تولیدات گیاهی (مجله علمی کشاورزی)، جلد ۳۶ شماره ۳، پاییز ۹۲

کاربرد روش اسکار _ پی. سی.آر در تعیین جنسیت دانهال‌های بنه

بهنام اسفندیاری[۱]*، غلام‌حسین داوری‌نژاد[۲] و فرج الله شهریاری[۳]

۱*- **نویسنده مسؤول:** دانشجوی دکتری باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد (Behnam.esfandiyari@gmail.com)

۲- استاد گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳- استاد گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهان زراعی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۱/۹/۱۵

چکیده

بنه گیاهی دو پایه می‌باشد که علاوه بر ارزش بالای تغذیه‌ای و دارویی، بدلیل داشتن صفات مطلوب یکی از مهمترین پایه‌های پسته اهلی محسوب می‌شود. با توجه به این‌که انتخاب به کمک نشانگر می‌تواند به علت طولانی بودن دوران نونهالی بنه باعث تسریع کارهای اصلاحی گردد، ناحیه‌ی تکثیر شونده با توالی مشخص (اسکار) جهت شناسایی جنسیت مورد استفاده قرار گرفت. در این پژوهش نه نمونه‌ی برگی بنه از درختان نر و ماده شناخته شده و یک نمونه شناخته نشده جمع آوری و با استفاده از یک جفت آغازگر اسکار مورد مقایسه قرار گرفتند. بر اساس نتایج، تنها یک باند تقریباً ۳۰۰ جفت بازی در نمونه‌های ماده تکثیر شد که در نمونه‌های نر مشاهده نگردید. با وجود این که مکانیزم تعیین جنسیت در پسته همچنان ناشناخته است، با توجه به پیوستگی نشانگر با جایگاه تعیین کننده جنسیت، می توان از نشانگرهای اسکار جهت تعیین جنسیت دانهال بنه استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: بنه، نونهالی، تعیین جنسیت، اسکار

مقدمه

پسته گیاهی دوپایه از خانواده سماق‌سانان[۱] و شامل یازده گونه می‌باشد (سمیع و همکاران، ۱۳۸۴). در این بین بنه[۲] یکی از مهمترین گونه‌های پسته می‌باشد که علاوه بر ارزش بالای تغذیه‌ای و دارویی به دلیل دارا بودن ویژگی‌هایی نظیر مقاومت به نماتد مولد غده ریشه، تحمل زیاد به سرما و مقاومت به ورتیسیلیوم یک پایه مناسب نیز محسوب می‌شود (فرگسون، ۱۳۷۸). این پایه همچنین در مقایسه با پایه‌های ورا[۳]، تربینتوس[۴] و اوریکارپا[۵] از قدرت رشدی بالاتری نیز برخوردار است (کافکس[۶]، ۲۰۰۲).

بلوغ زایشی دانهال‌های پسته تحت شرایط مطلوب پنج تا هشت سال به طول می انجامد. در حال حاضر جهت تمایز دانهال‌های نر و ماده بنه قبل از ظهور علائم ظاهری نظیر تشکیل گل روشی وجود ندارد. با توجه به این که پدیده دو پایگی سبب سهولت در برنامه های اصلاحی می‌شود، استفاده از یک روش مناسب جهت تعیین جنسیت گیاه قبل از فاز گلدهی می‌تواند منجر به بهبود روند اصلاحی و گزینش سریع‌تر شده و در نتیجه صرفه‌جویی قابل توجهی در زمان و منابع اقتصادی را به همراه داشته باشد (هورمازا و همکاران[۷]، ۱۹۹۴).

گیاهان دوپایه تقریبا ۴ درصد از کل گیاهان گلدار را شامل می‌شوند و در ۷۵ درصد خانواده‌های گیاهی پراکنده شده‌اند (ایسنثورد[۸]، ۲۰۰۰). در گیاهان

1- *Anacardiaceae*
2- *Pistacia atlantica* Desf. *mutica*
3- *P.vera*
4- *P.terebinthus*
5- *P.eurycarpa*
6- Kafkas
7- Hormaza *et al.*
8- Ainsworth

سیستم‌های تعیین کننده جنسیت ارتباط نزدیکی با شیوه تکاملی جنسیت‌ها دارند (چارلزورد[1]، ۲۰۰۲). مکانیزم‌های ژنتیکی متفاوتی در رابطه با تعیین جنسیت در گونه‌های گیاهی مختلف گزارش شده است، از جمله می‌توان به نقش کروموزوم‌های جنسی در سیلن و رازک، تغییرات هورمونی درخیار (پرل‌تروس[2]، ۱۹۹۹) و و میکرو آر. ان. ای[3] در ذرت (بنکس[4]، ۲۰۰۸) اشاره کرد. پتانسیل و گسترش بالای نشانگرهایی مولکولی باعث بکارگیری روش های بسیاری برای غلبه بر مشکلات اصلاحی و ژنتیکی گیاهان شده است (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶). بهره گیری از این روش‌ها در مطالعات تعیین جنسیت در پسته و سایر گیاهان نیز گزارش شده است. هورمازا و همکاران (۱۹۹۴) با استفاده از روش آنالیز تفکیک توده‌ای و غربالگری از ۱۰۰۰ آغازگر رپید[5] نشانگر واحدی را برای تعیین جنسیت در گونه‌ی ورا معرفی کردند. این نشانگر باعث تکثیر یک باند ۹۰۵ جفت بازی در جنس ماده و در نتیجه شناسایی آن از جنس نر گردید.کافکس و همکاران (۲۰۰۱) نیز با غربالگری ۴۷۲ آغازگر رپید توانستند دو نشانگر رپید مرتبط با جنسیت در گونه اوریکارپا و یک نشانگر در گونه آتلانتیکا را شناسایی کردند. با این حال تلاش‌ها جهت استفاده از آغازگر رپید ۹۰۵ جفت بازی جهت تمایز جنس نر و ماده در گونه‌های وحشی پسته موفقیت‌آمیز نبوده است (کافکس و همکاران، ۲۰۰۱). یاکابو و همکاران[6] (۲۰۰۵) قطعه تکثیر شده رپید، را همسانه‌سازی و سپس توالی‌یابی کردند. بر اساس انتهای هر قطعه همسانه‌سازی شده، آغازگرهای اسکار[7] را طراحی، و با بهره گیری از روش تاچ‌دون پی. سی. آر[8] در تکثیر ناحیه هدف، روش دقیق‌تری در جهت تعیین جنسیت پسته اهلی در سنین نونهالی معرفی کردند. همچنین گزارشات مشابهی از تبدیل نشانگر رپید به اسکار جهت تعیین جنسیت در پاپایا، مرکوریالیس[9]، اوکومیا[10]، جینکو و پاندانوس[11] صورت گرفته است (وینود و همکاران[12]، ۲۰۰۷; لانگدو و همکاران[13]، ۲۰۰۶; ژو و همکاران[14]، ۲۰۰۴; کادکا و همکاران[15]، ۲۰۰۲; بدویا و نونز[16]، ۲۰۰۶).

مزیت آغازگرهای اسکار نسبت به رپید آن است که در رپید چندین جایگاه ژنی تکثیر می‌شود، به شرایط واکنش حساس بوده و همچنین نحوه توارث به صورت غالبیت می‌باشد. در حالی‌که به علت افزایش شرایط سختی[17] در نشانگر اسکار، تنها یک جایگاه ژنی شناسایی می‌شود، همچنین نحوه توارث بصورت همبارز است (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶).

با توجه به این که تاکنون یک روش مناسب و تکرارپذیر جهت شناسایی جنسیت بنه در سنین اولیه رشد گزارش نشده است. هدف از این مطالعه تعیین جنسیت بنه با استفاده از نشانگرهای مولکولی می‌باشد که منجر به شناسایی زودهنگام جنسیت این گونه و نهایتاً تسریع در برنامه‌های اصلاحی خواهد شد.

مواد و روش‌ها

نمونه برگ‌های جوان از چهار درخت نر، پنج درخت ماده و یک دانهال دو ساله با جنسیت نامشخص (۴ برگ از هر درخت) از موسسه تحقیقات ملی پسته ایران واقع در رفسنجان جمع آوری گردید. پس از قرار دادن در داخل یخدان سریعاً به آزمایشگاه منتقل شدند.

1- Charlesworth
2- Perl-Treves
3- Micro RNA
4- Banks
5- RAPD
6- Yakubov *et al.*
7- SCAR
8- Touchdown PCR
9- *Mercurialis annua*
10- *Eucommia ulmoides*
11- *Pandanus fascicularis*
12- Vinod *et al.*
13- Longdou *et al.*
14- Xu *et al.*
15- Khadka *et al.*
16- Bedoya & Nunez
17- stringency

نمونه‌ها در ازت مایع هموژن شده و دی.ان.ای[1] آنها آنها با استفاده از روش دویل و دویل [2] با اندکی تغییرات تغییرات استخراج شد. تغییرات اعمال شده شامل دو بار اضافه کردن فنل: کلرفرم: ایزوآمیل الکل به نسبت ۲۵:۲۴:۱ و قرار دادن نمونه ها پس از اضافه کردن ایزوپروپانول در دمای چهار درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ساعت بود. کمیت و کیفیت دی.ان.ای استخراجی با استفاده دستگاه نانودراپ[3] و الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد مورد سنجش قرار گرفت.

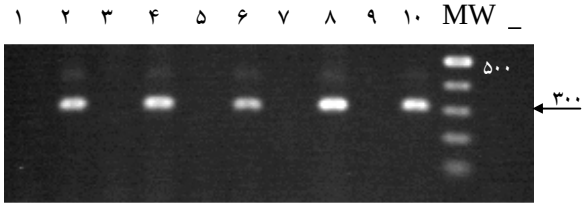
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ ماکرولیتر و با استفاده از دستگاه ترموسایکلر گرادیانت اپندورف (ساخت کشور آلمان) انجام شد. ترکیبات واکنش شامل بافر $(NH_4)_2SO_4$، کلرید منیزیم ۲ میلی‌مولار، ۳۰۰ ماکرومولار دی.ان.تی.پی[4]، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر، نیم واحد آنزیم تک پلیمراز[5] (شرکت فرمنتاز) و ۳۵ نانوگرم دی.ان.ای ژنومی جنس نر و ماده بودند. جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز از آغازگر اسکاری که توسط یاکابو و همکاران (۲۰۰۵) طراحی شده بود (جدول۱)، استفاده شد. دمای ذوب آغازگرها با فرمول $Tm= 4 (G + C) + 2 (A + T)$ محاسبه شد. که در این فرمول Tm[6] یا دمای ذوب می باشد. G نوکلئوتید گوانیدین[7]، C نوکلئوتید سیتوزین[8]، A نوکلئوتید آدنین[9] و T نوکلئوتید تیمین[10] می‌باشد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تحت شرایط زیر صورت گرفت. ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه به همراه ۴۰ سیکل دمایی به ترتیب ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۴۲ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۲ دقیقه و بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت. محصولات تکثیر شده در ژل آگارز ۱/۲ درصد بارگذاری شد و زیر نور ماورا بنفش بعد از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید قابل رویت شدند. جهت اطمینان آزمایش سه بار تکرار گردید.

نتایج و بحث

بر اساس نتایج تکثیر دی.ان.ای ژنومی بنه با استفاده از آغازگرهای اسکار، یک باند تقریباً ۳۰۰ جفت بازی در نمونه‌های ماده شناسایی شد، که در نمونه‌های نر دیده نشد (شکل ۱). همچنین دانهال دوساله به عنوان جنس ماده شناسایی شد. این نتایج با نتایج یاکابو و همکاران (۲۰۰۵) که یک باند اختصاصی ۲۹۷ جفت بازی را در نمونه‌ی ماده پسته اهلی شناسایی کردند، مطابقت داشت.

جدول۱- توالی آغازگر اسکار جهت تعیین جنسیت بنه

آغازگرها	توالی آغازگر	دمای ذوب
$PVF_{1\,(For)}$	۵'-GTCGTAGATGAAAACACC- ۳'	۵۲
$PVF_{2\,(Rev)}$	۵'- TAATAGAAGCCATAGA- ۳'	۴۲



شکل۱_ الگوی باندی آغازگر اسکار در نمونه‌های نر(۱،۳،۵،۷،۹) و ماده (۲،۴،۶،۸،۱۰). علامت پیکان نشان‌دهنده قطعه ۳۰۰ جفت بازی. MW وزن مولکولی. علامت (-) بیانگر کنترل منفی می‌باشد.

1- DNA
2- Doyle & Doyle
3- nano drop (ND1000, USA)
4- dNTP
5- Taq polymerase
6- Temeprature melting
7- Guanine
8- Cytosine
9- Adenine
10- Thymine

تاکنون تعداد زیادی از نشانگرهای دی.ان.ای در تجزیه‌های ژنتیک گیاهان مورد استفاده قرار گرفته است. شرایط تکثیر اسکار مانند روش رپید می‌باشد با این تفاوت که درجه حرارت مرحله اتصال آغازگر بر اساس طول و مقدار GC هر یک از جفت آغازگرها متغیر است. این آغازگرها به دلیل افزایش اختصاصی‌بودن، عموماً یک باند فوق‌العاده تکرارپذیر را ایجاد می‌کنند (نقوی و همکاران، ۱۳۸۶). با توجه به شناسایی باند ۲۹۷ جفت بازی درجنس ماده پسته اهلی (2n=30) توسط یاکابو و همکاران (۲۰۰۵) با توجه وجود این باند در نمونه‌های ماده بنه(2n=28)، و همچنین با توجه به این که عوامل ژنتیکی موثر بر تعیین جنسیت از جمله مواردی هستند که در گونه‌های مختلف به شدت حفاظت شده می‌باشند، علیرغم تفاوت در عدد کروموزومی دو گونه پسته (گونه آتلانتیکا و گونه ورا)، اندازه و تعداد باند تکثیری مشابهی حاصل شد. از طرفی با ۳ بار تکرار باند ۳۰۰ جفت بازی دقت و تکرارپذیری پژوهش حاصل تایید گردید. از این رو می‌توان نتیجه‌گیری کرد که احتمالاً قطعه تکثیر شده با ژن‌های درگیر در جنسیت به شدت پیوسته است. این تحقیق اولین گزارش در زمینه تعیین جنسیت بنه با استفاده از روش اسکار- پی.سی.آر می‌باشد.

با وجود شناسایی مکانیسم تعیین جنسیت در گونه‌های مختلف نظیر کروموزوم‌های جنسی در سیلن (ژانگ و همکاران[1]، ۱۹۸۸)، پاپایا (سمری و گراهام[2]، ۱۹۹۸)، انگور (اریش و نلسون[3]، ۱۹۸۹)، مارچوبه (جیانگ وسینک[4]، ۱۹۹۷) و ملاندریوم[5] (یه و همکاران[6]، همکاران[6]، ۱۹۹۱) و تک ژن‌های مسئول تعیین جنسیت در مرکوریالیس، آتریپلکس (راس و همکاران[7]، ۱۹۹۸)، ۱۹۹۸)، خیار (پرل تروس، ۱۹۹۹)، و انجیر (پاریش[8]، ۲۰۰۴) این مکانیسم در پسته همچنان ناشناخته است. با توجه به این که فنوتیپ جنسی در گیاهان توسط عوامل ژنتیکی و محیطی کنترل می‌شود، میزان تنوع فیتوژنتیکی مستقل گیاهان دوپایه، بیان‌کننده فراوانی تکاملی بالا در این گیاهان می‌باشد و تنوع گسترده سیستم‌های تعیین کننده جنسیت را در گیاهان توجیه می‌کند (تانوردزیک و بنکس[9]، ۲۰۰۴). گرانت و همکاران[10] (۱۹۹۸) چهار سیستم تعیین جنسیت که شامل تک جایگاه، گروهی از جایگاه‌ها که بصورت تنگاتنگی به کروموزوم اتوزوم متصل‌اند، تعدادی از جایگاه‌های غیر متصل به کروموزوم‌های اتوزوم[11] و سیستم جایگاه‌های متصل به کروموزوم‌های هتروموروفیک[12]، را گزارش کردند.

فراوانی لوکوس‌های نشانگر مرتبط با جنسیت به عواملی نظیر تعداد کروموزوم، اندازه کلی ژنوم و اندازه نسبی قطعات کروموزومی که تعیین کننده جنسیت هستند، بستگی دارد (کافکس و همکاران، ۲۰۰۱). در سیلن[13] که دارای کروموزوم Y بزرگی می‌باشد، ۱۲ نشانگر رپید جنسیتی با غربالگری ۳۴۰ آغازگر تصادفی مشخص شده است (ژانگ و همکاران، ۱۹۸۸)، در حالی‌که در کیوی که دارای یک سیستم فعال کروموزومی Y می‌باشد، از ۵۰۰ آغازگر رپید آزمایش شده تنها دو نشانگر جنسیتی یافت شد (هاروی و همکاران[14] ، ۱۹۹۷). همچنین از بین ۱۰۰۰ آغازگر رپید تنها یک نشانگر باعث تمایز جنسیتی در پسته اهلی گردید (هورمازا و همکاران، ۱۹۹۴). به همین دلیل فراوانی پایین باندهای مرتبط با جنسیت در گونه‌های پسته ممکن است ناشی از این باشد که قطعه‌ای از دی.ان.ای

1- Zhang *et al.*
2- Samri & Graham
3- Irish & Nelson
4- Jiang & Sink
5- *Melandriumm*
6- Ye *et al.*
7- Ruas *et al.*
8- Parish
9- Tanurdzic & Banks
10- Grant *et al.*
11- Autosome chromosome
12- Heteromorphic chromosome
13- *Silene latifolia*
14- Harvey *et al.*

که در تعیین جنسیت دخالت دارد، کوچک بوده و یا توسط تعداد کمی از ژن‌ها کنترل شود (کافکس، ۲۰۰۲).

جهت مشخص کردن نوع وراثت جنسیتی و محاسبه فاصله نقشه ژنتیکی بین ژن مرتبط با جنسیت و نشانگر، جمعیت‌های حاصل از تفکیک تلاقی‌های کنترل شده بایستی مورد آزمایش قرار بگیرد تا اطلاعات جامع‌تری در زمینه مکانیزم ژنتیکی تعیین جنسیت در پسته فراهم شود.

در مجموع روش اسکار- پی.سی.آر جهت شناسایی جنس نر و ماده در درختان بنه قابل توصیه می‌باشد، که این امر باعث صرفه جویی قابل توجهی در منابع اقتصادی و زمانی مورد نیاز جهت اصلاح پایه‌های پسته خواهد شد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از سرکار خانم میرشاهی مسئول محترم آزمایشگاه بیوتکنولوژی و کشت بافت پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی به جهت همکاری بی‌دریغ و صمیمانه ایشان طی مراحل این پژوهش کمال تشکر را دارم.

منابع

۱. فرگسون، ل. ۱۳۷۸. کشت و تولید پسته. درویشیان، م. موسسه فرهنگی نشر آیندگان. چاپ اول. صص ۲۷۲.

۲. سمیع، م.، علیزاده، ع. و صابری ریسه، ر.ا. ۱۳۸۴. آفت ها و بیماری‌های مهم پسته در ایران و مدیریت تلفیقی آن‌ها. جهاد دانشگاهی واحد تهران. صص ۳۰۱.

۳. نقوی، م ر.، قره‌یاضی، ب. و حسینی سالکده، ق. ۱۳۸۶. نشانگرهای مولکولی. انتشارات دانشگاه تهران. صص ۳۳۴.

4. Ainsworth, C. 2000. Boys and girls come out to play: The molecular biology of dioecious plants. Annual Botany, 86, 211-221.

5. Banks, J. 2008. Micro RNA sex determination and floral meristem determination in maize. Genome Biology, 9: 204-207.

6. Bedoya, G., and Nunez, V. 2006. A SCAR marker for the sex types determination in Colombian genotypes of *Carica papaya*. Euphytica, 153: 215-220.

7. Charlesworth, D. 2002. Plant sex determination and sex chromosome. Heredity, 88: 94-101.

8. Chattopadhay, D., and Sharma, A.K. 1991. Sex determination in dioecious species of plants. Feddes Repertorium, 102: 29-55.

9. Doyle, J.J., and Doyle, J.L. 1987. A rapid isolation for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemistry Bulletin, 19: 11-15.

10. Durand, B., and Durand, R. 1991. Sex determination and reproductive organ differentiation in *Mercurialis*. Plant Science, 80: 49-65.

11. Grant, S., Houben, A,. Vyskot, B., Siiroky, W., Pan., J, Macas, B., and Saedler, H. 1998. Genetics of sex determination in flower plants. Developmental Genetics, 15: 214-230.

12. Harvey, C.F., Gill, G.P., Fraser, L.G., and McNeilage, M.A. 1997. Sex determination in *Actinidia*. 1. Sex- linked markers and progeny sex ratio in diploid *A. chinensis*. Sexual Plant Reproduction, 10: 149-154.

13. Hormaza, J.I., Dollo, L., and Polito, V.S. 1994. Identification of a RAPD marker linked to sex determination in *Pistacia vera* using bulked segregant analaysis. Theoretical and Applied Genetics, 89: 9-13.

14. Irish, E., and Nelson, T. 1989. Sex determination in monoecious and dioecious plants. The Plant Cell, 1: 737-744.

15. Jiang, C., and Sink, K. 1997. RAPD and SCAR markers linked to the sex expression locus M in *Asparagus*. Euphytica, 94: 329- 333.

16. Kafkas S., Cetiner, S., and Perl-Treves, R. 2001. Develpoment of sex associated RAPD markers in wild *Pistacia* species. Horticultural Science & Biotechnology, 76: 242-246.

17. Kafkas, S. 2002. Develpoing of monoecious Pistachio (*P. vera* L.) populations and the sex determination mechanism in *Pistacia* by cross breeding. Acta Horticulture, 524: 231-235.

18. Khadka, D.K., Nejidat, A., Tal, M., and Golan-Goldhirsh, A. 2002. DNA markers for sex: Molecular evidence for gender dimorphism in dioecious *Mercurialis annua* L. Molecular Breeding, 9**:** 251–257.

19. Longdou, L., Qibai, X., Meili, J., Wujun, G., and Ruili, L. 2006. Identification of RAPD markers linked to the male sex in dioecious *Ginkgo biloba* L. Sectiunea Genetica si Biologie Moleculara, 7: 105-110.

20. Parish, T. 2004. Identification of a male specific AFLP marker in a functionally dioecious fig (*Moraceae*). Sex Plant, 17: 17-22.

21. Perl-Treves, R. 1999. Male and female conversion along the cucumber shoot: approaches to studying sex genes and floral development in *Cucumis sativus*. In: Sex Determination in Plants. BIOS Scientefic Publisher, Oxford, UK, 189-216.

22. Ruas, F. C., Fairbanks, J.D., Paul Evans, R., Stutz, C.H., Andersen, W.R., and Raus, M.P.1998. Male-specific DNA in the dioecious species *Atriplex garrettii* (Chenopodiaceae). American Journal of Botany, 85: 162-167.

23. Samri, S., and Graham, M.W. 1998. Developing molecular markers for sex prediction in Papaya (*Carica papaya* L.). Acta Horticulturae, 561: 141-146.

24. Tanurdzic, M., and Banks, J.O. 2004. Sex- determing mechanisms in lands plants. The plant cell, 16: 61-71.

25. Vinod, M.S., Prashanth, S.R., Suja, G., and Ajay, P. 2007. Identification of a sex specific SCAR marker in dioecious *Pandanus fascicularis* L. Genome 9: 834-839.

26. Xu, W.J., Wang, W.B., and Cui, M.K. 2004. RAPD and SCAR markers linked to sex determination in *Eucommia ulmoides* Oliv. Euphytica 136**:** 233–238.

27. Yakubov, B., Barazani, O., and Golan-Goldhrish, A. 2005. Combination of SCAR primers and Touchdown- PCR for sex identification in *Pistacia vera* L. Scientia Horticulturae, 103: 473-478.

28. Ye, D., Oliveira, M., Veuskens, J., Wu, Y., Installe, P., Hinnisdaels, S., Truong, A., Brown, S., Mouras, A., and Negrutiu, I. 1991. Sex determination in dioecious *Melandrium* The X/Y chromosome system allows complementary cloning strategies. Plant Science, 80: 93-106.

29. Zhang, Y.H., Stillo, S., Rehman, F., Avery, A., Mulcahy, D., and Kesseli, R. 1988. Y chromosome specific markers and the evolution of dioecy in the genus *Silene*. Genome, 41: 141-147.