جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد
مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۹ شماره ۱ صفحه های ۱۱۱ تا ۱۱۸ (۱۳۸۷)

تعیین تنوع ژنتیکی رقم های گلابی (*Pyrus* spp.) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره‌ای[1]

DETERMINATION OF GENETIC DIVERSITY IN PEAR (*PYRUS* SPP.) USING MICROSATELLITE MARKERS

مریم صفرپور شورباخلو، مسعود بهار، بدرالدین ابراهیم سید طباطبائی و حمید عبدالهی[2]

چکیده

برخلاف موقعیت ممتاز تنوع ژنتیکی گلابی، هنوز اطلاعات دقیقی از روابط بین نژادگان‌های مختلف این گونه در ایران وجود ندارد. در این پژوهش به منظور گروه‌بندی نژادگان‌های گلابی و تعیین موقعیت ژنتیکی گلابی 'سبری' در بین رقم های خارجی و ایرانی، از نوزده جفت آغازگر SSR [3] سیب، که در گلابی به طور حفاظت شده وجود دارد، برای تکثیر قطعات DNA در۲۷ رقم گلابی استفاده گردید که در کل ۱۲۰ آلل ریزماهواره تولید کردند. بر مبنای دندروگرام رسم شده از تفاوت های آللی ریزماهواره ای، رقم های گلابی مربوط به *Pyrus pyrifolia* در یک گروه به طور کامل متفاوت از رقم های متعلق به *P. communis* قرار گرفتند. گروه بندی رقم های ایرانی 'شاه‌میوه'، 'دم‌کج' و 'سبری' در گروه نژادگان های غیر تجاری خوج‌ها نشان داد که به احتمال این رقم های از خوج‌ها منشأ گرفته اند و فاقد رابطه خویشاوندی با گلابی‌های آسیایی می باشند. دو رقم 'محمدعلی' و 'سردرودی' با رقم های اروپایی یک گروه خاصی را تشکیل دادند و رقم 'دره‌گزی' در گروه رقم های فرانسوی قرار گرفت. می توان چنین استنباط نمود که این سه نژادگان شناخته شده در ایران به احتمال منشأ متفاوتی از خوج‌ها داشته و با رقم های اروپایی اجداد مشترکی دارند.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، ریزماهواره، گلابی خوج، نشانگرSSR ، *Pyrus*.

مقدمه

گلابی از جنس *Pyrus*، عضوی از زیرتیره Pomoideae و تیره Rosaceae، و پس از سیب مهمترین محصول تجاری زیر گروه میوه های دانه‌دار به شمار می‌آید (۲۷). در این جنس۲۲ گونه اولیه بومی اروپا، آسیا و مناطق کوهستانی شمال آفریقا، شش دورگه بین گونه ای طبیعی و حداقل سه دورگه مصنوعی قرار دارند (۹). به تقریب همه گونه‌های *Pyrus* دوگان هایی (دیپلوییدهایی) با ۱۷ جفت کروموزوم (۳۴ =2X =2n) هستند و به دلیل این که دارای خودناسازگاری[4] گامتوفیتی می باشند، تنوع بالایی در این جنس وجود دارد (۱۰).

رقم های گلابی تجاری مورد کشت به دو تیپ شرقی[5] و اروپایی تقسیم می‌شوند. رقم های شرقی (*P. pyrifolia*) به طور عمده در کشور های جنوب شرقی آسیا کشت می‌شوند و ویژگی عمده آن ها مزه شیرین

۱- تاریخ دریافت: ۸۶/۱۱/۱۵ تاریخ پذیرش: ۸۷/۵/۲۳

۲- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیاران گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان ودانشیار موسسه تحقیقات اصلاح وتهیه نهال و بذر، کرج، جمهوری اسلامی ایران.

۳- Simple Sequence Repeat ۴- Self-incompatible ۵- Oriental pear

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

و بافت ترد همراه با مقدار زیادی یاخته های اسکلروئیدی در میوه است (۹). گلابی‌های اروپایی ترکیب بافت کره مانندی دارند و مزه و عطر خوشایند از ویژگی های این دسته می‌باشد. گونه مهم اقتصادی این گروه *P. communis* است که به تقریب ۹۰٪ رقم های گلابی کشت شده در دنیا را شامل می‌شود (۳).

به دلیل امکان تلاقی بین گونه‌ها، وجود دورگه های بین گونه ای و تنوع مورفولوژیکی محدود، ارزیابی تنوع ژنتیکی رقم ها و گونه های *Pyrus* spp. مشکل است. در گذشته ویژگی های مورفولوژیکی و تجزیه و تحلیل‌های آیزوزایمی برای بررسی تنوع ژنتیکی جنس *Pyrus* مورد استفاده قرار می‌گرفت (۱۱)، ولی به دلیل محدودیت نشانگرهای مورفولوژیکی و آیزوزایمی (۱۱)، دسته بندی رقم های گلابی با چنین روش‌هایی به طور کامل موفقیت آمیز نبوده است. به همین جهت در سال‌های اخیر استفاده از روش‌های ملکولی برای تعیین مشخصات ژنتیکی گونه و رقم های گلابی توجه بیشتری را جلب کرده است (۳۴، ۳۵، ۳۶).

به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی گلابی، از نشانگرهای مولکولی RAPD[۱] (۲۴، ۳۰، ۳۱، ۳۳) و AFLP[۲] (۱۳، ۲۴) استفاده بیشتری شده است. بر خلاف سودمندی این نشانگرهای مولکولی، تکرارپذیری پایین RAPD و هزینه بالا به همراه پیچیدگی روش در استفاده از AFLP ، کاربرد این نشانگرها را کاهش داده است. در مقابل، استفاده از نشانگر SSR[۳] که ریزماهواره[۴] نیز نامیده می‌شود به دلیل سرعت، دقت، ماهیت هم بارز، پراکندگی یکنواخت و تکرارپذیری بالا (۱۶، ۲۸) در شناسایی رقم های گلابی، کاربرد بیشتری داشته است.

ریزماهواره‌ها، واحدهای تکراری دو تا شش نوکلئوتیدی هستند که در مجموعه هایی به طول تقریبی ۱۰۰ نوکلئوتید سامان یافته‌اند (۱۲). متغیر بودن بیش از حد جایگاه‌های ریزماهواره، آلل‌های فراوانی در هر جایگاه تولید می‌کند که توسط مناطق حفاظت شده‌ای[۵] احاطه شده‌اند. بنابراین می‌توان با طراحی آغازگرهای اختصاصی از توالی‌های اطراف ریزماهواره[۶]، چندشکلی ریزماهواره‌ها را در موجودات مختلف تعیین نمود (۸، ۱۸، ۲۹، ۳۴، ۳۶).

طراحی آغازگرهای ریزماهواره عملی پرهزینه و وقت گیر است، بنابراین به سبب حفاظت شدگی توالی‌های احاطه کننده ریزماهواره‌ها در بین گونه‌های یک جنس، استفاده از نشانگرهای شناخته شده یک گونه هدف برای ارزیابی ژنتیکی گونه‌های نزدیک و یا حتی دور، رو به افزایش است (۳۴، ۳۶). امکان استفاده از ریزماهواره‌های سیب در تعیین تنوع ژنتیکی رقم های گلابی در مطالعه های زیادی اثبات شده است. یاماموتو[۷] و همکاران (۳۶) با کمک ریزماهواره‌های سیب، ۳۶ نمونه گلابی از پنج گونه مختلف جنس *Pyrus* را شناسایی کردند و ثابت نمودند که این مناطق ژنتیکی بسیار حفاظت شده‌اند. پس از آن، استفاده از آغازگرهای SSR سیب در شناسایی رقم های گلابی (۸، و ۳۴)، تعیین نقشه ژنتیکی (۱۸) و مطالعه تلاقی‌های سیب و گلابی (۲۹) کاربرد پیدا کرد.

در مطالعه نژادگان های گلابی افزون بر ریزماهواره‌های طراحی شده از سیب، از ریزماهوارهای توسعه یافته برای خود گلابی هم استفاده شده است. طراحی نشانگرهای ریزماهواره‌ای گلابی با استفاده از روش RAHM[۸]، روش PCR *anchored* – 5′ (۳۵)، روش کتابخانه غنی شده ژنومی (۲۱) و توالی های موجود گلابی

۱- Random Amplified Polymorphic DNA ۲- Amplified Fragment Length Polymorphism
۳- Simple Sequence Repeat ۴- Microsatellite ۵- Conserved ۶- Flanking region
۷- Yamamoto ۸- Random Amplified Hybridization Microsatellite

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

در بانک ژن[۱] (۶، ۷) به معرفی آغازگرهایی منجر شد که توانست با موفقیت برای شناسایی و تخمین تنوع ژنتیکی رقم های وحشی و تجاری گلابی (۱۵، ۲۰)، رقم های انتخاب شده از برنامه‌های اصلاحی و تلاقی های بین گونه ای (۱۵) به کار رود. از کلیه SSR های طراحی شده برای گلابی و ریزماهواره‌های سیب قابل انتقال به گلابی، برای توسعه نقشه ژنتیکی گلابی استفاده شده است (۳۲).

ایران با دارا بودن بیش از ده گونه از جنس *Pyrus* به عنوان یکی از مراکز تنوع ژنتیکی گلابی در دنیا شناخته‌شده است (۴). از طرف دیگر، کشور ایران با سطح کشتی معادل ۱۷۰۰۰ هکتار و با عملکرد ۱۱۵ تن در هکتار، یکی از مراکز پر اهمیت تولید گلابی محسوب می‌شود. در این میان، رقم معروف به 'سبری' از گلابی های زمستانه، به سبب دارا بودن کیفیت و انبارمانی بالا، مورد توجه باغداران استان اصفهان می‌باشد. بر خلاف این موقعیت ممتاز جغرافیایی برای گلابی در ایران، هنوز اطلاعات دقیقی از روابط بین نژادگان‌های مختلف گلابی در ایران وجود ندارد و مشخص نیست رقم های بومی ایرانی چه نسبت ژنتیکی با رقم های تجاری وارداتی دارند. در این پژوهش، از نشانگرهای SSR به منظور گروه‌بندی نژادگان‌های گلابی و تعیین موقعیت ژنتیکی گلابی سبری در بین رقم های خارجی و ایرانی استفاده شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و استخراج DNA

نمونه های برگ گلابی شامل ۱۷ رقم خارجی از دو گروه رقم های اروپایی و آسیایی و ۱۰ رقم ایرانی (جدول ۱)، از مجموعه گلابی بخش تحقیقات باغبانی مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج جمع آوری شدند و بعد از انجماد سریع با نیتروژن مایع، تا زمان استخراج DNA ژنومی در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد نگهداری گردیدند.

استخراج DNA از برگ های جوان گلابی به روش موری و تامسون (۲۵) انجام گرفت، با این تفاوت که به بافر استخراج مقدار ۲٪ مرکاپتواتانول[۲] اضافه شد و مرحله خالص سازی با مخلوط کلروفرم/ ایزوامیل الکل (۲۴:۱) برای هر نمونه دوبار انجام گرفت. برای تعیین کمیت و کیفیت DNA از روش الکتروفورز پنج میکرولیتر از DNA به دست آمده در ژل آگاروز ۰/۷٪ در بافر TAE[۳] و مقایسه تراکم باند آن با مقدار استاندارد قطعات نشانگر III (λDNA برش یافته با آنزیم‌های برشی *Eco*RI و *Hin*d III) استفاده شد.

تکثیر ریزماهواره‌ها

بیست و هشت جفت آغازگر SSR طراحی شده از سیب (۱۷، ۱۹، ۲۳) برای بررسی تنوع ژنتیکی رقم های گلابی به کار رفت. از میان این جفت آغازگرها، نوزده جفت آغازگر که در آزمایش های مقدماتی قدرت تکثیر در گلابی را نشان داده بودند برای ارزیابی روابط ژنتیکی رقم های گلابی انتخاب شدند (جدول ۲). همگی آغازگرها از شرکت آیزوژن (Isogen Co. The Netherlands) تهیه شدند.

۱- Gene Bank ۲- ß-mercaptoethanol ۳- Tris-Acetate-EDTA

جدول ۱- اطلاعات مربوط به منشاء نژادگان های گلابی مورد استفاده در این پژوهش.

Table 1. Pear genotypes used in this study.

ردیف No.	رقم Cultivar	گونه species	خاستگاه Origin
1	‘آنجو’ ’Anjou’	*Pyrus communis*	فرانسه (France)
2	‘ویلیامز ’ (بارتلت) ’ ’ (Bartlett)’ ’Williams’	*P. communis*	انگلستان (England)
3	‘بوره بوسک’ ’ Beurre Bosc’	*P. communis*	فرانسه (France)
4	‘کوشیا ’ ’ Coscia’	*P. communis*	ایتالیا (Italy)
5	‘کنفرنس’ ’ Conference’	*P. communis*	انگلستان (England)
6	‘دوشس’ ’ Duchesse’	*P. communis*	فرانسه (France)
7	‘لوئیس بن’ ’ Louise Bonne’	*P. communis*	فرانسه (France)
8	‘آبت فتال’ ’ Abate Fetel’	*P. communis*	فرانسه (France)
9	‘فلسطینی’ ’ Palestine’	*P. communis*	فرانسه (France)
10	‘ردبارتلت’ ’ Red Bartlett’	*P. communis*	انگلستان (England)
11	‘پاس کراسان’ ’ Passe Crassane’	*P. communis*	فرانسه (France)
12	‘هاروسویت ’ ’ Harrow Sweet’	*P. communis*	کانادا (Canada)
13	‘اسپادونا ’ ’ Spadona’	*P. communis*	ایتالیا (Italy)
14	‘دوین دوکومیس’ ’ Doyenne du Comice’	*P. communis*	فرانسه (France)
15	‘بوره ژیفارد’ ’ Beurre Giffard’	*P. communis*	فرانسه (France)
16	’ SK10’	*P. pyrifolia*	ژاپن (Japan)

17	’ SK13’	*P. pyrifolia*	ژاپن (Japan)
18	‘خوج کته سر’ ’ Khuj Katesar’	*P. communis*	ایران (Iran)
19	‘خوج مرداب انزلی’ ’ Khuj Mordab Anzali’	*P. communis*	ایران (Iran)
20	‘کولی خوج’ ’ Koli Khuj’	*P. communis*	ایران (Iran)
21	‘سبری’ ’ Sebri’	*P. communis*	ایران (Iran)
22	‘شاه میوه’ ’ Shah Miveh’	*P. communis*	ایران (Iran)
23	‘خوج لب ترش’ ’ Khuj Labtorsh’	*P. communis*	ایران (Iran)
24	‘دمکج’ ’ Dom Kaj’	*P. communis*	ایران (Iran)
25	‘دره گزی’ ’ Daregazi’	*P. communis*	ایران (Iran)
26	‘محمدعلی’ ’ Mohammad Ali’	*P. communis*	ایران (Iran)
27	‘سردرودی’ ’ Sardroud’	*P. communis*	ایران (Iran)

Native genotypes, ‘Khuj Katesar’, ‘Koli Khuj’, ‘Khuj Mordab Anzali’ and ‘Khuj Labtorsh’ are wild pear and the other accessions known as commercial cultivars.

نژادگان های محلی ‘خوج کته سر’، ‘خوج مرداب انزلی’، ‘کولی خوج’ و‘خوج لب ترش’ جزو رقم های وحشی و سایر نژادگان ها رقم های تجاری هستند.

انجام واکنش PCR

واکنش PCR برای نمونه‌ها در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ۱/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X حاوی کلریدمنیزیم ۱/۵ میلی مولار، ۰/۳ میکرولیتر *Taq* DNA Polymerase (Cinnagen Co.)، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر، ۰/۳ میکرولیتر dNTPs (Cinnagen Co.) و ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی از هر نمونه تهیه شد. پس از اضافه کردن یک قطره روغن معدنی سترون به هر نمونه، لوله‌ها در دستگاه ترموسایکلر[۱] قرار گرفتند که در آن انجام واکنش PCR به صورت یک چرخه واسرشت سازی اولیه[۲] در ۹۴ به مدت ۳ دقیقه، ۳۰ چرخه شامل واسرشت سازی در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، اتصال DNA[۳] در دمای بهینه شده برای هر آغازگر (جدول۲) به مدت ۴۵

۱- Eppendorf Maste cycler– gradient ۲- Denaturing ۳- Annealing

جدول ۲- اطلاعات مربوط به جفت آغازگرهای SSR مورد استفاده در این پژوهش برای انگشت نگـاری ژنتیکـی رقم های محلی و تجاری گلابی.

Table 2. Microsatellite sets used to fingerprint native and commercial pears in this study.

نام جفت آغازگر SSR name	توالی آغازگر Primer sequence (5'-3')	منابع Reference	دمای اتصال (℃) Annealing temp.
CHO1B12	F:CGC ATG CTG ACA TGT AT R:CGG TGA GCC CTC TTA TGT GA	Liebhard *et. al.* (2002) [31]	59
CHO1D03	F:CCA CTT GGC AAT GAC TCC TC R:ACC TTA CCG CCA ATG TGA AG	Liebhard *et. al.* (2002) [31]	55
CHO1D09	F:GCC ATC TGA ACA GAA TGT GC R:CCC TTC ATT CAC ATT TCC AG	Liebhard *et. al.* (2002) [31]	60.5
CHO1F02	F:ACC ACA TTA GAG CAG TTG AGG R:CTG GTT TGT TTT CCT CCA GC	Liebhard *et. al.* (2002) [31]	60
CHO1F03b	F:GAG AAG CAA ATG CAA AAC CC R:CTC CCC GGC TCC TAT TCT AC	Liebhard *et. al.* (2002) [31]	58
CHO1H01	F:GAA AGA CTT GCA GTG GGA GC R:GGA GTG GGT TTG AGA AGG TT	Liebhard *et. al.* (2002) [31]	57
CHO2B07	F:CCA GAC AAG TCA TCA CAA CAC TC R:ATG TCG ATG TCG CTC TGT TG	Liebhard *et. al.* (2002) [31]	57
CHO2F06	F:CCC TCT TCA GAC CTG CAT ATG R:ACT GTT TCC AAG CGA TCA GG	Liebhard *et. al.* (2002) [31]	56
CHO3A04	F:GAC GCA TAA CTT CTC TTC CAC C R:TCA AGG TGT GCT AGA CAA GGA G	Liebhard *et. al.* (2002) [31]	60
CHO3C02	F:TCA CTA TTT ACG GGA TCA AGC A R:GTG CAG AGT CTT TGA CAA GGC	Liebhard *et. al.* (2002) [31]	57
CHO4G04	F:AGT GGC TGA TGA GGA TGA GG R:GCT AGT TGC ACC AAG TTC ACA	Liebhard *et. al.* (2002) [31]	60
CHO5A02	F:GTT GCA AGA GTT GCA TGT TAG C R:TTT TGA CCC CAT AAA ACC CAC	Liebhard *et. al.* (2002) [31]	58
CHO5D03	F:TAC CTG AAA GAG GAA GCC CT R:TCA TTC CTT CTC ACA TCC ACT	Liebhard *et. al.* (2002) [31]	58
CHO5E03	F:CGA ATA TTT TCA CTC TGA CTG GG R:CAA GTT GTT GTA CTG CTC CGA C	Liebhard *et. al.* (2002) [31]	55.5
O2b1	F:CCG TGA TGA CAA AGT GCA TGA R:ATG AGT TTG ATG CCC TTG GA	Guilford *et. al.* (1996) [23]	61
O5g8	F:CGG CCA TCG ATT ATC TTA CTC TT R:GGA TCA ATG CAC TGA AAT AAA CG	Guilford *et. al.* (1996) [23]	57
GD96	F:CGG CGG AAA GCA ATC ACC T R:GCC AGC CCT CTA TGG TTC CAG A	Honkanson *et. al.* (1998) [25]	58.5
GD142	F:GGC ACC CAA GCC CCT AA R:GGA ACC TAC GAC AGC AAA GTT ACA	Honkanson *et. al.* (1998) [25]	56
GD147	F:TCC CGC CAT TTC TCT GC R:AAA CCG CTG CTG CTG AAC	Honkanson *et. al.* (1998) [25]	55

ثانیه و تکثیر[1] در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و نیز یک چرخه تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت پنج دقیقه، برنامه ریزی شده بود.

مقدار ۱۰ میکرولیتر از محصول PCR با حجم مساوی از بافر نمونه گذاری فرمامید[2] (۹۵٪ فرمامید، ۰/۵٪ برموفنل بلو[3]، ۰/۵٪ زایلن سیانول[4] و ۱۰ mM اتیلن دی آمین تترا استیک اسید[5]) مخلوط شد. بعد از واسرشته کردن مخلوط در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، مقدار پنج میکرولیتر از آن در یک چاهک ژل اکریل آمید ۶ ٪ واسرشت حاوی ۷ مولار اوره بار گذاری شد و به مدت ۱/۵ ساعت با ولتاژ ۲۰۰ میلی آمپر الکتروفورز گردید. جهت نمایان کردن قطعات DNA در ژل، از رنگ آمیزی به روش نیترات نقره (۵) استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

بر اساس حضور و عدم حضور باندها در هر نمونه DNA مورد بررسی، الگوهای باندی به صورت حروف لاتین امتیازدهی شدند. در جفت آغازگرهایی که چندمکان ژنی ریزماهواره را تکثیر می کردند، هر مکان ژنی به طور جداگانه امتیازدهی گردید. داده ها با استفاده از نرم افزار Power Marker V. 3.25 (http://www.Powermarker.net) تجزیه و تحلیل شد و بر اساس دندروگرام‌های مختلف به دست آمده با این نرم افزار به واسطه آزمون Bootstrap، درخت فیلوژنتیکی مورد توافق[6] با کمک نرم افزار $MEGA_3$ رسم گردید.

نتایج و بحث

از ۲۸ جفت آغازگر بررسی شده، ۱۹ جفت آغازگر قادر به انجام تکثیر مناسب ۲۱ مکان ریز ماهواره ای در رقم های مورد بررسی گلابی بودند (شکل های ۱ و ۲) که اطلاعات کافی برای تشخیص رقم های گلابی از همدیگر فراهم آورد. در این بررسی به غیر از جفت آغازگر CHO2B07 که یک باند حدود۱۰۰ جفت بازی را در همه رقم ها تکثیر نمود، بقیه ۱۸ جفت آغازگر انتخاب شده واجد چند شکلی بودند. امکان تکثیر ریزماهواره های طراحی شده از سیب در رقم های گلابی در پژوهش های مختلفی (۸، ۱۸، ۲۹، ۳۴، ۳۶) به اثبات رسیده است. نتایج این پژوهش نیز با تکثیر موفق ۱۹ جفت آغازگر سیب در رقم های گلابی، حفاظت شدگی مناطق کناری ریزماهواره‌های سیب را در گلابی ثابت می نماید و نیز تأیید می کند که این نشانگرها برای تشخیص تنوع ژرم‌پلاسم گلابی مناسب هستند.

بیشتر رقم های گلابی دوگان (دیپلوئید) می‌باشند و فقط تعداد محدودی رقم های سه گان (تریپلوئید) وجود دارند (۹). بنابراین تکثیر دو باند (دو آلل) برای افراد هتروزیگوت و تکثیر یک باند (یک آلل) برای افراد هموزیگوت در هر مکان ریزماهواره در رقم های دیپلوئید منطقی است. در رقم های تری پلوئید امکان مشاهده سه باند در هر مکان ریزماهواره هم وجود دارد (۱۰). چون جفت آغازگرهای به کار رفته در این پژوهش همواره دو باند در هر مکان آللی در رقم های گلابی تکثیر نمودند، بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که تمامی رقم های گلابی مورد بررسی به احتمال دوگان می‌باشند.

۱- Extension ۲- Formamide ۳- Bromophenol blue ۴- Xylene cyanol

۵- Ethylene Diamine Tetra Acetic acid (EDTA) ۶- Consensus tree

تعداد آلل های مشاهده شده در مکان های مختلف از یک آلل (در مکانCHO2B07) تا هشت آلل (در مکان‌های Gd142، O5g8، CHO1DO9 و CHO1DO3a) متغیر بود. در کل تعداد ۱۲۰ آلل مشاهده شد که میانگین تعداد آلل ها به ازای هر مکان ۵/۷۱ ارزیابی گردید.

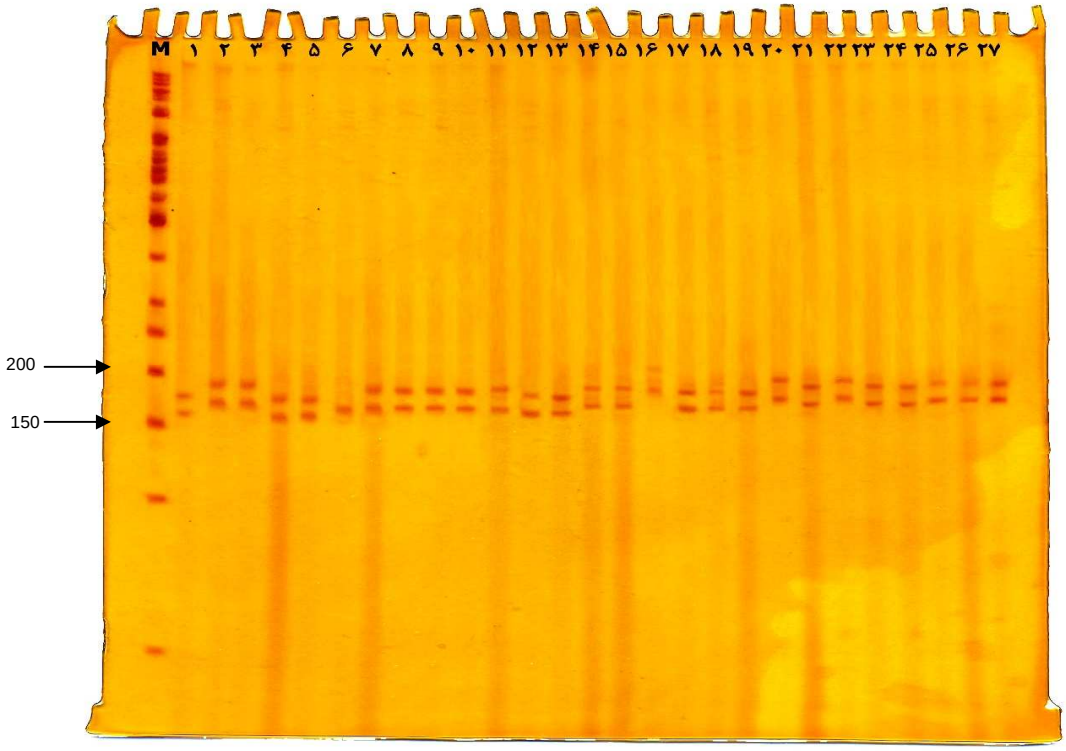

Fig. 1. Electrophoretic patterns of pear genotypes amplified with microsatellite CHO4GO4. M: 50 bp DNA Ladder. 1. ‘Sardrood’, 2. ‘SK13’, 3. ‘SK10’, 4. ‘Coscia’, 5. ‘Conference’, 6. ‘Bartlett’, 7. ‘Red Bartlett’, 8. ‘Passe Crassane’, 9. ‘Doyenneducomice’, 10. ‘Harrow Sweet’, 11. ‘Duchesse’, 12. ‘Abate Fetel’, 13. ‘Palestine’, 14. ‘Beurre Bosc’, 15. ‘Beurre Giffard’, 16. ‘Anjou’, 17. ‘Louise Bonne’, 18. ‘Sardrood’, 19. ‘Mohammad Ali’, 20. ‘KoliKhuj’, 21. ‘Daregazi’, 22. ‘Khuj Labtorsh’, 23. ‘Dom Kaj’, 24. ‘Sebri’, 25. ‘Shah Miveh’, 26. ‘Khuj Katesar’ and 27. ‘Khuj Mordab Anzali’.

شکل ۱- الگوی تکثیر DNA در رقم های مختلف گلابی با استفاده از جفت آغازگر ریز ماهواره CHO4GO4.

M: نشانگر اندازه ۵۰، ۱- ‘اسپادونا’، ۲- ‘SK13’، ۳- ‘SK10’، ۴- ‘کوشیا’، ۵- ‘کنفرنس’، ۶- ‘بارتلت’، ۷- ‘ردبارتلت’، ۸- ‘پاس کراسان’، ۹- ‘دوین دوکومیس’، ۱۰- ‘هاروسویت’، ۱۱- ‘دوشس’، ۱۲- ‘آبت‌فتال’، ۱۳- ‘فلسطینی’، ۱۴- ‘بوره بوسک’، ۱۵- ‘بوره ژیفارد’، ۱۶-‘آنجو’، ۱۷- ‘لوئیس بن’، ۱۸- ‘سردرودی’، ۱۹- ‘محمدعلی’، ۲۰- ‘کولی خوج’، ۲۱- ‘دره‌گزی’، ۲۲- ‘خوج لب ترش’، ۲۳- ‘دم کج’، ۲۴- ‘سبری’، ۲۵- ‘شاه‌میوه’، ۲۶- ‘خوج کته سر’ و ۲۷- ‘خوج مرداب انزلی’.

جدول ۳ نتایج بدست آمده از هر مکان ژنی ریزماهواره ای به کار رفته در گلابی را نشان می‌دهد. تعداد رقم های گلابی هتروزیگوت از دو رقم در جایگاه CHO3A04 تا ۲۷ رقم هتروزیگوت مربوط به جایگاه های

جدول ۳- تعداد و فراوانی آللی، تنوع ژنی، هتروزیگوتی مشاهده شده و محتوای اطلاعات چند شکلی جفت آغازگرهای ریزماهواره مورد استفاده برای انگشت نگاری ژنتیکی ژنوتیپ های گلابی.

Table 3. Number and frequency of alleles, gene diversity, observed heterozygoties and polymorphic information contents for each SSR set used for genetic fingerprinting of pear genotypes.

شماره No	مکان ژنیSSR SSR Loci	فراوانی آلل حداکثر	تعداد ژنوتیپ No. of genotype	تعداد آلل ها No. of alleles	تنوع ژنی Gene diversity	هتروزیگوسیتی مشاهده شده Observed heterozygosity	PIC†
1	CHO1B12a	0.38	6	5	0.69	0.46	0.63
2	CHO1B12b	0.76	4	4	0.38	0.15	0.36
3	CHO1D03a	0.25	8	8	0.81	0.88	0.78
4	CHO1D03b	0.35	6	7	0.79	0.92	0.77
5	CHO1D09	0.36	5	8	0.77	0.84	0.74
6	CHO1F02	0.42	6	7	0.71	1.00	0.67
7	CH01F03b	0.39	4	5	0.70	0.96	0.65
8	CHO1H01	0.48	5	6	0.63	0.84	0.56
9	CHO2B07	1	1	1	0.00	0.00	0.00
10	CHO2F06	0.48	4	4	0.65	1.00	0.59
11	CHO3A04	0.87	2	2	0.22	0.25	0.20
12	CHO3C02	0.35	6	7	0.73	0.96	0.68
13	CHO4G04	0.41	4	5	0.67	0.92	0.62
14	CHO5A02	0.54	7	6	0.62	0.69	0.57
15	CHO5D03	0.41	7	6	0.69	0.96	0.64
16	CHO5E03	0.33	4	6	0.76	1.00	0.73
17	O2b1	0.42	4	5	0.65	0.96	0.58
18	O5g8	0.29	10	8	0.79	0.88	0.76
19	Gd96	0.40	4	6	0.72	1.00	0.68
20	Gd142	0.28	10	8	0.81	0.92	0.79
21	Gd147	0.42	5	6	0.69	0.96	0.63
	Mean	0.45	5.33	5.71	0.64	0.79	0.60

† PIC: polymorphism information content

† PIC: محتوای اطلاعات چند شکلی

CHO1FO2، CHO1DO3b و CHO5EO3 متغیر بود. میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده ۰/۷۹ تخمین زده شد که کمی بیشتر از هتروزیگوسیتی مورد انتظار (۰/۶۵) است. این نسبت بالای هتروزیگوسیتی با طبیعت دگرگشن و خود ناسازگاری گلابی که سبب افزایش هتروزیگوسیتی در آن می شود مطابقت دارد. گر چه نتایج هتروزیگوسیتی یا تنوع ژنی در گلابی را نمی توان به طور دقیق با سایر درختان میوه خود ناسازگار مقایسه کرد ولی با استفاده از جفت آغازگرهای SSR، میزان هتروزیگوسیتی در بین ۶۰ رقم گلابی ۰/۶۳ (۲۲) و ۱۴۲ رقم سیب ۰/۶۲ (۱۹) گزارش شده است. به این ترتیب، میزان هتروزیگوسیتی محاسبه شده در مطالعه حاضر (۰/۷۹) در گلابی منطقی می‌باشد.

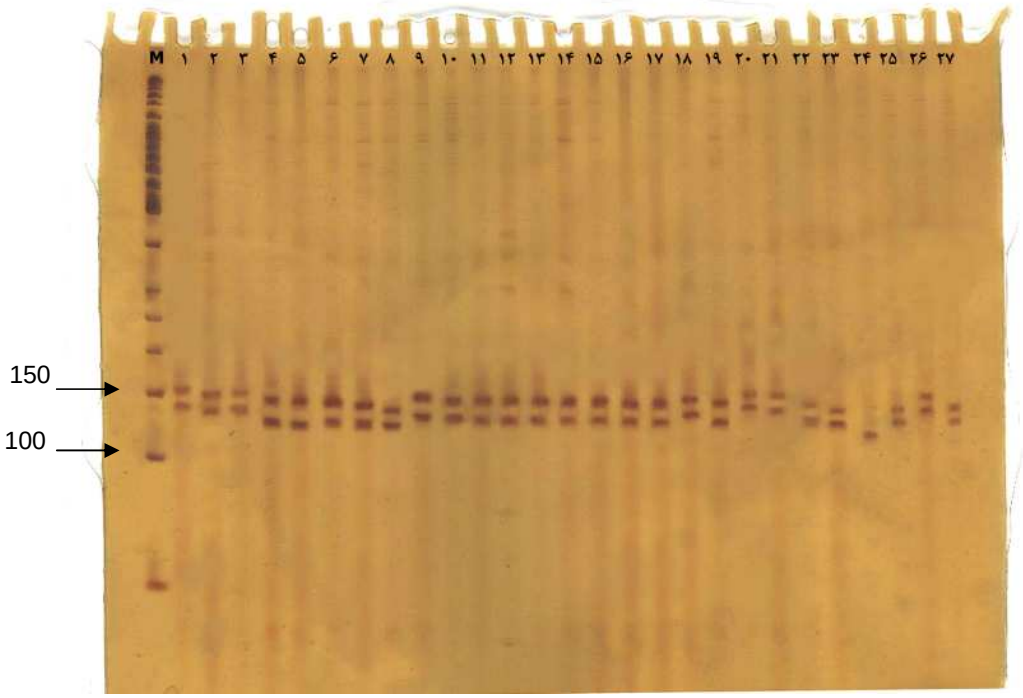

Fig. 2. Electrophoretic patterns of pear genotypes amplified with microsatellite CHO3CO2.
M: 50 bp DNA Ladder. 1. ‘Sardrood’, 2. ‘SK13’, 3. ‘SK10’, 4. ‘Coscia’, 5. ‘Conference’, 6. ‘Bartlett’, 7. ‘Red Bartlett’, 8. ‘Passe Crassane’, 9. ‘Doyenneducomice’, 10. ‘Harrow Sweet’, 11. ‘Duchesse’, 12. ‘Abate Fetel’, 13. ‘Palestine’, 14. ‘Beurre Bosc’, 15. ‘Beurre Giffard’, 16. ‘Anjou’, 17. ‘Louise Bonne’, 18. ‘Sardrood’, 19. ‘Mohammad Ali’, 20. ‘KoliKhuj’, 21. ‘Daregazi’, 22. ‘Khuj Labtorsh’, 23. ‘Dom Kaj’, 24. ‘Sebri’, 25. ‘Shah Miveh’, 26. ‘Khuj Katesar’ and 27. ‘Khuj Mordab Anzali’.

شکل۲- الگوی تکثیر DNA در رقم های مختلف گلابی با استفاده از جفت آغازگر ریز ماهواره CHO3C02.

M: نشانگر اندازه ۵۰، ۱- ۱- ‘اسپادونا’، ۲- ‘SK13’، ۳- ‘SK10’، ۴- ‘کوشیا’، ۵- ‘کنفرنس’، ۶- ‘بارتلت’، ۷- ‘ردبارتلت’، ۸- ‘پاس کراسان’، ۹- ‘دوین دوکومیس’، ۱۰- ‘هاروسویت’، ۱۱- ‘دوشس’، ۱۲- ‘آبت‌فتال’، ۱۳- ‘فلسطینی’، ۱۴- ‘بوره بوسک’، ۱۵- ‘بوره ژیفارد’، ۱۶-‘آنجو’، ۱۷- ‘لوئیس بن’، ۱۸- ‘سردرودی’، ۱۹- ‘محمدعلی’، ۲۰- ‘کولی خوج’، ۲۱- ‘دره‌گزی’، ۲۲- ‘خوج لب ترش’، ۲۳- ‘دم کج’، ۲۴- ‘سبری’، ۲۵- ‘شاه‌میوه’، ۲۶- ‘خوج کته سر’ و ۲۷- ‘خوج مرداب انزلی’.

در این پژوهش میانگین محاسبه اطلاعات چند شکلی ریزماهواره ها (PIC)، ۰/۶ بود. بالاترین PIC (۰/۷۹) در جایگاه Gd142 (با ۸ آلل) و پایین ترین PIC (صفر) در نشانگر CHO2B07، که فقط یک آلل تولید کرده بود، مشاهده شد. با افزایش هتروزیگوسیتی، PIC هم افزایش می‌یابد (۱۴). در تجزیه و تحلیل اطلاعات به دست آمده، میانگین تعداد آلل های تولید شده در رقم های ایرانی زیادتر از رقم های خارجی بود. این نتایج نشان می دهد که به احتمال رقم های ایرانی به دلیل این که در برنامه های بهنژادی و گزینش قرار نگرفته اند، زمینه ژنتیکی متنوع‌تری دارند و می‌توان از آن ها برای انتخاب نژادگان های متنوع به منظور تولید رقم های جدید استفاده کرد.

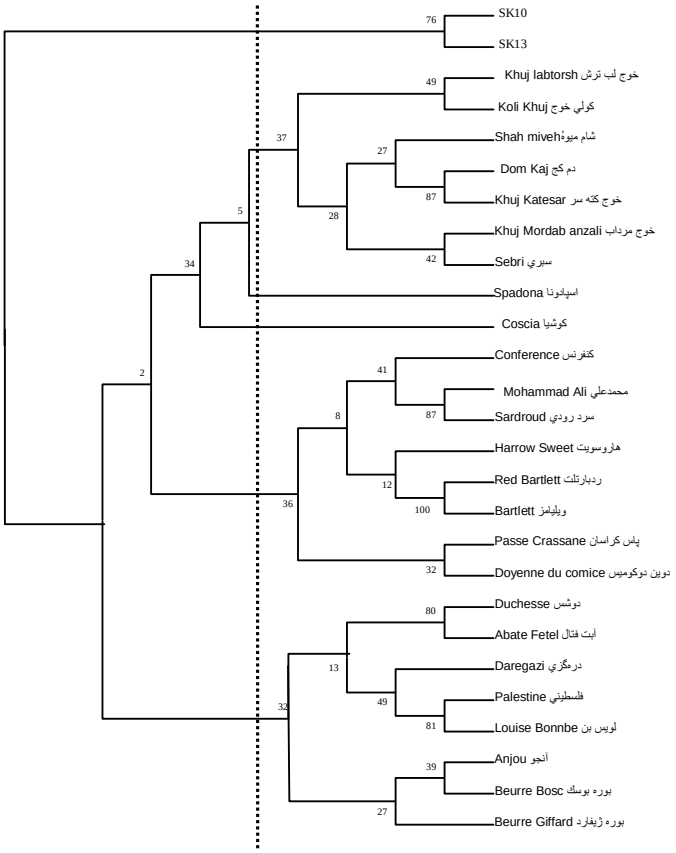

Fig. 3. Phylogenetic dendrogram of 27 pear genotypes constructed using data from 19 polymorphic SSr markers. The phenogram was produced using the UPGMA method of Nei's genetic identity between cultivars.

شکل ۳- دندروگرام ۲۷ نژادگان گلابی بر اساس اطلاعات الگو های باندی ۱۹ نشانگر چندشکلی ریزماهواره، با استفاده از ضریب تشابه نی (۱۹۸۳) و روش UPGMA و Bootstrap consensus tree.

برای تعیین روابط ژنتیکی رقم های گلابی مورد بررسی، براساس اطلاعات به دست آمده از نشانگر SSR و با استفاده از ضریب تشابه نی (۲۶) و روش UPGMA (شکل۲) دندروگرام مربوطه ترسیم گردید. بر اساس این

دندروگرام، رقم های گلابی به چهار دسته و دو نژادگان مستقل تقسیم شدند. در گروه اول 'SK10'و'SK13'، در گروه دوم 'خوج لب ترش'، 'کولی خوج'، 'شاه‌میوه'، 'دم‌کج'، 'خوج کته‌سر'، 'خوج مرداب انزلی' و 'سبری'، در گروه سوم 'کنفرنس'، 'هاروسویت'، 'بارتلت'، 'ردبارتلت'، 'پاس‌کراسان'، 'دوین دوکومیس'، 'محمدعلی' و 'سردرودی' و در گروه چهارم 'دوشس'، 'آبت فتال'، 'دره‌گزی'، 'فلسطینی'، 'لوئیس بن'، 'آنجو'، 'بوره‌ژیفارد' و 'بوره‌بوسک' قرار گرفتند. دو رقم 'اسپادونا ' و 'کوشیا ' به صورت جدا از هم و مستقل از بقیه گلابی‌ها دسته بندی شدند.

درگروه اول دو نژادگان SK10 و SK13 متعلق به گونه *P. pyrifolia* (گلابی های آسیایی) قرار داشتند که به صورت آشکاری از نژادگان های گلابی اروپایی که در بین گروه‌های دیگر تقسیم شده بودند، متمایز شدند. کم بودن فاصله ژنتیکی دو رقم SKl0 و SKl3 (۰/۱۸) در این پژوهش به تقویت این نظریه کمک می‌کند که این دو نژادگان نیز مانند نژادگان‌های دیگر آسیایی رابطه ژنتیکی بسیار نزدیکی با هم دارند (۳۵).

در گروه دوم همه رقم های گلابی ایرانی شامل چهار رقم وحشی ('کولی خوج'،'خوج لب ترش'، 'خوج کته سر' و'خوج مرداب انزلی') و سه رقم تجاری داخلی ('دم کج'، 'سبری ' و 'شاه میوه') قرار گرفتند. دو رقم وحشی 'خوج لب ترش' و 'کولی خوج' نسبت به سایر رقم های ایرانی این دسته فاصله ژنتیکی بیشتری داشتند. ویژگی های مورفولوژیکی این دو رقم نیز تا حدودی از سایر خوج‌ها متفاوت می‌باشد و ویژگی‌های وحشی بودن خود را بیشتر حفظ کرده‌اند (۲) و شاید به همین سبب این نژادگان ها از سایر رقم های این دسته فاصله گرفته‌اند. قرار گرفتن رقم 'سبری' در گروه 'خوج ها'، موید عدم ارتباط خویشاوندی این رقم با رقم های گلابی آسیایی است.

دسته سوم شامل رقم هایی از غرب اروپا ('کنفرنس' و 'بارتلت' از انگلستان و 'پاس کراسان' و 'دوین دو کومیس' از فرانسه) و دو رقم ایرانی 'محمد علی' و 'سرد رودی' بودند. 'ردبارتلت' یا 'ماکس ردبارتلت'[۱] یک جوانه غیر عادی از رقم 'بارتلت' است که در اثر پدیده جهش حاصل شده است و به خاطر رنگ قرمز خاص مورد توجه می باشد (۳۶). الگوی تکثیر تمام آغازگرهای SSR مطالعه شده در این پژوهش برای رقم 'بارتلت' و جهش یافته آن یعنی رقم 'ردبارتلت' به طور دقیق یکسان بود. خویشاوندی بسیار زیاد و مورد انتظار این دو رقم با فاصله ژنتیکی صفر به عنوان یک آزمون برای درخت ژنتیکی ترسیم شده در این پژوهش محسوب می‌شود که صحت دندروگرام ترسیم شده را ثابت می‌کند، در حالی که در بعضی بررسی های قبلی، عدم توانایی نشانگر SSR در جدا سازی رقم های جهش یافته گلابی از رقم منشأ، گزارش شده است (۲۱، ۳۴، ۳۶). قرارگیری رقم 'هاروسویت' در کنار 'بارتلت' نیز منطقی به نظر می‌رسد. به سبب اینکه رقم 'هاروسویت' یک نژادگان آمریکایی مشتق شده از تلاقی Bartlett x Purduet می‌باشد بنابراین در نصف ژنوم خود با 'بارتلت' و 'ردبارتلت' مشترک است (۲۹)، بنابراین انتظار می‌رود در همه مکان‌های ریزماهواره بررسی شده، 'هاروسویت' و 'بارتلت' دستکم یک آلل مشترک داشته باشند.

در پژوهش های قبلی با استفاده از آغازگرهای RAPD رابطه ژنتیکی نزدیک سه رقم 'پاس‌کراسان '، 'بارتلت' و 'کنفرنس' (۳۰) و همچنین دو رقم 'پاس‌کراسان' و 'دوین دوکومیس' (۲۷) که هر دو فرانسوی هستند مشخص شده بود. نتایج پژوهش حاضر نیز رابطه ژنتیکی نزدیک رقم های 'کنفرنس'، 'هاروسویت' و 'بارتلت' و

۱- Max Redbartlett

همچنین 'پاس کراسان' و 'دوین دوکومیس' را نشان می‌دهد. چون دو رقم 'محمدعلی' و 'سردرودی' نیز در این دسته قرار گرفتند، به نظر می‌رسد رقم های مزبور با رقم های اروپایی نزدیکی قابل ملاحظه‌ای داشته باشند.

دسته چهارم شامل رقم های 'گلابی فرانسوی' و رقم ایرانی 'دره‌گزی' بود. قرارگیری رقم های فرانسوی در یک دسته نشان می‌دهد دندروگرام حاصل توانسته است رقم های را بر اساس منشأ جغرافیایی آن ها تقسیم‌بندی کند. اگر چنین فرضیه ای صحت داشته باشد، حضور رقم دره‌گزی در این دسته نشان دهنده رابطه خویشاوندی نزدیک این رقم با رقم های فرانسوی است. ویژگی های مورفولوژیکی مانند اندازه بزرگ میوه‌های این رقم نیز نشان می‌دهد که به احتمال زیاد رقم 'دره گزی' منشأ متفاوتی از 'خوج‌ها ' دارد و شاید با رقم های فرانسوی اجداد مشترکی داشته باشد. در مطالعه ای که با استفاده از ریزماهواره‌های سیب، تنوع ژنتیکی رقم های گلابی بررسی شده بود، رقم های قدیمی فرانسوی در یک دسته مستقل قرار گرفتند که رقم های 'لوئیس بن' و 'بوره ژیفارد' رابطه ژنتیکی نزدیکی نشان دادند (۳۴). دو نژادگان ایتالیایی 'اسپادونا' و 'کوشیا' به صورت دو نژادگان مستقل قرار گرفتند که منشأ متفاوت این دو رقم از سایر رقم های را اثبات می‌کند.

یکی از اهداف این پژوهش، تعیین موقعیت گلابی 'سبری' در میان رقم های خارجی و ایرانی و تعیین شناسنامه ژنتیکی این رقم تجاری گلابی بود. برخی به دلیل شباهت های مورفولوژیکی، رقم 'سبری' را جزو رقم های گلابی‌های آسیایی دانسته اند و بیان کرده اند این رقم متعلق به گونه *P. pyrifolia* است (۴). برای روشن شدن موضوع، در بین رقم های مورد بررسی در این پژوهش، دو رقم ژاپنی 'SKl0' و 'SKl3' متعلق به گونه *P. pyrifolia* نیز قرار داده شدند تا از طریق مقایسه با این رقم های که منشأ مشخصی دارند، ابزاری برای ارزیابی موقعیت نامشخص رقم 'سبری' فراهم شود. برخلاف اطلاعات پیشین (۴)، نتایج الگوهای SSR حاصل از این پژوهش به وضوح رابطه ژنتیکی نزدیک رقم 'سبری' را با رقم های *P. communis* و رقم 'خوج مرداب انزلی' در دسته رقم های ایرانی و غیرمرتبط بودن آن را با رقم های *P. pyrifolia* نشان داد. در تقسیم بندی جهانی گلابی بر اساس پراکنش جغرافیایی، چین، ژاپن، کره و تایوان مناطقی هستند که رقم های *P. pyrifolia* در آن ها قرار دارند و در مناطق دیگر کمتر گزارش شده اند (۹). ثابتی منشأ بیشتر رقم های گلابی بومی ایران را از نژادگان خوج می داند (۱). با توجه به عدم پراکنش گونه *P. pyrifolia* در ایران و نیز براساس نتایج این پژوهش که نژادگان سبری در دسته خوج‌ها قرار گرفت، شاید بتوان گفت منشأ رقم 'سبری'، خوج باشد. مقایسه مورفولوژی میوه و برگ این رقم با نژادگان های خوج کردستان به وضوح بیانگر احتمال گزینش این رقم از این مناطق می باشد. رقم های تجاری شاه میوه، دم‌کج و سبری که بیشتر در مرکز ایران پراکنده اند، از نظر مورفولوژیکی (به عنوان مثال اندازه میوه‌ها) شباهت زیادی با رقم های وحشی 'خوج' دارند. به نظر می‌رسد این گلابی‌ها از 'خوج ها' منشأ گرفته اند و بعدا طی زمان به صورت متفاوتی تکامل یافته‌اند (۲).

نتایج این پژوهش نشان داد که سه رقم 'محمدعلی'، 'سردرودی' و 'دره گزی' از رقم های ایرانی فاصله داشته و در میان رقم های اروپایی قرار دارند. این سه رقم از نظر ظاهری نیز کاملا متفاوت از 'خوج ها' هستند. رقم 'سردرودی' منشأ آذربایجانی دارد در حالی که مبدأ مشخصی برای رقم 'محمدعلی' وجود ندارد. از آنجا که در دندروگرام رسم شده این دو رقم کنار هم قرار گرفته‌اند می توان این احتمال را داد که هر دو مبدأ مشترکی داشته باشند. چون برخی رقم های از گونه *P. communis* در زمان نامشخصی از نواحی قفقاز (گرجستان، ارمنستان و جمهوری آذربایجان) وارد ایران شده اند (۴)، شاید 'محمدعلی' و 'سردرودی' از این رقم های منشأ گرفته باشند. برخی منابع رقم 'محمدعلی' را یک جهش یافته از 'دوشس' می‌دانند (۴). گرچه رقم 'محمدعلی' به رقم های فرانسوی نزدیک است و به احتمال زیاد با آنها منشأ یکسانی دارد، اما نتایج این پژوهش چنین

فرضیه ای را تأیید نمی‌کند. به سبب این که فاصله ژنتیکی بین دو رقم محمدعلی و 'دوشس' خیلی بیشتر از مقدار فاصله‌ای است که جهش خوانده شود، بنابراین رقم 'محمدعلی' نمی‌تواند جهش یافته رقم 'دوشس' باشد.

به طور کلی، نتایج حاصل ازاین پژوهش نشان داد نشانگر SSR یک روش بسیار مناسب برای مطالعات تنوع ژنتیکی و شناسایی نژادگان‌های مختلف گلابی می‌باشد و می‌توان از آن در تعیین شجره رقم های بومی و منشأ پیدایش آن ها استفاده نمود.

REFERENCES منابع

۱. ثابتی، ح.، ۱۳۵۵. جنگل ها، درختان و درختچه های ایران، انتشارات تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی تهران.

۲. عبدالهی، ح.، ۱۳۸۶. مروری بر وضعیت کشت و کار گلابی در ایران، نشریه فنی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر. انتشارات وزارت جهاد کشاورزی.

۳. عطار، ع.، ۱۳۸۰. مشخصات رقم های سیب و گلابی تجاری اروپا و آمریکا، نشر آموزش کشاورزی.

۴. منیعی، ع.، ۱۳۷۳. گلابی و به و پرورش آنها، انتشارات فنی ایران. تهران.

5. Bassam, B.J., G. Caetano-Anolles and P.M. Greesshoff. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA inpolyacrylamide gels. Anal. Biochem. 19: 680-683.
6. Bassil, N.V., C. Neou and J. Postman. 2005. EST-SSR utility in managing the pear collection at the national germplasm repository. Plant and Animal Genome XIII Conference, San Diego, CA. U.S.A. 134.
7. Bassil, N.V., J.D. Postman and C.Neou. 2004. *Pyrus* microsatellite markers from genbank sequences. Acta. Hort. 671:42.
8. Bassil, N.V., K.E. Hummer and J.D. Postman. 2006. Microsatellites are used to examine apple and pear identities and genetic relationships. HortScience 41:993.
9. Bell, R.L. 1990. Pears (*Pyrus*). In: J.N. Moore and J.R. Ballington, (eds), Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops. Int. Soc. Hort. Sci., Wageningen, the Netherland. 665-697.
10. Bell, R.L. and L.F. Hough. 1986. Interspecific hybridization of *Pyrus*. HortScience 21:62-64.
11. Chevreau, E., S. Leuliette and M. Gallet. 1997. Inheritance and linkage of isozyme loci in pear (*Pyrus communis* L.). Theor. Appl. Genet. 94: 498-506.
12. Chunli, Y., A.B. Korol, T. Fahima, A. Beiles and E. Nero. 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanism. Mol. Ecol. 11:2453-2465.
13. Dolatowski, J., J. Nowosielski, W. Podyma, M. Szymanska and M. Zych. 2004. Molecular studies on the variability of polish semi-wild pears *(Pyrus*) using AFLP. Fruit Ornam. Plant Res. 12:22-26.
14. Eujayl, I., M.K. Sledge, L. Wang, G.D. May, K. Chekhovskiy, J.C. Zwonitzer and M.A.R. Mian. 2003. *Medicago truncetula* EST-SSRs reveal cross-species gentic markers for *Medicago* spp. Theor. Appl. Genet. 108:414-422.
15. Fernández-Fernandez, F., N.G. Harvey and C.M. James. 2006. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers from European pear (*Pyrus communis*). Mol. Ecol. Notes 6: 1036-1041.
16. Goulão, L. and C.M. Oliveira. 2001. Molecular characterization of cultivars of apple (*Malus domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. Euphytica 122:81-89.

17. Guilford, P., S. Prakash, J.M. Zhu, E. Rikkerink, S. Gardiner, H. Bassett and R. Forster. 1996. Microsatellites in *Malus* × *domestica* (apple): abundance, polymorphism and cultivar identification. Theor. Appl. Genet. 94:249-254.
18. Hemmat, M., N.F. Weeden and S.F. Brown. 2003. Mapping and evaluation of *Malus domestica* microsatellites in apple and pear. J. Am. Soc. Hort. Sci. 128:515-520.
19. Hokanson, S.C., A.K. Szewc-McFadden, W.F. Lamboy and J.R. McFerson. 1998. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus domestica* borkh. Core subset collection. Theor. Appl. Genet. 97:671-683.
20. Inoue, E., Y. Matsuki, H. Anzai and K. Evans. 2007. Isolation and characterization of microsatellite markers in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). Mol. Ecol. Notes 7:445-447.
21. Kimura, T., Y. Ban, T. Yamamoto, Y.Z. Shi. K. Kotobuki, N. Matsuta and T. Hayash. 1999. The japanese pear genome program I. Development of SSR markers and identification of pears. Acta. Hort. 587:237-242.
22. Kimura, T., Y. Zhongshi, M. Shedo, K. Kotobuki, N. Matsuta, T. Hayashi, Y. Ban and T. Yamamoto. 2002. Identification of Asian pear varieties by SSR analysis. Breed. Sci. 25:115-121.
23. Liebhard, R., L. Gianfranceschi, B. Koller, C.D. Ryder, R. Tarchini, E. Van De Weg and C. Gessler. 2002. Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus domestica* Borkh.). Mol Breed. 10:217-241.
24. Monta–Corvo, L., L. Caberita and J. Leitao. 2000. Assessment of genetic relationships among *Pyrus* species and cultivars using AFLP and RAPD markers. Genet. Resour. Crop Evol. 47:257-265.
25. Murray, G.C. and W.F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight DNA. Nucleic Acids Res. 8:4321–4325.
26. Nei, M. and N. Takezaki. 1004. Estimation of genetic distances and phylogenetic trees from DNA analysis. 5th World Cong. Genet. Appl. Livstock Prod. 21:405-412.
27. Olivera, C. M., M. Mota, L. Monte-Corvo, L. Goulão and D.M. Silva. 1999. Molecular typing of *Pyrus* based on RAPD markers. Sci. Hort. 79:163-174.
28. Pewell, W., G.C. Machray and J. Provan. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Trends in Plant Sci. 1:215-222.
29. Pierantoni, L., K.H. Cho, I.S. Shin, R. Chiodini, S. Tartarini, L. Dondini, S. J. Kang and S. Sansavini. 2004. Characterisation and transferability of apple SSRs to two European pear F1 populations. Theor. Appl. Genet. 109:1519-1524.
30. Schiliro, E., S. Predieri and A. Bertaccini. 2001. Use of random amplified polymorphic DNA analysis to detect genetic variation in *Pyrus* species. Plant Mol. Biol. Rep. 19:271a-h.
31. Sharifani, M.M. and J.F. Jackson. 2000. Characterization of pear species and cultivars using RAPD primers. Acta. Hort. 538:499-504.
32. Van Dyk, M.M., G. Koning, Z. Simayi, S. Booi, R. Maharaj, M. C. Selala and D.J.G. Rees. 2005. Development of microsatellite markers in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Naki.). Mol. Ecol. Notes 7:445-447.
33. Wang, J.Y. and J.C. Shih. 2004. Molecular for fingerprinting cultivar of oriental pear (*Pyrus pyrifolia).* Sci. Hort. 107:441-421.
34. Wünsch, A. and J.I. Hormaza. 2007. Characterization of variability and genetic similarity of European pear using microsatellite loci developed in apple. Sci. Hort. 113:37-43.
35. Yamamoto, T., T. Kimuru, Y. Sawamura, T. Manabe, K. Kotobuki, T. Hayashi .Y. Ban and N. Mastuta. 2002. Simple sequence repeats for genetic analysis in pear. Euphytica 124:129-137.

36. Yamamoto, T., T. Kimura, Y. Sawamura, Y. Ban, T. Aayashi and N. Matsuta. 2001. SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. Theor. Appl. Genet. 102:865-870.