تنوع ژنتیکی سیب شرقی (*Malus Orientalis* Uglitz.) جنگل هیرکانی ایران، با استفاده از نشانگر ISSR-PCR

علی خدادوست[۱]، حامد یوسف‌زاده[۲*]، نرجس امیرچخماقی[۱]، حمید عبدالهی[۳] و اباصلت حسین زاده کلاگر[۴]

[۱] نور، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی، گروه جنگل شناسی و اکولوژی جنگل

[۲] تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی، گروه محیط زیست-تنوع زیستی

[۳] کرج، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری

[۴] بابلسر، دانشگاه مازندران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی

تاریخ دریافت: ۹۵/۱/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۵/۳۱

چکیده

سیب شرقی (*Malus orientalis*) دارای پراکنش وسیع در سرتاسر جنگل هیرکانی از مناطق پایین‌بند تا نواحی کوهستانی و شیب‌دار می‌باشد. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی، نمونه های برگ ۱۰۴ پایه از چهارده رویشگاه جنگلهای هیرکانی جمع آوری شدند. پس از استخراج DNA ژنومی، چند شکلی DNA های تکثیر شده با استفاده از ۴ آغازگر $(GA)_8YC$، $(AC)_8YA$، $(AG)_8AT$ و $(AC)_8G$ به روش ISSR-PCR بررسی گردید. این مطالعه نشان داد کل آللهای تکثیر شده برای ۴ آغازگر، برابر ۳۸۵ آلل با میانگین هتروزیگوسیتی ۰/۰۴۹ است. به طوری که بیشترین میزان هتروزیگوسیتی در جمعیت کدیر و لمزر (۰/۰۵۹) و کمترین میزان آن نیز مربوط به جمعیت افراتخته (۰/۰۳۱) در شرق استان گلستان است. بر اساس شاخص شباهت ژنتیکی Nei بیشترین فاصله ژنتیکی مربوط به جمعیتهای سیاه‌بیل و ماسال و کمترین آن مربوط به جمعیتهای یوش، افراتخته و دینکوه از یکدیگر بود. آنالیز واریانس مولکولی تنوع درون جمعیتها و بین جمعیتی، را به ترتیب ۹۴ درصد و ۶ درصد از کل تنوع نشان داد، که بیانگر تنوع درون جمعیتی قابل ملاحظه در جمعیتهای این گونه است. این تحقیق نشان داد علی رغم شرایط رویشگاهی متفاوت و فاصله جغرافیایی زیاد جمعیتها از یکدیگر، سطح تمایز ژنتیکی بین جمعیتهای مورد مطالعه (به استثنای جمعیت جلگه‌ای سیاه بیل) پایین و هتروزیگوسیتی درون جمعیتها بسیار مشابه با یکدیگر است. این مسئله می تواند حاکی از سطح بالای برقراری جریان ژن و تبادل ژنتیکی بین جمعیتهای سیب جنگلی شمال ایران باشد.

واژه های کلیدی: جنگلهای هیرکانی، تنوع ژنتیکی، سیب وحشی، نشانگرISSR .

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۱۱۴۴۵۲۳۱۰۱؛ پست الکترونیکی: h.yousfzadeh@modares.ac.ir

مقدمه

تأمین مواد غذایی به عنوان یکی از چالشهای اساسی پیش رو بشر در طی دهه‌های اخیر، بازگشت به ذخایر ژنتیکی وحشی و به کارگیری آنها در عملیات به نژادی را، به دلیل داشتن ژنهای مفید و مقاوم به عوامل نامساعد طبیعی، اجتناب ناپذیر نموده است. سیب شرقی (*Malus orientalis*)، که به سیب جنگلی نیز معروف است، در نواحی جنگلی کوهستانی و شیب‌دار در ترکیه، ایران، منطقه قفقاز و روسیه پراکنش دارد و بر اساس مستندات تاریخی و ژنتیکی ایران نقش مهمی را در معرفی این گونه از شرق آسیا به یونان و رم

باستان ایفاء می‌کند (۱۴). این گونه با گسترش وسیع در نواحی کوهستانی، جنگلها، درختچه‌زارها و صخره‌های شیب‌دار، منبع مهم اقتصادی، دارویی، غذایی و نوشیدنی در این نواحی به شمار می‌رفت. امروزه نیز سیب به دلیل دارا بودن انواع متابولیتهای پلی‌فنولی مانند دی هیدروکالون‌ها از ارزش دارویی بالایی برخوردار است (۱۸). اگرچه تاکنون گزارشی از وضعیت رویشگاهی و تنوع ژنتیکی سیب جنگلی در ایران موجود نیست ولیکن به نظر می‌رسد هم‌راستا با تخریب گسترده جنگل هیرکانی به ویژه در سه دهه اخیر، بسیاری از رویشگاههای سیب نیز مورد تخریب قرار گرفته است. بنابراین بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین ارتباط بین جمعیتهای مختلف این گونه، به عنوان یکی از گامهای پایه‌ای و اساسی کمک می‌نماید تا بتوان راهکارهای مدیریتی مناسب و صحیح‌تری را برای حفظ ژرم‌پلاسم این گونه ارزشمند جنگلی- باغی اتخاذ نمود. بدین منظور محققین انواع گوناگونی از نشانگرهای ریختی، بیوشیمیایی و مولکولی را مورد استفاده قرار می‌دهند. از آنجایی که روشهای سنتی تعیین تنوع ژنتیکی گیاهان بر اساس ویژگیهای مرتبط با خصوصیات ظاهری، فنولوژی و کاشت آن گونه است که به شدت تحت تأثیر شرایط محیطی می‌باشند و از سوی دیگر این روشها محدود و در بسیاری از موارد قادر به شناسایی پایه‌های نزدیک و با تشابهات بیشتر نیستند (۱۹). لذا استفاده از نشانگرهای مولکولی ابزاری مناسب در تعیین خصوصیات ژنتیکی ژرم پلاسم گونه‌ها بر اساس تشابهات ژنتیکی به شمار می‌رود (۲).

تاکنون مطالعات متعددی با استفاده از نشانگرهای مولکولی مانند؛ RFLP (۱۳)، AFLP (۱۵)، RAPD (۸، ۲۰ و ۲۵)، SCARs (۲۸) و SSR (۱۲، ۱۶ و ۲۶) برای بررسی تنوع ژنتیکی سیب انجام شد. در بین نشانگرهای مختلف، نشانگر بین ریز ماهواره‌ای یا همان ISSR (Inter-simple sequence repeat) روشی است که به دانش اولیه در مورد ژنوم، کلون‌سازی و یا طراحی پرایمر اخصاصی نیازی ندارد (۱۶ و ۲۹). چرا که اساس این روش تکثیر قطعاتی است که بین توالی تکراری SSR (Simple Sequence Repeat) یا همان میکروساتلیتی وجود دارند می باشد. از طرفی چون توالیهای تکراری ۲-۶ بازی SSR هم در نواحی اینترون و هم درون نواحی کدکننده یک ژن می‌توانند حضور داشته باشند (۲۹)، در ISSR-PCR از آغازگرهایی استفاده می شود که تا سه نوکلئوتید روی توالی SSR در یک انتها مکمل شوند. این نشانگر استفاده زیادی در مطالعه موجودات یوکاریوتی با تکثیر قطعات SSR مجاور و یا معکوس دارد (۲۹) و کاربردهای زیادی از این نشانگر نیز در مطالعات تنوع ژنتیکی گیاهان گونه‌های درختی گزارش شد (۱).

تنوع ژنتیکی ۲۴ رقم گلابی با نشانگر ISSR توسط Monte-Corvo و همکاران در سال ۲۰۰۱ مورد بررسی قرار گرفت. میزان چندشکلی DNA در این مطالعه ۷۹/۵۰ درصد به دست آمد (۲۳). در مطالعه‌ای دیگر توسط Goulão و همکاران در سال ۲۰۰۱ میزان تشابه ۴۱ رقم تجاری سیب با استفاده از مارکرهای SSR و ISSR ارزیابی شد. دامنه تشابه بین ارقام بین ۰/۲۰ تا ۰/۷۸ برای نشانگر SSR و ۰/۹۲-۰/۷۱ برای نشانگر ISSR تعیین شد (۱۶). همچنین Farrokhi و همکاران در سال۲۰۱۱ با ارزیابی تنوع ژنتیکی در بین ارقام سیب خوراکی (*M. domestica*) با نشانگر SSR، میزان تشابه در بین ارقام را ۰/۱۹ تا ۰/۷۹ گزارش کردند (۱۲).

علی رغم عدم وجود اطلاعات دقیق از تنوع ژنتیکی سیب جنگلی در شمال ایران، با توجه به حضور نسبتاً گسترده آن در این مناطق و شرایط اقلیمی، توپوگرافی و ادافیکی متفاوت، انتظار می‌رود این گونه دارای تنوع ژنتیکی بالایی در این ناحیه باشد. از این رو ضرورت

انجام پژوهشی در راستای شناسایی مناسب و تیپ‌بندی ژرم‌پلاسم سیب برای اتخاذ تصمیم‌گیریهای مدیریتی، به ویژه در شمال ایران با شدت تخریب بالا آشکار می‌گردد. از آنجایی که تا کنون هیچ مطالعه‌ای مبنی بر ارزیابی تنوع ژنتیکی سیب جنگلی هیرکانی با نشانگر ISSR گزارش نشده است، هدف اصلی از این تحقیق، بررسی تنوع ژنتیکی و تعیین ساختار جمعیتی سیب جنگلهای هیرکانی در طول گرادیان جغرافیایی و ارتفاعی پراکنش این گونه است.

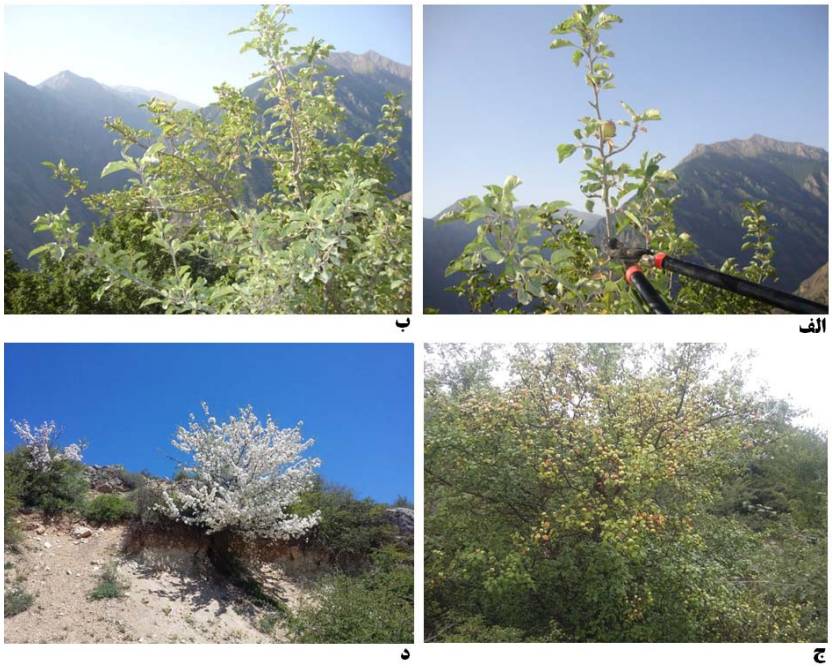
مواد و روشها

انتخاب رویشگاه و نمونه برداری: با در نظر گرفتن تغییرات خصوصیات بوم‌شناختی عرصه‌های مورد انتشار این گونه در سطح جنگلهای شمال، نمونه‌برداری از این گونه در چهارده رویشگاه در چهار ناحیه طول جغرافیایی جنگلهای هیرکانی شامل: گیلان، (جمعیتهای اسالم، ماسال، سیاه بیل) مازندران، (جمعیتهای کدیر، دینکوه، دلیر، دوهزار، جواهرده، کردکوی، لمزر، لز و یوش) و گلستان، (جمعیت های افراتخته، کردکوی) می باشد، انجام شد (جدول ۱). سپس از هر رویشگاه بسته به فراوانی حضور درخت سیب تا ۱۰ درخت با فاصله حداقل ۱۰۰ متر (در صورت امکان) از یکدیگر به روش Miles و همکاران (۲۲)، انتخاب و نمونه برگ تهیه شد (شکل ۱).

استخراج DNA و تکثیر ISSR: استخراج DNA از بافت برگ نمونه‌ها با استفاده از روش موری و تامسون (۲۴) انجام شد. برای تکثیر نواحی مورد نظر ۴ آغازگر بین ریز ماهواره‌ای شامل؛ $(GA)_8YC$، $(AC)_8YA$، $(AG)_8AT$ و (AC)8 G استفاده شد.

جدول ۱- مختصات جغرافیایی جمعیت‌های نمونه‌برداری شده سیب شرقی (*Malus orientalis*)

ناحیه هیرکانی	نام رویشگاه (جمعیت)	کد اختصار	عرض جغرافیایی (شمالی)	طول جغرافیایی (شرقی)	ارتفاع از سطح دریا (متر)
استان گیلان	اسالم	As	۳۷°۳۷'۳۴"	۴۸°۴۶'۳۶"	۱۸۲۴
	سیاه بیل	Si	۳۷°۳۸'۵۹"	۴۸°۵۸'۵۹"	۵۰
	ماسال	Ma	۳۷°۱۸'۰۹"	۴۸°۵۹'۲۷"	۹۰۰-۸۰۰
استان مازندران	آلاشت	Al	۳۶°۰۴'۴۵"	۵۲°۵۱'۰۳"	۱۸۵۰-۲۰۰۰
	کدیر	Co	۳۶°۲۶'۲۱"	۵۱°۵۳'۰۳"	۸۰۰-۱۶۰۰
	دینکوه	D	۳۶°۲۰'۲۶"	۵۱°۵۳'۲۷"	۱۸۰۰-۲۰۰۰
	دلیر	Da	۳۶°۱۸'۵۳"	۵۱°۱۰'۰۱"	۱۸۰۰-۲۰۰۰
	دوهزار	Do	۳۶°۳۶'۳۹"	۵۰°۴۳'۵۷"	۱۲۲۹
	جواهرده	Ja	۳۶°۵۱'۰۸"	۵۰°۲۸'۳۷"	۱۷۳۰
	لمزر	Le	۳۶°۰۳'۵۸"	۵۳°۰۸'۳۱"	۱۲۴۰-۱۳۵۰
	لز	Ua	۳۶°۱۸'۵۳"	۵۱°۴۸'۵۳"	۲۳۵۰
	یوش	Ub	۳۶°۱۸'۵۷"	۵۱°۱۸'۵۷'	۱۷۰۰-۱۹۰۰
استان گلستان	افراتخته	Af	۳۶°۴۷'۲۱"	۵۴°۵۸'۱۰"	۱۴۷۰
	کردکوی	K	۳۶°۳۱'۳۳"	۵۳°۵۹'۴۱"	۲۰۳۰



شکل ۱- برخی از درختان نمونه‌برداری شدهسیب شرقی در مراحل مختلف رویشی و زایشی آن (الف و ب: درخت مورد نمونه برداری در رویشگاه دلیر؛ ج: درخت سیب با میوه در رویشگاه دینکوه؛ د: درخت سیب با گل در رویشگاه کدیر)

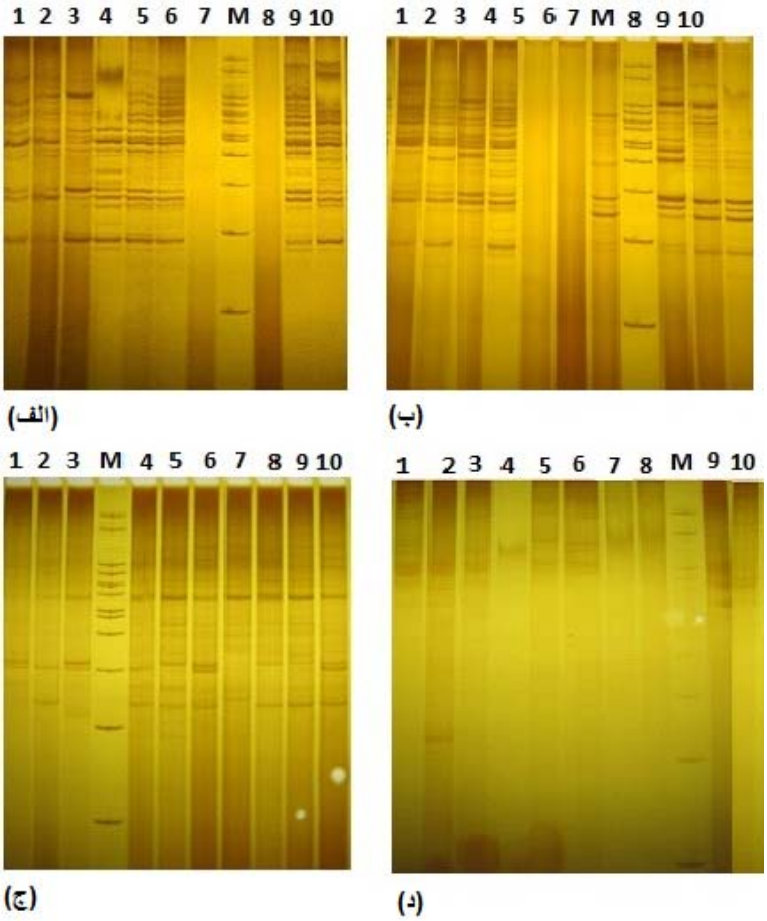
این آغازگرها بر اساس نتایج موفق محققان روی سایر گیاهان چوبی انتخاب شدند (۱۰، ۱۱ و ۲۷). بدین منظور مواد مورد نیاز به حجم ۱۵ میکرولیتر شامل: ۵ میکرولیتر مستر میکس شرکت بایونیر (با نام تجاری: AccuPower® PCR PreMix)، ۶ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه، ۳ میکرولیتر DNA و ۱ میکرولیتر آغازگر برای انجام واکنش PCR مخلوط شدند. سپس این واکنش در سه مرحله شامل ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به منظور واسرشت اولیه، ۳۰ چرخه با دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، ۵۴ درجه سانتی‌گراد ۴۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد ۲ دقیقه و در نهایت به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از بارگذاری محصول PCR بر روی ژل اکریل آمید شش درصد، رنگ‌آمیزی آن به روش نیترات نقره آمونیاکی (۳) انجام و الگوی نواری باندها مشاهده شد (شکل۲).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: پس از علامت‌گذاری محل باندها، تمامی پایه‌ها بر اساس حضور و عدم حضور هر باند با کد صفر و یک کددهی شدند. با استفاده از نرم افزار GenAlEx ver. 6 شاخص تشابه بر اساس روش Nei به همراه سایر پارامترهای ژنتیکی از قبیل درصد جایگاه چند شکلی، تنوع ژنتیکی کل، سهم تنوع داخل و برون جمعیتی محاسبه شد. جهت نمایش پایه‌های درختی و میزان تمایز آنها از یکدیگر به تفکیک هر جمعیت با استفاده از آنالیز به مؤلفه های اصلی (PCA) انجام شد.

نتایج

تکثیر قطعات بین SRR در ۱۰۴ پایه از ۱۴ جمعیت سیب شرقی، با استفاده از ISSR-PCR و چهار آغازگر انجام شد. نتایج نشان داد اندازه تقریبی این مناطق از کمترین ۱۵۰جفت باز تا بزرگترین ۲۵۰۰ جفت باز در الکتروفورز ژل پلی آکریلامید است (شکل۲). که شامل ۳۸۵ آلل تکثیر شده برای ۴ آغازگر می باشد. آنالیز پارامترهای آماری شامل: میزان تنوع ژنتیکی (He)، شاخص شانون (I)، تعداد آلل مؤثر (Ne) تعداد آللهای

متفاوت (Na) و درصد جایگاه پلی‌مورفیک (Pp) انجام شد (جدول۲).



شکل ۲- الکتروفورز محصولات ISSR-PCR در ژل پلی آکریلامید با رنگ آمیزی نیترات نقره آمونیاکی: نمونه های مربوط به درخت شماره یک تا ۱۰ جمعیت سیاه بیل برای چهار آغازگر مورد مطالعه؛ M نمایانگر مارکر DNA(*Ladder 100bp plus-100*-3000bp. *Cat.* No. *PR911653, CinnaGen Co.*).

نتایج نشان داد بیشترین میزان هتروزیگوسیتی در جمعیت کدیر و لمزر و کمترین میزان آن نیز مربوط به جمعیت افراتخته در شرق استان گلستان است. در این بین جمعیت سیاه بیل علی رغم شرایط رویشگاهی خاص (اندازه کوچک و عدم امکان تبادل ژنتیکی با سایر جمعیتها) از هتروزیگوسیتی نسبتاً مشابه (۰/۰۵۳ =He) با سایر جمعیتها برخوردار بود. بر اساس شاخص شباهت ژنتیکی Nei بیشترین فاصله ژنتیکی مربوط به جمعیتهای سیاه بیل و ماسال و کمترین آن مربوط به جمعیتهای یوش، افراتخته و دینکوه از یکدیگر بود (جدول ۳).

همچنین آنالیز واریانس مولکولی (AMOVA)، تنوع درون جمعیتها و بین جمعیتی مشاهده شده، را به ترتیب ۹۴ درصد و ۶ درصد تنوع کل نشان داد، که بیانگر تنوع درون جمعیتی قابل ملاحظه در جمعیتهای گونه سیب شرقی است (جدول۴). آنالیز تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) به منظور مطالعه میزان تنوع و تمایز جمعیتها، از یکدیگر انجام شد، که تمایز بالای جمعیتهای سیاه بیل و لز (برخی از پایه‌های آن) از سایر جمعیتها با فاصله نسبتاً زیاد را نشان داد (شکل ۳).

جدول ۲- تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های سیب شرقی ناحیه هیرکانی بر اساس نشانگر بین ریز ماهواره‌ای

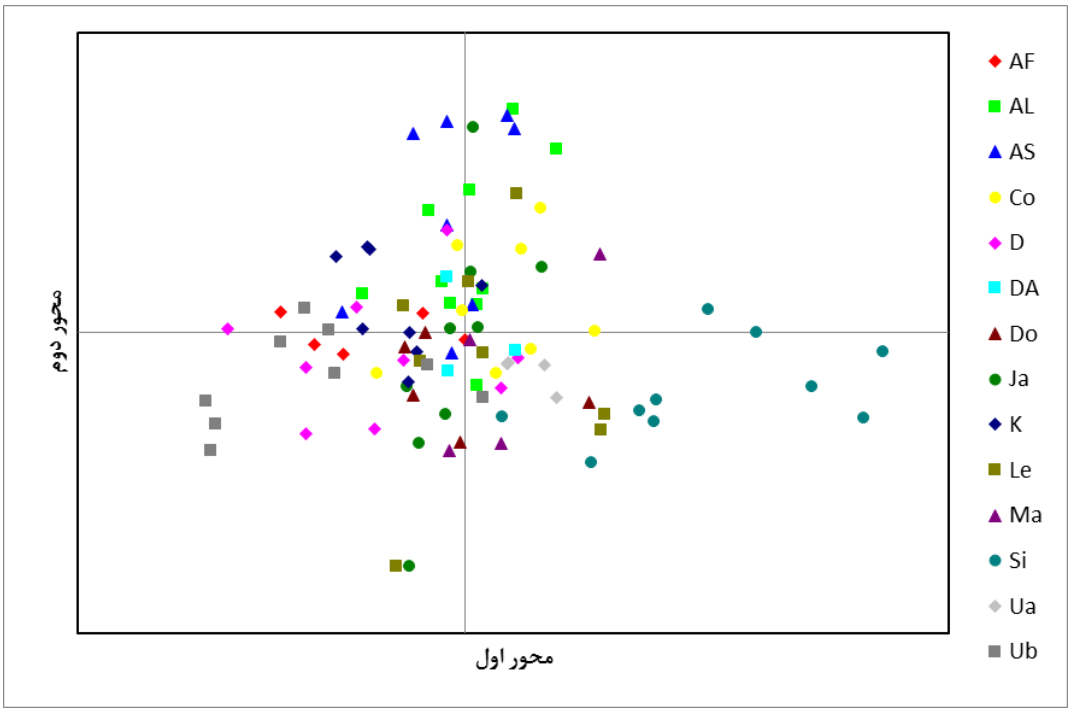
جمعیت	مقادیر	تعداد الل‌های متفاوت (Na)	تعدادالل‌های موثر (Ne)	شاخص (Iشانون)	هتروزیگوسیتی مورد انتظار(He)	درصدجایگاه پلی مورفیک (P%)
افراتخته	میانگین	۰/۲۶۵	۱/۰۴۴	۰/۰۵۲	۰/۰۳۱	۱۳/۲۵
	SM	۰/۰۳۵	۰/۰۰۷	۰/۰۰۷	۰/۰۰۴	
آلاشت	میانگین	۰/۶۶۵	۱/۰۶۸	۰/۰۹۷	۰/۰۵۴	۳۳/۲۵
	SM	۰/۰۴۸	۰/۰۰۶	۰/۰۰۸	۰/۰۰۵	
اسالم	میانگین	۰/۵۸۲	۱/۰۶۵	۰/۰۸۹	۰/۰۵۰	۲۹/۰۹
	SM	۰/۰۴۶	۰/۰۰۷	۰/۰۰۸	۰/۰۰۵	
کدیر	میانگین	۰/۶۳۴	۱/۰۷۷	۰/۱۰۳	۰/۰۵۹	۳۱/۶۹
	SM	۰/۰۴۷	۰/۰۰۷	۰/۰۰۸	۰/۰۰۵	
دینکوه	میانگین	۰/۵۵۶	۱/۰۵۶	۰/۰۸۱	۰/۰۴۴	۲۷/۷۹
	SM	۰/۰۴۶	۰/۰۰۶	۰/۰۰۷	۰/۰۰۴	
دلیر	میانگین	۰/۳۳۲	۱/۰۵۸	۰/۰۶۹	۰/۰۴۲	۱۶/۶۲
	SM	۰/۰۳۸	۰/۰۰۷	۰/۰۰۸	۰/۰۰۵	
دوهزار	میانگین	۰/۴۵۷	۱/۰۶۵	۰/۰۸۵	۰/۰۴۹	۲۲/۸۶
	SM	۰/۰۴۳	۰/۰۰۷	۰/۰۰۸	۰/۰۰۵	
جواهرده	میانگین	۰/۶۶۵	۱/۰۶۷	۰/۰۹۷	۰/۰۵۳	۳۳/۲۵
	SM	۰/۰۴۸	۰/۰۰۶	۰/۰۰۸	۰/۰۰۴	
کردکوی	میانگین	۰/۵۲۵	۱/۰۵۶	۰/۰۷۹	۰/۰۴۴	۲۶/۲۳
	SM	۰/۰۴۵	۰/۰۰۶	۰/۰۰۷	۰/۰۰۴	
لمزر	میانگین	۰/۶۶۰	۱/۰۷۶	۰/۱۰۵	۰/۰۵۹	۳۲/۹۹
	SM	۰/۰۴۸	۰/۰۰۷	۰/۰۰۸	۰/۰۰۵	
ماسال	میانگین	۰/۴۰۰	۱/۰۷۵	۰/۰۸۶	۰/۰۵۳	۲۰/۰۰
	SM	۰/۰۴۱	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۰۶	
سیاه بیل	میانگین	۰/۵۹۷	۱/۰۷۱	۰/۰۹۳	۰/۰۵۳	۲۹/۸۷
	SM	۰/۰۴۷	۰/۰۰۸	۰/۰۰۸	۰/۰۰۵	
لز	میانگین	۰/۶۲۹	۱/۰۵۳	۰/۰۸۱	۰/۰۴۳	۱۹/۲۲
	SM	۰/۰۴۷	۰/۰۰۵	۰/۰۰۷	۰/۰۰۴	
یوش	میانگین	۰/۳۹۵	۱/۰۵۹	۰/۰۷۲	۰/۰۴۳	۱۹/۷۴
	SM	۰/۰۴۱	۰/۰۰۸	۰/۰۰۸	۰/۰۰۵	
کل	میانگین	۰/۵۳۶	۱/۰۶۴	۰/۰۸۶	۰/۰۴۹	۲۶/۷۹
	SM	۰/۰۱۳	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲	۰/۰۰۱	۱/۸۵

جدول۴- نتایج آنالیز واریانس مولکولی، درصد تنوع درون و بین جمعیتی سیب شرقی ناحیه هیرکانی بر اساس نشانگر

منبع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	واریانس	درصد فراوانی	آماره	مقدار	P(rand >= data)
بین جمعیت‌ها	۱۳	۳۳۸/۲	۲۶/۰۲	۱/۱۵	۶٪	PhiPT	۰/۰۶	۰/۰۱۰
جمعیت‌ها درون	۸۷	۱۵۴۲/۷	۱۷/۷۳	۱۷/۷۳	۹۴٪			
کل	۱۰۰	۱۸۸۱/۰۵		۱۸/۸۹۴	۱۰۰٪			

جدول۳- فاصله ژنتیکی جمعیت‌های سیب شرقی ناحیه هیرکانی بر اساس فاصله ژنتیکی Nei

کد جمعیت	Af	Al	As	Co	D	Da	Do	Ja	K	Le	Ma	Si	Ua	Ub
Af	۰													
Al	۰/۰۰۶	۰												
As	۰/۰۰۶	۰/۰۰۵	۰											
Co	۰/۰۰۶	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰										
D	۰/۰۰۴	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰									
Da	۰/۰۰۷	۰/۰۰۷	۰/۰۰۷	۰/۰۰۶	۰/۰۰۶	۰								
Do	۰/۰۰۶	۰/۰۰۶	۰/۰۰۶	۰/۰۰۷	۰/۰۰۵	۰/۰۰۷	۰							
Ja	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۶	۰/۰۰۴	۰/۰۰۶	۰/۰۰۶	۰						
K	۰/۰۰۴	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۷	۰/۰۰۵	۰/۰۰۶	۰/۰۰۶	۰/۰۰۵	۰					
Le	۰/۰۰۶	۰/۰۰۵	۰/۰۰۶	۰/۰۰۶	۰/۰۰۵	۰/۰۰۷	۰/۰۰۶	۰/۰۰۵	۰/۰۰۶	۰				
Ma	۰/۰۰۸	۰/۰۰۸	۰/۰۰۸	۰/۰۰۸	۰/۰۰۷	۰/۰۰۹	۰/۰۰۸	۰/۰۰۸	۰/۰۰۸	۰/۰۰۸	۰			
Si	۰/۰۰۸	۰/۰۰۷	۰/۰۰۸	۰/۰۰۸	۰/۰۰۷	۰/۰۰۸	۰/۰۰۸	۰/۰۰۷	۰/۰۰۸	۰/۰۰۸	۰/۰۱۰	۰		
Ua	۰/۰۰۹	۰/۰۱	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۱	۰/۰۰۸	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۱۱	۰/۰۱	۰	
Ub	۰/۰۰۴	۰/۰۰۶	۰/۰۰۶	۰/۰۰۶	۰/۰۰۴	/۰۰۷۰	۰/۰۰۶	۰/۰۰۵	۰/۰۰۵	۰/۰۰۶	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰/۰۰۹	۰



شکل۳- پراکنش پایه‌های درختی جمعیت های مورد مطالعه سیب شرقی ناحیه هیرکانی بر اساس آنالیز تجزیه به مولفه‌های اصلی

بحث

آگاهی از تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیتی گونه‌ها، ابزاری مفید در ارائه استراتژیهای کارآمد حفاظتی در اکوسیستمهای طبیعی به شمار می‌رود (۷). در بسیاری از گونه‌های گیاهی سیستم تولیدمثلی گونه، شیوه گرده افشانی، مکانیسم پراکنش و دامنه جغرافیایی و مرحله تکاملی اکوسیستم به عنوان عوامل اصلی تفاوت در الگوی تنوع ژنتیکی گونه‌ها به شمار می‌روند. در میان

این عوامل سیستم تولیدمثلی گونه سیستم لقاح عامل اصلی مؤثر در تنوع ژنتیکی جمعیتهای متفاوت از گونه مورد نظر می‌باشد (۱۷).

فقدان موانع تولیدمثلی بین گونه‌ای، خودناسازگاری و کشت سیب در نواحی که جوامع وحشی آن به طور طبیعی مستقر شده‌اند و همچنین گرده افشانی گسترده توسط حشرات در داخل جمعیتهای سیب (۲۱) سبب افزایش جریان ژنی و در نتیجه افزایش تنوع ژنتیکی درون جمعیتی و کاهش تمایز بین جمعیتها می‌گردد. نتایج مطالعه حاضر در ارزیابی تنوع ژنتیکی جمعیتهای مختلف سیب جنگلی بیانگر درصد بالای تنوع درون جمعیتی در این گونه بود. مشابه این نتیجه در مطالعه‌ای توسط Dhyani و همکاران، (۲۰۱۵) در تعیین خصوصیات ژنتیکی ارقام مختلف سیب به دست آمده از موقعیتهای جغرافیایی متفاوت و ارتفاع از سطح دریا ۱۷۷۱ تا ۲۷۸۰ متر مشاهده شد. به‌طوری که ۵۳ تا ۷۳ درصد تنوع کل در این ارقام را تنوع درون جمعیتی شامل می‌شد (۹). به طور مشابه Goulao و Oliveira (۲۰۰۱) نیز در ارزیابی روابط ۴۱ رقم سیب با استفاده از مارکرهای SSR و ISSR وجود تنوع بالای درون جمعیتی برای این گونه را گزارش کردند (۱۵). هم راستا با نتایج سایر محققین، نتایج تحقیق حاضر نیز حاکی از تنوع درون جمعیتی بالاتر سیب جنگل هیرکانی در مقایسه با تنوع بین جمعیتی آن می‌باشد. جریان ژنی سریع در درختان عامل اصلی تنوع بالای درون جمعیتی به شمار می‌رود (۱۷). با توجه به تفاوت فاحش در گرادیان جغرافیایی و ارتفاعی جمعیتهای موجود در این مطالعه و درصد پایین تنوع بین جمعیتی به نظر می‌رسد جریان ژنی در بین جمعیتهای مختلف به دلیل خودناسازگاری و دگرآمیزی در این گونه بسیار سریع اتفاق می‌افتد. در همین راستا، مشخص است که علی رغم گستردگی مناطق نمونه برداری شده، هتروزیگوسیتی تک تک جمعیتها، در حدود میانگین هتروزیگوسیتی کل جمعیت (He=۰/۰۴۹) بود. در این بین تنها جمعیت افراتخته از میانگین هتروزیگوسیتی بسیار پایین‌تری (He=۰/۰۳۱) نسبت به سایر جمعیتها برخوردار بود که این مسئله را می توان به شدت تخریب این رویشگاه و تبدیل اراضی جنگلی (محل نمونه برداری) به اراضی زراعی مرتبط دانست. اگرچه در بسیاری از مطالعات تمایز پایین جمعیتی برای جنس سیب گزارش شد (۶، ۱۴ و ۲۶) اما بر اساس نتایج این تحقیق، جمعیت سیاه بیل واقع در پایین‌ترین حد جغرافیایی پراکنش سیب در جنگل هیرکانی (منطقه جلگه ای با ارتفاع ۵۰ متر سطح دریا) از سایر جمعیتها متمایز شد. در تمام گونه‌های درختی زمان باز شدن جوانه‌ها و گلدهی از الگوی تغییرات تدریجی ژنتیکی وابسته به ارتفاع، طول و عرض جغرافیایی محل استقرار پایه‌ها تبعیت می‌کند. این امر در تمام عرض جغرافیایی جنوبی یا ارتفاعات پایین‌تر به دلیل حرارت بیشتر، زودتر از عرض‌جغرافیایی شمالی یا ارتفاعات بالاتر رخ می‌دهد. تغییر در زمان گلدهی یک جمعیت منجر به تمایز آن در بین جمعیتهای مختلف می‌شود (۲ و ۴). بنابراین قابل انتظار است که جمعیت سیاه بیل به دلیل قرار گرفتن در ارتفاع ۵۰ متر از سطح دریا و با فاصله حداقل ۱۵۰۰ متر از نزدیکترین جمعیت نمونه‌برداری شده در این تحقیق (اسالم) به دلیل حداقل ۲۰ روز گلدهی زودتر از سایر جمعیتها متمایز باشد.

نتیجه‌گیری نهایی

این اولین گزارش در راستای آگاهی از سطح تنوع و تمایز ژنتیکی جمعیتهای سیب جنگلی شمال ایران با رویکرد مولکولی است. علی رغم شرایط رویشگاهی متفاوت و فاصله جغرافیایی زیاد جمعیتها از یکدیگر، سطح تمایز ژنتیکی بین جمعیتهای مورد مطالعه (به استثنای جمعیت جلگه‌ای سیاه بیل) پایین و

هتروزیگوسیتی درون جمعیتها مشابه با یکدیگر بود. این مسئله می‌تواند حاکی از سطح بالای تبادل ژنتیکی بین جمعیتهای سیب جنگلی شمال ایران باشد.

تشکر و قدر دانی

هزینه های این تحقیق با حمایت صندوق پژوهشگران و فناوران کشور و نیز دانشگاه تربیت مدرس تأمین شده است و از این طریق از مسئولین مربوطه، تشکر قدردانی می شود. همچنین از همه کسانی که در نمونه‌برداری این تحقیق کمک نمودند، سپاسگزاری می‌شود.

منابع

۱- حسین زاده کلاگر، ا.، فلاح، ف.، یوسف زاده، ح. ۱۳۹۴. تنوع و تمایز ژنتیکی جمعیتهای توس (*Betula pendula*) ایران، با استفاده از چند شکلی DNA سه ناحیه (CD، DT و K1K2) ژنوم کلروپلاستی. مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران)، ۲۸(۲): ۱۹۱-۲۰۱.

2- Agarwal, M., Shrivastava, N., and Padh, H., 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. Plant Cell Reports, 27: 617-631.

3- Alberto, F., Bouffier, L., Louvet, J.M., Lamy, J.B., Delzon, S., and Kremer, A., 2011. Adaptive responses for seed and leaf phenology in natural populations of sessile oak along an altitudinal gradient. Journal of Evolutionary Biology, 24:1442-1454.

4- Bassam, B. J., Caetano-Anolles, G., and Greesshoff, P.M., 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry. 19: 680-683.

5- Chuine, I., and Cour, P., 1999. Climatic determinants of budburst seasonality in four temperate-zone tree species. New Phytologist, 143:339-349.

6- Coart, E., Vekemans, X., Smulders, M.J.M., Wagner, I., Huylenbroeck, J., Bockstaele, E., and Rolda´n-Ruiz, I., 2003. Genetic variation in the endangered wild apple (*Malus sylvestris* L.) in Belgium as revealed by amplified fragment length polymorphism and microsatellite markers. Molecular Ecology, 12:845-857.

7- Dantas. A., Silva de, M., Fortes, J.A., and Rombaldi, C., 2000. RAPD in Somaclones of Apple Rootstocks Cultivar M.9 Regenerated from Aluminium Medium. Revista-Brasileira-de-Fruticultura (Brazil), 2: 303-305.

8- Dávila, J.A., Sánchez dela Hoz, M.O., Loarce, Y., and Ferrer, E.,1998. The use of random amplified microsatellite polymorphic DNA and coefficients of parentage to determine genetic relationships in barley. Genome, 41:486-477.

9- Dhyani, P., Bahukhandi, A., Jugran, A., Bhatt, I., Rawal, R., and Pande, V., 2015. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers based genetic characterization of selected Delicious group of apple cultivars. International Journal of Advanced Research, 3: 591-598.

10- Fang, D., Krueger, R.R., and Roose, M.L., 1998. Phylogenetic relationships among selected Citrus germplasm accessions revealed by intersimple sequence repeat (ISSR) markers. Journal American Society Horticulture Science, 123: 612–617.

11- Fang, D.Q., Roose, M.L. , Krueger, R.R., and Federici, C.T., 1997. Fingerprinting trifoliate orange germplasm accessions with isozymes, RFLPs, and inter-simple sequence repeat markers. Theoretical and Applied Genetics, 95:211–219.

12- Farrokhi, J., Darvishzadeh, R., Naseri, L., Mohseni Azar, M., and Hatami Maleki, H., 2011. Evaluation of genetic diversity among Iranian apple (*Malus* × *domestica* Borkh.) cultivars and landraces using simple sequence repeat markers. Australian Journal of Crop Science, 5:815-821.

13- Gardiner, S.E., Bassett, C. Madie and Noiton, D.A.M., 1996. Isozyme, random amplified polymorphic DNA (RAPD), restriction fragment-length polymorphism (RFLP) markers to deduce a putative parent for the 'Braeburn' apple. Journal of the American Society for Horticultural Science, 121: 996-1001.

14- Gharghani, A., Zamani, Z, Talaie, A., Oraguzie, N.C., Fatahi, R., Hajnajari, H., Wiedow, C., and Gardiner, S.E., 2009. Genetic identity and relationships of Iranian apple (*Malus× domestica* Borkh.) cultivars and landraces, wild Malus species and representative old apple cultivars based on simple sequence repeat (SSR) marker analysis. Genetic resources and crop evolution, 56: 829-842.

15- Goulão, L., and Oliveira, C.M., 2001. Molecular characterization of cultivars of apple (*Malus× domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. Euphytica, 122 : 81-89.

16- Goulão, L., Cabrita L., Oliveira, C.M., and Leitão, J.M., 2001. Compar- ing RAPD and AFLP analysis in discrimination and estimation of genetic similarities among apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars. Euphytic, 3:259-270.

17- Hamrick, J.L., Godt, M.J.W., and Sherman-broyles, S.L. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. New Forest, 5: 95-124.

18- Ibdah, M., Berim, A., Martens, S., Valderrama, A.L.H., Palmieri, L., Lewinsohn, E., and Gang, D.R. 2014. Identification and cloning of an NADPH-dependent hydroxycinnamoyl-CoA double bond reductase involved in dihydrochalcone formation in *Malus×domestica* Borkh. Phytochemistry, 107: 24-31.

19- King, R.A., and Ferris, C., 2000. Chloroplast DNA and nuclear DNA variation in the sympatric alder species *Alnus cordata* (Lois.) Duby and *A. glutinosa* (L.) Gaertn. Biological Journal of the Linnean Society, 70: 147– 160.

20- Koller, B., Lehmann, J.M., McDermott and Gessler, C., 1993. Identification of apple cultivars using RAPD markers. Theoretical and Applied Genetics, 85: 901-904.

21- Larsen A.S., Asmussen C.B., Coart E., Olrik D.C., and Kjer E.D., 2006. Hybridization and genetic variation in Danish populations of European crab apple (*Malus sylvestris*), Tree Genetics and Genomes, 2 (2): 86-97.

22- Miles, T. R., Miles Jr, T. R., Baxter, L. L., Bryers, R. W., Jenkins, B. M., and Oden, L. L., 1995. Alkali deposits found in biomass power plants: A preliminary Investigation of Their Extent and Nature. 1: 433-8142.

23- Monte-Corvo, L., Goulao, L., and Oliveira, C., 2001. ISSR analysis of cultivars of pear and suitability of molecular markers for clone discrimination. Journal of the American Society for Horticultural Science, 126: 517-522.

24- Murray, M.G., and Thompson, W.F., 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research, 8: 4321-4325.

25- Nasiri, M., Yari, R., and Abedini, A., 2015. The Study of Genetic Variation of *Malus Orientalis* Plant Using Rapd –Pcr in Lorestan Province. International Journal of Review in Life Science, 5: 192-202.

26- Pereira-Lorenzo, S., Ramos-Cabrer, A.M., and Diaz-Hernandez, M.B.,2007. Evaluation of genetic identity and variation of local apple cultivars (Malus 9 domestica Borkh.) from Spain using microsatellite markers. Genetic Resources and Crop Evolution, 54:405-420.

27- Tsumara, Y., Ohba, K., and Strauss, S.H., 1996. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in douglas-fi r (Pseudotsuga menziesii) and sugi (Cryptomeria japonica). Theoretical and Applied Genetics, 92:40–45.

28- Xu, M., Huaracha, E., and Korban, S.S., 2001. Development of sequence-characterized amplified regions (SCARs) from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the Vf gene in apple. Genome, 44:63-70.

29- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., and Labuda, D., 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics, 20: 176-183.

Genetic Diversity of *Malus orientalis* in Hyrcanian Forest Using ISSR-PCR Markers

Khodadost A.[1], Yousefzadeh H.[2], Amirchakhmaghi N.[1], Abdollahi H.[3] and Hosseinzadeh Colagar A.[4]

[1] Forestry Dept., Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, I.R. of Iran

[2] Invironmental Dept., Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, I.R. of Iran

[3] Host/Pathogen Interaction & Biotechnology of Fruit Trees Dept., Seed and Plant Improvement Institute, Karaj, I.R. of Iran

[4] Molecular and Cell Biology Dept., Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, I.R. of Iran

Abstract

Apple (*Malus orientalis*.) distributed throughout the Hyrcanian forest from lowland regions to steep and mountainous areas. For evaluation genetic diversity, leaf material were collected from 104 individual of were 14 population. DNA was extracted and DNA polymorphism were considered using four primers $(GA)_8YC$, $(AC)_8YA$,$(AG)_8AT$ and $(AC)_8G$ with ISSR-PCR method. The results showed that for four primers was detected 385 allele with 0.049 heterozygosiyt.The mean heterozygosity was 0.049 and varied from 0.031 in “Afratakhte” population to 0.059 in “kodir” and “Lamzer” populations. The maximum Nei genetic distance was belong to “Siahbill” and “Masal” populations and the minimum was related to “Yousch”, “Afratakhte” and “Dinekooh”. the AMOVA result indicated that the intra and inter population diversity were 94% and 6%, respectively that indicate significant within population diversity of this species.Despite the different habitat conditions and long geographical distance among populations, The low genetic differentiation (excluding Siahbill population) and similar heterozygosity within populations suggest high gene flow among populations of *Malus orientalis* in north of Iran.

Key words: Hyrcanian forest, Genetic Diversity, Wild *Malus*, ISSR markers.