

## شناسایی آلل‌های خودناسازگاری شماری از ارقام گلابی بومی ایران

### Identification of Self-Incompatibility Alleles in some Iranian Native Pear Cultivar

فائزه بابائی<sup>۱</sup>، حمید عبداللهی<sup>۲</sup> و شهاب حاج منصور<sup>۳</sup>

۱ و ۳- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و مربی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات،

گروه بیوتکنولوژی، تهران

۲- دانشیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۸/۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۳/۱۲

#### چکیده

بابائی، ف.، عبداللهی، ح. و حاج منصور، ش. ۱۳۹۱. شناسایی آلل‌های خودناسازگاری شماری از ارقام گلابی بومی ایران. مجله به‌نژادی نهال و بذر ۲۸-۲۱۴: ۲۰۱-۲۰۱.

باردهی درخت گلابی (*Pyrus communis* L.) تحت تاثیر عوامل متعدد ژنتیکی و محیطی قرار می‌گیرد. ارقام گلابی دارای خودناسازگاری گامتوفیتی تحت کنترل مکان ژنی S هستند بنابراین کشت ارقام گرده‌زای مناسب با سازگاری گرده در باغ ضروری است. این تحقیق با هدف شناسایی آلل‌های خودناسازگاری پنج رقم بومی گلابی ایرانی شامل ارقام درگزی، کنجونی، بیروتی، قوسی و آمرود-۲ با استفاده از روش PCR انجام شد. بدین منظور DNA ژنومی ارقام استخراج و پس از ارزیابی کمی و کیفی، آلل‌های S آن‌ها با جفت آغازگرهای اختصاصی از پیش طراحی شده Sall-F و Sall-R1 و آغازگرهای طراحی شده با استفاده از خطی کردن آلل‌های S گونه‌های مختلف گلابی، شامل جفت آغازگر FB-F و FB-R1 و جفت آغازگر لانه گزینی شده FB-F و FB-R2 تکثیر شدند. برای تفکیک دقیق آلل‌ها، الگوی نواری قطعات تکثیری پس از هضم با آنزیم‌های برشی EcoRI، DraI، MspI و HaeIII با الگوی مورد انتظار مقایسه شد. از میان ارقام مورد بررسی، جفت آغازگرهای مورد استفاده توانستند آلل‌های S را در کلیه ارقام تکثیر و مجموعاً شش نوع آلل شامل S1 (Se, Sj) در ارقام قوسی، بیروتی و آمرود-۲، S2 (SI) در رقم درگزی، S4 (Sb) در ارقام بیروتی و درگزی، S5 (Sa) در رقم کنجونی، S13 (St) در رقم قوسی و S42 در رقم کنجونی شناسایی شدند. نتایج نشان‌دهنده حضور آلل نادر S42 متعلق به گونه گلابی یوزوری (*Pyrus ussuriensis* Maxim.) با منشاء منچوری چین در رقم کنجونی بود که اولین گزارش حاکی از وجود جریان ژنی این گونه در ارقام کشور است.

واژه‌های کلیدی: گلابی، آلل‌های S، آنزیم برشی، PCR.

## مقدمه

دوره‌ی گلدهی (Verma and Jindal, 1997) و خودناسازگاری (Crane and Lewis, 1942) است. در صورت وجود ناسازگاری، با وجود زنده بودن هر دو عضو جنسی، دانه‌گرده قادر به باروری مادگی نبوده و بنابراین از عوامل مهم محدود کننده تولید میوه به شمار می‌آید (Hiratsuka and Zhang, 2002). سیستم خودناسازگاری در گیاه گلابی همومورفیک و از نوع گامتوفیتیک است که توسط مکان ژنی S با چندین آلل کنترل شده (De Nettancourt, 2001) و در آن رشد گرده‌ی حامل آلل S در خامه گیاه دیپلوئید دارند S- آلل مشابه ممانعت می‌شود (Zhang and Xue, 2008). بنابراین به‌منظور پیشگیری از تلاقی‌های بی‌ثمر یا کم‌ثمر، افزایش تولید میوه و همچنین امکان انجام تلاقی‌های مناسب در طرح‌های به‌نژادی، شناسایی ژنوتیپ‌های خودناسازگار و دگرناسازگار ضروری است (Tehrani and Lay, 1988).

پیشرفت درک بشر در خصوص خودناسازگاری از اواسط دهه ۱۹۹۰ میلادی سرعت گرفت. تاکنون از روش‌های متعددی از جمله استفاده از گرده‌افشانی کنترل شده به‌منظور بررسی میزان تشکیل میوه (Sadat Mousavi, 2009) و بررسی رشد لوله‌گرده در تخمدان (Kaufman and Rumpunen, 2002)؛ روش‌های مبتنی بر PCR (Kushesh Saba, 2004)؛ کوشش‌ها، ۲۰۰۴؛

گلابی از خانواده گلسرخیان (Rosaceae) و زیر خانواده دانه‌دارها (Pomoideae) است (Westwood, 1993) و پس از سیب مهم‌ترین گیاه دانه‌دار ایران و جهان محسوب می‌شود. ارقام تجارتي گلابی عمدتاً در دو گروه اصلی اروپایی (*Pyrus communis* L.) و آسیایی (*P. pyrifolia* Rehd.) قرار می‌گیرند. ارقام اروپایی بومی شرق اروپا و غرب آسیا هستند و بیش‌ترین سطح زیر کشت را در انواع تجاری جهان دارند. بافت میوه در بیشتر ارقام این گونه نرم و آبدار بوده و بافت شنی کمتر در آن‌ها دیده می‌شود. در مقابل ارقام دیگری معروف به گلابی شنی (Sand pear) یا گلابی آسیایی (Asian pear) در سطح محدودتری کشت و کار می‌شوند که با داشتن سلول‌های سنگی فراوان در بافت میوه، برگ‌های بزرگ و گسترده و قدرت رشد زیادتر، از انواع اروپایی متمایز می‌شوند (Abdollahi, 2011). میوه در ارقام مختلف این گروه سیبی شکل، آبدار، دارای بافت ترد و سفت و رنگ پوست از زرد تا قرمز متمایل به قهوه‌ای دیده می‌شود (Arzani, 2002).

میوه‌دهی در گلابی و بسیاری از دیگر اعضای خانواده گلسرخیان نظیر سیب، بادام، آلو، زردآلو و گیلاس، متأثر از چندین فاکتور ژنتیکی و محیطی (Gu et al., 2009) نظیر طول درجه حرارت زمستان (Saure, 1985; Ruck, 1975) هم‌زمانی

*Sa*، *Sr* و *Sg* عنوان شده است (Goldway *et al.*, 2009؛ Zuccherelli *et al.*, 2002).

ارقام گلابی موجود در کلکسیون ملی گلابی ایستگاه تحقیقات باغبانی موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کشور شامل ۵۶ رقم وارداتی و ۳۸ رقم بومی است که این تحقیق با هدف شناسایی آلل‌های خودناسازگاری پنج رقم بومی این کلکسیون با استفاده از روش PCR انجام شد. بررسی نتایج حاصل از آن‌ها راه را برای انتخاب صحیح‌تر والد گرده دهنده و مادری جهت استفاده در پژوهش‌های به‌نژادی و افزایش ثمردهی باغ‌های این ارقام فراهم خواهد کرد.

#### مواد و روش‌ها

ارقام گلابی مورد استفاده در این تحقیق پنج رقم بومی شامل ارقام بیرونی، درگزی، کنجونی، قوسی و آمرود-۲ موجود در ایستگاه تحقیقاتی کمال‌شهر وابسته به بخش تحقیقات باغبانی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر بودند. به منظور استخراج DNA ژنومی، برگ‌های جوان و سالم در آخر اردیبهشت ماه برداشت و تا زمان استخراج، در ۷۰- درجه‌سانتی‌گراد نگهداری شدند. با توجه به تجمع بالای ترکیبات پلی ساکاریدی و مواد فنلی در بافت‌های برگ‌ها برداشت شده، از روش تلفیقی CTAB-SDS به‌عنوان روش مناسب جهت استخراج DNA استفاده شد (Khoramdel Azad, 2008). خلوص و غلظت

گوو و همکاران، ۲۰۰۹؛ Mota *et al.*, 2007) و روش‌های بیوشیمیایی نظیر تجزیه گلیکوپروتئین‌های خامه (S-RNase) (Tomimoto *et al.*, 1996؛ Norioka *et al.*, 2007) برای مطالعه خودناسازگاری و دگرناسازگاری در گلابی استفاده شده است. اولین نتایج درباره ناسازگاری آللی در گلابی با کشف ریونوکلنازهای خامه در ارقام آسیایی به‌دست آمد (Sassa *et al.*, 1992). همچنین روش PCR-RFLP برای تعیین S-ژنوتیپ‌های گلابی‌های آسیایی توسط ایشیموزو در سال ۱۹۹۹ ابداع شد که بر پایه‌ی تکثیر PCR توالی c-DNA و هضم محصولات توسط آنزیم‌های برشی استوار بود (Ishimizu *et al.*, 1999).

مطالعه سیستم خودناسازگاری با استفاده از تکنیک PCR به‌عنوان یک روش سریع، ساده و دقیق، ضمن شناسایی نوع آلل‌های که امکان تفکیک ارقام سازگار از ناسازگار را فراهم می‌آورد. از طرفی نتایج اعلام شده در رابطه با نوع آلل‌های خودناسازگاری در ارقام مختلف گلابی تاکنون با تناقضاتی همراه بوده است به‌عنوان مثال سانزول و همکاران (Sanzol and Herrero, 2002) آلل‌های خودناسازگاری رقم گلابی توسکا (Tosca) را *SIS4* اعلام کردند، پنج سال بعد توسط موتا و همکاران (۲۰۰۷) آلل‌های *S2S4* در این رقم دیپلوئید گزارش شدند. همچنین آلل‌های خودناسازگاری رقم پاس کراسان (Passe Crassane) در پژوهش‌های مختلف

FB-R1 جهت ارزیابی صحت نوار تکثیری حاصل استفاده شد. به منظور ارزیابی دقیق تر نتایج به دست آمده با این آغازگرها و با توجه به این که اکثریت ارقام گلابی ایران از گونه اروپایی یا *P. communis* L. هستند، یک جفت آغازگر اختصاصی دیگر به نام های Sall-F و Sall-R (جدول ۱ و شکل ۱) بر اساس نتایج موتا و همکاران (۲۰۰۷) انتخاب شد. این جفت آغازگر قادر به شناسایی و تفکیک آلل های *Sh*، *Sl*، *Sm*، *Sn*، *Sp*، *Si*، *Sb*، *Sd*، *So*، *Sk*، *Sj* هستند (موتا و همکاران، ۲۰۰۷)، که به ترتیب ۳/۴، ۲۸/۲، ۴/۵، ۰/۴، ۴/۵، ۰/۲، ۱/۵، ۰/۸، ۱/۱ و ۱۵/۴ درصد از کلیه آلل های خودناسازگاری ارقام اروپایی (جدول ۲) را به خود اختصاص می دهند (گلدوی و همکاران، ۲۰۰۹). به منظور حصول اطمینان از صحت نوارهای تکثیر شده، جفت آغازگر FB-F و FB-R2، پس از هم ردیفی با محصول احتمالی واکنش Sall، به صورت لانه گزینی شده مورد استفاده قرار گرفت.

DNA استخراج شده به وسیله الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸٪ و سپس روش اسپکتروفتومتریک در طول موج های ۲۳۰، ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت و مقدار و غلظت DNA مورد نیاز هر نمونه جهت انجام PCR نهایی با یک آزمون RAPD بهینه سازی شد.

آغازگرهای اختصاصی، بر اساس توالی نوکلئوتیدی نواحی حفاظت شده ژن های خودناسازگاری (S-RNase) طراحی شد. به منظور دستیابی به این نواحی، کلیه آلل های S شناسایی و ودیعه گذاشته شده متعلق به جنس *Pyrus* در بانک اطلاعاتی از تارنمای NCBI جستجو و دریافت شد. بر اساس نتایج حاصل از هم ردیفی آلل ها در نرم افزار ClustalW2، سه ناحیه حفاظت شده انتخاب و با استفاده از نرم افزار OLIGO سه آغازگر FB-F، FB-R1 و FB-R2 (جدول ۱) روی این نواحی طراحی شد. جفت آغازگر FB-F و FB-R2 قادر به تکثیر کلیه آلل های خودناسازگاری بوده و از آن به صورت نیمه لانه گزینی شده روی محصول واکنش جفت آغازگر FB-F و



شکل ۱- ترتیب قرارگیری آغازگرهای Sall و FB روی ژن های خودناسازگاری گونه های مختلف گلابی

Fig. 1. Position of FB and Sall primer annealing on self-incompatibility alleles of various pear species

جدول ۱- توالی‌های نوکلئوتیدی آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده در تکثیر آلل‌های S ارقام گلابی

Table 1. Nucleotide sequences of primers used for S-alleles amplification of pear cultivars

آغازگرها	توالی نوکلئوتیدی	منبع
Primers	Nucleotide sequence	Reference
FB-F	5' - GATCCT(C/A)CTGACAA(G/A)TTGTT(T/C)AC - 3'	Designed in this research
FB-R1	5' - GCATTTTCAATATCCA(C/A)CAG -3'	Designed in this research
FB-R2	5' - CCAAATAATT(T/A)(C/T/G)CA(A/G)CTG(T/G)G -3'	Designed in this research
Sall-F	5' - TTTACGCAGCAATATCAGC -3'	Mota <i>et al.</i> , 2007
Sall-R	5' - TTTTG(T/C)TTC(T/C)(T/G/C)GGTT(G/A)TGTAC -3'	Mota <i>et al.</i> , 2007

جدول ۲- آلل‌های S جنس گلابی (Pyrus) و تخمین طول قطعه‌ی تکثیری آن‌ها با استفاده از

آغازگرهای Sall و FB

Table 2. S-alleles of pear genus (Pyrus) and estimated length of amplified region by Sall and FB primers

آلل‌ها - Alleles	طول قطعه‌ی تکثیری - Amplified template length		
	Sall-F/ Sall-R1	FB-F/ FB-R1	FB-F/ FB-R2
<i>S1(Se,Sj)Com.</i> <sup>1</sup>	1134	-	936
<i>S2(Sl)Com.</i>	1547/1378	-	1352
<i>S3(Sk)Com.</i>	1410	-	1212
<i>S22Com.=S3(Sk)Py.</i> <sup>2</sup>	512	532	314
<i>S4(Sb)Com.</i>	576	596	384
<i>S4(Sb)Py.</i>	504	524	306
<i>S5(Sa)Com.</i>	480	501	283
<i>S5(Sa)Py.</i>	512	532	314
<i>S7(Sh)Com.</i>	480	501	283
<i>S8(Sd)Com.</i>	504	-	307
<i>S8(Sd)Py.</i>	569	590	372
<i>S9(Sp)Com.</i>	473	494	276
<i>S11(Ss)Com.</i>	502	523	305
<i>S11(Ss)Py.</i>	-	-	307
<i>Sq Com.=S12Com.</i>	1419	-	1220
<i>S12Py.</i>	-	-	473
<i>S13(St)Com.</i>	-	-	1580
<i>S13Py.</i>	486	506	288
<i>S14(Sc)Com.</i>	474	-	272
<i>S18(Sr)Com.</i>	489	-	291
<i>S18(Sr)Py.</i>	-	-	1362
<i>S21Com.</i>	489	509	291
<i>S35Ussu.</i> <sup>3</sup>	-	-	316
<i>S42 Ussu.</i>	664	-	467
<i>Sm Com</i>	486	-	288
<i>Sn Com</i>	498	518	300
<i>So Com.</i>	1427	1447	1229

<sup>1</sup> Com.: *P.communis*, <sup>2</sup> Py.: *P.pyrifolia*, <sup>3</sup> Ussu.: *P.ussuriensis*

۲ تا ۴ با تکرار ۴۰ و ۳۵ چرخه به ترتیب برای PCR و FB-F/FB-R1 اجرا شد. واکنش داخلی با جفت آغازگر لانه‌گزینی شده همانند واکنش اول به استثناء ۰/۲ نانوگرم DNA تکثیر شده و ۱ میلی‌مولار کلرید منیزیم با همان پروفایل حرارتی در دمای اتصال ۵۹ درجه سانتی‌گراد اجرا شد. محصولات تکثیری واکنش‌ها به وسیله الکتروفورز در ژل آگارز ۲٪ در بافر TAE و ولتاژ ۶۵ ولت از یک دیگر تفکیک شده و در اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و زیر اشعه‌ی UV قابل رویت شدند. محاسبه وزن نوارها با استفاده از خط نشان <sup>۳۳۳</sup> bp ۱۰۰ انجام شد.

محصولات واکنش PCR در هر دو جفت آغازگر Sall-F و Sall-R1، FB-F و FB-R1 پس از تأیید صحت نوار تکثیر شده با استفاده از جفت آغازگر لانه‌گزینی شده، توسط ۴ آنزیم برشی *EcoRI*، *DraI*، *HaeIII* و *MspI* به طور جداگانه تیمار شدند. مخلوط واکنش برای هر محصول در حجم ۱۴ میکرولیتر برای ۳ آنزیم *EcoRI*، *MspI* و *HaeIII* و حجم ۱۵ میکرولیتر برای آنزیم *DraI*، با نسبت اجزاء ۵ میکرولیتر محصول PCR و آنزیم ۲ واحدی و بافر آن هر کدام به حجم ۱ میکرولیتر تهیه شده، به مدت ۵ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. ارزیابی نوارهای حاصل از هضم آنزیمی همانند مرحله قبل روی ژل آگاروز ۲٪ انجام شد.

برای بررسی آلل‌های خودناسازگاری از روش PCR و مقایسه طول نوارهای حاصل از آن استفاده شد. واکنش PCR اول با جفت آغازگرهای FB، در حجم ۲۵ میکرولیتر با اجزاء واکنش شامل ۵۰ نانوگرم DNA الگو، ۲/۷۵ میکرولیتر بافر PCR ۱۰ برابر، ۲/۵ میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۰/۶ میکرومولار از هر یک از آغازگرهای پیشرو و پیرو، ۰/۳ میلی‌مولار مخلوط نوکلئوتیدی و ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase ۵ واحدی انجام شد. همچنین واکنش PCR دوم با جفت آغازگرهای Sall، در حجم ۲۵ میکرولیتر با اجزاء واکنش ۵۰ نانوگرم DNA الگو، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR ۱۰ برابر، ۲ میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۰/۴ میکرومولار از هر یک از آغازگرهای پیشرو و پیرو، ۰/۲ میلی‌مولار مخلوط نوکلئوتیدی و ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase ۵ واحدی تهیه شده، در یک پروفایل حرارتی مطابق با ۳ دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه واسرشته‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ ثانیه در ۵۸ درجه سانتی‌گراد و ۱ دقیقه در ۵۲ درجه سانتی‌گراد به ترتیب برای جفت آغازگرهای FB-F/FB-R1 و Sall به‌عنوان دمای اتصال آغازگرها و ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت بسط واکنش و یک مرحله‌ی بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شده و مراحل

## نتایج و بحث

الکتروفورز محصول PCR مشخص کرد که آغازگرهای مورد استفاده (Sall و FB) مجموعاً توانسته‌اند آلل‌های خودناسازگاری را در کلیه ارقام مورد بررسی تکثیر کنند، ضمن آن که جفت آغازگر FB-F و FB-R2 طراحی شده در این تحقیق خود به تنهایی قادر به تکثیر تمامی آلل‌های S ارقام بودند. همچنین به منظور بررسی صحت توالی‌های تکثیر شده، از جفت آغازگر FB-F و FB-R2 به صورت لانه‌گزینی شده روی محصولات واکنش دو جفت آغازگر دیگر استفاده شده، طول نوارهای تکثیری حاصل با محصولات واکنش اول مقایسه شد.

از مجموع پنج رقم مورد مطالعه، در سه ژنوتیپ آللی در محدوده ۳۰۰ جفت باز با استفاده از جفت آغازگر FB-F و FB-R2 و ۵۰۰ جفت باز با استفاده از جفت آغازگر FB-F و FB-R1 و همچنین جفت آغازگر Sall-F و Sall-R1 تکثیر شد. همچنین آغازگرها در چهار رقم مورد مطالعه، قطعاتی به طول یک کیلوباز و بیش‌تر تکثیر کردند که حاکی از وجود آللی با محدوده‌ی اینترونی بزرگ‌تر اعم از آلل‌های S1، S2، S3، S10، Sq یا So بود. در دو رقم بیرونی و کنجونی نیز نوارهایی در محدوده ۶۰۰ جفت باز و بیش‌تر از آن توسط جفت آغازگر FB-F و FB-R1 و همچنین جفت آغازگر Sall-F و Sall-R1 تکثیر شدند. از طرفی در واکنش آغازگرهای FB-F و FB-R2 نوارهایی با طول ۴۰۰ جفت باز و بیش‌تر تکثیر شدند که

گویای حضور آلل S4 یا S8 و S42 یا احتمالاً S12 بود. همچنین در تمامی ارقام به جز رقم امروزه ۲- هر دو آلل خودناسازگاری توسط آغازگرهای مورد استفاده تکثیر شدند (جدول ۳). نتیجه حاصل از آزمون PCR داخلی روی محصول جفت آغازگرها صحت نتایج حاصل از تکثیر اولیه را تأیید کرد، از نوارهای حاصل برای واکنش آنزیمی با ۴ آنزیم برشی انتخابی *EcoRI*، *DraI*، *MspI* و *HaeIII* و برآورد نهایی نوع آلل خودناسازگاری ارقام استفاده شد.

در رقم بیرونی ضمن در نظر گرفتن طول نوارهای اولیه مشخص شد که آنزیم *EcoRI* هیچ برشی روی آلل‌ها ایجاد نکرده است. همچنین آنزیم *MspI* حضور نوارهایی به طول ۱۰۸ و ۸۲۸ جفت باز و در واکنش آنزیمی *HaeIII* نوارهایی به طول ۷۰۵ و ۱۹۴ جفت باز و در واکنش *DraI* نوارهایی به طول ۶۷۵ و ۲۶۱ جفت باز حضور آلل S1 با منشأ *P. communis* را به اثبات رسانید. نوارهایی به طول ۱۹۷، ۹۵ و ۸۶ جفت باز نیز در واکنش *DraI* و ۳۴۱ و ۳۷ جفت باز در واکنش *MspI* حاکی از حضور آلل S4 با منشأ *P. communis* در این رقم بود. نتایج حاصل از هضم آنزیمی در رقم کنجونی، با در نظر گرفتن طول نوارهای اولیه، مشخص کرد که آنزیم *EcoRI* در این رقم نیز هیچ برشی روی آلل‌ها ایجاد نکرده است. همچنین آنزیم *MspI* حضور نوارهایی به طول ۳۰۸ و ۶ جفت باز و در واکنش آنزیمی

جدول ۳- آلل های S شناسایی شده ارقام مختلف گلابی بومی با استفاده از آغازگرهای Sall و FB

Table 3. Identified S-alleles in various native pear cultivars by using Sall and FB primers

رقم Cultivar	آغازگرهای Sall		آغازگرهای FB-R1 و FB-F		آغازگرهای FB-R2 و FB-F (لانه گزینی)		آلل S کاندید Candidate S-allele
	Sall primers		FB-F and FB-R1 primers		FB-F and FB-R2 primers (Nested)		
	طول نوار (bp) Band length (bp)	آلل S شناسایی شده Identified S -allele	طول نوار (bp) Band length (bp)	آلل S شناسایی شده Identified S -allele	طول نوار (bp) Band length (bp)	آلل S شناسایی شده Identified S -allele	
Beyrouti	570~	<i>S4(Sb)/ S8(Sd)</i>	590~	<i>S4(Sb)/ S8(Sd)</i>	380~	<i>S4(Sb)/ S8(Sd)</i>	<i>S4(Sb)/ S8(Sd)</i>
	1100~	<i>S1(Se,Sj)</i>	---	---	940~	<i>S1(Se,Sj)</i>	<i>S1(Se,Sj)</i>
Konjuni	650~	<i>S42</i>	---	---	450~	<i>S42/ S12</i>	<i>S42</i>
	>500	<i>S22=S3(Sk)/ S4(Sb)/ S5(Sa)/ S8(Sd)/ S11(Ss)/ S18(Sr)/ S21</i>	>500	<i>Sn/ S3(Sk)/ S11(Ss)/ S4(Sb)/ S5(Sa)/ S21/ S22=S3(Sk)</i>	>300	<i>S22=S3(Sk)/ S5a/ S5(Sa)/ S35</i>	<i>S5(Sa)/ S22=S3(Sk)</i>
Ghosi	1100~	<i>S1(Se,Sj)</i>	---	---	940~	<i>S1(Se,Sj)</i>	<i>S1(Se,Sj)</i>
	480~	<i>S9(Sp)/ Sm/ S5(Sa)/ S18(Sr)/ S13(Si)/ S14(Sc)/ S7(Sh)/ S21</i>	500~	<i>S13(St)/ S21/ S7(Sh)/ S5(Sa)/ S9(Sp)</i>	300>	<i>S5(Sa)/ Sm/ S24/ S7(Sh)/ S18/ S14(Sc)/ S34/ S13(Si)/ S7(Sh)/ S5(Sa) S9(Sp)/ S14(Sc)/ S21/ S18(Sr)</i>	<i>S13(St)/ S21/ S7(Sh)/ S5(Sa)</i>
Dargazi	>1500	<i>S2(Sl)</i>	---	---	1350~	<i>S2(Sl)</i>	<i>S2(Sl)</i>
	500~	<i>S4(Sb)/ S8(Sd)/ S11(Ss)/ Sn</i>	>500	<i>Sn/ S3(Sk)/ S11(Ss)/ S4(Sb)/ S5(Sa)/ S21/ S22=S3(Sk)</i>	300~	<i>S11(Ss)/ S4(Sb)/ S21/ S18(Sr)/ S6(Si)/ Sn/S8</i>	<i>S11(Ss)/ S4(Sb)</i>
Amroud-II	1100~	<i>S1(Se,Sj)</i>	---	---	940~	<i>S1(Se,Sj)</i>	<i>S1(Se,Sj)</i>



برش روی توالی‌ها، *MspI* نوارهایی به طول ۸۲۸ و ۱۰۸ جفت باز، آنزیم *HaeIII* نوارهایی به طول ۷۰۵ و ۱۹۴ جفت باز و در واکنش *DraI* نوارهایی به طول ۶۷۵ و ۲۶۱ جفت باز حضور آلل *SI* با منشأ *P. communis* را به قطعیت رسانید (جدول ۴).

بر اساس آنچه از نوع آلل‌های شناسایی شده در این پنج رقم به اثبات رسید نتیجه‌گیری می‌شود که به استثناء رقم آمروود-۲ که تنها یک آلل آن شناسایی شد، هیچ‌یک از این ارقام با یک‌دیگر ناسازگاری کامل ندارند و رقم آمروود-۲ با داشتن آلل *SI* با ارقام بیروتی و قوسی نیمه ناسازگار است. ارقام بیروتی و درگزی نیز به علت داشتن آلل *S4* با دو منشأ متفاوت با یک‌دیگر نیمه سازگار تا کاملاً سازگارند که برای تأیید میزان سازگاری این دو رقم می‌توان از آزمون‌های مزرعه‌ای و انجام تلاقی‌های مصنوعی کنترل شده بین دو رقم استفاده کرد. رقم کنجونی با تمامی این ارقام سازگار بوده و لذا می‌تواند به عنوان درخت گرده‌زا در باغی مرکب از این ارقام به کار رود. سازگاری بالای رقم کنجونی با دیگر ارقام به علت دارا بودن نوع متفاوت و کمیاب آلل خودناسازگاری *S42* با منشأ گونه *P. ussuriensis* و همچنین آلل نسبتاً کمیاب *S5* در آن است.

نکته قابل توجه در مورد آلل‌های خودناسازگاری شناسایی شده در ارقام بومی ایران وجود دو آلل *SI3* در گلابی رقم قوسی و

*HaeIII* نوارهایی به طول ۴۳۰، ۲۷۷ و ۳۷ جفت باز و در واکنش *DraI* نوارهایی به طول ۲۳۱، ۲۳۰، ۹۰، ۸۴، ۶۸ و ۳۳ جفت باز، مجموعاً حضور آلل‌های *S5* با منشأ *P. pyrifolia* و آلل نادر *S42* را با منشأ *P. ussuriensis* ثابت کرد.

در رقم قوسی نیز نتایج نشان داد شد که الگوی برشی آنزیم *EcoRI* با عدم توانایی در ایجاد برش روی توالی‌ها و همچنین حضور نوارهایی به طول ۸۲۸ و ۱۰۸ جفت باز در واکنش آنزیم *MspI* و نیز در واکنش آنزیمی *HaeIII* نوارهایی به طول ۷۰۵، ۲۴۹، ۱۹۴، ۳۹ و ۳۷ جفت باز و در واکنش *DraI* نوارهایی برابر با ۶۷۵ و ۲۶۱ جفت باز با آلل‌های *SI* با منشأ *P. communis* و آلل *S13* با منشأ *P. pyrifolia* مطابقت دارد.

نتایج حاصل از هضم آنزیمی در رقم درگزی نیز مشخص کرد که آنزیم *MspI* در این رقم هیچ برشی روی آلل‌ها ایجاد نکرده است. همچنین آنزیم *EcoRI* حضور نوارهایی به طول‌های ۲۱۷ و ۸۹ جفت باز و در واکنش آنزیمی *HaeIII* نوارهایی به طول ۷۹۴، ۵۲۱، ۲۶۹ و ۳۷ جفت باز و در واکنش *DraI* نوارهایی به طول ۷۱۲، ۲۶۸، ۲۲۷، ۲۲۲، ۸۹، ۸۴ و ۴۵ جفت باز مجموعاً حضور آلل‌های *S4* با منشأ *P. pyrifolia* و آلل *S2* را با منشأ *P. communis* ثابت کرد. در رقم آمروود-۲ نیز تأثیر آنزیم‌های برشی روی تنها آلل تکثیر شده این رقم با تبعیت نوارهای حاصل از الگوی برشی آنزیمی *EcoRI* با عدم توانایی در ایجاد

جدول ۴- تایید نهائی آلل‌های S شناسایی شده ارقام گلابی با استفاده از هضم آنزیم‌های برشی و بررسی طول قطعات

Table 4. Final confirmation of identified S-alleles in pear cultivars by using restriction enzymes and fragments length evaluation

رقم Cultivar	نوار آغازگرهای FB-F/ FB-R2 Bands of FB-F/ FB-R2 primers	طول نوارهای حاصل از هضم آنزیمی روی محصول PCR Band lengths obtained from restriction digest of PCR products				آلل S تایید شده Confirmed S-allele
		DraI	EcoRI	HaeIII	MspI	
Beyrouti	936	675, 261	---	705, 194, 37	828, 108	<i>S1(Se, Sj) Com.</i>
	378	197, 95, 86	---	341, 37	---	<i>S4(Sb) Com.</i>
Ghosi	936	675, 261	---	705, 194, 37	828, 108	<i>S1(Se, Sj) Com.</i>
	288	---	---	251, 37	---	<i>S13(St) Py.</i>
Dargazi	1352	712, 268, 227, 89, 45, 11	---	794, 521, 37	---	<i>S2(Sl) Com.</i>
	306	222,84	217, 89	269, 37	---	<i>S4(Sb)Py.</i>
Konjuni	467	231, 90, 68, 33	---	430, 37	---	<i>S42 Ussu.</i>
	314	230, 84	---	277, 37	308, 6	<i>S5 Py.</i>
Amroud-II	936	675, 261	---	705, 194, 37	828, 108	<i>S1(Se, Sj) Com.</i>
	---	---	---	---	---	---

که در بردارنده کوه‌های قفقاز و آسیای صغیر است و مرکز گونه *P. communis* است و در نهایت مرکز سوم که آسیای مرکزی است و در آن گونه *P. communis* و هیبریدهای آن یافت می‌شود (Vavilov, 1951). با توجه به این که گستره جغرافیایی ایران طی قرون گذشته فراتر از مرزهای کنونی و پوشش دهنده بخشی از آسیای مرکزی بوده است و همچنین با اثبات وجود ارتباط خویشاوندی ارقام بومی گلابی کشور با ژنوتیپ‌های بومی شمال و غرب (Safarpour Shorbakhlo et al., 2008) به نظر می‌رسد بخشی از جریان ژنی ارقام بومی در اثر ورود ژرم پلاسم جدید از نواحی مرکزی آسیا بوده است. از طرفی گذر جاده ابریشم از مناطق تنوع دو گونه *P. ussuriensis* و *P. Pyrifolia* در چین و سپس عبور آن از ایران (Jackson, 2003) می‌تواند به نحو بهتری توجیه کننده حضور آلل خودناسازگاری S42 با منشاء منچوری چین در ذخایر ژنتیکی گلابی نواحی مرکزی ایران باشد. لذا در ادامه این تحقیق لازم است به نحو کامل تر و جامع تری به جریان ژنی ارقام گلابی موجود در کشور پرداخته شود.

#### سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاری آقای مصطفی محمدی به خاطر همکاری در انجام مراحل مقدماتی این تحقیق قدردانی می‌شود.

آلل S4 در گلابی رقم درگزی است که هر دو آلل بر اساس اطلاعات موجود در بانک اطلاعاتی دارای منشأ گلابی‌های آسیایی (*P. pyrifolia*) هستند. لازم به ذکر است هر دو رقم درگزی و قوسی از ناحیه شمال شرق کشور منشأ گرفته و از نظر بافت میوه با گلابی‌های تجارتي و محلی منطقه مرکزی ایران و همچنین بسیاری از ارقام اروپایی که دارای بافت میوه نرم هستند، متفاوتند. از سوی دیگر سازگاری متفاوت رقم درگزی با دیگر ارقام در ارزیابی‌های انجام شده توسط زراعتگر (Zeraatgar, 1997) تأییدی بر وجود انواع متفاوتی از آلل‌های S در این رقم است. چنین تفاوتی در رفتار دیگر درختان میوه دانه‌دار نیز مشاهده شده است به این صورت که ارقام بومی سیب شمال شرق کشور با فراوانی بالاتری نسبت به ارقام بومی شمال غرب و مرکز ایران تحمل به بیماری آتشک را نشان دادند (Abdollahi and Majidi Heravan, 2005). ظاهراً این تفاوت می‌تواند با نزدیکی جغرافیایی ارقام سیب این ناحیه به جریان ژنی سیب‌های وحشی منطقه آسیای مرکزی در قزاقستان، تاجیکستان و قرقیزستان در ارتباط دانست (Morgan and Richard, 1993). در ارتباط با تنوع ژنتیکی و گستره گونه‌های گلابی در دنیا چنین به نظر می‌رسد که کشت و کار گلابی از سه مرکز تنوع ژنتیکی در دنیا شروع شده است. مرکز چین که دو گونه *P. ussuriensis* و *P. pyrifolia* در آن رشد می‌کنند، مرکز دوم



## References

- Abdollahi, H. 2011.** Pear, Botany, Cultivars and Rootstocks. Agricultural Education Publisher, Plant Production Deputy, Ministry of Jihade-Agriculture, Tehran, Iran. 200pp. (in Persian).
- Abdollahi, H., and Majidi Heravan, E. 2005.** Relation between fire blight resistance with different vegetative and reproductive traits in apple (*Malus domestica* Borkh.). Seed and Plant 21: 501-513 (in Persian).
- Arzani, K. 2002.** The position of pear breeding and culture in Iran: Introduction of some Asian pear (*Pyrus serotina* Rehd.) cultivars. Acta Horticulturae 587: 167-173.
- Crane, M. B., and Lewis, D. 1942.** Genetical studies in pears III. Incompatibility and sterility. Journal of Genetics 43: 31-44.
- De Nettancourt, D. 2001.** Incompatibility and Incongruity in Wild and Cultivated Plants. Springer-Verlag Publisher, Berlin, Heidelberg, Germany. 314pp.
- Goldway, M., Takasaki-Yasuda, T., Sanzol, J., Mota, M., Zisovich, A., Stern, R., and Sansavini, S. 2009.** Renumbering the S-RNase alleles of European pears (*Pyrus communis* L.). Scientia Horticulturae 119: 417-422.
- Gu, Q., Zhang, Q., Hu, H., Chen, Q., and Luo, Z. 2009.** Identification of self-incompatibility genotypes in some sand pears (*Pyrus pyrifolia* Nakai.) by PCR-RFLP analysis. Agricultural Sciences in China 8: 154-160.
- Hiratsuka, S., and Zhang, S. L. 2002.** Cultivar differences in the expression of self incompatibility in Japanese pears. Acta Horticulturae 587: 437-448.
- Ishimizu, T., Inoue, K., Shimonaka, M., Saito, T., Terai, O., and Norioka, S. 1999.** PCR-based method for identifying the S genotypes of Japanese pear cultivars. Theoretical and Applied Genetics 98: 961-967.
- Jackson, J. E. 2003.** Biology of Apples and Pears. Cambridge University Press, New York, USA. 488pp.
- Kaufmane, E., and Rumpunen, K. 2002.** Pollination, pollen tube growth and fertilization in *Chaenomeles japonica* (Japanese quince). Scientia Horticulturae 94: 258-271.
- Khorramdel Azad, M., Abdollahi, H., and Taeb, M. 2008.** Optimization of DNA extraction from Iranian quince (*Cydonia oblonga* Mill.) genotypes. The 2<sup>nd</sup>

- International Student Conference of Biotechnology. 15-17 November, University of Tehran, Tehran, Iran.
- Kushesh Saba, M. 2004.** Self incompatibility and cross incompatibility detection in some Asian pear (*Pyrus serotina* Rehd.) genotypes by field and molecular experiments. MSc. Thesis, College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. 110 pp. (in Persian).
- Morgan, J., and Richard, A. 1993.** The Book of Apples. Ebury Press, London, UK. 800pp.
- Mota, M., Tavares, L., and Oliveira C.M. 2007.** Identification of S-alleles in pear (*Pyrus communis* L.) cv. 'Rocha' and other European cultivars. *Scientia Horticulturae* 113: 13-19.
- Norioka, S., Oneyama, C., Takuma, S., Shinkawa, T., Ishimizu, T., Nakanishi, T., and Sakiyama, F. 2007.** Purification and characterization of a non-S-RNase and S-RNases from styles of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 878-886.
- Ruck, H. C. 1975.** Deciduous fruit tree cultivars for tropical and subtropical regions. *Horticultural Reviews* 3: 84-172.
- Sadat Mousavi, S. 2009.** Identification of self incompatibility, cross incompatibility and chilling requirement of some Asian pear (*Pyrus serotina* Rehd.) genotypes. MSc. Thesis College of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. 114 pp. (in Persian).
- Safarpour Shorbakhlo, M., Bahar, M., Tabatabee, B. E. S., and Abdollahi, H. 2008.** Determination of genetic diversity in pear (*Pyrus* spp.) using microsatellite markers. *Iranian Journal of Horticultural Science and Technologies* 9: 113-128. (in Persian).
- Sanzol, J., and Herrero, M. 2002.** Identification of self-incompatibility alleles in pear cultivars (*Pyrus communis* L.). *Euphytica* 128: 325-331.
- Sassa, H., Hirano, H., and Ikehashi, H. 1992.** Self incompatibility-related RNases in styles of Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd.). *Plant Cell Physiology* 33: 811-814.
- Saure, M. C. 1985.** Dormancy release in deciduous fruit trees. *Horticultural Review*. 7: 239-287.

- Tehrani, G., and Lay, J. W. 1988.** Verification of pedigrees of different sweet cherry cultivars introduced from Vineland through pollen compatibility studies. HortScience 23: 783-788.
- Tomimoto, Y., Nakazaki, T., Ikehashi, H., Ueno, H., and Hayashi, R. 1996.** Analysis of self-incompatibility-related ribonucleases (S-RNases) in two species of pears, *Pyrus communis* and *Pyrus ussuriensis*. Scientia Horticulturae 66: 159-167.
- Vavilov, N. I. 1951.** The Origin, Variation, Immunity and Breeding of Cultivated Plants. Ronald Press and Waltham, New York, MA. USA. 468pp.
- Verma, L. R., and Jindal, K. K. 1997.** Fruit Crop Pollination. Kalyani Publication, Ludhiana, India. 405pp.
- Westwood, M. N. 1993.** Temperate Zone Pomology: Physiology and Culture. Timber Press, Portland, Oregon, USA. 523 pp.
- Zhang, Y., and Xue, Y. 2008.** Molecular biology of S-RNase-based self-incompatibility. pp. 193- 216. In: Franklin-Tong, V. E. (ed.) Self-Incompatibility in Flowering Plants: Evolution, Diversity, and Mechanisms. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany.
- Zeraatgar, H. 1997.** Identifying the best pollinizer for pear cultivars. MSc. Thesis, Islamic Azad University, Unit Jahrom, Jahrom, Iran. 105p. (in Farsi).
- Zuccherelli, S., Tassinari, P., Broothaerts, W., Tartarini, S., Dondini, L., and Sansavini, S. 2002.** S-Allele characterization in self-incompatible pear (*Pyrus communis* L.). Sexual Plant Reproduction 15: 153–158.