

تنوع ژنتیکی کلروپلاستی و جریانات ژنی در گونه‌های گلابی با استفاده از نشانگر CAPS

Chloroplastic Genetic Diversity and Gene Flow in Pear Species Revealed by the CAPS Marker

اعظم نیک‌زاد قره‌آغاجی^۱، حمید عبداللهی^۲، کاظم ارزانی^۳، عبدالعلی شجاعیان^۴،
پاولود فرانچسکی^۵ و لوکا دوندینی^۶

۱، ۳ و ۴- به ترتیب دانشجوی دکتری، استاد و استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

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

۵ و ۶- به ترتیب پسا دکتری و استادیار، گروه علوم کشاورزی، دانشگاه بولونیا، بولونیا، ایتالیا

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۲/۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۸/۲۲

چکیده

نیک‌زاد قره‌آغاجی، ا.، عبداللهی، ح.، ارزانی، ک.، شجاعیان، ع.، فرانچسکی، پی. و دوندینی، ال. ۱۳۹۴. تنوع ژنتیکی کلروپلاستی و جریانات ژنی در گونه‌های گلابی با استفاده از نشانگر CAPS. مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۳۱: ۱۳۴-۱۱۷.

مناطق غیر کدکننده برای ارزیابی گروه‌بندی‌های فیلوژن در جنس *Pyrus* بسیار قابل استفاده است زیرا این مناطق کمتر عملکردی بوده و بنابراین تنوع آن‌ها تحت تأثیر انتخاب خنثی است. در این پژوهش، روش توالی‌های چندشکل تکثیر شده شکسته شده (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence: CAPS) برای تجزیه سه ناحیه بسیار متغیر در نواحی بین‌ژنی DNA کلروپلاست در ۷۳ رقم بومی و ژنوتیپ وحشی گلابی ایرانی و اروپایی (*Pyrus communis*) نه رقم ژاپنی *P. pyrifolia*, syn. *P. serotina* و یک ژنوتیپ چینی *P. × bretschneideri* مورد بررسی قرار گرفت. مطالعه ژنوم کلروپلاست ۸۳ رقم و ژنوتیپ با استفاده از سه جفت آغازگر کلروپلاستی و سه آنزیم برشی *RsaI*، *BsuRI*، *TruII* و پانزده هاپلوتیپ را شناسایی کرد. هاپلوتیپ H1 بالاترین فراوانی را در بین ارقام اروپایی نشان داد و هاپلوتیپ‌های H10، H7 و H4 منحصراً در ارقام ژنوتیپ‌های ایرانی مشاهده شد. در کل، نشانگر CAPS ارقام و ژنوتیپ‌های وحشی مورد بررسی در این مطالعه را به پنج گروه جداگانه تقسیم کرد و ارقام ژاپنی در این دندروگرام با ژنوتیپ‌های ایرانی هم‌گروه بودند. این نتایج فرضیه رد پای ژنتیکی روی ژرم‌پلاسم گلابی ایرانی را توسط دورگ‌گیری گلابی‌های کشت شده آسیای شرقی و اروپایی و جریانات ژنی از گونه‌های وحشی به اهلی، تأیید کرد.

واژه‌های کلیدی: *Pyrus sp.* DNA کلروپلاست، توالی‌های چندشکل تکثیر شده شکسته شده، جمعیت گلابی.

مقدمه

گلابی *Pyrus communis* L. پس از سیب مهم‌ترین میوه دانه‌دار در سطح جهان است. علاوه بر این، وجود سایر گونه‌های متعلق به جنس *Pyrus* نظیر گلابی ژاپنی *P. pyrifolia*, syn. *P. serotina* سبب گستردگی و تنوع بیشتر این میوه شده است (Abdollahi, 2011). در ایران، نقاطی نظیر استان‌های ساحلی دریای خزر به‌ویژه استان گیلان، استان‌های غربی، به‌ویژه استان کردستان و استان‌های واقع روی رشته کوه‌های البرز و زاگرس از مراکز تنوع قابل توجه برای گونه *P. communis* برخوردارند. گونه‌های گلابی متعلق به جنس *Pyrus*، زیرطایفه *Pyrinae*، زیرخانواده مالوئیده (*Maloideae*) از خانواده وردسانان (*Rosaceae*) هستند که شامل ۲۶ گونه اولیه شناسایی شده و ده هیبرید بین‌گونه‌ای می‌است باشد که در اروپا، غرب آسیا و مناطق کوهستانی آفریقای شمالی پراکنده‌اند (Bell, 1986)؛ تعداد زیادی از گونه‌های شناخته شده بومی آسیا هستند، اما تعیین دقیق تعداد گونه‌های گلابی در جهان به دلایل زیر بسیار مشکل است: فقدان جمعیت‌های وحشی به‌ویژه در گونه‌های کشت شده، تنوع مورفولوژیک کم و فقدان ویژگی‌های متمایز بین گونه‌ها، توانایی تلاقی‌های گسترده و دورگ‌گیری بین‌گونه‌ای (*Interspecific*) و جریان ژنی (*Gene flow*) در میان گونه‌ها. قابل ذکر است که بیشتر ارقام،

نژاد و حتی گونه‌های وحشی که دارای ویژگی‌های حد وسط هستند منشأ هیبرید دارند، گرچه شواهد اثبات کننده، مخصوصاً شواهد مولکولی بسیار نادر است (Wolko *et al.*, 2010) اما ویژگی‌های مورفولوژیک، ترکیب‌های فنولیک و نشانگرهای DNA برای تخمین طبقه‌بندی فیلوژنتیک در جنس *Pyrus* استفاده شده است (Katayama *et al.*, 2007)؛ Katayama and Uematsu, 2003؛ Terakami *et al.*, 2012؛ Katayama, 2002؛ Sharifani *et al.*, 2008؛ Iketani *et al.*, 1998). امروزه استفاده از نشانگرهای DNA کلروپلاست برای تعیین ارتباط تکاملی و تاکسونومی در جنس *Pyrus*، بیشتر به دلیل نوع وراثتی آن، اهمیت زیادی یافته است (Katayama, 2002)؛ Katayama and Uematsu, 2003؛ Iketani *et al.*, 1998). DNA کلروپلاستی معمولاً نشان دهنده وراثت مادری در نهاندانگان است. دورگ‌گیری بین دو گونه متفاوت از نظر مورفولوژیک و ژنتیکی، باعث ایجاد نسل جدیدی می‌شود که بیشتر ویژگی‌های مورفولوژیک آن حدواسط بین دو گونه تلاقی است و این در حالی است که DNA کلروپلاستی فقط از والد مادری به ارث می‌رسد (Whittemore and Schaal, 1991)؛ Arnold *et al.*, 1991). ساختار DNA کلروپلاستی بسیار حفاظت شده است

۱۴۱bp بین ژن‌های *rps16-trnQ* تشکیل داد. دو گروه اول، اکثراً شامل گلابی‌های بومی آسیای شرق و جنوب بودند. و گروه سوم شامل *P. communis* و بومی‌های مرتبط وحشی اروپا، آسیای غرب و مرکزی، روسیه و آفریقا بودند.

ایران در مسیر اصلی جاده ابریشم قرار گرفته است که این جاده از طریق چین، طول آسیای مرکزی و افغانستان را طی کرده و سپس از طریق ایران به سواحل شرقی دریای مدیترانه وصل شده و بعد در امتداد آن با مراکز تجاری شرق نزدیک و اروپا ارتباط می‌یابد. طی دوره تجارت و انتقال فرهنگ بین چین قدیم و آسیای مرکزی/غرب، جاده ابریشم از نظر تاریخی، به‌عنوان متمرکزترین مرکز تبادل محصولات و تکنولوژی کشاورزی بود (Wei et al., 2008). بدین ترتیب؛ ایران، شاید جزء اولین کشوری‌هایی در دنیا است که نمونه‌های *P. communis* وارد شده از اروپا، با ژنوتیپ‌های *P. pyrifolia*, syn. *P. serotina* کشورهای آسیای شرقی در ارتباط هستند. بنابراین انتظار می‌رود که دورگ‌گیری گلابی‌های کشت شده آسیای شرقی و جریان‌های ژنی از گونه‌های وحشی به اهلی، ردپای ژنتیکی روی ژرم‌پلاسم گلابی ایرانی داشته باشد. بدین منظور برای بررسی تکامل و موقعیت فیلوژنی ۷۳ رقم بومی و ژنوتیپ وحشی گلابی ایرانی و اروپایی *P. communis*، نه رقم ژاپنی *P. pyrifolia*, syn. *P. serotina* و یک

(Palmer and Stein, 1986) و بنابراین جفت پرایمرهای عمومی برای تکثیر نواحی خاصی از این مولکول طراحی شدند (Heinze, 1998; Fonfona et al., 1997)؛ (Dumolin-Lapeque et al., 1997)؛ (Weising and Gardner, 1999)؛ (Demesure et al., 1995)؛ (Grivet et al., 2001)؛ (Taberlet et al., 1991). هضم نواحی ژنومی تکثیر شده DNA کلروپلاستی در بسیاری از تحقیق‌ها برای فهم ارتباط‌های فیلوژنی و تکاملی بین جمعیت‌ها در وردسانان استفاده شده است (Panda et al., 2003)؛ (Turkec et al., 2006)؛ (Bouhadida et al., 2007)؛ (Mohanty et al., 2001, 2003)؛ (Coart et al., 2006). ایکتانی (Iketani, 1994) تنوع و تکامل رفتارهای DNA کلروپلاستی را در *Pyrus* و جنس‌های مرتبط آن بررسی کرد. در این مطالعه، با استفاده از کاوشگرهای DNA کلروپلاستی که ۹۹ درصد ژنوم کلروپلاست را پوشش می‌داد و ۱۶ آنزیم برشی متفاوت، فقط سه مورد چندشکل شناسایی شد. کاتایاما و همکاران (Katayama et al., 2011) دو ناحیه بسیار متغیر (Hypervariable) در فضاهای بین ژنی DNA کلروپلاستی در ۲۱ گونه *Pyrus* شناسایی کردند. ارتباط فیلوژنی بین ۲۵ هاپلوتیپ، با استفاده از تجزیه شبکه‌ای هاپلوتیپ (Haplotype network analysis)، سه گروه با دو حذف‌شدگی بزرگ؛ (۱) ۲۲۸bp طول بین ژن‌های *accD-psaI* و (۲)

ژنومی در فریزر ۸۰ درجه سانتی‌گراد زیر صفر نگهداری شدند و تعداد دیگر بعد از خشک شدن به مدت دو روز در دستگاه خشک‌کن انجمادی، با استفاده از دستگاه آسیاب مکانیکی (Mixer Mill MM 300, Retsch GmbH & Co. KG) کاملاً پودر شدند.

استخراج DNA

برای استخراج DNA، ۰/۰۵ گرم از برگ‌های هر ژنوتیپ، در آسیاب مکانیکی کاملاً پودر شدند و DNA با استفاده از روش CTAB تغییر یافته استخراج شدند (Maguire et al., 1994). DNAهای استخراج شده با استفاده از دستگاه نانو اسپکتروفتومتر (NanoDrop Technology, Rockland, DE) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

توسعه واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

سه بخش بسیار متغییر در نواحی بین ژنی *Rps16-trnQ* و *accD-psaI*، *rbcl-accD* بر اساس جفت آغازگرهای کاتایاما و همکاران (Katayama et al., 2011) و جفت آغازگر طراحی شده با نرم‌افزار Primer3 (<http://primer3.wi.mit.edu/>) در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، در حجم نهایی ۲۲ میکرولیتر با غلظت‌های؛ ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی، بافر

ژنوتیپ چینی *P. × bretschneideri* سه ناحیه بسیار متغییر از فضا‌های بین ژنی DNA کلروپلاستی به‌عنوان نشانگر مورد استفاده قرار گرفت و ردپای ژنتیکی گونه‌های دیگر *Pyrus* در ارقام و ژنوتیپ‌های ایرانی و هیبریدهای آن‌ها بحث شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

هشتاد و سه ژنوتیپ شامل ۷۳ رقم بومی و ژنوتیپ وحشی گلابی ایرانی و اروپایی *P. communis*، نه رقم ژاپنی *P. pyrifolia*, syn. *P. serotina* و یک ژنوتیپ چینی *P. × bretschneideri*، در این مطالعه برای بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگر CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) مورد استفاده قرار گرفتند. برگ‌های سالم درختان از باغ گیاه‌شناسی مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج، ایران (SPII)، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گیلان و آذربایجان غربی در ایران و به ترتیب GANRC و WANRC، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع (RIFR)، گروه علوم کشاورزی دانشگاه بولونیا، ایتالیا (DIPSA) و مرکز تحقیقات و تکنولوژی کشاورزی آرگون، اسپانیا (CITA)، جمع‌آوری شدند. تعدادی از برگ‌ها بعد از برداشت، به منظور استخراج DNA در نیتروژن مایع منجمد شده و تا زمان استخراج DNA

زنجیره‌ای پلی‌مراز بود. برای تفکیک و بررسی دقیق محصولات‌های هضمی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز حاصل از جفت آغازگرهای DNA کلروپلاستی، از ژل پلی‌اکریل‌آمید در دستگاه الکتروفورز عمودی (Bio-RAD, Foster city, CA, USA) استفاده شد. قطعه‌های هضم شده بر روی ژل پلی‌اکریل‌آمید تقریبی چهار درصد با بافر (Bio-RAD, Foster city, CA, USA) $1 \times$ TBE به مدت ۹۰ دقیقه با ۶۵ وات (W) بارگذاری شده و با رنگ آمیزی نقره قابل مشاهده و نمره‌دهی شدند.

تجزیه داده‌ها

بعد از انجام آزمایش‌های مربوط به رنگ آمیزی با نیترات نقره و مشاهده نوارها، نوارها با استفاده از نشانگر DNA مورد استفاده، تخمین اندازه شدند و حضور و عدم حضور آن‌ها در هر نمونه مورد بررسی، به صورت حروف لاتین امتیازدهی شد. داده‌های گم شده با عدد ۹ مشخص شدند. در جفت آغازگرهایی که چندمکان ژنی توالی‌های تکراری ساده را تکثیر می‌کردند، هر مکان ژنی به‌طور جداگانه امتیازدهی شد. سپس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای GenAIEx و NTSYS تجزیه و تحلیل شد و درخت فیلوژنتیکی با روش تجزیه خوشه‌ای UPGMA و ضریب تشابه جاکارد رسم شد. تعداد آلل‌های مشاهده شده (N_a)، تعداد آلل مؤثر (N_e)، هتروزیگوسیتی در هر

واکنش PCR $1 \times$ ، دو میلی‌مولار $MgCl_2$ ، 0.6 واحد DNA Tag پلی‌مراز (Applied Biosystem, Amplitaq Gold® (DNA Polymerase)، 0.2 میلی‌مولار dNTPs و 0.4 و میکرومولار از هر آغازگر (پیشرو و پسرو) تهیه شد. در مرحله بعد واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Applied Biosystems 2720, USA) تحت برنامه (۱) ناحیه $rbcL-accD$ ؛ یک چرخه در ۱۰ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ چرخه در ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه در ۵۷ درجه سانتی‌گراد و دو دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و سپس مرحله گسترش نهایی به مدت هفت دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و (۲) دو ناحیه $Rps16-trnQ$ و $accD-psaI$ ؛ یک چرخه در ده دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ چرخه در ۲۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه در ۶۲ درجه سانتی‌گراد و ۹۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و سپس ۲۵ چرخه در ۲۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ ثانیه در ۵۸ درجه سانتی‌گراد و ۹۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد، و سپس مرحله گسترش نهایی: ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد، انجام شد. قطعه‌های تکثیر شده با آنزیم‌های برشی برش داده شدند. هر واکنش هضمی با حجم نهایی ۱۴ میکرولیتر شامل؛ $1/4$ میکرولیتر بافر مخصوص آنزیم برشی، 0.15 میکرولیتر آنزیم برشی، $2/45$ میکرولیتر آب دو بار تقطیر اتوکلاو شده و 10 میکرولیتر محصول واکنش

لوکوس (H)، شاخص شانون (I) و درصد پلی مورفی لوکوس (PPL) برای ارزیابی تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها محاسبه شد. نتایج و بحث

تحقیق در جدول ۱، نواحی کلروپلاست و توالی آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۲ و آنزیم‌های برشی استفاده شده در جدول ۳ نشان داده شده‌اند.

نام و منشاء ژنوتیپ‌های بررسی شده در این

جدول ۱- لیست ارقام و ژنوتیپ‌های گلابی مورد بررسی در این مطالعه و هاپلوتیپ‌های تعیین شده
Table 1. List of pear genotypes used in this study and determined haplotypes

رقم Cultivar	محل جمع‌آوری Origin	هاپلوتایپ Haplotype	رقم Cultivar	محل جمع‌آوری Origin	هاپلوتایپ Haplotype
Reference European cultivars			Continues		
Verdi/Sweet Blush	DIPSA, Italy	H1	Passé Colmar	SPII, Iran	H1
Ovid	DIPSA, Italy	H1	Kaiser/ Beurré Bosc	SPII, Iran	H1
Conseiller a la Coeur	DIPSA, Italy	H6	Wild genotypes (<i>P. communis</i>)		
Reimer Red	DIPSA, Italy	H6	Isolate40	GANRC, Guilan, Iran	H13
Doyenne du Comice	DIPSA, Italy	H6	Isolate42	GANRC, Guilan, Iran	H4
Angelys	DIPSA, Italy	H1	Isolate43	GANRC, Guilan, Iran	H1
Beurré Giffard	DIPSA, Italy	H1	Isolate45	GANRC, Guilan, Iran	H5
Fertility	DIPSA, Italy	H1	Isolate46	GANRC, Guilan, Iran	H2
Conférence	DIPSA, Italy	H1	Isolate47	GANRC, Guilan, Iran	H4
Delbard première	CITA, Spain	H1	Isolate71	GANRC, Guilan, Iran	H4
President Heron	DIPSA, Italy	H2	Isolate72	GANRC, Guilan, Iran	H7
Wilder	DIPSA, Italy	H1	Isolate73	GANRC, Guilan, Iran	H10
Beurré Clairgeau	DIPSA, Italy	H2	Isolate74	GANRC, Guilan, Iran	H4
Old Home	DIPSA, Italy	H1	Isolate75	GANRC, Guilan, Iran	H4
Monchallard	CITA, Spain	H2	Isolate76	GANRC, Guilan, Iran	H4
Rosmarie	DIPSA, Italy	H1	Isolate77	GANRC, Guilan, Iran	H10
Bella di Giugno	DIPSA, Italy	H1	Isolate78	GANRC, Guilan, Iran	H10
Kieffer	DIPSA, Italy	H9	Isolate79	GANRC, Guilan, Iran	H10
Doyenné d'Hiver	DIPSA, Italy	H1	Isolate80	GANRC, Guilan, Iran	H10
Kaiser/ Beurré Bosc	DIPSA, Italy	H1	Isolate81	GANRC, Guilan, Iran	H8
Guamogna	DIPSA, Italy	H2	Isolate82	GANRC, Guilan, Iran	H10
Green Summer	CITA, Spain	H11	Isolate83	GANRC, Guilan, Iran	H4
Ceremeño	CITA, Spain	H3	Isolate84	GANRC, Guilan, Iran	H10
Iranian cultivars			Isolate85	GANRC, Guilan, Iran	H10
Tashkandi	SPII, Iran	H1	Isolate86	GANRC, Guilan, Iran	H10
Darghazi	SPII, Iran	H7	Isolate87	GANRC, Guilan, Iran	H10
Mohammadali	SPII, Iran	H2	Isolate89	GANRC, Guilan, Iran	H7
Sardrodi	SPII, Iran	H7	Isolate90	GANRC, Guilan, Iran	H7
Seif Tabriz	SPII, Iran	H4	Isolate91	GANRC, Guilan, Iran	H7
Domkaj	SPII, Iran	H4	Isolate92	GANRC, Guilan, Iran	H1
Sebri	SPII, Iran	H4	Isolate93	GANRC, Guilan, Iran	H10
Shahmiveh	SPII, Iran	H4	Isolate94	GANRC, Guilan, Iran	H10
Shahak	SPII, Iran	H2	Genotypes of <i>P. × bretschneideri</i>		
Konjoni	SPII, Iran	H4	E Li	DIPSA, Italy	H7
Krus siehan	Central Asia	H5	Genotypes of <i>P. pyrifolia</i> syn. <i>P. serotina</i>		
Krusalun	Central Asia	H1	Isolate 13	RIFR, Iran-UK	H7
Samardok	Central Asia	H1	Isolate 64	TMU, Iran	H15
Krasnadar	Transcaucasian Region	H5	Isolate 95	DIPSA, Italy	H7
European cultivars grown in Iran			Isolate 96	DIPSA, Italy	H7
Louise Bonne de Jersey	SPII, Iran	H1	Isolate 97	DIPSA, Italy	H9
Spadona	SPII, Iran	H12	Isolate 98	DIPSA, Italy	H16
William Duchesse	SPII, Iran	H1	Isolate 99	DIPSA, Italy	H14
Harrow Delight	SPII, Iran	H1	Isolate 100	DIPSA, Italy	H9
Coscia	SPII, Iran	H1	Isolate 101	DIPSA, Italy	H9

جدول ۲- نواحی کلروپلاست و توالی‌های آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه
Table 2. Chloroplast regions and primer sequences used in this study

ناحیه	فضای بین ژنی	اندازه	توالی آغازگر	منابع
Region	Intergenic spacer	Length (bp)	Primer Sequence (5' → 3')	References
<i>rbcL-accD</i>	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase - Acetyl CoA carboxylase	568	F: TGATCTTGCTCAGGAAGGTA R: CTTTCTTGCCCTCATTTAC	(Katayama <i>et al.</i> , 2011) Designed in this study
<i>accD-psaI</i>	Acetyl CoA carboxylase - Photosystem I	584	F: GGGCGTTCTGAGTGAGTTAT R: CCCACTAAAGGCACAAAAAT	Designed in this study
<i>Rps16-trnQ</i>	Ribosomal protein S16-Transfer RNAs, <i>trnQ</i> -UUG	882	F: ACCACATCGTTTCAAACGAAG R: GCTATTCGGAGGTCGAATCC	(Katayama <i>et al.</i> , 2011) (Katayama <i>et al.</i> , 2011)

جدول ۳- آنزیم‌های برشی برای هضم قطعه‌های حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز
Table 3. Restriction enzymes for digestion of PCR products

ناحیه	آنزیم برشی	ناحیه برش	شرایط واکنش
Region	Restriction enzymes	Restriction site	Reaction condition
<i>rbcL-accD</i>	<i>BsuRI</i>	5'-GG↓CC-3' 3'-CC↑GG-5'	37°C
<i>accD-psaI</i>	<i>TruII</i>	5'-T↓TAA-3' 3'-AAT↑T-5'	65°C
<i>Rps16-trnQ</i>	<i>RsaI</i>	5'-GT↓AC-3' 3'-CA↑TG-5'	37°C

ناحیه بسیار متغیر (Hypervariable) در فضای بین ژنی DNA کلروپلاستی بین *rbcL-accD* و *Rps16-trnQ* به عنوان نشانگر برای شناسایی ژنوتیپ‌های گلابی مطابق با جفت نشانگرهای کاتایاما و همکاران (Katayama *et al.*, 2011) استفاده شد. با توجه به این که نشانگر پسر و ناحیه *rbcL-accD* در مطالعه کاتایاما و همکاران (۲۰۱۱) قادر به تکثیر توالی کلروپلاست در ناحیه مذکور نبود، بنابراین طراحی نشانگر پسر و برای این ناحیه و جفت نشانگر سوم برای ناحیه بسیار متغیر *accD-psaI* انجام شد (جدول ۲). نشانگرهای طراحی شده به طور موفقیت آمیزی قادر به تکثیر توالی‌ها در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بودند. نوارهای تکثیر شده که با استفاده از آنزیم‌های برشی *RsaI*، *BsuRI*، *TruII* و

توسعه آغازگرها برای تکثیر توالی‌های کلروپلاست مناطق غیر کدکننده (Non-Coding Regions) برای ارزیابی گروه‌بندی‌های فیلوژن در جنس *Pyrus* بسیار قابل استفاده است زیرا این مناطق کمتر عملکردی بوده و بنابراین تنوع آن‌ها تحت تأثیر انتخاب خشی است. با وجودی که نتایج زیادی در رابطه با ویژگی‌های فیلوژنتیک ژنوتیپ‌های ژاپنی در دسترس است، مطالعه‌های کمی روی ژنوتیپ‌های گلابی اروپایی و ایرانی انجام شده است. هدف این پژوهش، تجزیه سه ناحیه بسیار متغیر در نواحی بین ژنی DNA کلروپلاست ارقام بسیار مهم ایرانی و اروپایی، به منظور بررسی تکامل و موقعیت فیلوژنی آن‌ها بود. دو

ژاپنی متغیر بود. جمعیت‌های وحشی ایران (ژنوتیپ‌های ایرانی) از نظر ژنتیکی به ارقام ایرانی (۰/۱۰۹) نزدیک‌تر از ارقام اروپایی (۰/۱۵۱) بودند و بیشترین فاصله را از ارقام ژاپنی (۰/۳۳۹) داشتند (جدول ۵). ارقام ایرانی به ارقام اروپایی (۰/۰۸۶) نزدیک‌تر از ژنوتیپ‌های ایرانی (۰/۱۰۹) بودند. تفاوت قابل ملاحظه‌ای در مقدار Nei بین جمعیت‌های مورد مطالعه وجود نداشت. دوری و نزدیکی ژنتیکی جمعیت‌های مورد مطالعه نسبت به هم می‌تواند به دلایل زیر باشد:

نزدیکی جمعیت‌های گلابی به یک‌دیگر به دلیل بالا بودن درصد آلل‌های مشابه و همچنین احتمال وقوع هیبریداسیون بین جمعیت‌های نزدیک به هم و در نتیجه، احتمال وجود جریان ژنی بین و دورن جمعیت‌های مورد مطالعه به دلیل وجود خودناسازگاری در جنس *Pyrus* و یا دوری سه جمعیت مورد مطالعه از جمعیت ارقام گلابی ایرانی به دلیل تعداد کم نمونه‌ها (۱۰ رقم) در این جمعیت است که در نتیجه آن فراوانی آلل‌های این جمعیت نسبت به سه جمعیت دیگر کمتر می‌شود.

بررسی نتایج ارتباط فیلوژن بین ژنوتیپ‌های

جنس *Pyrus*

در ارقام و ژنوتیپ‌های مورد بررسی در این مطالعه ۱۵ هاپلو تیپ (Haplotype) کلروپلاست با سه آنزیم برشی *RsaI* و *BsuRI*، *TruII* و به‌دست آمد (جدول ۱ و شکل ۲). هاپلو تیپ

مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند، درجه بالایی از چندشکل را در میان ارقام و ژنوتیپ‌های وحشی گلابی نشان دادند (شکل ۱). کاتایاما و همکاران (۲۰۱۱) نیز تنوع دو ناحیه بسیار متغیر در فضا‌های بین‌ژنی DNA کلروپلاستی، ناحیه‌ای در حدود ۸۵۷ bp بین ژن‌های *accD-psaI* و ناحیه دیگر در حدود ۹۰۴ bp بین ژن‌های *rps16-trnQ* را در ۲۱ گونه *Pyrus* را شناسایی کردند.

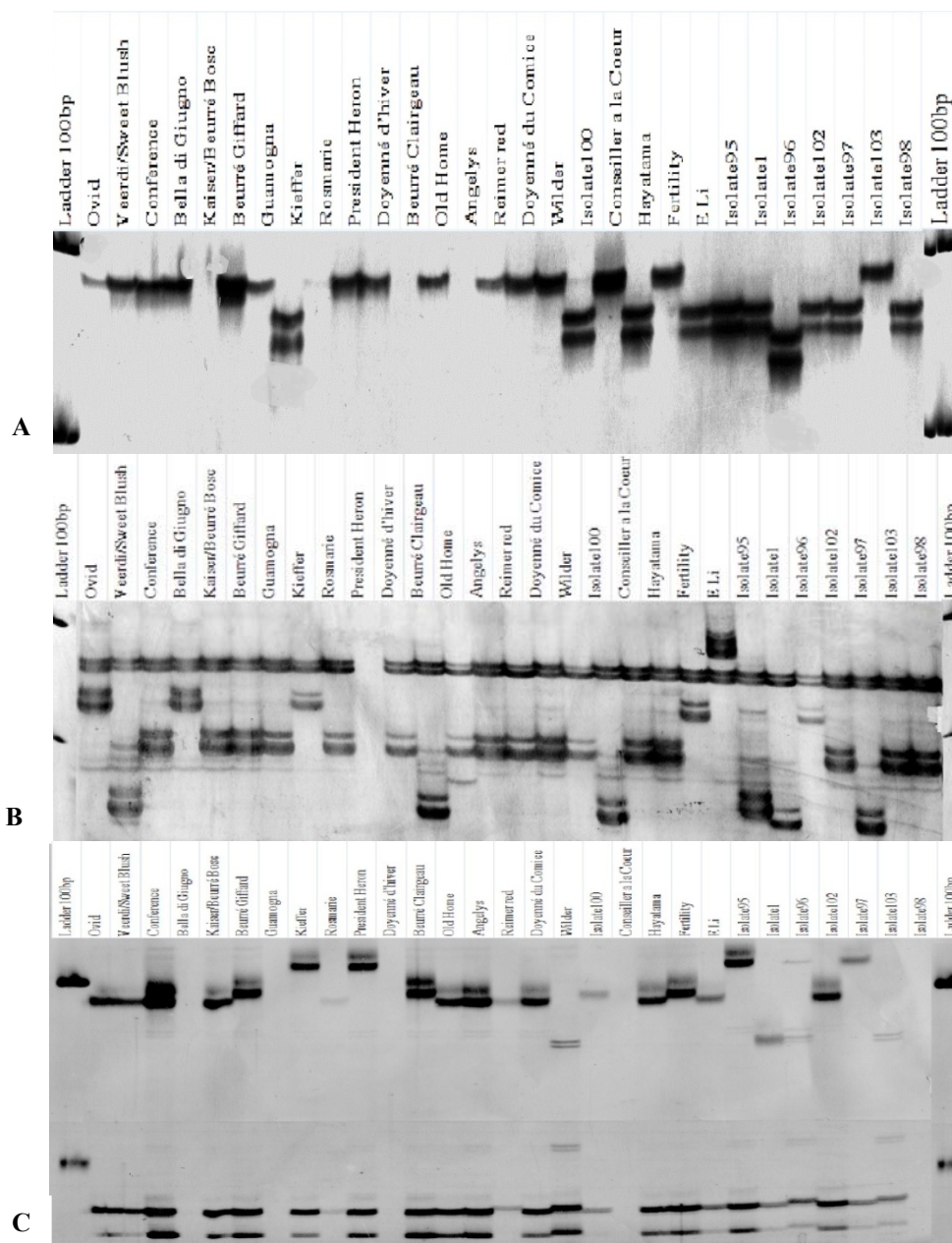
روابط ژنتیک ارقام و ژنوتیپ‌های گونه‌های

جنس *Pyrus*

جهت بررسی تنوع ژنتیکی، ارقام و ژنوتیپ‌های مورد بررسی در این پژوهش با استفاده از نرم‌افزار GenAIEX، در چهار جمعیت قرار گرفتند که شامل جمعیت ارقام اروپایی، ارقام ایرانی، ژنوتیپ‌های ایرانی و ارقام ژاپنی (به‌علاوه رقم چینی و ارقام آسیای مرکزی) بودند. در شاخص‌های *H*، *I*، *Na*، *Ne* و *PPL* ژنوتیپ‌های ایرانی دارای بیشترین مقدار بود و ارقام ایرانی از نظر شاخص *Na* و ارقام اروپایی از نظر شاخص‌های *H* و *Ne* کمترین میزان بودند (جدول ۴).

برای تشریح الگوی تمایز، فاصله ژنتیکی

بین جمعیت‌ها بر اساس فاصله ژنتیکی Nei (1978) در جمعیت‌های مورد مطالعه گونه‌های گلابی محاسبه شد. مقدار فاصله ژنتیکی از ۰/۰۸۶ بین جمعیت‌های ارقام ایرانی و ارقام اروپایی تا ۰/۳۳۹ بین ارقام اروپایی و ارقام



شکل ۱- نوارهای حاصل از هضم آنزیمی محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز DNA کلروپلاستی روی ژل پلی‌آکریل‌آمید چهار درصد رنگ‌آمیزی شده با نیترات نقره در میان ارقام اروپایی و ژاپنی. (A) نوارهای حاصل از هضم آنزیمی ناحیه *rbcL-accD*; (B) نوارهای حاصل از هضم آنزیمی ناحیه *accD-psaI*; (C) نوارهای حاصل از هضم آنزیمی ناحیه *Rps16-trnQ*

Fig. 1. Digested fragments separated by gel electrophoresis in a denaturing 4% polyacrilamide gel, silver-stained for bands visualization. A) Digested fragments of *rbcL-accD* region; B) Digested fragments of *accD-psaI*; C) Digested fragments of *Rps16-trnQ*

جدول ۴- مقادیر شاخص‌های استفاده شده برای ارزیابی تنوع بین جمعیت‌های گونه‌های گلابی
Table 4. Genetic diversity characterization of populations of *Pyrus* species

Pop	Na	Ne	I	H	PPL
Europe cultivar	0.789	1.080	0.110	0.062	36.84
Iranian cultivar	0.526	1.120	0.105	0.069	21.05
Iranian wild	1.105	1.341	0.282	0.191	52.63
Japanese cultivars	0.947	1.090	0.138	0.075	47.37

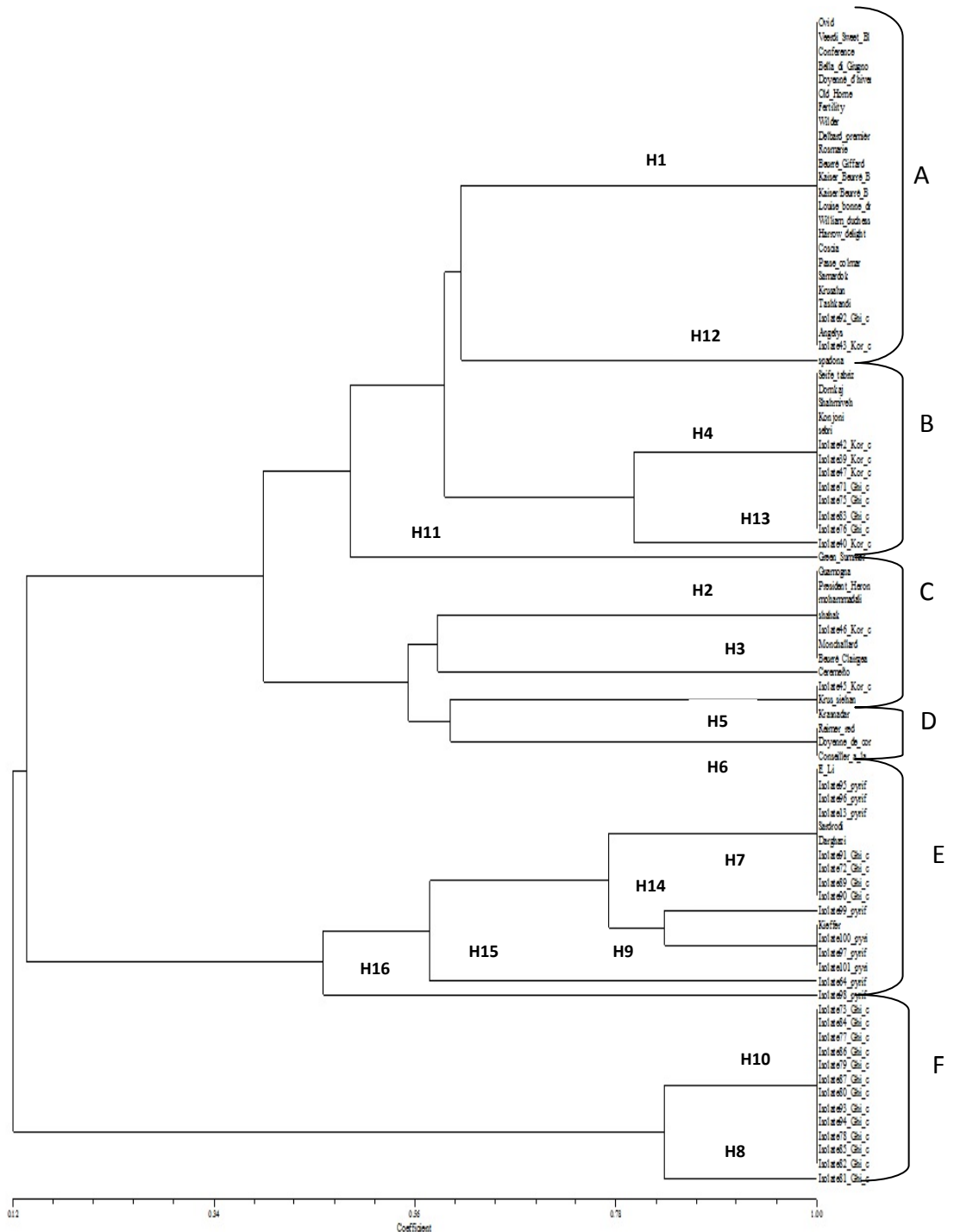
I: میانگین شاخص شانون؛ H: میانگین تنوع ژن؛ Na: میانگین تعداد آلل مشاهده شده؛ Ne: میانگین تعداد آلل مؤثر؛ PPL: درصد همه لوکوس‌هایی که پلی مورف هستند.

جدول ۵- ماتریس برآورد فاصله‌های ژنتیکی Nei در جمعیت‌های گونه‌های گلابی
Table 5. Pairwise population matrix of Nei's genetic diversity of populations of *Pyrus* species

Population	European cultivar	Iranian cultivar	Iranian wild	Japanese cultivars
Europe cultivar	0.000			
Iranian cultivar	0.086	0.000		
Iranian wild	0.151	0.109	0.000	
Japanese cultivars	0.339	0.331	0.245	0.000

طرفی، هاپلوتیپ H7 در سه رقم گلابی ژاپنی *P. pyrifolia*, syn. *P. serotina* وجود داشت. در بین ارقام ژاپنی چهار نوع هاپلوتیپ H9، H14، H15 و H16 نیز به دست آمد. هاپلوتیپ H9 در رقم اروپایی کيفر نیز مشاهده شد. رقم اروپایی کيفر (Kieffer) از تلاقی بین گونه‌ای *P. pyrifolia*, syn. *P. serotina* و *P. communis* حاصل شده است. با توجه به این که ژنوم کلروپلاست از طریق والد مادری به ارث می‌رسد نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که *P. pyrifolia*, syn. *P. serotina* به عنوان والد مادری رقم کيفر می‌است. در بین ژنوتیپ‌های گیلان هاپلوتیپ H10 بیشترین فراوانی را داشت و این نوع هاپلوتیپ مختص این گروه بود.

H1 فراوانی بالایی در بین ارقام و ژنوتیپ‌ها نشان داد (جدول ۶)، اکثر ارقام اروپایی و ارقام آسیای مرکزی هاپلوتیپ H1 داشتند. در بین ارقام ایرانی، رقم تری پلوئید تاشکندی (Nikzad et al., 2013) در گروه هاپلوتیپ H1 قرار گرفت. در ارقام گلابی اروپایی، هاپلوتیپ نوع H2 نیز به وفور مشاهده شد در حالی که، هر دو هاپلوتیپ در افراد گلابی ایرانی در شش رقم و ژنوتیپ دیده شد. بقیه ارقام ایرانی دارای هاپلوتیپ متفاوت؛ H2، H7 و H4 بودند، هاپلوتیپ H4 فراوانی بالایی در بین ارقام ایرانی نشان داد. هاپلوتیپ H4 و H7 در هیچ کدام از ارقام اروپایی مشاهده نشد اما در ژنوتیپ‌های *P. communis* ایرانی به وفور یافت می‌شد. از



شکل ۲- دندروگرام ارقام و ژنوتیپ‌های گلابی نشان دهنده روابط فیلوژنی بر اساس اطلاعات نواری سه فضای بین ژنی؛ *accD-psaI*، *rbcl-accD* و *Rps16-trnQ*، نرم افزار NTSYS با روش الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه جاکارد ارقام و ژنوتیپ‌های مورد بررسی در این پژوهش را به شش گروه جداگانه تقسیم کرد: A و D: ارقام اروپایی؛ B: ارقام و ژنوتیپ‌های ایرانی؛ C: ارقام اروپایی و ایرانی؛ E: ارقام ژاپنی، رقم چینی E-Li، ارقام ایرانی در گزی و سبری و رقم اروپایی کيفر؛ F: ژنوتیپ‌های گیلان

Fig. 2. UPGMA dendrogram with NTSYS-pc showing phylogenetic relationship among 83 individuals of pear genotypes using three intergenic spacers; *rbcl-accD*; *accD-psaI*; and *Rps16-trnQ*, based on Jaccard's similarity coefficient, all genotypes were divided in 6 groups; A, D: European cultivars; B: Iranian cultivars and genotypes; C: European and Iranian cultivars; E: Japanese cultivars, Chinese cultivar E-Li, Iranian cultivars Darghazi, Sebrl and European cultivar Kieffer; F: Guilan genotypes

جدول ۶- فراوانی هاپلوتیپ‌ها در ارقام و ژنوتیپ‌های گلابی با استفاده از با سه آنزیم برشی *TruII*، *RsaI* و *BsuRI*

Table 6. Frequencies of haplotype in the cultivars and genotypes analyzed by three restriction enzymes *TruII*, *BsuRI* and *RsaI*

Haplotype هاپلوتیپ	Frequencies فراوانی						
	Total	European cultivars	Iranian cultivars	Iranian wild	Total Iran	Central Asia	Japanese cultivars
H1	24	19	1	2	3	2	0
H2	7	4	2	1	3	0	0
H3	1	1	0	0	0	0	0
H4	12	0	5	7	12	0	0
H5	3	0	0	1	1	2	0
H6	3	3	0	0	0	0	0
H7	10	0	2	4	6	0	4
H8	1	0	0	1	1	0	0
H9	4	1	0	0	0	0	3
H10	12	0	0	12	12	0	0
H11	1	1	0	0	0	0	0
H12	1	1	0	0	0	0	0
H13	1	0	0	1	1	0	0
H14	1	0	0	0	0	0	1
H15	1	0	0	0	0	0	1
H16	1	0	0	0	0	0	1

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرراز از DNA کلروپلاستی، دندروگرام ۷۳ رقم و ژنوتیپ گلابی ایرانی و اروپایی (*P. communis*)، نه رقم ژاپنی *P. pyrifolia*, syn. *P. serotina*، یک رقم چینی *P. × bretschneideri*، دو ژنوتیپ *P. ussuriensis*، یک ژنوتیپ *P. korshinskyi*، شش ژنوتیپ *P. syriaca*، دو ژنوتیپ *P. salicifolia*، یک ژنوتیپ *P. nivalis* و یک ژنوتیپ *P. elaeagrifolia* با روش تجزیه خوشه‌ای UPGMA رسم شد (شکل ۲). ضریب تشابه جاکارد در میان ژنوتیپ‌های مورد بررسی ۰/۹۶ بود که این ارتباط توسط تجزیه خوشه‌ای تقویت شد. تجزیه خوشه‌ای به‌طور واضح، ارقام اروپایی را در سه گروه قرار داد (گروه‌های A، C و D در

ایکتانی و همکاران (۱۹۹۸) چندشکل DNA کلروپلاستی در ۱۰۶ رقم *Pyrus* را بررسی کردند. چهار هاپلوتیپ با ترکیب سه آنزیم برشی *Xba I*، *Sal I*، *EcoO109 I* به‌ترتیب شناسایی شد. در افراد گلابی غربی، انواع با صفات اجدادی مشاهده شد؛ در حالی که، هر چهار هاپلوتیپ در افراد گلابی شرقی وجود داشت. او نشان داد که گونه‌های شرقی و غربی *Pyrus* به‌طور مستقل از هم تکامل یافته‌اند. این نتایج برای گونه‌های اروپایی و ژاپنی می‌تواند صادق باشد اما نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که اجداد ارقام ایرانی در حین تکامل تحت تأثیر گونه‌های ژاپنی و اروپایی قرار گرفته‌اند. بر اساس ضریب تشابه جاکارد (Jaccard) به‌دست آمده از قطعه‌های هضمی محصول

شکل ۲). اولین گروه (گروه A در شکل ۲) شامل اکثر ارقام اروپایی جمع‌آوری شده از اروپا و همچنین ارقام اروپایی کشت شونده در ایران بود. رقم ایرانی تاشکندی و ژنوتیپ ایرانی (ژنوتیپ ۹۲) نیز در این گروه و بین ارقام اروپایی قرار گرفتند. ارقام ایرانی شامل شاهک و محمدعلی و ژنوتیپ ژنوتیپ ۴۶ در گروه دوم از ارقام اروپایی (گروه C در شکل ۲) قرار گرفتند که نشان می‌دهد احتمالاً این ارقام و ژنوتیپ‌ها دارای اجداد مشترکی با ارقام اروپایی هستند.

ارقام و ژنوتیپ‌های ایرانی به چهار گروه تقسیم شدند (گروه‌های B، C، E و F در شکل ۲). ارقام ژاپنی و همچنین رقم چینی E Li با ارقام ایرانی سردرودی و درگزی و تعدادی از ژنوتیپ‌های گیلان در یک گروه (گروه E در شکل ۲) قرار گرفتند. احتمالاً رقم سردرودی و درگزی با گلابی‌های ژاپنی و چینی دارای تشابه ژنتیکی هستند. تجزیه‌های اخیر با نشانگرهای مولکولی، خویشاوندی نزدیک گلابی‌های ژاپنی و چینی را پررنگ‌تر ساخته است، بنابراین به نویسندگان این امکان را می‌دهد که *P. × breteschneideri* را به عنوان زیرگونه *P. pyrifolia*, syn. *P. serotina* پیشنهاد کرده و نام آن را به *P. pyrifolia* var. *sinensis* تغییر دهند (Teng et al., 2002; Bao et al., 2007). به هر حال، رقم درگزی که از شرق ایران منشاء گرفته است همانند ارقام چینی

مقاومت بالایی به بیماری آتشک گلابی دارد (Erfani et al., 2012, 2013). آذرآبادی و همکاران (Azarabadi et al., 2013) نیز با استفاده از آغازگر RLG1 و CH02c02b آلل مقاومت به بیماری آتشک را در رقم درگزی شناسایی کردند. نتایج بررسی توالی‌های نوکلئوتیدی حاصل از DNA کلروپلاستی توسط شریفانی و همکاران (۲۰۰۸) نشان می‌داد که رقم درگزی دارای ارتباط نزدیکی با ارقام گلابی ژاپنی و چینی است. آنها تنوع بالایی را در جمعیت‌های گلابی ایرانی نشان دادند و بیانگر این است که احتمالاً، ایران یکی از مناطق تنوع جنس *Pyrus* بوده و نقش پل ارتباطی بین گلابی‌های اروپایی و آسیایی را بازی کرده است. این نتایج ردپای گلابی ژاپنی *P. pyrifolia* را در مراحل تکامل جنس *Pyrus* در ایران تقویت می‌کند (Sharifani et al., 2008).

ایران شاید جزء اولین کشوری‌هایی در دنیا است که نمونه‌های *P. communis* وارد شده از اروپا، با ژنوتیپ‌های *P. pyrifolia*, syn. *P. serotina* کشورهای آسیای شرقی در ارتباط هستند. علاوه بر این، همان‌طور که قبلاً نیز اشاره شد، گونه *P. × breteschneideri* زیرگونه *P. pyrifolia*, syn. *P. serotina* شناخته شده است (Bao et al., 2007). با این دلایل، می‌توان فرض کرد که ارقام سردرودی و درگزی دارای

است. تعدادی از ارقام ایرانی شامل سیف‌تبریز، دم‌کج، شاه‌میوه، کنجونی و سبری با ژنوتیپ‌های گیلان گروه‌بندی شدند. گزارش شده است که ارقام دم‌کج و شاه‌میوه شدیداً با ارقام خوج همبستگی دارند. تصور می‌شود که ژنوتیپ‌های وحشی متعلق به گونه *P. communis* که از جنگل‌های شمال ایران منشأ گرفته‌اند، نقش اساسی در به‌نژادی ارقام ایرانی دارند (Erfani et al., 2012).

در کل، نشانگر CAPS ارقام و ژنوتیپ‌های وحشی مورد بررسی در این پژوهش را به شش گروه جداگانه تقسیم کرد. تمامی گونه‌های *Pyrus* دگرسازگار هستند، بنابراین انتظار می‌رود که دورگ‌گیری گلابی‌های کشت شده آسیای شرقی و جریان ژنی از گونه‌های وحشی به اهلی، ردپای ژنتیکی روی ژرم‌پلاسم گلابی ایرانی داشته باشد. نتایج آزمایش‌های این تحقیق، با توجه به این که ارقام کشت شونده و ژنوتیپ‌های وحشی ایران را داخل گروه‌های متفاوتی با ژنوتیپ‌های اروپایی و ژاپنی قرار داده است، این فرضیه را تقویت می‌کند.

سپاسگزاری

از دکتر محمدنقی پاداشت، مهندس شهید هناره و دکتر خاویار سانزول به خاطر فراهم کردن برگ‌تعدادی از نمونه‌ها قدردانی می‌شود.

اجدادی از گونه‌های *P. communis* و *P. pyrifolia*, syn. *P. serotina* هستند. درخت فیلوژن حاصل از توالی‌های نواحی بین ژنی *accD-psaI* و *accD-rbcL* در تعدادی از ارقام و ژنوتیپ‌های ایرانی این نتایج را اثبات کرد، زیرا ژنوتیپ‌های وحشی ایران شامل ژنوتیپ ۷۸، ژنوتیپ ۹۰ و ژنوتیپ ۱۰۱ با گونه‌های *P. pyrifolia* و *P. × bretschneideri* گروه‌بندی شدند. رقم ایرانی کنجونی با ارقام اروپایی *P. communis* در یک گروه قرار گرفت. این نتایج با مطالعه‌های عرفانی و همکاران (۲۰۱۲) در یک مورد توافق ندارد؛ عرفانی در گزارش‌های خود با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره، با ضریب تشابه ۰/۴۰ و تجزیه خوشه‌ای بر اساس UPGMA ارقام ژاپنی را به‌طور کامل از ارقام و ژنوتیپ‌های وحشی ایران جدا کرده است، اما رقم درگزی را با ارقام چینی در یک گروه قرار داده است.

رقم اروپایی کیفیت همانند رقم ایرانی درگزی، دارای اجدادی از گونه‌های *P. communis* و *P. pyrifolia*, syn. *P. serotina* است. زیرا این رقم از تلاقی بین گونه‌ای *P. communis* و *P. pyrifolia*, syn. *P. serotina* حاصل شده است و در دندروگرام در بین ژنوتیپ‌های ایران قرار گرفت. بارتلت، با وراثت مادری DNA کلروپلاستی با ارقام ژاپنی گروه‌بندی شده

References

- Abdollahi, H. 2011.** Pear, Botany, Cultivars and Rootstocks. Agricultural Education Publisher, Plant Production Deputy, Ministry of Jihade-Agriculture, Tehran, Iran. 200pp. (in Persian).
- Arnold, M. L., Buckner, C. M., and Robinson, J. J. 1991.** Pollen-mediated introgression and hybrid speciation in Louisiana irises. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88 (4): 398-402.
- Azarabadi, S. R., Abdollahi, H., and Torabi, M. 2014.** Resistance of new semi-dwarfing pear rootstocks to fire blight *in vitro* and greenhouse conditions. Seed and Plant Improvement Journal 30-1 (2): 227-242 (in Persian).
- Bao, L., Chen, K., Zhang, D., Cao, Y., Yamamoto, T., and Teng, Y. 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.
- Bell, R. L. 1986.** Inter-specific and inter-generic hybridization of *Pyrus*. Horticultural Science 21 (1): 62-64.
- Bouhadida, M., Martín, J. P., Eremin, G., Pinochet, J., Moreno, M. Á., and Gogorcena, Y. 2007.** Chloroplast DNA diversity in *Prunus* and its implication on genetic relationships. Journal of the American Society for Horticultural Science 132 (5): 670-679.
- Coart, E., Van Glabeke, S., De Loose, M., Larsen, A. S., and Roldan-Ruiz, I. 2006.** Chloroplast diversity in the genus *Malus*: New insights into the relationship between the European wild apple (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) and the domesticated apple (*Malus domestica* Borkh.). Molecular Ecology 15: 2171-2182.
- Demesure, B., Sodzi, N., and Petit, R. J. 1995.** A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. Molecular Ecology 4: 129-131.
- Dumolin-Lapegue, S., Pemonge, M. H., and Petit, R. J. 1997.** An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. Molecular. Ecology 6:393-397
- Erfani, J., Abdollahi, H., Ebadi, A., Fatahi Moghadam, M. R., and Arzani, K. 2013.** Evaluation of fire blight resistance and the related markers in some European

- and Asian pear cultivars. Seed and Plant Improvement Journal 29-1 (4): 659-672 (in Persian).
- Erfani, J., Ebadi, A., Abdollahi, H., and Fatahi, R. 2012.** Genetic diversity of some pear cultivars and genotypes using simple sequence repeat (SSR) markers. Plant Molecular Biology Reporter 30 (5): 1065-1072.
- Fofona, B., Harvengt, L., Baudoin, J. P., and Du Jardin, P. 1997.** New primers for the polymerase chain reaction of cpDNA intergenic spacers in Phaseolus phylogeny. Belgian Journal of Botany 129: 118-122.
- Grivet, D., Heinze, B., Vendraminà, G. G., and Petit, R. J. 2001.** Genome walking with consensus primers: Application to the large single copy region of chloroplast DNA. Molecular Ecology 1: 345-349.
- Heinze, B. 1998.** PCR based chloroplast DNA assay for the identification of native *Populus nigra* and introduced poplar hybrids in Europe. Forest Genetics 5 (1): 31-38.
- Iketani, H. 1994.** Chloroplast DNA diversity in Pyrus and related genera. Gamma Field Symposia 32: 63-69.
- Iketani, H., Manabe, T., Matsuta, N., Akihama, T., and Hayashi, T. 1998.** Incongruence between RFLPs of chloroplast DNA and morphological classification in east Asian pear (*Pyrus* spp.). Genetic Resources and Crop Evolution 45: 533-539.
- Katayama, H. 2002.** Phylogenetic Analysis of Pyrus species: The chloroplast DNA structure of *Pyrus ussuriensis* var. *hondoensis*. Acta Horticulturae 587: 259-268.
- Katayama, H., Adachi, S., Yamamoto, T., and Uematsu, C. 2007.** A wide range of genetic diversity in pear (*Pyrus ussuriensis* var. *aromatica*) genetic resources from Iwate, Japan revealed by SSR and chloroplast DNA markers. Genetic Resources and Crop Evolution 54 (7): 1573-1585.
- Katayama, H., Tachibana, M., Iketani, H., Zhang, S. L., and Uematsu, C. 2011.** Phylogenetic utility of structural alterations found in the chloroplast genome of pear: hypervariable regions in a highly conserved genome. Tree Genetics & Genomes 8 (2): 313-326.
- Katayama, H., and Uematsu, C. 2003.** Comparative analysis of chloroplast DNA in Pyrus species: physical map and gene localization. Theoretical and Applied Genetics 106 (2): 303-310.
- Maguire, T. L., Collins, G. G., and Sedgley, M. 1994.** A modified CTAB DNA

- extraction procedure for plants belonging to the family Proteaceae. *Plant Molecular Biology Reporter* 12 (2): 106-109.
- Mohanty, A., Martín, J. P., and Aguinagalde, I. 2001.** Chloroplast DNA study in wild populations and some cultivars of *Prunus avium* L. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 112-117.
- Nei, M. 1978.** Estimation of average heterozygosity and distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Nikzad, A., Arzani, K., Abdollahi, H., Shojaeiyan, A., Dondini, L., and De Franceschi, P. 2013.** 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 & Genomes* 10: 411-428.
- Palmer, J. D., and Stein, D. B. 1986.** Conservation of chloroplast genome structure among vascular plant. *Current Genetics* 10: 823-833.
- Panda, S., Pedro, M. J., and Aguinagalde, I. 2003.** Chloroplast DNA study in sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.) using PCR-RFLP method. *Genetic Resources and Crop Evolution* 50: 489-495.
- Sharifani, M., Erfani, V., Bagerian, A., Nishtani, C., Yamamoto, T., and Kimura, T. 2008.** Mutations in chloroplast DNA revealed relations and discriminations in genus *Pyrus*. *Acta Horticulturae* 800: 355-364.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., and Bouvet, J. 1991.** Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105-1109.
- Teng, Y., Tanabe, K., Tamura, F., and Itai, A. 2002.** Genetic relationships of *Pyrus* species and cultivars native to East Asia revealed by randomly amplified polymorphic DNA markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 127 (2): 262-270.
- Terakami, S., Matsumura, Y., Kurita, K., Kanamori, H., Katayose, Y., Yamamoto, T., and Katayama, H. 2012.** Complete sequence of the chloroplast genome from pear (*Pyrus pyrifolia*): genome structure and comparative analysis. *Tree Genetics & Genomes* 8(4): 841-854.
- Turkec, A., Sayar, M., and Heinze, B. 2006.** Identification of sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.) and analysis of their genetic relationships by chloroplast

sequence-characterised amplified regions (cpSCAR). *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 1635-1641.

- Wei, H., Li, J., Peng, Z., Lu, B., Zhao, Z., and Yang, W. 2008.** Relationships of *Aegilops tauschii* revealed by DNA fingerprints: The evidence for agriculture exchange between China and the West. *Progress in Natural Science* 18 (12): 1525-1531.
- Weising, K., and Gardner, R. C. 1999.** A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome* 42: 9-19.
- Whittemore, A. T., and Schaal, B. A. 1991.** Interspecific gene flow in sympatric oaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (6): 2540-2544.
- Wolko, L., Antkowiak, W., Lenartowicz, E., and Bocianowski, J. 2010.** Genetic diversity of European pear cultivars (*Pyrus communis* L.) and wild pear (*Pyrus pyraster* (L.) Burgsd.) inferred from microsatellite markers analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution* 57 (6): 801-806.

