

## آنالیز بیوانفورماتیک مکان ژنی خودناسازگاری گونه گلایی *Pyrus communis* L. و بررسی آلل‌های مرتبط در برخی از ارقام تجاری و بومی

بومی

### Bioinformatic Analysis of Self-Incompatibility Locus in Pear Species *Pyrus communis* L. and Evaluation of the Related Alleles in Some Commercial and Native Cultivars

حمید عبداللهی<sup>۱\*</sup>، سارا صادق‌نژاد<sup>۲</sup>

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

و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۲- کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران

Abdollahi H<sup>\*1</sup>, Sadeghniejad S<sup>2</sup>

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

2. MSc Student, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Azad University Science and Research Unit, Tehran, Iran

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: h.abdollahi@areeo.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۷/۴/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۹۸/۹/۲۷)

#### چکیده

آلل‌های جدید شناسایی شده مکان ژنی خودناسازگاری گلایی معمولی، نام‌گذاری مجدد و همولوژی بالای برخی این آلل‌ها، سبب تداخل در بررسی و طبقه‌بندی آن‌ها شده است. تحقیق اخیر با هدف مرور جامع بیوانفورماتیک و بررسی ساختار ژنتیکی کلیه ۲۷ آلل S شناسایی شده این گونه و بررسی این آلل‌ها در برخی ارقام تجاری و بومی گلایی ایران بر اساس این اطلاعات بیوانفورماتیک و مقایسه با گزارشات قبل انجام شد. نتایج نشان‌دهنده وجود توالی کامل ۲۱ آلل این گونه بود که به صورت نواحی ۱۳ گانه شامل پیشرانه، پنج ناحیه حفاظت شده C1 تا C5، اینترون و ۶ ناحیه بینابینی خطی و حفاظت‌شدگی قابل توجهی در ناحیه پیشرانه و سیگنال، به غیر از نواحی C1 تا C5 مشاهده شد. همچنین در ناحیه پیشرانه اغلب آلل‌ها، حداقل دو جایگاه CAAT و دو جایگاه نزدیک و یا به هم چسبیده TAAT مشاهده شد. تجزیه خوشه‌ای بخش‌های مختلف آلل‌ها، بیانگر شباهت کامل پلی‌پپتیدی دو آلل *SI19* و *SI21* بود، لیکن از نظر اینترون تفاوت جزئی در طول و توالی داشته که دلیل اشتباهات ارزیابی آلل‌های برخی ارقام داخلی نظیر رقم درگزی بود. مقایسه نتایج بررسی آلل‌های خودناسازگاری در برخی از ارقام بومی با استفاده از نتایج بیوانفورماتیک نشان‌داد، استفاده از آغازگرهای اختصاصی، روش کاملاً قابل اعتمادی در شناسایی این آلل‌ها خصوصاً در ارقام دارای جریان ژنی دیگر گونه‌ها نیست. بررسی آلل‌های خودناسازگاری ارقام نشان‌دهنده حضور آلل *SI04* در ارقام شاهد کوشیا و بوره‌دیل و رقم کروس‌سیحان (*Krus Siehan*)، *SI08* در کروسالون (*Krusalun*)، *SI07* در شاه‌میوه و شگری، *SI19* در اسفراینی و درگزی، *S35* گونه *P. ussuriensis* در ارقام کفترپچه، شیرین‌ترکان و کنجونی و *SI19* گونه *P. × bretschnederi* به‌عنوان دیگر آلل رقم شگری بود. نتایج ضمن تایید گزارشات قبلی وجود جریان ژنی دیگر گونه‌های گلایی در تکامل ارقام بومی ایران، نشانگر اهمیت بررسی جامع بیوانفورماتیک آلل‌های جنس *Pyrus* در کنار هم بود.

#### واژه‌های کلیدی

تجزیه خوشه‌ای

تعیین توالی

جریان ژنی

رقم بومی

سازگاری گرده

## مقدمه

گلابی معمولی (*Pyrus communis* L.) متعلق به زیرخانواده پیرینه (Pyrinae) از خانواده گلسرخیان (Rosaceae) بوده (Morgan 2015) و دارای سیستم خودناسازگاری گامتوفیتیک با یک مکان ژنی (*S*-locus)، واجد تعداد زیادی آلل خودناسازگاری (*S*-allele) است. در این سیستم خودناسازگاری، حداقل دو مکان ژنی یکی متعلق به گروه و دیگری متعلق به خامه، عامل شناسائی و ایجاد (نا)سازگاری گرده می‌باشد (de Nettancourt 1977). بر اساس این مدل، یک یا چند جایگاه ژنی باروری (*F*-box) متعلق به هاپلویتایپ گرده و یک ریونوکلاز خامه معروف به *S*-RNase (Broothaerts et al. 1995) تعیین‌کننده اثر متقابل سازگاری گرده و خامه می‌باشند.

اولین بررسی پلی‌پپتیدهای حاصل از مکان ژنی خودناسازگاری در گلابی معمولی (*P. communis*)، توسط Tomimoto et al. (1996) روی هشت رقم از ارقام این گونه انجام شد و ضمن تعیین آلل‌های *S1* تا *S9* بدون در نظر گرفتن ماهیت نوکلئوتیدی آن‌ها، برای اولین بار از سیستم نام‌گذاری شماره‌ای آلل‌ها استفاده شد. هم‌چنین بررسی تنوع این آلل‌ها در گلابی با استفاده از روش توالی‌یابی توسط Zuccherelli et al. (2002) روی ۱۰ رقم از ارقام گلابی اروپائی با استفاده از آغازگرهای آلل‌های خودناسازگاری سیب انجام و آلل‌های *Sa*, *Sb*, *Sc*, *Sd*, *Se* و *Sh* شناسائی شدند. (Sanzol and Herero 2002) به بررسی *S*-ژنوتایپینگ ارقام گلابی معمولی با استفاده از سازگاری گرده پرداخته و آلل‌های *S1* تا *S4* را بدون در نظر گرفتن ماهیت مولکولی آن‌ها مشخص کردند. هم‌چنین در بررسی Zisovich et al. (2004) آلل‌های *Si*, *Sj*, *Sk*, *Sl*, *Sm*, *Sn*, *So* و *Sp* در این گونه شناسائی و گزارش شد. (Moriya et al. 2005) همانند بررسی Tomimoto et al. (1996) به بررسی ساختار آللی ارقام گلابی معمولی با استفاده از تلافی ارقام پرداخته و بدون بررسی مولکولی ساختار آللی، نتایج قبلی به‌دست آمده را مورد تایید قرار دادند. Takasaki et al. (2006) به بررسی توالی کامل cDNA حاصل از ۹ عدد از آلل‌های خودناسازگاری گلابی معمولی پرداخته و دو آلل جدید *Sq* و *Sr* را گزارش کردند. در این بررسی هم‌چنین مشخص شد که *Se* و *Sj* (*S1* یا *S101*) آلل‌های مشابهی هستند که به اشتباه

جداگانه تفکیک شده‌اند. بر اساس این تحقیق، توالی نوکلئوتیدی کامل تعداد قابل توجهی از آلل‌های خودناسازگاری این گونه مشخص و به امانت گذاشته شد. (Morya et al. 2007) آلل‌های *Sg*, *Ss* و *St* را در گلابی معمولی گزارش و آخرین گروه آللی این گونه را که با استفاده از حروف مشخص می‌شد تعیین نمودند. هم‌چنین توالی نوکلئوتیدی کامل تعدادی از آلل‌های خودناسازگاری این گونه مشخص شد. (Mota et al. 2007) به بررسی آلل‌های خودناسازگاری رقم گلابی غالب کشور پرتغال معروف به رقم روکا (Rocha) و هشت رقم دیگر متعلق به گونه گلابی معمولی پرداختند، لیکن هیچ آلل جدید و یا توالی کاملی را گزارش نکردند. (Sanzol and Robbins 2008) برای تبدیل سیستم نام‌گذاری حرفی این آلل‌ها به عددی به صورت *S1* تا *S14* اقدام و برخی از آلل‌ها را نیز به‌صورت توالی کامل به امانت گذاشتند. در نهایت در مرور اطلاعات قبلی و نام‌گذاری مجدد آلل‌های خودناسازگاری گلابی معمولی توسط Goldway et al. (2008) تمامی آلل‌های ۱۹ گانه این گونه که به‌صورت *Sa*, *Sb*, *Sc*, *Sd*, *Se*, *Sg*, *Sh*, *Si*, *Sj*, *Sk*, *Sl*, *Sm*, *Sn*, *So*, *Sp*, *Sq*, *Sr* و *Ss* نام‌گذاری شده بودند و در بررسی Sanzol and Robbins (2008) برخی از آن‌ها بر اساس روش شماره‌ای از *S1* تا *S14* تغییر نام داده بود اقدام شد. به‌علاوه آلل‌های *Sm*, *Sn*, *So* و *Sq* و *Sr* که در نام‌گذاری شماره‌ای وارد نشده بودند، بر اساس توافق کلیه گروه‌های تحقیق‌کننده در رابطه با این آلل‌ها در گلابی معمولی، به‌صورت *S101* تا *S119* نام‌گذاری مجدد شدند، با این استثناء که به‌دلیل عدم وجود آلل *Sf* از نام‌گذاری آلل *S112* اجتناب شد (جدول ۱).

پس از نام‌گذاری سه شماره‌ای آلل‌های خودناسازگاری گونه گلابی معمولی توسط Goldway et al. (2008) که به‌منظور جلوگیری از تداخل نام این آلل‌ها با آلل‌های دیگر گونه‌های گلابی، به‌ویژه آلل‌های گونه گلابی آسیائی (*P. pyrifolia*) انجام گرفت، آلل‌های بعدی بر اساس نام‌گذاری جدید تعیین شدند. در بررسی (Sanzol 2009b)، آلل‌های *S120* و *S121* به‌ترتیب در ارقام بلادی‌جونو (Bella di Giugno) و دلبونا (Delbuena) گزارش شدند. هم‌چنین در بررسی دیگر (Sanzol, 2009a)، آلل‌های *S122*، *S123*، *S124* و *S125* (با نام‌های *S23*، *S24* و

گذاشته شده‌اند. (2006) Takasaki et al. و Moriya et al. (2007) جمعاً ۱۷ آلل خودناسازگاری گلابی معمولی را گزارش و همچنین ساختار عمومی ژنتیکی این آلل‌ها را با آلل‌های خودناسازگاری سیب‌سانان (Maloideae) مورد مقایسه و شباهت آن‌ها را تایید کردند. بر اساس این بررسی‌ها، ساختار عمومی وجود پنج ناحیه حفاظت شده C1-C3، RC4 و C5، وجود یک ناحیه دارای تنوع بسیار بالا (hyper-variable region-HVR) در بین ناحیه C3 و اینترون، و همچنین یک ناحیه اینترونی واحد با طول و توالی بسیار متغیر همانند آنچه در خانواده‌های به غیر از گلسرخیان، نظیر سولاناسه (*Solanaceae*) دیده می‌شود، به اثبات رسید.

(S25) شناسائی و گزارش شدند. (2012) De Franceschi et al. به مرور کامل ساختار اثر متقابل S-RNase خامه و جایگاه ژنی باروری (F-box) متعلق به هاپلوتایپ گرده در زیرخانواده گلابی‌سانان پرداختند. در نهایت جدیدترین آلل‌های خودناسازگاری گونه *P. communis*، به نام‌های S126، S127 و S128 در شماری از ارقام گلابی بومی ایران توسط (2014) Nikzad Gharehaghaji et al. شناسائی و به امانت گذاشته شدند. در این بررسی برای اولین بار با توجه به گزارشات قبلی جریان ژنی دیگر گونه‌های گلابی در برخی ارقام، از نام‌گذاری جدید ادغام نام‌گونه و نوع آلل استفاده شد. در بررسی آلل‌های خودناسازگاری گلابی معمولی، برخی آلل‌ها به صورت توالی کامل و برخی به صورت توالی ناقص به امانت

جدول ۱- فهرست کلیه آلل‌های شناسائی شده خودناسازگاری در گونه گلابی معمولی (*Pyrus communis*) تا سال ۱۳۹۵.

آلل S	آلل S	آلل S	رقم نمونه	توالی	شماره	طول
(اولین نامگذاری)	(نامگذاری شماره‌ای)	(آخرین نامگذاری)	اولین گزارش	موجود	دسترسی	ایترون (bp)
Sj/Se	S1	S101	Zuccherelli et al. 2002	Williams	AB236428	786 bp
Sl	S2	S102	Zisovich et al. 2004	Chaplin	AB236425	1211 bp
Sk	S3	S103	Zisovich et al. 2004	Spadona	AB236432	1093 bp
Sb	S4	S104	Zuccherelli et al. 2002	Comice	AB236429	246 bp
Sa	S5	S105	Zuccherelli et al. 2002	Abate Fetel	AB236430	145 bp
Si	S6	S106	Zisovich et al. 2004	Gentile	AB258361	177 bp
Sh	S7	S107	Zuccherelli et al. 2002	Beurré Bosc	AB236431	151 bp
Sd	S8	S108	Zuccherelli et al. 2002	Conference	AB236427	170 bp
Sp	S9	S109	Zisovich et al. 2004	Acka	AB258364	157 bp
Sg	S10	S110	Morya et al. 2007	PasseCrassan	AB258360	1736 bp
Ss	S11	S111	Morya et al. 2007	Comte Flandr	AB258365	167 bp
---	S12	S112	Not nominated	---	---	---
St	S13	S113	Morya et al. 2007	Old Home	AB258366	1116 bp
Sc	S14	S114	Zuccherelli et al. 2002	Kaiser	AB258359	136 bp
Sm	S15	S115	Zisovich et al. 2004	Chaplin	AB258362	154 bp
Sn	S16	S116	Zisovich et al. 2004	Forelle	AB258363	163 bp
So	S17	S117	Zisovich et al. 2004	Lawson	---	1091 bp
Sq	S18	S118	Takasaki et al. 2006	General Leclerc	AB236424	1083 bp
Sr	S19	S119	Takasaki et al. 2006	PasseCrassan	AB236426	149 bp
---	S20	S120	Sanzol, 2009b	Bella di Giugno	---	310 bp
---	S21	S121	Sanzol, 2009b	Conference	EU477839	153 bp
---	S22	S122	Sanzol, 2009a	Cure	AB779646	179 bp
---	S23	S123	Sanzol, 2009a	Conseiller	---	147 bp
---	S24	S124	Sanzol, 2009a	Green Summer	---	106 bp
---	S25	S125	Sanzol, 2009a	Ceremeño	AB731592	3130 bp
---	S26	S126	Nikzad Gh.et al. 2014	Shah Miveh	KF588567	176 bp
---	S27	S127	Nikzad Gh.et al. 2014	Ghosi	---	251 bp
---	S28	S128	Nikzad Gh.et al. 2014	Domkaj	---	147 bp

\* در رابطه با آلل‌های S117، S120، S123، S124، S127 و S128 توالی‌های کامل در بانک‌های اطلاعاتی یافت نشد، لیکن به ترتیب کامل‌ترین توالی‌های موجود در بانک‌های اطلاعاتی به ترتیب با کدهای دسترسی شامل: AY261994 (1628 bp) برای S117، EU118758 (752 bp) برای S120، EU118761 (600 bp) برای S123، EU118762 (601 bp) برای S124، KF588568 (706 bp) برای S127 و KF588569 (599 bp) برای S128 بودند.

کلیه آل‌های ۲۷ گانه گلابی معمولی مشتمل بر *SI01* تا *SI28* (به غیر از *SI12* که تاکنون آلی با این شماره نام‌گذاری نشده‌است) واجد کامل‌ترین توالی (جدول ۱)، با استفاده از هم‌ردیف کردن (Alignment)، پنج ناحیه حفاظت شده *C1* تا *C5* روی توالی نوکلئوتیدی آنها شناسایی شد و سپس با استفاده از ترجمه نوکلئوتید به پلی‌پپتید در تارنمای اکسپازی (Expasy)، توالی پلی‌پپتیدی نواحی حفاظت شده فوق مشخص شد. با توجه به وجود ناحیه دارای تنوع بسیار بالا (hyper-variable region) روی توالی‌های نوکلئوتیدی در بین ناحیه *C3* و ایترون و خود ناحیه ایترون با طول و توالی بسیار متفاوت، خطی کردن آل‌ها و مقایسه آنها با استفاده از نرم‌افزارهای خطی کردن غیرممکن بود، لذا نواحی ۱۳ گانه شامل پیشرانه، ناحیه سیگنال، ناحیه *C1* تا *C2*، ناحیه *C2* تا ایترون، ناحیه ایترونی، ناحیه انتهای ایترون تا *C3*، ناحیه *C3* تا *RC4*، ناحیه *RC4* تا *C5* و در نهایت ناحیه *C5* تا انتهای ژن همراه با پنج ناحیه حفاظت شده، به صورت دستی تفکیک و جداسازی و سپس هر واحد به صورت مستقل به صورت چندگانه هم‌ردیفی (Multiple Alignment) شدند. خطی کردن توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار تحت وب مولنالین (MultAlin) (Corpet 1988) و ارزیابی پیشرانه با نرم‌افزار Plant-Care انجام شد.

مواد گیاهی مورد استفاده در این تحقیق شامل ۱۱ رقم تجاری گلابی بومی و وارداتی کشور بودند. تمامی ارقام انتخابی بر اساس خصوصیات ظاهری متعلق به گونه گلابی معمولی یا *P. communis* بوده، لیکن در ارزیابی مولکولی این ارقام با استفاده از نشانگر مولکولی توالی‌های ساده تکراری توسط Erfani et al. (2012)، ارقام بومی مد نظر قرار گرفتند که با گونه‌های شرقی، قرابت نشان داده بودند. بر این اساس، ارقام درگزی، شیرین‌ترکان، شاه‌میوه، کفترپچه، کنجونی، شکری، اسفراینی و دو رقم اروپایی کوشیا (Coscia) و بوره دیل (Beurre Diel) و دو رقم منشاء گرفته از آسیای مرکزی شامل کروس‌سیحان (Krus siehan) و کوروسالون (Krusalun) انتخاب و استخراج DNA ژنومی روی برگ‌های جوان آنها با روش ترکیبی CTAB و SDS انجام شد (Khoramdel Azad et al. 2008). ارزیابی غلظت و میزان خلوص DNA استخراج شده، با استفاده از روش

از طرفی توالی دقیق نواحی *C1* تا *C5* از نظر ناحیه ابتدائی و انتهائی مورد توافق نیست، به صورتی که (Goldway et al. 2008) توالی پلی‌پپتیدی FTQQYQ با طول ۶ اسید آمینه را به عنوان ناحیه *C1* مورد بررسی قرار دادند، در حالی که (Nikzad 2014) Gharehaghaji et al. توالی پلی‌پپتیدی DYFQFTQQYQPA با طول ۱۲ اسید آمینه، به عنوان ناحیه *C1* معرفی نمودند، که نشانگر عدم وجود یک توافق عمومی، چه در رابطه با گونه گلابی معمولی و حتی در سطح بالاتر در بین خانواده‌های گیاهی در رابطه با محدوده دقیق نواحی حفاظت شده *C1* تا *C5* است.

با توجه به شناسایی اخیر شماری از آل‌های خودناسازگاری گونه گلابی معمولی، نام‌گذاری‌های متنوع انجام شده روی این آل‌ها و در نهایت قرابت ژنتیکی برخی از ارقام ایران با گونه‌های شرقی، این تحقیق با هدف مرور کامل بیوانفورماتیک، تعیین خلاءهای تحقیقاتی در زمینه تعیین توالی کامل، بررسی وجود مناطق حفاظت شده در منطقه پیشرانه مکان ژنی خودناسازگاری و یا قبل از ناحیه *C1* و همچنین انتهای ژن و در نهایت مقایسه نتایج حاصل از دو روش ارزیابی نوع آل خودناسازگاری با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و تعیین توالی انجام گرفت.

### مواد و روش‌ها

به منظور دستیابی به کامل‌ترین توالی آل‌های خودناسازگاری امانت گذاشته شده در بانک اطلاعاتی و ترجیحاً واجد بخشی از پیشرانه، با استفاده از تارنمای مرکز ملی اطلاعات زیست‌فن‌آوری (National Center for Biotechnology Information-NCBI) میان ۱۵۰ توالی کامل و ناقص (Partial) موجود، کامل‌ترین توالی‌ها بر اساس جستجو با نام آل انتخاب شدند. با توجه به عدم دسترسی مستقیم به همه توالی‌ها کامل از روش فوق، نسبت به بررسی دقیق مقالات (Zuccherelli et al. 2002)، (Moriya et al. 2007)، (Takasaki et al. 2006)، (Zisovich et al. 2007)، (Sanzol and Robbins 2008)، (Mota et al. 2007)، (Goldway et al. 2008)، (Sanzol, 2009a,b) و (Nikzad 2014) Gharehaghaji et al. پرداخته شد و کدسترسی آل‌های به امانت گذاشته شده و گزارش شده استخراج شدند.

تشابه توالی‌های شناسای شده با آل‌های مختلف، در نرم‌افزار بلاست بررسی شد. آنالیز خوشه‌ای توالی پلی‌پپتیدی با استفاده از نرم‌افزار مگا (MEGA) نسخه ۷، انجام گرفت.

### نتایج و بحث

بررسی اطلاعات بیوانفورماتیک موجود در بانک اطلاعاتی مرتبط با آل‌های مکان ژنی خودناسازگاری نشان داد که از ابتدای بررسی مولکولی این آل‌ها توسط (Zuccherelli et al. (2002) روی ۱۰ رقم از ارقام گلابی اروپایی در سال ۲۰۰۲، تا آخرین بررسی و شناسایی این آل‌ها توسط (Nikzad (2014) Gharehaghaji et al. در سال ۲۰۱۴، تعداد ۲۷ آل که ۱۹ آل در ابتدا به صورت حرفی که به شکل *Sh*, *Sg*, *Se*, *Sd*, *Sc*, *Sb*, *Sa*, *St* نام‌گذاری شده‌اند وجود دارد (جدول ۱). متعاقب آن (Sanzol and Robbins (2008) این آل‌ها بر اساس روش شماره‌ای، از *SI* تا *Sn* نامگذاری کردند و توسط (Goldway et al. (2008) به صورت سه شماره‌ای از *SI01* به بعد نام‌گذاری آن‌ها تجدید شد. تازه‌ترین شناسایی آل‌های مکان ژنی خودناسازگاری این گونه بر اساس بررسی (Nikzad Gharehaghaji et al. (2014) تعیین کننده وجود سه آل جدید در ارقام بومی ایران شامل آل *SI26* در رقم شاه میوه، *SI27* در رقم قوسی از خراسان و *SI28* در رقم دمکج کرج بود (جدول ۱). این امر نشان دهنده این مطلب است که با توجه به اینکه اغلب ارقام مورد بررسی در ارزیابی‌های قبلی، ارقام مربوط به اروپا، خصوصاً اروپای غربی بوده، در صورت بررسی ارقام بومی متعلق به گونه گلابی معمولی یا *P. communis* که متعلق به سایر نواحی تنوع ژنتیکی این گونه است، احتمال بالایی برای اضافه شدن سایر انواع آل‌های این مکان ژنی، وجود دارد. همچنین این بررسی نشان داد که از مجموع ۲۷ آل شناسایی شده، تعداد ۲۱ آل به طور کامل تعیین توالی شده‌اند و در رابطه با سایرین توالی کامل موجود نیست (جدول ۱). آل‌های دارای توالی ناقص که لازم است در بررسی‌های تکمیلی به طور کامل تعیین توالی شوند شامل آل‌های *SI17*، *SI20*، *SI23*، *SI24*، *SI27* و *SI28* می‌باشند، لیکن با توجه به اینکه میزان همولوژی و طراحی آغازگرها تاکنون بیش‌تر بر اساس هم‌ردیفی نواحی

اسپکتروفتومتریک، به صورت ارزیابی میزان جذب در طول موج‌های ۲۳۰ و ۲۶۰ نانومتر انجام شد. گزینش آغازگرهای مورد استفاده بر اساس حداکثر طول تکثیر مکان ژنی، هدف قرار گرفت و با بررسی در منابع مختلف، سه جفت آغازگر انتخاب شدند. این آغازگرها شامل جفت آغازگر *Sall*، ارائه شده توسط (Mota et al. (2007) و جفت آغازگرهای *FB*، ارائه شده توسط (Babaei et al. (2012) بودند. از بین آغازگرها، جفت آغازگر *Sall-F* (5'-TTTACGCAGCAATATCAGC-3') و *FB-R1* (5'-GCATTTTCAATATCCA(C/A)CAG-3') که از نظر طول، حداکثر قدرت تکثیر را داشت انتخاب شدند. پس از هم‌ردیفی این آغازگرها با توالی‌های هدف، مشخص شد که آغازگر پیشرو گزینش شده در منطقه *C1* و آغازگر پیرو آن در ناحیه نیمه‌حفاظت شده ۵۳ نوکلئوتید پایین دست انتهای منطقه حفاظت شده *RC4* قرار دارد که گستره قابل توجهی از کلیه آل‌ها را پوشش می‌دهد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی (PCR) با استفاده از دستگاه ترموسایکلر اپندورف (Eppendorf) مدل MasterCycler-Gradient روی DNA ارقام گلابی انجام گرفت. به منظور تعیین آل‌های خود ناسازگاری از روش توالی‌یابی محصولات حاصل استفاده شد. جفت آغازگر مورد استفاده از شرکت متابایون (Metabion) تهیه و رقیق‌سازی آن‌ها با آب مقطر دی‌یونیزه و براساس OD ارائه شده آغازگر در غلظت ۱۰ میکرومولار انجام شد. سایر مواد مورد نیاز واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل ۲۰ میکرومول  $MgCl_2$ ، ۱۰۰ نانوگرم DNA بوده و همچنین در هر واکنش، غلظت هر آغازگر پنج میکرولیتر به ازاء هر واکنش ۲۵ میکرولیتری بود. سایر اجزاء ثابت واکنش PCR، به میزان ۰/۵ میکرولیتر بافر واکنش ۱۰ برابر غلظت (10X)، یک واحد آنزیم DNA پلی‌مراز و ۰/۵ میکرولیتر از محلول مادری dNTPs با غلظت ۱۰ میلی‌مولار بود. به منظور مشاهده و اندازه‌گیری وزن باندهای حاصل، از دستگاه الکتروفورز افقی با ژل آگارز یک درصد استفاده و با ولتاژ ۸۵ ولت باندها تفکیک شدند. به منظور شناسایی نوع آل‌های خودناسازگاری تکثیر شده، محصولات PCR توسط کمپانی بایونیرکره جنوبی توالی‌یابی شدند. توالی‌های به دست آمده، در نرم‌افزار بیو‌ادیت (BioEdit) ویرایش و میزان

در بررسی ناحیه پیشرانه گیاهان (همانند دیگر یوکاریوت‌ها) مشخص شده که در حدود ۲۵ نوکلئوتید بالادست شروع رونویسی (atg)، جایگاه تاتا (TATA) با توالی معمول 5'-T(C/G)TATA(T/A)A1-3(C/T)A-3' قرارداد (Heldt 2005). ارزیابی ناحیه پیشرانه‌ای آل‌های فوق حاکی از وجود دو جایگاه TAAT تقریباً یا کاملاً مجاور در حدود ۲۹ نوکلئوتید بالادست شروع رونویسی با توالی مرکزی taat بود (جدول ۲). همچنین جایگاه پیشرانه‌ای مهم دیگر جایگاه کات (CAAT) است که بررسی‌های عمومی نشان‌داده که این جایگاه حدود ۸۰ تا ۱۱۰ نوکلئوتید با توالی معمول 5'-(C/T)AA1-4(T/G)NGA2-3' قرارداد (atg) (Heldt 2005).

حفاظت شده C1 تا C5 در این گونه انجام گرفته بود، شش عدد از توالی‌های به امانت گذاشته شده از این مکان ژنی به صورت ناقص و پس از ناحیه C1 شروع و تا بخش‌های نیمه انتهایی ژن، یعنی نواحی RC4 تا C5 را مورد پوشش قرار می‌دهد. بر این اساس، در صورت وجود مناطق حفاظت‌شده روی نواحی پیشرانه این مکان ژنی و یا نواحی انتهایی و بعد از منطقه C5، این نواحی می‌تواند به منظور ارزیابی توالی کامل آل‌ها مد نظر قرار گیرد. استخراج، ارزیابی و مقایسه ناحیه پیشرانه مکان ژنی خودناسازگاری نشان داد که از میان ۲۷ آل شناسایی‌شده در این گونه، بخش ناحیه پیشرانه آن‌ها در ۲۰ آل لیست شده در جدول ۲، موجود است که کوتاه‌ترین ناحیه پیشرانه تعیین‌توالی شده مربوط به آل S126 با ۱۴ نوکلئوتید و بلندترین آن مربوط به آل S121 با بیش از ۸۳ نوکلئوتید بود.

جدول ۲- مقایسه جایگاه‌های TATA و CAAT در ناحیه‌های پیشرانه‌ای مکان ژنی خودناسازگاری (S) در آل‌های مختلف این مکان ژنی در گونه گلایی *Pyrus communis* L.

آل S	توالی ناحیه پرموتوری (3'-5') قابل دسترس
S101	ccaccaccacttcaaatcgatctaatagtaatcaatctgcctcgctcttgaacaaatattattca
S102	tacttcagatcaatctaatagtaattttatctccccgctattgaacaaatatttttcg
S103	tccacactaccaccactactacttcagatggatcaaatagtaattaatctgcctcgcttttgagcaaacattattca
S104	caaatagtaattaatctgcctcgctcttgaataaaatattattca
S105	atcagcaccactactacttcaaatcgatctgattagtaatttaatctgcctcgccactgaacaaatattattca
S106	caaatagtaattaatctgcctcgcttgaacaaatattattca
S107	cttcaaatgcatcaaatagtaattaatttgctcgctcctgaacaaatattattca
S108	cctctactacttcaaaagtcaaatcgatctaatagtaattaatcttctcctccttgaacaaatattattca
S109	caaatagtaattaatctgcctcagcttgaacaaatattattca
S110	tcggccttgcccatgaacgaatattattca
S111	tttgaattaatctgccttgctacagaacaaatattattca
S113	ccctcgctcttgaataaaatatttttcg
S114	aaaagttcaaacggatgtaattagtaattaatctgcctcgctcttgaacaaatattattca
S115	taaattaatctgcctcgccctgaacaaatattattca
S116	aacggatcaaatgataattaatctgcctcgctttaaacaacaaatattattca
S118	atccacactaccaccactactacttcaaatggatcaaatagtaattaatctgcctcgcttgaacaaacattattca
S119	acggatccaaccacgcctacaactacttcaaatggatcaaatataattaatctgcctcgcttggcaaatattattca
S121	cggatccaaccacgcctacaactacttcaaatggatcaaatataattaatctgcctcgcttgaacaaatattattca
S125	caccactactacttcaaatggatcaaatgagtaattaatttgctcgctcttgaacaaatattattca
S126	Acaaatattattca
Cons	caaatagtaattaatctgcctcgctcttgaacaAAaTtaTTCa

با توجه به طول کم ناحیه تعیین توالی شده پیشرانه‌ای آل‌های S110، S113 و S126 این ناحیه در این بررسی در هم‌ردیفی ناحیه پیشرانه‌ای مکان ژنی خودناسازگاری مدنظر قرار نگرفت.

جدول ۳- مقایسه توالی نوکلئوتیدی نواحی حفاظت شده پنج گانه مکان ژنی خودناسازگاری در آلل‌های مختلف S101 تا S128 متعلق به گونه *Pyrus communis* L. منطقه مشخص شده با رنگ خاکستری در ناحیه حفاظت شده C1 در آلل S101، بیانگر محل اتصال آغازگر پیشرو Sall-F (Mota et al. 2007) است.

آلل	ناحیه حفاظت شده C1	ناحیه حفاظت شده C2	ناحیه حفاظت شده C3	ناحیه حفاظت شده RC4	ناحیه حفاظت شده C5
S101	gattattttcaaTTtAcGcagcaatatcag	aaTTgttttacggttcacggtttgtggccttca	tttgggaataaacagtggaacaacatggcacctgtgggtat	aaacaaaacgtctctcaaatcctctca	atTgaattggttgaggtcactcctttgcagc
S102	gattattttcaatttacgagcaatatcag	aaTgttttacggttcacggtttgtggccttca	ttctgggaataaacagtggaacaacatggcacctgtgggtat	aaacaaaacgtctctcaaatcctctca	acTgaattggttgaggtcactcctttgcagc
S103	gattattttcaatttacgagcaatatcag	aaTgttttacggttcacggtttgtggccttca	ttctgggaataaacagtggaacaacatggcacctgtgggtat	aaacaaaacgtctctcaaatcctctca	actgaattggttgaggtcactcctttgcagc
S104	gattattttcaatttacgagcaatatcag	aaTgttttacggttcacggtttgtggccttca	ttctgggaataaacagtggaacaacatggcacctgtgggtat	aaacaaaacgtctctcaaatcctctca	actgaattggttgaggtcactcctttgcagc
S105	gattattttcaatttacgagcaatatcag	aaTgttttacggttcacggtttgtggccttca	ttctgggaataaacagtggaacaacatggcacctgtgggtat	aaacaaaacgtctctcaaatcctctca	actgaattggttgaggtcactcctttgcagc
S106	gattattttcaatttacgagcaatatcag	aaTgttttacggttcacggtttgtggccttca	ttctgggaataaacagtggaacaacatggcacctgtgggtat	aaacaaaacgtctctcaaatcctctca	acTgaattggttgaggtcactcctttgcagc
S107	gattattttcaatttacgagcaatatcag	aaTgttttacggttcacggtttgtggccttca	ttctgggaataaacagtggaacaacatggcacctgtgggtat	aaacaaaacgtctctcaaatcctctca	actgaattggttgaggtcactcctttgcagc
S108	gattattttcaatttacgagcaatatcag	aaTgttttacggttcacggtttgtggccttca	ttctgggaataaacagtggaacaacatggcacctgtgggtat	aaacaaaacgtctctcaaatcctctca	actgaattggttgaggtcactcctttgcagc
S109	gattattttcaatttacgagcaatatcag	aaTgttttacggttcacggtttgtggccttca	ttctgggaataaacagtggaacaacatggcacctgtgggtat	aaacaaaacgtctctcaaatcctctca	actgaattggttgaggtcactcctttgcagc
S110	gattattttcaatttacgagcaatatcag	aaTgttttacggttcacggtttgtggccttca	ttctgggaataaacagtggaacaacatggcacctgtgggtat	aaacaaaacgtctctcaaatcctctca	actgaattggttgaggtcactcctttgcagc
S111	gattattttcaatttacgagcaatatcag	aaTgttttacggttcacggtttgtggccttca	ttctgggaataaacagtggaacaacatggcacctgtgggtat	aaacaaaacgtctctcaaatcctctca	actgaattggttgaggtcactcctttgcagc
S113	gattattttcaatttacgagcaatatcag	aaTgttttacggttcacggtttgtggccttca	ttctgggaataaacagtggaacaacatggcacctgtgggtat	aaacaaaacgtctctcaaatcctctca	actgaattggttgaggtcactcctttgcagc
S114	gattattttcaatttacgagcaatatcag	aaTgttttacggttcacggtttgtggccttca	ttctgggaataaacagtggaacaacatggcacctgtgggtat	aaacaaaacgtctctcaaatcctctca	actgaattggttgaggtcactcctttgcagc
S115	gattattttcaatttacgagcaatatcag	aaTgttttacggttcacggtttgtggccttca	ttctgggaataaacagtggaacaacatggcacctgtgggtat	aaacaaaacgtctctcaaatcctctca	actgaattggttgaggtcactcctttgcagc
S116	gattattttcaatttacgagcaatatcag	aaTgttttacggttcacggtttgtggccttca	ttctgggaataaacagtggaacaacatggcacctgtgggtat	aaacaaaacgtctctcaaatcctctca	actgaattggttgaggtcactcctttgcagc
S117	-----tttacgagcaatatcag	aaTgttttacggttcacggtttgtggccttca	ttctgggaataaacagtggaacaacatggcacctgtgggtat	aaacaaaacgtctctcaaatcctctca	actgaattggttgaggtcactcctttgcagc
S118	gattattttcaatttacgagcaatatcag	aaTgttttacggttcacggtttgtggccttca	ttctgggaataaacagtggaacaacatggcacctgtgggtat	aaacaaaacgtctctcaaatcctctca	actgaattggttgaggtcactcctttgcagc
S119	gattattttcaatttacgagcaatatcag	aaTgttttacggttcacggtttgtggccttca	ttctgggaataaacagtggaacaacatggcacctgtgggtat	aaacaaaacgtctctcaaatcctctca	actgaattggttgaggtcactcctttgcagc
S120	-----	aaTgttttacggttcacggtttgtggccttca	ttctgggaataaacagtggaacaacatggcacctgtgggtat	aaacaaaacgtctctcaaatcctctca	-----
S121	gattattttcaatttacgagcaatatcag	aaTgttttacggttcacggtttgtggccttca	ttctgggaataaacagtggaacaacatggcacctgtgggtat	aaacaaaacgtctctcaaatcctctca	actgaattggttgaggtcactcctttgcagc
S122	gattattttcaatttacgagcaatatcag	aaTgttttacggttcacggtttgtggccttca	ttctgggaataaacagtggaacaacatggcacctgtgggtat	aaacaaaacgtctctcaaatcctctca	actgaattggttgaggtcactcctttgcagc
S123	-----	aaTgttttacggttcacggtttgtggccttca	ttctgggaataaacagtggaacaacatggcacctgtgggtat	aaacaaaacgtctctcaaatcctctca	-----
S124	-----	aaTgttttacggttcacggtttgtggccttca	ttctgggaataaacagtggaacaacatggcacctgtgggtat	aaacaaaacgtctctcaaatcctctca	-----
S125	gattattttcaatttacgagcaatatcag	aaTgttttacggttcacggtttgtggccttca	ttctgggaataaacagtggaacaacatggcacctgtgggtat	aaacaaaacgtctctcaaatcctctca	actgaattggttgaggtcactcctttgcagc
S126	gattattttcaatttacgagcaatatcag	aaTgttttacggttcacggtttgtggccttca	ttctgggaataaacagtggaacaacatggcacctgtgggtat	aaacaaaacgtctctcaaatcctctca	actgaattggttgaggtcactcctttgcagc
S127	-----	aaTgttttacggttcacggtttgtggccttca	ttctgggaataaacagtggaacaacatggcacctgtgggtat	aaacaaaacgtctctcaaatcctctca	-----
S128	-----	aaTgttttacggttcacggtttgtggccttca	ttctgggaataaacagtggaacaacatggcacctgtgggtat	aaacaaaacgtctctcaaatcctctca	-----
Cons.	gattattttcaaTTtAcGcagcaatatcag	AAgTtGTTtAcGgTtCacGgTtTgTGGcTTTCA	TTtTGGAatAaAcAGTGGaacAAACAATGcTccTGTgggtat	AaaCAaaAGTcTctgaaATcCTctca	ActgAATtGcTtGAGgTCactcTtTgcagT

در موارد وجود خط زیر نوکلئوتید، در توالی نوکلئوتیدی خطا در توالی به امانت گذاشته شده در بانک اطلاعاتی وجود داشت.

تکثیر این آل‌ها با هدف تعیین توالی کامل از ابتدای محل آغاز رونویسی باشد.

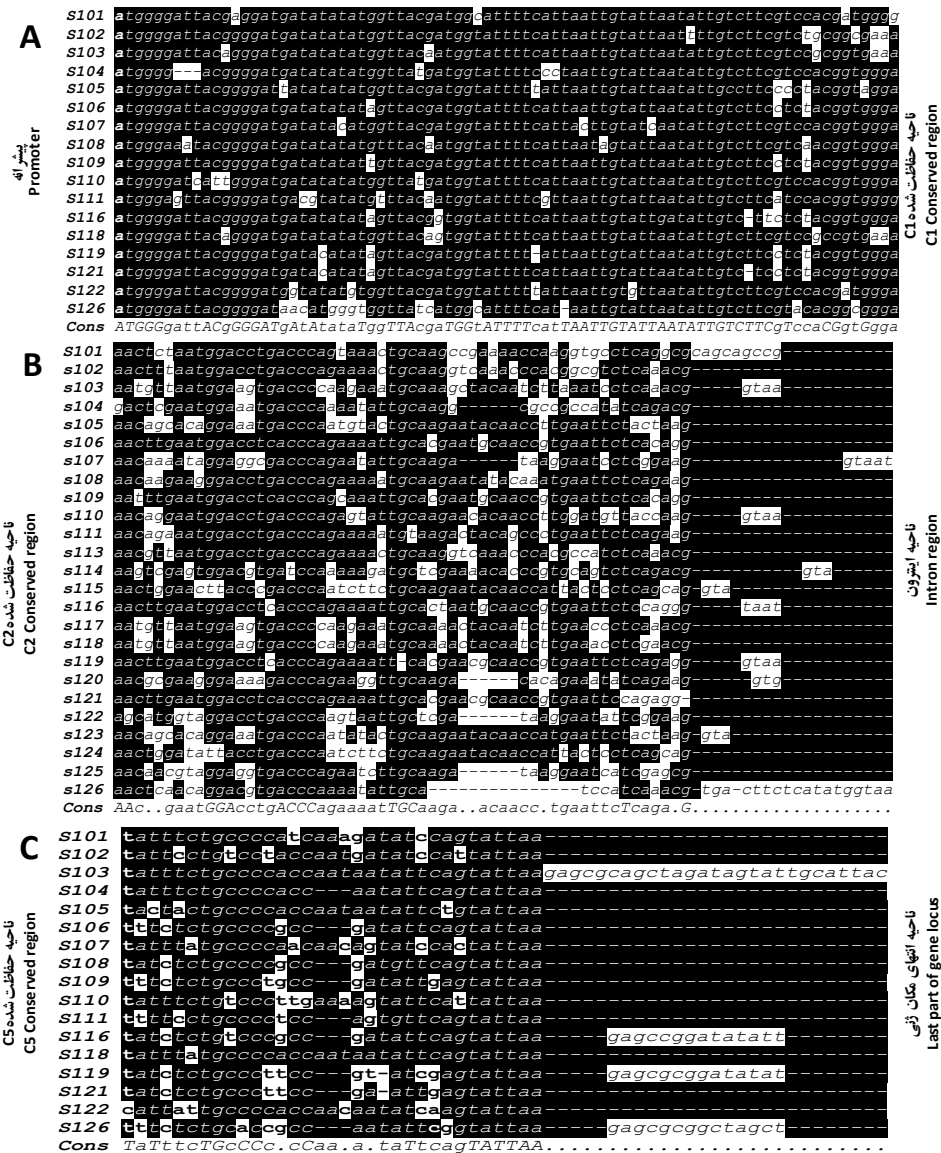
مقایسه توالی نوکلئوتیدی و اسیدآمینه‌ای نواحی حفاظت شده C1 تا C5 چنانچه انتظار می‌رفت نشان‌دهنده میزان بالای حفاظت‌شدگی این نواحی تقریباً در تمامی آل‌های ۲۷ گانه شناسائی شده در گونه گلابی معمولی بود (جدول ۳ و جدول ۴). بالاترین میزان حفاظت‌شدگی نوکلئوتیدی در ناحیه حفاظت شده C1 و سپس C2 مشاهده شد و سایر نواحی مشتمل بر C3، RC4 و C5 از میزان حفاظت‌شدگی پائین‌تری در مقایسه با دو ناحیه قبل از اینترون یعنی C1 و C2 برخوردارند (جدول ۳). علاوه براین، بالاترین میزان حفاظت‌شدگی اسیدآمینه‌ای در ناحیه C2 و سپس C1 و سپس در سایر نواحی حفاظت شده مشتمل بر سه ناحیه C3، RC4 و C5 مشاهده شد (جدول ۴).

ارزیابی ناحیه پیشرانه‌ای آل‌های فوق نشان داد که برخلاف معمول، در ناحیه پیشرانه‌ای این مکان ژنی دو جایگاه CAAT، یکی در حدود ۴۰ و دیگری در حدود ۸ نوکلئوتید بالادست شروع رونویسی با توالی مرکزی caaat وجود دارد (جدول ۲). بررسی هم‌ردیفی ناحیه پیشرانه‌ای آل‌های فوق بیانگر وجود نواحی حفاظت‌شده‌ای، دقیقاً در بالادست ناحیه شروع رونویسی است. هم‌چنین با توجه به وجود ۱۸ نوکلئوتید با میزان حفاظت‌شدگی زیاد در بالادست شروع رونویسی، همراه با کد شروع رونویسی (atg)، کدکننده اسیدآمینه متیونین (M) و وجود یک ناحیه کدکننده (ggg) گلیسین (G) در پائین دست کدشروع رونویسی تقریباً تمامی آل‌های فوق، نشان‌دهنده این است که در گونه گلابی معمولی یا *P. communis* ناحیه پیشرانه‌ای می‌تواند دربردارنده نواحی مناسبی برای طراحی آغازگرهای عمومی برای

جدول ۴- مقایسه توالی پلی‌پپتیدی نواحی حفاظت‌شده C1 تا C5 در آل‌های S شناسائی شده گلابی. *Pyrus communis* L.

ناحیه C5	ناحیه RC4	ناحیه C3	ناحیه C2	ناحیه C1	آل S
TELVEVSLCS	KQNVSCILS	FWNKQWIKHGTTCGY	KLFTVHGLWPS	DYFQFTQQYQ	S101
TELVEVSLCS	KQNVSYILS	FWNKQWIKHGTTCGS	KLFTVHGLWPS	DYFQFTQQYQ	S102
TELVEVGLCS	KQNVSEILS	FWNKQWIKHGTTCGY	KLFTVHGLWPS	DYFQFTQQYQ	S103
TELVEVGLCS	KQNVSEILS	FWNKQWIKHGTTCGS	KLFTVHGLWPS	DYFQFTQQYQ	S104
TELVEVTICS	KQNVSEILS	FWNKQWIKHGTTCGS	KLFTVHGLWPS	DYFQFTQQYQ	S105
TELVEVSLCS	KQNVSEILS	FWNKQWIKHGTTCGS	KLFTVHGLWPS	DYFQFTQQYQ	S106
TELVEVTLCS	KQNVSRILS	FWNKQWIKHGTTCGY	KLFTVHGLWPS	DYFQFTQQYQ	S107
TELVEVTLCS	KQNVSAILS	FWNKQWIKHGTTCGY	KLFTVHGLWPS	DYFQFTQQYQ	S108
TELVEVSLCS	KQNVSGILS	FWNKQWIKHGTTCGS	KLFTVHGLWPS	DYFQFTQQYQ	S109
TELVEVTLCS	KQNVSEILS	FWNKQWIKHGTTCGS	KLFTVHGLWPS	DYFQFTQQYQ	S110
TELVEVTLCS	KQNVSAILS	FWNKQWIKHGTTCGY	KLFTVHGLWPS	DYFQFTQQYQ	S111
TELVEVSLCS	KQNVSYILS	FWNKQWIKHGTTCGS	KLFTVHGLWPS	DYFQFTQQYQ	S113
TELVEVTLCS	KQNVSKILS	FWNKQWIKHGTTCGS	KLFTVHGLWPS	DYFQFTQQYQ	S114
TELVEVTLCS	KQNVSKILS	FWNKQWIKHGTTCGY	KLFTVHGLWPS	DYFQFTQQYQ	S115
TELVEVSLCS	KQNVSEILS	FWNKQWIKHGTTCGY	KLFTVHGLWPS	DYFQFTQQYQ	S116
TELVEVGLCS	KQNVSEILS	FWNKQWIKHGTTCGY	KLFTVHGLWPS	----FTQQYQ	S117
TELVEVGLCS	KQNVSEILS	FWNKQWIKHGTTCGY	KLFTVHGLWPS	DYFQFTQQYQ	S118
TKLVEVSLCS	KQNVSGILS	FWNKQWIKHGTTCGS	KLFTVHGLWPS	DYFQFTQQYQ	S119
TKLVEVSLCS	KQNVSYILS	FWNKQWIKHGTTCGS	KLFTVHGLWPS	-----	S120
TKLVEVSLCS	KQNVSGILS	FWNKQWIKHGTTCGS	KLFTVHGLWPS	DYFQFTQQYQ	S121
TELVEVTLCS	KQNVSGILS	FWNKQWIKHGTTCGY	KLFTVHGLWPS	DYFQFTQQYQ	S122
T-----	RQNVSEILS	FWNKQWIKHGTTCGS	KLFTVHGLWPS	-----	S123
T-----	KQNVSKILS	FWNKQWIKHGTTCGY	KLFTVHGLWPS	-----	S124
TELVEVTLCS	KQNVSKILS	FWNKQWIKHGTTCGY	KLFTVHGLWPS	DYFQFTQQYQ	S125
TELVEVTLCS	KQNVSKILS	FWNKQWIKHGTTCGS	KLFTVHGLWPS	DYFQFTQQYQ	S126
T-----	KQNVSEILS	FWNKQWIKHGTTCGS	KLFTVHGLWPS	-----	S127
T-----	KQNVSRILS	FWNKQWIKHGTTCGY	KLFTVHGLWPS	-----	S128
tELVEvtLCS	RQNVSeILS	FWnkQwiKHGScgy	KLFTVHGLWPS	DYfQftQQYQ	Consensus





شکل ۱- نتایج هم‌ردیفی ناحیه ژنی بین پیش‌رانه و ناحیه حفاظت شده اول (C1) (A)؛ ناحیه ژنی بین ناحیه حفاظت شده دوم (C2) و اینترون (در بردارنده ناحیه دارای تنوع زیاد اول- HV1) (B) و ناحیه ژنی انتهایی بین ناحیه حفاظت شده پنجم (C5) و انتهای ژن (C) در آل‌های مختلف خود ناسازگاری در گونه *Pyrus communis* L.

شده در فعالیت S-RNase حاصل از ترجمه RNA حاصل از آن، موتاسیون‌هایی قدرت دوام و بقاء بیش‌تری داشته‌اند که کم‌تر منجر به تغییر کد اسیدآمینهای شوند. از سوی دیگر توالی اسیدآمینهای نواحی حفاظت‌شده C1 تا C5 به ترتیب به صورت FWNKQWIKHGSCGY\_KLFTVHGLWPS\_DYFQTTQQYQ و KQNVSEILS و TELVEVTLCS به‌عنوان محتمل‌ترین نواحی حفاظت‌شده این گونه است. نکته قابل توجه در این بررسی این است که بر اساس تحقیقات قبلی، وجود دو عدد اسید آمینه هیستیدین (Histidine) مشخص شده با علامت اختصاری H که اولین آن در ناحیه حفاظت شده C2 و دیگری در ناحیه حفاظت

با توجه به وجود بالاترین میزان حفاظت‌شدگی نوکلئوتیدی در ناحیه C1 و با توجه به اینکه این ناحیه قبل از ناحیه اینترون قرار گرفته است، در بررسی‌های متعدد نظیر تحقیق Mota et al. (2007) به‌عنوان بهترین ناحیه برای طراحی آغازگر(های) پیشرو برای تکثیر آل‌های خودناسازگاری گلابی معمولی و دیگر گونه‌های نظیر سیب (*Malus domestica*) توسط (2002) Zuccherelli et al. مد نظر قرار گرفته است. این امر همچنین نشان‌دهنده این است که در سطح مکان ژنی، موتاسیون‌های نقطه‌ای و تغییر نوع نوکلئوتید در طی تکامل ارقام گلابی در این این لوکوس اتفاق افتاده، لیکن با توجه به اهمیت نواحی حفاظت

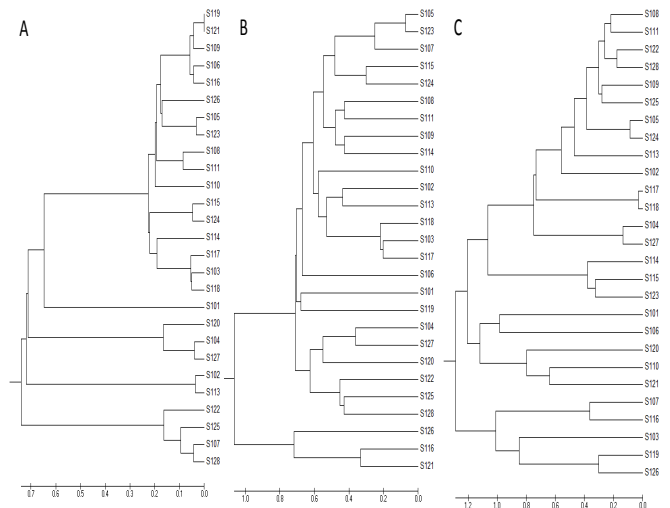
طول اینترون، اینترون تا C3، C3 تا RC4، RC4 تا C5 و C5 تا انتهای ژن نشان می‌دهد که اطلاعات به‌امانت گذاشته‌شده در بانک اطلاعاتی در مواردی دارای اشکالاتی خصوصاً پرش از یک نوکلئوتید در مرحله توالی‌یابی بوده که خصوصاً در هم‌ردیفی ناحیه سیگنال روی دو آل *S116* و *S121* در مکان نوکلئوتیدهای شماره ۶۶ به‌خوبی آشکار است (شکل ۱-C). بر خلاف این حفاظت‌شدگی بالا در ناحیه سیگنال، به‌دلیل وجود ناحیه تنوع بسیار بالا (HVR) در بین C2 و اینترون، این ناحیه خصوصاً در منطقه انتهائی از تنوع بسیار بالائی برخوردار بود (شکل ۱-B). علاوه بر این، منطقه بین ناحیه حفاظت‌شده C5 تا انتهای ژن نیز از حفاظت‌شدگی نسبتاً مطلوبی برای طراحی آغازگرهای عمومی برای تکثیر کل مکان ژنی و توالی‌یابی و تکمیل اطلاعات موجود در بانک‌های اطلاعاتی برخوردار است (شکل ۱-C). این بررسی با توجه به طول حداکثری ۲۴۲۲ نوکلئوتیدی آل خودناسازگاری *S110*، از نظر تکثیر با PCR امکان‌پذیر و از نظر توالی‌یابی حداکثر با یک جفت آغازگر حدواسط به‌خوبی قابل اجرا خواهد بود. تجزیه خوشه‌ای رابطه فیلوژنی آل‌های مختلف خودناسازگاری ۲۷ گانه گونه گلابی معمولی نشان داد که بر اساس توالی پلی‌پپتیدی، کلیه آل‌ها به غیر از دو آل *S119* و *S121* متفاوت و دو آل فوق از این نظر کاملاً یکسان می‌باشند (شکل ۲-A)، هر دو آل بر اساس جدول ۱، دارای یک اینترون نسبتاً کوتاه حدود ۱۵۰ نوکلئوتیدی بوده و چنانچه در آنالیز خوشه‌ای رابطه فیلوژنی آل‌های فوق مشخص است، این دو آل از نظر توالی پلی‌پپتیدی کاملاً یکسان، لیکن از نظر اینترون تاحدی متفاوت، به‌صورتی که از نظر توالی ناحیه حفاظت‌شده دوم (C2) تا انتهای ناحیه حفاظت‌شده چهارم (C4) (شکل ۲-B) و هم‌چنین بر اساس توالی اینترون مستقل (شکل ۲-C)، با آل‌های دیگری خوشه‌بندی شدند. در بررسی (Takasaki et al. 2006) به‌دلیل عدم گزارش و شناخت آل *S121* تا آن زمان و گزارش بعدی این آل توسط Sanzol (2009b) (جدول ۱)، شباهت پلی‌پپتیدی این دو آل مورد گزارش قرار نگرفت. هم‌چنین در بررسی اخیر (2014) Nikzad Gharehaghaji et al. علی‌رغم بررسی توالی پلی‌پپتیدی آل‌های مختلف خودناسازگاری گونه گلابی معمولی، با بیان دلیل روشن نبودن منشاء این آل بر اساس نظر (Goldway et

شده C5 قرار دارد، برای فعالیت S-RNase پروتئین کد شده توسط این مکان ژنی ضروری است (Zhang and Xue 2008). Royo et al. (1994) گزارش کردند که در گونه گوجه‌فرنگی *Lycopersicon peruvianum* از دست رفتن هیستدین‌های نواحی حفاظت‌شده، منجر به خودسازگاری خواهد شد. مقایسه نتایج این تحقیق مبنی بر هم‌ردیفی نواحی حفاظت‌شده C1 تا C5 در جدول ۲ با گزارش Royo et al. (1994) نشان می‌دهد که در گلابی وجود هیستیدین ناحیه حفاظت‌شده C5 برای فعالیت S-RNase در گونه گلابی ضروری نیست به‌صورتی که در هیچ یک از آل‌های ۲۷ گانه، این اسید آمینه در ناحیه C5 مشاهده نشد (جدول ۳). در بررسی Ida et al. (2001) گزارش شده که بر خلاف نظر Royo et al. (1994)، دو هیستیدین موجود در دو ناحیه C2 و C3 برای فعالیت S-RNase ضروری است. مقایسه توالی اسیدآمینه‌ای نواحی حفاظت‌شده گونه گلابی معمولی در جدول ۳ نشان می‌دهد که این دو اسید آمینه هیستیدین بدون هیچ استثنائی در کلیه آل‌های خودناسازگاری گلابی یکی در ناحیه C2 (اسید آمینه پنجم) و دیگری در ناحیه C3 (اسید آمینه دوم) به صورت کاملاً محافظت‌شده وجود دارند. این امر تایید کننده نظر Ida et al. (2001) در اهمیت دو هیستیدین این دو ناحیه بوده و اینکه به نظر می‌رسد در بین گونه‌های مختلف گیاهی تا حدی در مکان قرار گیری این هیستیدین‌ها تفاوت وجود دارد.

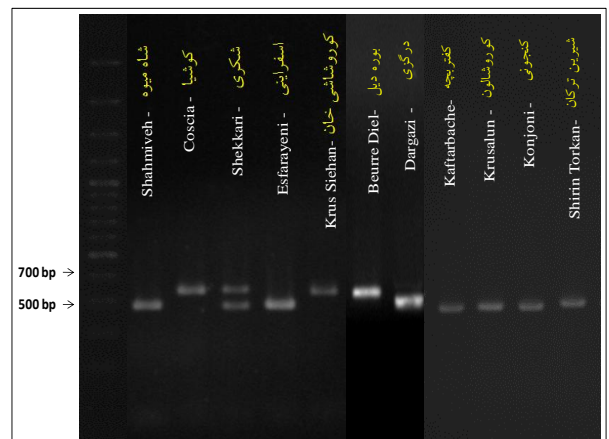
در مرور ساختار مولکولی آل‌های خودناسازگاری گیاهان مختلف توسط Zhang and Xue (2008)، به غیر از پنج ناحیه حفاظت‌شده C1 تا C5، ناحیه بین پیشرانه تا C1 به‌عنوان ناحیه سیگنال و دو ناحیه دارای تنوع بسیار بالا، اولی بین C3 و اینترون، و دومی بین اینترون و RC4 گزارش شد. ارزیابی هم‌ردیفی این نواحی به تفکیک در آل‌های مختلف گلابی گونه *P. communis* نشان داد که در ناحیه سیگنال، میزان قابل قبولی از حفاظت‌شدگی وجود دارد. این مسئله نشان می‌دهد که علاوه بر ناحیه C1 و ناحیه پیشرانه که در این بررسی برای طراحی آغازگرهای مناسب برای تکثیر این مکان ژنی قابل استفاده است، ناحیه سیگنال نیز به‌عنوان ناحیه‌ای مناسب برای طراحی آغازگرهای مناسب در گونه گلابی معمولی قابل استفاده می‌باشد (شکل ۱-A). هم‌چنین ارزیابی دقیق بخش‌های مختلف سیگنال، ناحیه بین C1 تا C2، C2 تا اینترون،

بومی، در این بررسی در ادامه آنالیز بیوانفورماتیک آل‌های این مکان ژنی، به بررسی این آل‌ها بر اساس روش تعیین توالی پرداخته شد. نتایج بیانگر تکثیر یک باند در ارقام درگری، شیرین‌ترکان، شاه‌میوه، کفتربچه، کنجونی، اسفراینی و دو رقم اروپایی کوشیا، و بوره‌دیل و دو رقم آسیای مرکزی شامل کروس‌سیحان و کوروسالون بود و تنها در رقم شگری دو باند تکثیر شد (شکل ۳). طول تمامی باندهای تکثیری در واکنش جفت آغازگرهای استفاده شده در محدوده ۵۲۰ تا ۷۵۰ باز بود. بر اساس نتایج توالی‌یابی و هم‌ردیفی با اطلاعات امانت گذاشته شده در بانک اطلاعاتی، در رقم شاه‌میوه یک باند با وزن تقریبی ۵۲۰ جفت‌باز تکثیر شد، که بیانگر تشابه ۱۰۰ درصد و حضور یک آل *S107* گونه گلابی معمولی در این رقم بود. این نتایج تایید کننده نتایج Nikzad Gharehaghaji et al. (2014) مبنی بر وجود آل *S107* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی در این رقم است. هم‌چنین با توجه به آل جدید *S126* در این رقم، که توسط Nikzad Gharehaghaji et al. (2014) گزارش شده، آغازگر پیشرو FB-R1 قادر به تکثیر آل دیگر این رقم یعنی آل *S126* به دلیل عدم تشابه کافی نبوده است. هم‌چنین در ارقام دارای منشاء آسیای مرکزی شامل دو رقم کوروسالون و کروس‌سیحان، به ترتیب وزن تقریبی باند ۵۲۰ و ۶۵۰ باز بود، که در رقم آل *S108* گلابی معمولی با شباهت کامل و در رقم دوم آل *S117* همان گونه شناسائی شد. هم‌چنین در دو رقم اروپائی بوره‌دیل و کوشیا وزن تقریبی باند ۶۵۰ باز بود و تعیین توالی و هم‌ردیفی بیانگر یک آل *S104* گونه گلابی معمولی در این ارقام بود. این نتیجه با گزارش قبلی (Zisovich et al. 2004) در رابطه با وجود آل *S104* در رقم کوشیا منطبق و نشان‌دهنده صحت انجام بررسی بوده و در رابطه با رقم بوره‌دیل، اولین گزارش از تعیین وجود آل *S104* در این رقم است. هم‌چنین در ارقام کفتربچه و شیرین‌ترکان، باندهای با وزن تقریبی ۵۲۰ باز تکثیر شد، که دارای ۹۹ درصد شباهت با توالی نوکلئوتیدی آل *S1* گونه *P. betulifolia* و همین میزان شباهت با آل *S35* گونه *P. ussuriensis* نشان‌دادند. این نتایج در وهله نخست اولین گزارش از وجود آل خودناسازگاری گونه‌های شرقی، در این ارقام است که اولین رقم دارای منشاء اصفهان و رقم دوم از خراسان می‌باشد. از سوی دیگر، نتایج با گزارش

al. در بررسی وارد نشد. این در حالی است که تفکیک بخش‌های مختلف آل‌های خودناسازگاری در گلابی نشان‌دهنده توالی متفاوت این دو آل در ناحیه اینترونی بوده و از طرفی به دلیل طول بسیار نزدیک ناحیه اینترونی که اغلب روی ژل آگاروز مورد استفاده، قابل شناسائی نیست، امکان ایجاد تداخل بین این دو آل را بسیار محتمل می‌سازد.



شکل ۲- آنالیز خوشه‌ای بر اساس روش UPGMA روی توالی پلی‌پپتیدی (A) و نوکلئوتیدی (B) روی ابتدای ناحیه حفاظت‌شده دوم (C2) تا انتهای ناحیه حفاظت‌شده چهارم (C4)، و هم‌چنین بر اساس توالی اینترون مستقل در آل‌های مختلف خودناسازگاری در گونه *Pyrus communis* L.



شکل ۳- باندهای تکثیر شده متعلق به مکان ژنی خودناسازگاری در ارقام مختلف بومی و وارداتی گلابی متعلق به گونه *Pyrus communis* L. استفاده از جفت آغازگر FB-R1 و Sall-F

با توجه به نتایج متفاوت گزارش شده در رابطه با برخی از آل‌های خودناسازگاری ارقام مختلف گلابی و به‌ویژه در ارقام

آلل‌های گلابی موثر نبوده و استفاده از روش تعیین توالی روش بسیار قابل اعتمادتری خواهد بود. آلل دیگر این رقم در بررسی Babaei et al. (2012) و Nikzad Gharehaghaji et al. (2014) به ترتیب براساس استفاده از مارکر CAPS و آغازگرهای اختصاصی، آلل *SI02* گزارش شده که بر اساس شواهد می‌توان ژنوتیپ *SI02/SI19* را برای رقم درگزی جمع‌بندی کرد.

در نهایت در رقم کنجونی با منشاء اصفهان، باندی با وزن بیش از ۵۰۰ باز تکثیر شد که دارای شباهت بالای ۹۹ درصد به *S35* گونه *P. ussuriensis* بود. (Nikzad Gharehaghaji et al. (2014) احتمال تریپلوئید بودن این رقم را داده و در آن سه آلل گونه گلابی معمولی شامل *SI08*، *SI17* و *SI20* گزارش کردند. هم‌چنین Babaei et al. (2012) با استفاده از روش CAPS، آلل *S42* گونه *P. ussuriensis* و آلل *S5* گونه *P. pyrifolia* را در این رقم گزارش کردند. با توجه به استفاده از آغازگرهای عمومی (Sanzol, 2009a) و طول باند حاصله مشتمل بر ۶۸۰، ۸۰۰ و ۱۶۰۰ باز، در بررسی (Nikzad Gharehaghaji et al. (2014) آغازگرهای فوق با توالی‌های شناسائی شده توسط Babaei et al. (2012) و توالی این تحقیق هم‌ردیف شد و مشخص شد که آلل *S35* گونه *P. ussuriensis* و آلل *S5* گونه *P. pyrifolia* هر دو با آغازگرهای فوق، قادر به تکثیر باندهائی به طول ۶۸۰ باز هستند. هم‌چنین آغازگرهای فوق قادر به تکثیر باند ۸۴۰ بازی روی آلل *S42* گونه *P. ussuriensis* می‌باشند. در بررسی Erfani et al. (2012) این رقم با گونه شرقی *P. ×bretschneideri* در یک خوشه طبقه‌بندی شد. از این نتایج اینچنین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که روش آغازگرهای اختصاصی در مورد ارقام یا ژنوتیپ‌هائی که احتمال وجود جریان ژنی دیگر گونه‌ها در آنها وجود دارد روش قابل اطمینانی برای تعیین نوع آلل خودناسازگاری نبوده و لازم است از روش تعیین توالی استفاده شود. هم‌چنین لازم است آلل‌های خودناسازگاری این رقم در بررسی کامل‌تری مورد ارزیابی نهائی قرار گیرد.

نتایج این تحقیق نشان داد که در حال حاضر تعداد ۲۱ آلل خودناسازگاری از تعداد ۲۷ آلل شناسائی شده گونه گلابی معمولی به‌طور کامل تعیین توالی و در دسترس است. لذا در برنامه‌های تحقیقاتی بعدی لازم است شش عدد آلل باقی‌مانده

(Babaei et al. (2012) مبنی بر وجود جریان ژنی گلابی‌های شرق آسیا در برخی ارقام بومی و قدیمی کشور در انطباق بوده و نشان می‌دهد که هیبریداسیون بین‌گونه‌ای، در شکل‌گیری ارقام گلابی ایران در گذشته‌ای نامعین نقش داشته است. بر این اساس که ارقام فوق از نظر ظاهری و گیاهشناختی متعلق به گونه گلابی معمولی یا گونه *P. communis* بوده و با شباهت‌های اندکی در رابطه با میوه، دارای حداقل یک آلل از گونه شرقی گونه *P. ussuriensis* می‌باشند. باند تکثیر شده در رقم اسفراینی با وزن ۵۷۰ باز، با تشابه بالای ۹۹ درصد به آلل *SI19* گلابی معمولی شباهت داشت و باندهای دوگانه رقم شکری به ترتیب با وزن تقریبی ۶۶۰ و ۵۶۰ باز بودند که این دو آلل نیز به ترتیب با آلل *SI9* گونه *P. ×bretschneideri* و باند کوچک‌تر با آلل *SI07* گلابی معمولی شباهت داشت. این نتایج نیز اولین گزارش از وجود آلل‌های فوق در دو رقم اسفراینی و شکری، هر دو با منشاء شمال شرق کشور بوده و تا قبل از این تحقیق، بررسی در رابطه با آلل‌ها این ارقام گزارش نشده بود.

در رابطه با رقم درگزی، تنها باند تکثیر شده با وزن ۵۵۰ باز دارای ۹۳ درصد شباهت با آلل *SI19* در گلابی معمولی بود، لیکن در بررسی (Nikzad Gharehaghaji et al. (2014) آلل *SI21* برای این رقم گزارش شد، که حاصل از تکثیر این آلل با دو آغازگر *B52S21F2* for و *B53S21R2* rev بوده است. بر اساس محل اتصال آغازگرهای اختصاصی و غیراختصاصی مورد استفاده در تحقیق فوق، بایستی یک باند ۱۷۲۲ و یک باند ۴۸۳ بازی تکثیر شود که وزن باندهای ۱۷۰۰ و ۶۵۰ بازی گزارش شد. لذا به نظر می‌رسد آغازگرهای گزارش شده توسط (Sanzol (2009a) و باند مورد نظر بر اساس کد دسترسی EU477839 با طول اینترون ۱۵۳ باز برای *SI21* که در رقم پاسکراسان گزارش شده توسط آغازگرهای فوق، قابل تفکیک نبوده و در بررسی (Nikzad Gharehaghaji et al. (2014) به اشتباه آلل *SI21* که دارای شباهت بسیار زیاد به آلل *SI19* می‌باشد، گزارش شده است. بر اساس نتایج حاصله در ارزیابی بیوانفورماتیک و مقایسه نتایج (Nikzad Gharehaghaji et al. (2014) و Babaei et al. (2012) و نتایج این تحقیق، به نظر می‌رسد، ارزیابی بر اساس آغازگرهای اختصاصی به‌صورت کامل، حداقل در برخی از

آل‌های شناسائی شده، هیچ دو آللی به طور کامل شباهت نداشته و یکسان نیستند، و کنار گذاشتن آلل *S119* سبب بروز برخی اشتباهات در شناسائی آل‌های این گونه در ارقام بومی ایران شده است. در نهایت در این تحقیق ضمن شناسائی، تکمیل و یا تایید آل‌های خودناسازگاری ارقام مختلف، خصوصاً برخی ارقام بومی کشور، به بروز اشتباهات ناشی از استفاده از آغازگرهای اختصاصی بدون در نظر گرفتن، جریان ژنی دیگر گونه در ارقام اشاره و جمع‌بندی شد که استفاده از روش تعیین توالی به‌عنوان مطمئن‌ترین راه برای شناسائی آل‌ها خصوصاً در موارد این‌چنینی مطرح است. لذا ضمن تایید جریان ژنی دیگر گونه‌های گلابی در ارقام کشور، لازم است برخی ارقام نظیر رقم کنجونی مورد بررسی تکمیلی و مجدد قرار گیرند. از طرفی انجام یک برنامه بیوانفورماتیک عمومی روی این مکان ژنی برای کل جنس *Pyrus* که تاکنون انجام نگرفته است، همانند بررسی انجام شده در این تحقیق ضروری به نظر می‌رسد.

بررسی نهائی شوند. بررسی بیوانفورماتیک بخش‌های مختلف و خصوصاً ناحیه پیش‌رانه که برای اولین بار در این تحقیق بررسی شد، نشان داد نواحی نسبتاً حفاظت شده‌ای برای طراحی آغازگرهای عمومی برای تکثیر کل طول آل‌های خودناسازگاری، به جای استفاده از روش کلون‌کردن، برای توالی‌یابی کامل آل‌ها هم در ناحیه پیش‌رانه، ناحیه سیگنال و هم در انتهای آل وجود دارد. بر این اساس پیشنهاد می‌شود قابلیت تکثیر کامل آل‌های گلابی در ادامه این برنامه و تحقیقات قبلی، با استفاده از آغازگرهای این نواحی مورد ارزیابی قرار گیرد. در ادامه بررسی‌های بیوانفورماتیک، بررسی جامع انجام گرفته روی آل‌های ۲۷ گانه شناسائی شده در این گونه، علاوه بر اینکه به‌منظور استفاده در برنامه‌های تحقیقاتی بعدی کنارهم گردآوری شد، نشان داد که دو آلل *S121* و *S119* بر خلاف اینکه به دلیل شباهت نسبی، تنها آلل *S121* مد نظر بوده و آلل دیگر حذف شده است، لازم است به دلیل تفاوت در اینترون، مجدداً به‌عنوان آلل مستقل مد نظر قرار گیرد. از سوی دیگر نشان داده شد که از بین

### منابع

- Babaei F, Abdollahi H, Hajmansoor S (2012) Identification of self-incompatibility alleles in some Iranian native pear cultivar. Seed and Plant Improvement Journal 28-1:201-214. (In Farsi).
- Broothaerts W, Janssens GA, Proost P, Broekaert F (1995) cDNA cloning and molecular analysis of two self-incompatibility alleles from apple. Plant Molecular Biology 27:499-511.
- Corpet F (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering Nucleic Acids Research 16:10881-10890.
- de Nettancourt D (1977) Incompatibility in angiosperms. In: Frankel R, Gall GAE, Linskens HF (Eds.) Monographs in theoretical and applied genetics. Springer, Berlin Heidelberg, New York, USA. 1-27.
- Erfani J, Ebadi A, Abdollahi H, Fatahi MR (2012) Genetic diversity of some pear cultivars and genotypes using simple sequence repeat (SSR) markers. Plant Molecular Biology Reporter 30:1065-1072.
- Goldway M, Takasaki T, Sanzol J, Mota M, Zisovich A, Stern R, Sansavini S (2009) Renumbering the *S*-RNase alleles of European pears (*Pyrus communis* L.). Scientia Horticulturae 119:417-422.
- Heldt HW (2005) Plant Biochemistry. Elsevier Academic Press, Burlington, USA. 622p.
- Ida K, Norioka S, Yamamoto M, Kumasaka T, Yamashita E, Newbiggin E, Clarke AE, Sakiyama F, Sato M (2001)

- The 1.55 Å resolution structure of *Nicotiana alata* *SF11*-RNase associated with gametophytic self-incompatibility. Journal of Molecular Biology 314:103-112.
- Morgan J (2015) The book of pears. Ebury Press, The Royal Horticultural Society of UK. 304p.
- Moriya Y, Takai Y, Okada K, Ito D, Shiozaki Y, Nakanishi T, Takasaki T (2005) Parthenocarpy and self- and cross-incompatibility in ten European pear cultivars. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 74:424-430.
- Moriya Y, Yamamoto K, Okada K, Iwanami H, Bessho H, Nakanishi T, Takasaki T (2007) Development of a CAPS marker system for genotyping European pear cultivars harboring 17 *S* alleles. Plant Cell Reports 26:345-354.
- Mota M, Tavares L, Oliveira CM (2007) Identification of *S*-alleles in pear (*Pyrus communis* L.) cv. 'Rocha' and other European cultivars. Scientia Horticulturae 113:13-19.
- Nikzad Gharehaghaji A, Arzani K, Abdollahi H, Shojaeian A, Dondini L, De Franceschi P (2014) Genomic characterization of self-incompatibility ribonucleases in the Central Asian pear germplasm and introgression of new alleles from other species of the genus *Pyrus*. Tree Genetics and Genomics 10:411-428.
- Royo J, Kunz C, Kowiyama Y, Anderson MA, Clarke AE, Newbiggin E (1994) Loss of a histidine residue at the active site of *S*-locus ribonuclease is associated with self-

compatibility in *Lycopersicon peruvianum*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 91:6511-6514.

Sanzol J (2009a) Genomic characterization of self-incompatibility ribonucleases (*S*-RNases) in European pear cultivars and development of PCR detection for 20 alleles. *Tree Genetics and Genomics* 5:393-405.

Sanzol J (2009b) Pistil-function breakdown in a new *S*-allele of European pear, *S21*, confers self-compatibility. *Plant Cell Reports* 28:457-467.

Sanzol J, Herrero M (2002) Identification of self-incompatibility alleles in pear cultivars (*Pyrus communis* L.). *Euphytica* 128:325-331.

Sanzol J, Robbins TP (2008) Combined analysis of *S*-alleles in European pear by pollinations and PCR based *S*-genotyping: correlation between *S* phenotypes and *S*-RNase genotype. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 133:213-224.

Takasaki T, Moriya Y, Okada K, Yamamoto K, Iwanami H, Bessho H, Nakanishi T (2006) cDNA cloning of nine *S* alleles and establishment of a PCR-RFLP system for

genotyping European pear cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 112:1543-1552.

Tomimoto Y, Nakazaki T, Ikehashi H, Ueno H, 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.

Zhang Y, Xue Y (2008) Molecular biology of *S*-RNase-based self-incompatibility. In: Franklin-Tong, VE (Ed.) *Self-compatibility in flowering plants: evolution, diversity, and mechanisms*. Springer-Verlag, Germany. 193-216.

Zisovich AH, Stern RA, Shafir S, Goldway M (2004) Identification of seven *S*-alleles from the European pear (*Pyrus communis*) and the determination of compatibility among cultivars. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 79:101-106.

Zuccherelli S, Tassinari P, Broothaerts W, Tartarini S, Dondini L, Sansavini S, (2002) *S*-allele characterization in self-incompatible pear (*Pyrus communis* L.). *Sexual Plant Reproduction* 15:153-158.