDFYDFQFTQQYQPAACNSNPTCKDPPDKLEFVHGLWPSNNGSDPKKCKAT	---	ILNPQIT-DLKAQLEIIWPNVFN	NRKAHVSF	WRKQWRKH 116
PcS116	AB258363	MGITGMIYMTVMSLIVLILSSSTVGFDFYDFQFTQQYQPAACNSNPTCKDPPDKLEFVHGLWPSNNGSDPKKCKAT	---	ILNPQIT-DLKAQLEIIWPNVFN	NRKAHVSF	WRKQWRKH 116
PcS117	AY261994	-----FTQQYQPAACNSNPTCKDPPDKLEFVHGLWPSNNGSDPKKCKAT	---	ILNPQIT-DLKAQLEIIWPNVFN	NRKAHVSF	WRKQWRKH 84
PcS120	E0118758	-----AVCNFTPTCKDPPDKLEFVHGLWPSNNGSDPKKCKAT	---	ILNPQIT-DLKAQLEIIWPNVFN	NRKAHVSF	WRKQWRKH 75
PcS121	E0477839	MGITGMIHIVTMSLIVLILSSSTVGFDFYDFQFTQQYQPAACNSNPTCKDPPDKLEFVHGLWPSNNGSDPKKCKAT	---	ILNPQIT-DLKAQLEIIWPNVFN	NRKAHVSF	WRKQWRKH 116
PcS122	E0118760	-----AVCNFTPTCKDPPDKLEFVHGLWPSNNGSDPKKCKAT	---	ILNPQIT-DLKAQLEIIWPNVFN	NRKAHVSF	WRKQWRKH 76
PcS123	E0118761	-----AVCNFTPTCKDPPDKLEFVHGLWPSNNGSDPKKCKAT	---	ILNPQIT-DLKAQLEIIWPNVFN	NRKAHVSF	WRKQWRKH 77
PcS124	E0118762	-----AVCNFTPTCKDPPDKLEFVHGLWPSNNGSDPKKCKAT	---	ILNPQIT-DLKAQLEIIWPNVFN	NRKAHVSF	WRKQWRKH 77
PcS125	E0855799	-----AVCNFTPTCKDPPDKLEFVHGLWPSNNGSDPKKCKAT	---	ILNPQIT-DLKAQLEIIWPNVFN	NRKAHVSF	WRKQWRKH 76
PcS127		-----AVCNFTPTCKDPPDKLEFVHGLWPSNNGSDPKKCKAT	---	ILNPQIT-DLKAQLEIIWPNVFN	NRKAHVSF	WRKQWRKH 75

	RC4	C5		
PcS101	AB236428	GTCCGYPTIKDKNHLYQTVIKMYITKQKNSVLSLAKANINPDGIGRTRKLIENAIRNGTNDREPKLKCKQ-NNGTIELVEVS	---LCSNYLKGKHFINCNPKI	PQGSRYFCPIKDIQY 232
PcS102	AB236425	GTCCGYPTIKDKNHLYQTVIKMYITKQKNSVLSLAKANINPDGIGRTRKLIENAIRNGTNDREPKLKCKQ-NNGTIELVEVS	---LCSNYLKGKHFINCNPKI	PQGSRYFCPIKDIQY 229
PcS103	AB236432	GTCCGYPTIADDMHYFETVIRMYITKQKNSVLSLAKANINPDGIGRTRKLIENAIRNGTNDREPKLKCKQ-NNGTIELVEVS	---	LCSNYLKGKHFINCNPKI 228
PcS104	AB236429	GTCCGYPTIADDMHYFETVIRMYITKQKNSVLSLAKANINPDGIGRTRKLIENAIRNGTNDREPKLKCKQ-NNGTIELVEVS	---	LCSNYLKGKHFINCNPKI 226
PcS105	AB236430	GTCCGYPTIADDMHYFETVIRMYITKQKNSVLSLAKANINPDGIGRTRKLIENAIRNGTNDREPKLKCKQ-NNGTIELVEVS	---	LCSNYLKGKHFINCNPKI 228
PcS106	AB258361	GTCCGYPTIADDMHYFETVIRMYITKQKNSVLSLAKANINPDGIGRTRKLIENAIRNGTNDREPKLKCKQ-NNGTIELVEVS	---	LCSNYLKGKHFINCNPKI 227
PcS107	AB236431	GTCCGYPTIADDMHYFETVIRMYITKQKNSVLSLAKANINPDGIGRTRKLIENAIRNGTNDREPKLKCKQ-NNGTIELVEVS	---	LCSNYLKGKHFINCNPKI 227
PcS108	AB236427	GTCCGYPTIADDMHYFETVIRMYITKQKNSVLSLAKANINPDGIGRTRKLIENAIRNGTNDREPKLKCKQ-NNGTIELVEVS	---	LCSNYLKGKHFINCNPKI 227
PcS109	AB258364	GTCCGYPTIADDMHYFETVIRMYITKQKNSVLSLAKANINPDGIGRTRKLIENAIRNGTNDREPKLKCKQ-NNGTIELVEVS	---	LCSNYLKGKHFINCNPKI 227
PcS110	AB258360	GTCCGYPTIADDMHYFETVIRMYITKQKNSVLSLAKANINPDGIGRTRKLIENAIRNGTNDREPKLKCKQ-NNGTIELVEVS	---	LCSNYLKGKHFINCNPKI 228
PcS111	AB258365	GTCCGYPTIADDMHYFETVIRMYITKQKNSVLSLAKANINPDGIGRTRKLIENAIRNGTNDREPKLKCKQ-NNGTIELVEVS	---	LCSNYLKGKHFINCNPKI 228
PcS112	AB236424	GTCCGYPTIADDMHYFETVIRMYITKQKNSVLSLAKANINPDGIGRTRKLIENAIRNGTNDREPKLKCKQ-NNGTIELVEVS	---	LCSNYLKGKHFINCNPKI 228
PcS113	AB258366	GTCCGYPTIADDMHYFETVIRMYITKQKNSVLSLAKANINPDGIGRTRKLIENAIRNGTNDREPKLKCKQ-NNGTIELVEVS	---	LCSNYLKGKHFINCNPKI 229
PcS114	AB258359	GTCCGYPTIADDMHYFETVIRMYITKQKNSVLSLAKANINPDGIGRTRKLIENAIRNGTNDREPKLKCKQ-NNGTIELVEVS	---	LCSNYLKGKHFINCNPKI 228
PcS115	AB258362	GTCCGYPTIADDMHYFETVIRMYITKQKNSVLSLAKANINPDGIGRTRKLIENAIRNGTNDREPKLKCKQ-NNGTIELVEVS	---	LCSNYLKGKHFINCNPKI 228
PcS116	AB258363	GTCCGYPTIADDMHYFETVIRMYITKQKNSVLSLAKANINPDGIGRTRKLIENAIRNGTNDREPKLKCKQ-NNGTIELVEVS	---	LCSNYLKGKHFINCNPKI 226
PcS117	AY261994	GTCCGYPTIADDMHYFETVIRMYITKQKNSVLSLAKANINPDGIGRTRKLIENAIRNGTNDREPKLKCKQ-NNGTIELVEVS	---	LCSNYLKGKHFINCNPKI 179
PcS120	E0118758	GTCCGYPTIADDMHYFETVIRMYITKQKNSVLSLAKANINPDGIGRTRKLIENAIRNGTNDREPKLKCKQ-NNGTIELVEVS	---	LCSNYLKGKHFINCNPKI 148
PcS121	E0477839	GTCCGYPTIADDMHYFETVIRMYITKQKNSVLSLAKANINPDGIGRTRKLIENAIRNGTNDREPKLKCKQ-NNGTIELVEVS	---	LCSNYLKGKHFINCNPKI 227
PcS122	E0118760	GTCCGYPTIADDMHYFETVIRMYITKQKNSVLSLAKANINPDGIGRTRKLIENAIRNGTNDREPKLKCKQ-NNGTIELVEVS	---	LCSNYLKGKHFINCNPKI 150
PcS123	E0118761	GTCCGYPTIADDMHYFETVIRMYITKQKNSVLSLAKANINPDGIGRTRKLIENAIRNGTNDREPKLKCKQ-NNGTIELVEVS	---	LCSNYLKGKHFINCNPKI 151
PcS124	E0118762	GTCCGYPTIADDMHYFETVIRMYITKQKNSVLSLAKANINPDGIGRTRKLIENAIRNGTNDREPKLKCKQ-NNGTIELVEVS	---	LCSNYLKGKHFINCNPKI 151
PcS125	E0855799	GTCCGYPTIADDMHYFETVIRMYITKQKNSVLSLAKANINPDGIGRTRKLIENAIRNGTNDREPKLKCKQ-NNGTIELVEVS	---	LCSNYLKGKHFINCNPKI 150
PcS127		GTCCGYPTIADDMHYFETVIRMYITKQKNSVLSLAKANINPDGIGRTRKLIENAIRNGTNDREPKLKCKQ-NNGTIELVEVS	---	LCSNYLKGKHFINCNPKI 151

شکل ۲. هم‌تراز سازی توالی‌های پروتئین S-RNase (PcS101-PcS125) گلایی اروپایی و آلل جدید پیشنهادی PcS127، پنج ناحیه عمومی حفاظت شده (C1, C2, C3, C5) و یک ناحیه بسیار متغییر (RHV) پررنگ شده است.

گلایی بسیار حائز اهمیت است، چرا که؛ اطمینان از انتخاب ترکیبات سازگار در باغ‌ها و انتخاب والدین مناسب برای تلاقی‌های کنترل شده را تضمین می‌کند. درحالی‌که 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 گلایی اروپایی گزارش شده است؛ این آلل‌ها به صورت PcS101 تا PcS125، به‌منظور جلوگیری از تداخل اسمی با گلایی ژاپنی، نام‌گذاری شده‌اند (۱۰). قابل ذکر است که، آلل PcS118 با PcS112 یکسان است و آلل PcS119 نوترکیب یا محصول مصنوعی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز است. در این پژوهش، روش مبنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ارائه شده توسط سازول (۲۲) برای ثبت ژنومی آلل‌های خودناسازگاری در ژنوتیپ‌های ایرانی استفاده شد. شش آلل -S؛ PcS101، PcS102، PcS104، PcS110، PcS113، PcS120 و براساس اندازه باندهای تولید شده توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز عمومی شناسایی شد، ۱۴ آلل دیگر؛ PcS103، PcS105، PcS106، PcS107، PcS108، PcS109، PcS111، PcS112، PcS114، PcS115، PcS121، PcS122، PcS123 و PcS124 با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز اختصاصی شناسایی شد. آغازگرهای اختصاصی دیگر برای تکثیر آلل‌های PcS116، PcS117 و PcS125 برای تکمیل محدوده آلل‌های S - شناخته شده در گلایی اروپایی توسعه یافتند. علاوه بر این، در این آزمایش از آغازگرهای اختصاصی، برای شناسایی آلل‌های

PpS₁ تا PpS₉ در گلابی ژاپنی به کار رفت، زیرا گلابی ژاپنی ردپای معنی داری در ژرم پلاسم گلابی های ایرانی به جای گذاشته است (۹). براساس روش مبتنی بر واکنش زنجیره ای پلی مرز، ثبت ژنومی آلل های 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 آلل های S- اختصاصی در ارقام کنترل بودند که نشان دهنده کارایی بالا و موفقیت آمیز 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- آلل های PcS₁₀₁/PcS₁₁₉ گزارش شده بود (۱۰ و ۲۷)؛ بعداً فرض شد که PcS₁₁₉ محصول مصنوعی واکنش زنجیره ای پلی مرز و یا آلل نوترکیب است (۲۱). براساس نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر، این رقم دارای ترکیب آلی PcS₁₀₁/PcS₁₀₄ است و دیگری رقم کونسیلر آلاکوئر بود که در گزارشات قبلی دارای آلل های PcS₁₀₃/PcS₁₂₃ است (۲۲) اما نتایج این پژوهش نشان داد که این رقم دارای آلل سوم PcS₁₀₅ است. این نتایج با تجزیه های سیتولوژی سال ۱۹۶۰ (۳۰ و ۳۷) که این رقم را تری پلوئید معرفی کرده است، مطابقت دارد.

آلل های خودناسازگاری در ژنوتیپ های ایرانی دارای ترکیب آلی متفاوتی از ارقام و ژنوتیپ های اروپایی است و نشان دهنده ردپای ترکیب ژنتیکی معنی دار گونه های دیگر است. در هشت ژنوتیپ، حضور آلل گلابی ژاپنی (PpS₈) نشان داده شد؛ علاوه بر این، آلل PcS₁₂₇ که قبلاً گزارش نشده بود در ژرم پلاسم ایرانی یافت شد. این مطالعه به عنوان اولین گزارش در ثبت ژنومی آلل های خودناسازگاری ژنوتیپ های گلابی ایران، اطلاعات مهمی را برای پرورش دهندگان و به نژادگران گلابی فراهم می سازد. براساس نتایج این پژوهش، تعدادی از ترکیبات دگر ناسازگار که دارای ترکیبات S- آلل یکسانی هستند مانند؛ ژنوتیپ ۳۹ و ژنوتیپ ۴۳ با ترکیب آلی PcS₁₀₄/PcS₁₂₇ و ژنوتیپ ۷۳ و ژنوتیپ ۸۲ با ترکیب آلی PcS₁₂₂/PcS₁₂₄ و هم چنین لوئیس بونه دجرسی و کوشیا با ترکیب آلی PpS₁ تا PpS₉ در گلابی ژاپنی به کار رفت، زیرا گلابی ژاپنی ردپای معنی داری در ژرم پلاسم گلابی های ایرانی به جای گذاشته است (۹). براساس روش مبتنی بر واکنش زنجیره ای پلی مرز، ثبت ژنومی آلل های 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 آلل های S- اختصاصی در ارقام کنترل بودند که نشان دهنده کارایی بالا و موفقیت آمیز 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- آلل های PcS₁₀₁/PcS₁₁₉ گزارش شده بود (۱۰ و ۲۷)؛ بعداً فرض شد که PcS₁₁₉ محصول مصنوعی واکنش زنجیره ای پلی مرز و یا آلل نوترکیب است (۲۱). براساس نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر، این رقم دارای ترکیب آلی PcS₁₀₁/PcS₁₀₄ است و دیگری رقم کونسیلر آلاکوئر بود که در گزارشات قبلی دارای آلل های PcS₁₀₃/PcS₁₂₃ است (۲۲) اما نتایج این پژوهش نشان داد که این رقم دارای آلل سوم PcS₁₀₅ است. این نتایج با تجزیه های سیتولوژی سال ۱۹۶۰ (۳۰ و ۳۷) که این رقم را تری پلوئید معرفی کرده است، مطابقت دارد.

PcS₁₀₃/PcS₁₀₄ نباید به عنوان والدین برای برنامه های به نژادی و یا کاشت در یک باغ به کار رود چرا که از نظر ژنتیکی دگر ناسازگار بوده و قادر به گرده افشانی همدیگر نبوده و به کاهش میوه و عملکرد در باغ می انجامد.

آلل جدید شناسایی شده در نه ژنوتیپ ایرانی از گونه *P. communis* (PcS₁₂₇) در سطح اسید آمینه با آلل S₁₉ گونه *P. bretschneideri* × *P.* یکسان است. در تئوری، این آلل جدید یا در گونه *P. communis* تکامل یافته و یا در این گونه از طریق دورگ گیری طبیعی وارد شده است. به هر حال، در گونه گلابی اطمینان کامل از منشاء آلل در گونه به دلیل وجود خودناسازگاری گامتوفیتی بسیار بالا و توانایی تلاقی های بین گونه ای، امکان پذیر نیست. در پژوهش های جریانات ژنی در محصول ها، معمولاً جمعیت های طبیعی خالص (Pure) به عنوان مواد استاندارد و کنترل در نظر گرفته می شوند، اما با توجه به اینکه در گلابی مانعی برای دورگ گیری به دلیل خودناسازگاری بالا و توانایی تلاقی های بین گونه ای وجود ندارد، یافتن جمعیت های خالص امکان پذیر نیست (۱۲). علاوه بر این، شباهت زیاد توالی با آلل های جنس های دیگر نمی تواند ضرورتاً تأیید کننده این موضوع باشد که این آلل ها در جنس *P. communis* از طریق دورگ گیری وارد شده اند، در حقیقت؛ ژن های S-locus تحت تأثیر انتخاب طولانی مدت متعادل وابسته به تکرر (۳۶) و پدیده تکامل درون گونه ای (۱۳) هستند. بدین معنی که، یک آلل اجدادی در گونه های متفاوت و حتی جنس برای مدت طولانی بعد از تفرق، تقریباً ماهیت خود را حفظ می کند و قابل شناسایی است و در نتیجه، تشابه بین آلل های گونه های موجود در مقایسات بین گونه ای بیشتر از درون گونه ای است (۶). بنابراین؛ یافتن آلل های خودناسازگاری مشابه یا تقریباً مشابه در گونه های متفاوت اما مرتبط غیر معمول نیست. برای تأیید وجود آلل جدید PcS₁₂₇ پیشنهاد می شود آزمایش های دگر گرده افشانی بین ارقام و ژنوتیپ های دارای آلل PcS₁₂₇ این پژوهش با رقم *P. bretschneideri* × *P.* دارای آلل S₁₉ برای بررسی نتایج ترکیبات سازگار و دگر سازگار انجام گیرد.

فرض شود حتی آلل جدید PcS₁₂₇ 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 PpS₈ همراه است که نشان می‌دهد این گیاهان از زیر گروه یا جمعیتی حاصل شده‌اند که سهم *P. pyrifolia syn. P. serotina* در دورگ‌گیری بسیار برجسته 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 به‌دست آمده از تجزیه آلل‌های خودناسازگاری ژنوتیپ‌های وحشی ایران، فرضیه دورگ‌گیری را به‌عنوان 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. به‌خاطر تنوع ژنتیکی بالا و وجود آلل‌های جدید، ژرم‌پلاسم ایران به‌عنوان مناسب‌ترین منبع تنوع برنامه‌های به‌نژادی است.

سپاسگزاری

نویسندگان مایل هستند از دکتر سانزول، دکتر محمد نقی پاداشت و مهندس مهشید هناره به‌دلیل 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.

به‌هرحال، شواهدی فرضیه دورگ‌گیری را به‌عنوان منشأ آلل PcS₁₂₇ 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 به‌طور 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 *P. pyrifolia syn. P. serotina* کشورهای آسیای شرقی در ارتباط بودند.

در کل، ایران یکی از مناطق دورگ‌گیری *P. communis* با *P. pyrifolia syn. P. korshinskyi* و *P. × bretschneideri* می‌باشد (۱۶). به‌این دلیل انتظار می‌رود که دورگ‌گیری با گلابی‌های آسیای شرق و جریان‌های 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 S₈ گونه *P. pyrifolia syn. P. serotina* در هشت ژنوتیپ وحشی به‌طور واضح ثابت شد. هم‌چنین، توالی آلل جدید PcS₁₂₇، با آلل S₁₉ گونه *P. × bretschneideri* مطابقت داشت، این گونه ابتدا تصور می‌شد که از دورگ‌گیری *P. pyrifolia syn. P. serotina* با *P. ussuriensis* (۳۲) یا *P. betulaefolia* ناشی شده است (۴). تجزیه‌های اخیر با نشانگرهای مولکولی، خویشاوندی نزدیک گلابی‌های ژاپنی و چینی را نشان داده است، بنابراین به نویسندگان این امکان را می‌دهد که *P. × bretschneideri* را به عنوان زیرگونه *P. pyrifolia syn. P. serotina* دانسته و نام آن را به *P. serotina var. sinensis* تغییر دهند (۱ و ۲۹). البته قضاوت تنها براساس آلل‌های خودناسازگاری قطعیت ندارد و حتماً باید براساس نشانگرهای اختصاصی و انگشت‌نگاری ژنتیکی مثل ریزماهورها اثبات گردد. بنابراین منطقی است که

منابع مورد استفاده

1. 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.
2. Boksaczanin, 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Entani, T., S. Takayama and A. Isogal. 2003. Molecular mechanism of the S-RNase mediated self-incompatibility system. *Plant and Cell Physiology* 44: 20-120.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Kole, C. 2011. Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources Temperate Fruits. Springer Heidelberg Dordrecht, Berlin.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. Saito, T., Y. Sato, Y. Sawamura, M. Shoda, T. Takasaki-Yasuda and K. Kotobuki. 2011. Dual recognition of S₁ and S₄ pistils by S₄sm pollen in self-incompatibility of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia Nakai*). *Tree Genetics and Genomes* 8(4): 689–694.
21. 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.
22. 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.
23. 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. *Journal of American Society Horticultural Science* 133(2): 213–224.
24. Sassa, H, T. Nishio, Y. Kowiyama, 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, L., 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.