

## تنوع ژنتیکی سیب شرقی (*Malus orientalis*) در جنگل‌های هیرکانی ایران با استفاده از نشانگرهای SSR

رویا رستمی<sup>۱</sup>، نسرین سیدی\*<sup>۲</sup> و حامد یوسف‌زاده<sup>۳</sup>

۱- کارشناسی ارشد جنگلداری، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. (roya4871@gmail.com)

۲- استادیار، گروه جنگلداری، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. (n.seyedi@urmia.ac.ir)

۳- استادیار، گروه محیط زیست، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران. (h.yousfzadeh@modares.ac.ir)

تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۴/۰۲

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۰/۲۳

### چکیده

سیب شرقی (*Malus orientalis*) دارای پراکنش وسیع در سرتاسر جنگل‌های هیرکانی شمال ایران از مناطق پایین‌بند تا نواحی کوهستانی و شیب‌دار است. برای بررسی تنوع ژنتیکی، نمونه‌های برگ ۶۰ پایه از شش رویشگاه جنگل‌های هیرکانی جمع‌آوری شدند. DNAهای استخراج شده با استفاده از شش آغازگر GD142، GD12، GD147، GD96، GD100 و GD162 به روش SSR-PCR بررسی شدند. کل آلل‌های تکثیرشده برای چهار آغازگر در این پژوهش، برابر ۴۵ آلل با میانگین هتروزیگوسیتی ۰/۳۹ بود. به‌طوری که بیشترین مقدار هتروزیگوسیتی در جمعیت کدیر، اسالم، یوش بالا و یوش میانی (یک) و کمترین مقدار آن نیز مربوط به جمعیت افراخته، یوش میانی، یوش بالایی و کدیر سوردار (صفر) بود. بیشترین فاصله ژنتیکی Nei مربوط به جمعیت‌های اسالم و سوردار و کمترین آن مربوط به جمعیت‌های یوش بالایی و اسالم بود. آنالیز واریانس مولکولی تنوع درون و بین جمعیت‌ها را به ترتیب ۹۷ و سه درصد از کل تنوع نشان داد که بیانگر تنوع درون جمعیتی قابل ملاحظه در جمعیت‌های این گونه است. این پژوهش نشان داد باوجود شرایط رویشگاهی متفاوت و فاصله جغرافیایی زیاد جمعیت‌ها از یکدیگر، سطح تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌های مورد پژوهش پایین و هتروزیگوسیتی درون جمعیت‌ها بسیار مشابه با یکدیگر است. این مسئله می‌تواند حاکی از سطح بالای برقراری جریان ژن و تبادل ژنتیکی بین جمعیت‌های سیب جنگلی شمال ایران باشد.

واژه‌های کلیدی: تعادل هاردی- واینبرگ، هتروزیگوسیتی، نشانگرهای ریزماهواره.

## مقدمه

است. این در حالی است که تغییر کاربری در مناطق بیلابقی شمال ایران (مناطق اصلی پراکنش سیب) و هم‌جواری رویشگاه‌های این گونه با روستاهای بیلابقی در شمال کشور، بسیاری از رویشگاه‌های این گونه مورد تخریب قرار گرفته است و مشاهدات صحرایی حاکی از آن است که از وضعیت مطلوبی برخوردار نیستند (Khodadost et al., 2016).

برای بررسی تنوع ژنتیکی نتاج سیب نیاز به دانش ژرم پلاسماست (Wang et al., 2007) که ابزار قابل اعتماد برای دسترسی به آن، نشانگرهای مولکولی است (Potts et al., 2012; Reim et al., 2013; Zhuang et al., 2011; Garkava-Gustavsson et al., 2008). پژوهشگران برای تخمین تنوع ژنتیکی، از انواع مختلف سیستم‌های نشانگری استفاده می‌کنند که از آن‌ها می‌توان به نشانگرهای ریزماهوره (SSR) اشاره کرد که سطوح بالای تنوع آلی، توارث هم‌بارزی، آن‌ها را به یک نشانگر مطلوب در بررسی‌های ژنوتیپی، تهیه نقشه و همسانه‌سازی ژن تبدیل کرده (Hokanson et al., 1998) و یک نشانگر مطلوب برای پژوهش تنوع ژنتیکی و انگشت‌نگاری گونه‌های درختان میوه دانه‌دار مانند سیب و گلابی به‌شمار می‌رود (Urrestarazu et al., 2012; Potts et al., 2012; Van Treuren et al., 2010; Galli et al., 2005). باتوجه به تغییرات آب و هوایی و گرم شدن جهانی زمین، حفظ تنوع ژنتیکی بالا (به‌دلیل سازگاری بالا با محیط) در جنگل‌ها احتمال زنده‌مانی درختان را افزایش می‌دهد. نهال‌های نتاج (حاصل زادآوری طبیعی) علاوه بر سازگاری بالا و حفظ تنوع ژنتیکی بین نسل‌های مختلف، به‌دلیل انتقال مستقیم آلل‌ها از پایه‌های مادری به فرزندان، نقش موثری در پرورش جنگل دارند (Vranckx et al., 2014). هدف از این

جنگل‌های شمال ایران ساختار و تنوع زیستی پیچیده دارند که فقط با شناخت کامل اکوسیستم می‌توان به مدیریت بهینه و درست آن‌ها امیدوار شد (Amiri et al., 2009). کاهش ۱/۵ میلیون هکتاری سطح جنگل‌های شمال کشور، به‌دلیل وسعت شهرنشینی، کشاورزی و تغییرات کاربری، علاوه بر تغییر در کیفیت و ترکیب جنگل، کاهش تنوع را نیز به‌همراه داشته است (Avatefi; Vahedi et al., 2016; Hemmat et al., 2013). این درحالی است که حفاظت حداکثری از تنوع زیستی موجود، ضامن بقای طولانی‌مدت برای زیست‌بشر به‌شمار می‌آید (Goto et al., 2009). از آنجایی که برای تدوین استراتژی‌های مدیریتی مناسب برای حفاظت گونه‌ها، آگاهی از تنوع ژنتیکی و توزیع آن مهم است (Goto et al., 2009)، بنابراین پژوهشگران با روش‌های مختلف اقدام به ارزیابی مقدار تنوع ژنتیکی گونه‌ها کرده‌اند (Wang et al., 2007).

سیب جنگلی (*Malus Orientalis*)، از خانواده گل‌سرخیان یکی از مهم‌ترین محصولات میوه‌ای مهم در سطح جهانی است که بیش از ۳۵ گونه (Ignatov and Bodishevskaya, 2011) و در برخی منابع بیش از ۵۵ گونه (Harris and Piersol, 2002) دارد. پراکنش اصلی گونه‌های مختلف جنس سیب در نواحی معتدله است (FAO, 2015) و به‌دلیل نزدیکی ایران به خاستگاه سیب در ناحیه آسیای مرکزی و قرقیزستان، این جنس در ایران از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار است (Juniper et al., 1999).

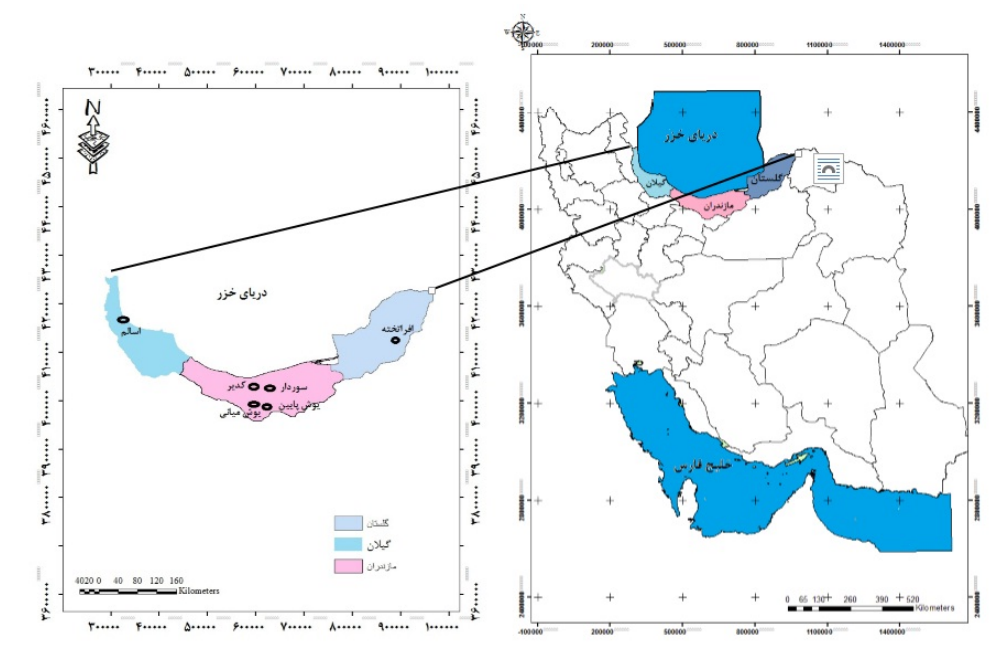
باوجود اهمیت اکولوژیکی و اقتصادی این گونه، به‌دلایل مختلف سیب جنگلی در شمال ایران چندان مورد توجه پژوهشگران علوم گیاهی قرار نگرفته

نمونه بذرهای مختلف سیب جنگلی از شش رویشگاه (اسالم، کدیر، یوش میانی، یوش بالایی، سوردار، افراخته) جمع‌آوری و به گلخانه انتقال داده شدند (شکل ۱، جدول ۱). بعد از جوانه‌زنی و رشد گیاه از هر جمعیت ۱۰ نمونه برگ به صورت تصادفی تهیه و در ظرف یخ نگهداری و برای استخراج DNA به آزمایشگاه منتقل شد.

پژوهش بررسی تنوع ژنتیکی سیب شرقی (*Malus orientalis*) با استفاده از نشانگرهای SSR در جنگل‌های هیرکانی ایران است.

## مواد و روش‌ها

### ۱- شناسایی رویشگاه‌های طبیعی و نمونه‌برداری



شکل ۱- موقعیت رویشگاه‌های مورد پژوهش: گلستان (افراخته)، مازندران (سوردار و کدیر و یوش میانی و یوش پایین) و گیلان (اسالم)

Figure 1. Location of studied sites: Golestan (Af), Mazandaran (S, Co, Um, Ub) and Gilan (As)

برای انجام واکنش PCR (واکنش زنجیره‌های پلی‌مرز) از شش جفت آغازگر ریزماهواره استفاده شد (جدول ۲). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز برای نمونه‌ها در حجم ۲۰ میکرولیتری محتوی هشت میکرولیتر آب مقطر تزریقی، شش میکرولیتر ( AccuPower HotStart Master Mix (PCR Premix kit (Bioner, Korea) یک میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای رفت و برگشت، دو میکرولیتر از DNA استخراج شده انجام شد.

### ۲- استخراج DNA

استخراج DNA به روش Murray and Thompson (1980) و کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با روش الکتروفورز و ژل آکریل‌امید ۸ درصد بررسی شد. به طوری که مقدار ۵۰ میلی‌گرم از نمونه‌های برگ توسط ازت مایع و به کمک هاون پودر شد و پودر نمونه‌ها در تیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری و در دمای ۲۰- درجه تا زمان استخراج DNA نگهداری شد.

### ۳- انجام واکنش زنجیره پلی‌مرز (PCR)

جدول ۱- نام، اختصار، مختصات و ارتفاع از سطح دریا جمعیت‌های مورد پژوهش

Table 1. Name, abbreviation, coordinates and elevation of studied populations

ارتفاع از سطح دریا (متر)	مختصات	اختصار	نام جمعیت
Elavation (m)	Coordinates	Abbreviation	Name of population
1552	54° 58' 04" E 36° 47' 28" N	Af	افراخته Afratakhteh
1650	51° 47' 29" E 36° 26' 49" N	Co	کدیر Codir
1700	51° 48' 53" E 36° 18' 53" N	Um	یوش میانی Ushmiyani
1824	48° 46' 04" E 37° 37' 34" N	As	اسالم Asalem
2000	51° 47' 59" E 36° 25' 50" N	S	سوردار Sourdar
2350	51° 52' 57" E 36° 57' 18" N	Ub	یوش بالایی Yushbalaee

جدول ۲- خصوصیات پرایمرهای مورد استفاده

Table 2. Properties of used primers

پرایمر	توالی پرایمر	دمای اتصال پرایمر (سانتی‌گراد)
Primer	Primer sequence	Primer annealing temperature (C°)
GD 162 <sub>F</sub>	CGGCGGAAAGCAATCACCT	55
GD 162 <sub>R</sub>	GCCAGCCCTCTATGGTTCCAGA	55
GD 100 <sub>F</sub>	ACAGCAAGGTGTTGGGTAAGAAGGT	55
GD 100 <sub>R</sub>	TGCGGACAAAGGAAAAAAAAAAGTG	55
GD 96 <sub>F</sub>	TTGAGGTGTTTCTCCCATTGGA	55
GD 96 <sub>R</sub>	CTAACGAAGCCGCCATTTCTTT	55
GD 147 <sub>F</sub>	GGCACCCAAGCCCCTAA	65
GD 147 <sub>R</sub>	GGAACCTACGACAGCAAAGTTACA	65
GD 12 <sub>F</sub>	TCCCGCCATTTCTCTGC	65
GD 12 <sub>R</sub>	AAACCGCTGCTGCTGAAC	65
GD 142 <sub>F</sub>	GAGGCAAGTGACAAAGAAAGATG	65
GD 142 <sub>R</sub>	AAAATGTAACAACCCGTC CAAGTG	65

F: Forward, R: Reward

F: پرایمر رفت، R: پرایمر برگشت.

ارزیابی تعداد آلل در هر جایگاه، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار در بررسی پلی مورفیسم ژنتیکی جمعیت‌ها و همچنین آزمون انحراف از تعادل هاردی- واینبرگ با استفاده از نرم‌افزار Gene Alex6.3 انجام شد. به منظور تعیین تنوع ژنتیکی درون جمعیتی و بین جمعیتی و همچنین مقدار تمایز بین جمعیتی براساس مدل آلی بی‌نهایت (Fst) از تجزیه واریانس مولکولی با بسته نرم‌افزار GeneAlex 6.3 استفاده شد.

برنامه حرارتی PCR در (جدول ۳) نشان داده شده است. محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز روی ژل اکریل آمید ۸ درصد جداسازی شدند. سپس ژل‌ها به روش نیترات نقره (Bassam *et al.*, 1991) رنگ-آمیزی و پس از تهیه تصویر ژل‌ها از نرم‌افزار Gel pro analyzer برای محاسبه طول قطعات استفاده شد.

۴- آنالیز و تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از نشانگرهای ریزماهواره

جدول ۳- برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

Table 3. Temperature program of Polymerase chain reaction

مراحل Steps	درجه حرارت (سانتی‌گراد) Temperature (C°)	زمان (دقیقه) Time (min)	تعداد چرخه Number of cycle
واسرشت‌سازی اولیه Initial denaturation	94	4	1
واسرشت‌سازی Denaturation	94	1	25
الحاق Annealing	55	2	25
بسط Extention	72	2	25
بسط نهایی Final Extention	72	5	1

### نتایج

تعلق داشت. میانگین آلل‌های مؤثر ۷/۳۰ به دست آمد که پایین‌ترین تعداد آلل مؤثر به جایگاه GD100 و بالاترین تعداد به جایگاه GD162 مربوط بود (جدول ۴).

همه ۶ جایگاه زنی که در این پژوهش استفاده شد پلی‌مورف بودند. میانگین تعداد آلل‌های مشاهده شده ۸/۵۸ گزارش شد که کم‌ترین تعداد به جایگاه GD100 و بیشترین تعداد به جایگاه GD162

جدول ۴- شاخص‌های تنوع ژنتیکی در ۶ جمعیت و ۶ جایگاه مورد بررسی

Table 4. Indexes of Genetic diversity in 6 studied population and locus

GD 142	GD 12	GD 147	GD 96	GD 100	GD 162	جمعیت Population
13	7	10	9	6	10	Na
11.57	5.55	7.71	7.69	4.76	9	Ne
2.5	1.83	2.16	2.11	1.67	2.25	I
0.44	0	0.66	0.03	0	0.83	Ho
0.91	0.82	0.87	0.87	0.79	0.88	He
*	***	ns	**	***	ns	PHW
9	7	8	5	7	11	Na
8.16	6.23	5.33	4.5	6.4	9.8	Ne
2.14	1.88	1.85	1.56	1.9	2.34	I
0.28	0	0.5	0	0	1	Ho
0.87	0.84	0.81	0.77	0.84	0.89	He
*	***	ns	**	***	ns	PHW

شاخص شانون، (Na) تعداد آلل، (Ne) تعداد آلل مؤثر، (Ho) هتروزیگوسیتی مشاهده شده، (He) هتروزیگوسیتی مورد انتظار، PHW تست ضریب احتمال هاردی-واینبرگ (ns, \*, \*\*, \*\*\*) به ترتیب عدم معنی‌داری و معنی‌داری در سطح  $p \leq 0/05$ ,  $p \leq 0/01$  و  $p \leq 0/001$ .

Shannon index, (Na) Number of alleles, (Ne) Number of effective alleles, (Ho) Observed heterozygosity, (He) Expected heterozygosity, PHW Hardness coefficient test, Weinberg test (ns, \*, \*\*, \*\*\*) And \*\*\*, respectively, were not significant and significant at the level of  $p \leq 0.05$ ,  $p \leq 0.01$  and  $p \leq 0.001$ .

ادامه جدول ۴.

Continued table 4.

GD 142	GD 12	GD 147	GD 96	GD 100	GD 162	جمعیت Population
9	5	7	9	6	12	Na
8	4.26	6.54	7	5.44	9.84	Ne
2.13	1.52	1.9	2.06	1.74	2.39	I
0.5	0	0.16	0.71	0	1	Ho
0.87	0.76	0.84	0.85	0.81	0.89	He
ns	***	*	Ns	**	ns	PHW
9	8	9	10	9	14	Na
7.11	7.36	8	5.71	9	12.8	Ne
2.07	2.04	2.13	2.03	2.19	2.59	I
0.25	0	0.5	0.4	0	1	Ho
0.85	0.86	0.87	0.82	0.88	0.92	He
**	***	ns	**	***	ns	PHW
8	6	9	7	4	14	Na
7.2	6	8	6.54	3.57	12.46	Ne
2.02	1.79	2.13	1.9	1.33	2.58	I
0.66	0	0.5	0.16	0	0.88	Ho
0.86	0.83	0.87	0.84	0.72	0.92	He
ns	*	ns	*	*	ns	PHW
7	8	10	8	7	12	Na
4.9	7.36	6.75	6.12	6.23	9.84	Ne
1.75	2.04	2.09	1.94	1.88	2.39	I
0.11	0	0.66	0.42	0	1	Ho
0.79	0.86	0.85	0.83	0.84	0.89	He
***	***	ns	Ns	***	ns	PHW

شاخص شانون، (Na) تعداد آلل، (Ne) تعداد آلل مؤثر، (Ho) هتروزیگوسیتی مشاهده شده، (He) هتروزیگوسیتی مورد انتظار، PHW تست ضریب احتمال هاردی-واینبرگ (ns, \*, \*\*, \*\*\*) به ترتیب عدم معنی داری و معنی داری در سطح  $p \leq 0/05$ ,  $p \leq 0/01$  و  $p \leq 0/001$ . Shannon index, (Na) Number of alleles, (Ne) Number of effective alleles, (Ho) Observed heterozygosity, (He) Expected heterozygosity, PHW Hardness coefficient test, Weinberg test (ns, \*, \*\*, \*\*\*) respectively, were not significant and significant at the level of  $p \leq 0.05$ ,  $p \leq 0.01$  and  $p \leq 0.001$ .

میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده، میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار، شاخص درون آمیزی و مقدار تمایز به ترتیب ۰/۳۶، ۰/۸۵، ۰/۵۵، ۰/۱۱ بود. (۵).  
است که میانگین کل این شاخص برابر ۲/۰۲۸ شد. همچنین متوسط جریان ژنی ۲/۰۶ مشاهده شد (جدول ۵).  
شاخص شانون یکی از شاخص های تنوع یک مکان

جدول ۵- مقدار جریان ژنی (Nm) و تمایز (Fst) و درون آمیزی (Fis) در ۶ جایگاه ژنی مورد استفاده

Table 5. Gene flow (Nm), genetic differentiation (Fst) and inbreeding coefficient (Fis) in 6 used locus

میانگین Average	GD 142	GD 12	GD 147	GD 96	GD 100	GD 162	پرایمر Primer
0.58	0.56	1	0.41	0.59	1	0.05	Fis
0.11	0.09	0.13	0.1	0.12	0.14	0.07	Fst
2.06	2.3	1.55	2.05	1.73	1.45	3.05	Nm

۰/۷۶ گزارش شده است. در پژوهش Gharghani و همکاران (2009) میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده برابر ۰/۶۳ بود که کمترین مقدار هتروزیگوسیتی مشاهده شده به گونه *M. orientalis* با مقدار ۰/۵۶ تعلق داشت.

میانگین هتروزیگوسیتی موردانتظار در این پژوهش ۰/۸۵ بود که در پژوهش Naghshin و همکاران (2008)، در پژوهش Gharghani و همکاران (2009) و در پژوهش Larsen و همکاران (2006) (همه پژوهش سیب جنگلی بود) به ترتیب ۰/۶۵، ۰/۵۲، ۰/۷۲ گزارش شده است. میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار در پژوهش Khodadost و همکاران (2016) برابر ۰/۶، گزارش شده است. در بررسی Gharghani و همکاران (2009) مقدار هتروزیگوسیتی مورد انتظار در گونه سیب جنگلی ۰/۸۶ گزارش شد که با پژوهش حاضر هم‌خوانی دارد. در پژوهش Khodadost و همکاران (2016) شاخص تثبیت Fis در گونه سیب جنگلی برابر ۰/۳۵ بود که این شاخص در پژوهش Farrokhi and Naseri (2012) ۰/۵۵ گزارش شد. در بررسی Gharghani و همکاران (2009)، بیشترین مقدار Fis در گونه سیب جنگلی ۰/۱۹۷ گزارش شد. در این پژوهش میانگین شاخص تثبیت Fis ۰/۵۵ گزارش شد و چون این مقدار بیش‌تر از صفر است می‌تواند دال بر آمیزش خویشاوندی و اختلاط بین جمعیت‌ها باشد (Wright, 1979).

هرگاه مقدار جریان ژنی (Nm) بیشتر از یک باشد، جریان ژنی اصلی‌ترین عامل تمایز ژنتیکی است و هرگاه کمتر از یک باشد رانش ژنی عامل اصلی ایجاد تمایز ژنتیکی است (Henzler et al., 2007). از این رو نتایج حاضر نشان‌دهنده این است که عامل ایجاد تمایز ژنتیکی بین جمعیت‌ها جریان ژنی با مقدار

بر اساس نتایج Fst حاصل از تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA)، بالاترین تنوع ژنتیکی (۹۷ درصد) درون جمعیت‌ها با ضریب تغییرات ۰/۴۲ و پایین‌ترین تنوع (سه درصد) بین جمعیت‌ها با ضریب تغییرات ۰/۳۲ وجود دارد که این اختلاف در سطح پنج درصد معنی‌دار است.

## بحث

در بررسی‌های تنوع ژنتیکی، غنای آلی نسبت به هتروزیگوسیتی دارای ارزش بالاتری است، میانگین تعداد آل مشاهده شده در این پژوهش ۷/۷۷ بود که از نتایج پژوهش ناصری و همکاران (Nasiri et al., 2015) بیشتر است. همچنین در پژوهشی که روی ارقام محلی و غیربومی از سه ناحیه اسپانیا انجام شد، میانگین تعداد آل ۱۲/۳ گزارش شد.

تعداد زیاد آل‌های مشاهده شده برای کلیه مکان‌های ژنی نشان‌دهنده این است که نشانگرهای ریز ماهواره می‌توانند در بررسی تنوع ژنتیکی سیب سودمند باشند. در پژوهش دیگری که توسط کورت و همکاران (Coart et al., 2003) روی جمعیت‌های سیب زینتی، اهلی و وحشی انجام شد مقادیر میانگین تعداد آل‌ها به ترتیب ۷/۷، ۶/۴، ۱۱/۷ گزارش شد. کاهش تعداد آل‌های مشاهده شده در سطوح جمعیتی می‌تواند بیانگر کاهش تنوع ژنتیکی باشد.

از آنجایی که هتروزیگوت‌ها ناقل آل‌های متفاوت هستند، بررسی‌های هتروزیگوسیتی اهمیت فراوانی دارند. میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده در این پژوهش ۰/۳۶ است که نشان‌دهنده سطح پایینی از هتروزیگوسیتی است و با میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده در پژوهش Farrokhi and Naseri (2012) برابر است. میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده در پژوهش Larsen و همکاران (2006) برابر

2002). این امر موجب افزایش جریان ژنی و در نتیجه افزایش تنوع ژنتیکی درون جمعیتی و کاهش تمایز بین جمعیت‌ها می‌شود. اگرچه حذف جمعیت‌های بینابینی و کاهش جریان ژنی سبب کاهش تنوع ژنتیکی در درون جمعیتی و افزایش تمایز جمعیت‌های مختلف می‌شود (Honnay and Jacquemyn, 2007).

#### نتیجه‌گیری کلی

با توجه به اینکه این پژوهش اولین پژوهش مولکولی برای بررسی تنوع ژنتیکی و شناسایی روابط درون-گونه‌ای جمعیت‌های نتاج سیب جنگلی جنگل‌های هیرکانی است، از این‌رو در این پژوهش با توجه به نتایج به‌دست آمده تنوع ژنتیکی می‌توان اظهار کرد که تنوع درون جمعیتی پایه‌های نتاج از تنوع بین جمعیتی نتاج بیشتر است که دلیل اصلی آن ممکن است شیوه تولید مثلی این گونه باشد. در بسیاری از گونه‌های گیاهی سیستم تولیدمثلی گونه، شیوه گرده‌افشانی، مکانیسم پراکنش و دامنه جغرافیایی و مرحله تکاملی اکوسیستم به‌عنوان عوامل اصلی تفاوت در الگوی تنوع ژنتیکی گونه‌ها به‌شمار می‌روند. در میان این عوامل سیستم تولیدمثلی گونه مهم‌ترین عامل مؤثر در تنوع ژنتیکی جمعیت‌های متفاوت از گونه مورد نظر است.

همچنین در نتایج حاصل از بررسی شاخص Fst

با توجه به اینکه جایگاه GD100 دارای مقدار Fst بالاتری نسبت به دیگر جایگاه‌ها بود، از این‌رو می‌توان بیان داشت که این جایگاه در بررسی تنوع ژنتیکی نتاج سیب تفاوت ژنتیکی افراد موجود در بین جمعیت‌های مختلف را بهتر ارزیابی می‌کند.

#### References

- Amiri, F., 2009. A model for classification of range suitability for sheep grazing in semi-arid regions of Iran, *Livestock Research for Rural Development*, 21(5): 241-266.
- Avatefi Hemmat, M., T. Shamekhi, M. Zobeiry, D. Reza Arab & M. Ghazi

۲/۰۶ بوده و دلیل مشاهده تنوع ژنتیکی درون جمعیتی بالا را می‌توان جریان ژنی بالا در داخل جمعیت‌ها دانست. جریان ژنی سریع در درختان عامل اصلی تنوع بالای درون جمعیتی به‌شمار می‌رود (Hamrick, 2004). با توجه به تفاوت فاحش در گرادیان جغرافیایی و ارتفاعی جمعیت‌های موجود در این پژوهش و درصد پایین تنوع بین جمعیتی به‌نظر می‌رسد جریان ژنی در بین جمعیت‌های مختلف به‌دلیل خود ناسازگاری و دگرآمیزی در این گونه بسیار سریع اتفاق می‌افتد.

هرگاه مقدار Fst کمتر از ۰/۰۵ باشد، نشان‌دهنده وجود تمایز کم، مقدار بین ۰/۰۵ تا ۰/۱۵ نشان‌دهنده تمایز متوسط، مقدار بین ۰/۱۵ تا ۰/۲۵ نشان‌دهنده تمایز بالا و مقدار بالای ۰/۲۵ نشان‌دهنده تمایز ژنتیکی خیلی بالا در بین جمعیت‌ها است. در این بررسی مقدار متوسط Fst، ۰/۱۱ بود.

نتایج آزمون AMOVA در این بررسی براساس Fst حاکی از تنوع ژنتیکی بالای درون جمعیتی (۹۷ درصد) و در عین حال تنوع ژنتیکی پایین بین جمعیتی (سه درصد) است. تمایز پایین بین جمعیتی بیانگر این مطلب است که بیشتر تنوع ژنتیکی درون جمعیتی است که احتمالاً به‌دلیل هم‌آمیزی بیشتر بین جمعیت‌هاست (Gharghani et al., 2009).

هیبریداسیون در این جنس به‌دلیل فقدان موانع تولیدمثلی بین‌گونه‌ای، خود ناسازگاری طبیعی و کشت سیب در نواحی که جوامع وحشی آن به‌طور طبیعی مستقر شده‌اند، رخ می‌دهد (Harris and Piersol,

- Tabatabaei, 2013. The reasons for the destruction of the forest: the study of the mental models of experts Natural resources and local people using the method System dynamics, *Journal of Forest and Wood Products*, 66(1): 39-54. (In Persian)
- Bassam, B. J., G. Caetano-Anollés & P. M. Gresshoff, 1991. Fast and sensitive silver



- staining of DNA in polyacrylamide gels, *Analytical biochemistry*, 196(1): 80-83.
- Coart, E., X. Vekemans, M. J. Smulders, I. Wagner, J. Van Huylenbroeck, E. Van Bockstaele & I. Roldán-Ruiz, 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(4): 845-857.
  - Farrokhi, J. & L. Naseri, 2012. Diversity Survey of Some Iranian Native and Exotic Apples (*Malus* × *Domestica*) Cultivars Using Ssr Markers, *Agricultural Biotechnology*, 10 (2): 27-34. (In Persian)
  - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2015. FAO statistics database on the World Wide Web <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID0567#ancor>. Accessed 27 July 2015.
  - Galli, Z., G. Halász, E. Kiss, L. Heszky & J. Dobránszki, 2005. Molecular identification of commercial apple cultivars with microsatellite markers, *HortScience*, 40(7): 1974-1977.
  - Garkava-Gustavsson, L., A. Kolodinska Brantestam, J. Sehic & H. Nybom, 2008. Molecular characterisation of indigenous Swedish apple cultivars based on SSR and S-allele analysis, *Hereditas*, 145(3): 99-112.
  - Gharghani, A., Z. Zamani, A. Talaie, N. C. Oraguzie, R. Fatahi, H. Hajnajari, C. Wiedow & S. E. Gardiner, 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(6): 829-842.
  - Goto, A., M. Akahori, H. Okamoto, M. Minami, N. Terauchi, Y. Haruhata, M. Obazawa, T. Noda, M. Honda & A. Mizota, 2009. Genetic analysis of typical wet-type age-related macular degeneration and polypoidal choroidal vasculopathy in Japanese population, *Journal of ocular biology, diseases, and informatics*, 2(4): 164-175.
  - Hamrick, J. L., 2004. Response of forest trees to global environmental changes, *Forest ecology and management*, 197(1-3): 323-335.
  - Harris, C. M. & A. G. Piersol, 2002. Harris' shock and vibration handbook (Vol. 5). New York: McGraw-Hill.
  - Henzler-Wildman, K. A., M. Lei, V. Thai, S. J. Kerns, M. Karplus & D. Kern, 2007. A hierarchy of timescales in protein dynamics is linked to enzyme catalysis, *Nature*, 450(7171): 913.
  - Hokanson, S. C., A. K. Szewc-McFadden, W. F. Lamboy & J. R. McFerson, 1998. Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus* × *domestica* Borkh. Core subset collection, *Theoretical and Applied Genetics*, 97(5-6): 671-683.
  - Honnay, O. & H. Jacquemyn, 2007. Susceptibility of common and rare plant species to the genetic consequences of habitat fragmentation, *Conservation Biology*, 21(3): 823-831.
  - Ignatov, A. & A. Bodishevskaya, 2011. *Malus*. In Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources (pp. 45-64). Springer Press, Berlin, Heidelberg.
  - Juniper, B. E., R. Watkins & S. A. Harris, 1999. The origin of apple, *Journal of Acta Hort*, 484: 27-33.
  - Khodadost, A., H. Yousefzadeh, N. Amirchakhmaghi, H. Abdollahi & A. Hosseinzadeh Colagar 2016. Genetic Diversity of *Malus orientalis* in Hyrcanian Forest Using ISSR-PCR Markers, *Journal of Cellular and Molecular Research*, 29(4): 359-369. (In Persian)
  - Larsen, A. S., C. B. Asmussen, E. Coart, D. C. Olrik & E. D. Kjær, 2006. Hybridization and genetic variation in Danish populations of European crab apple (*Malus sylvestris*), *Tree Genetics & Genomes*, 2(2): 86-97.
  - Murray, M. G. & W. F. Thompson, 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA, *Nucleic acids research*, 8(19): 4321-4326.
  - Naghshin, F., M. S. Bahar, A. Tabatabaei & H. Hajnajari, 2008. Evaluation of Genetic Diversity of "Golab" Apple Genotypes Using Microsatellite (SSR) Markers, *Iranian Journal of Horticultural Science and Technology*, 9(2): 69-82. (In Persian)
  - Nasiri, M., R. Yari & A. Abedini, 2015. The Study of Genetic Variation of *Malus orientalis* Plant Using Rapid-PCR in Lorestan Province, *International Journal of Review in Life Science*, 5: 192-202.

- Potts, S. M., Y. Han, M. A. Khan, M. M. Kushad, A. L. Rayburn & S. S. Korban, 2012. Genetic diversity and characterization of a core collection of Malus germplasm using simple sequence repeats (SSRs), *Plant molecular biology reporter*, 30(4): 827-837.
- Reim, S., A. Höltnen & M. Höfer, 2013. Diversity of the European indigenous wild apple (*Malus sylvestris* (L.) Mill.) in the East Ore Mountains (Osterzgebirge), Germany: II. Genetic characterization, *Genetic resources and crop evolution*, 60(3): 879-892.
- Urrestarazu, J., C. Miranda, L. G. Santesteban & J. B. Royo, 2012. Genetic diversity and structure of local apple cultivars from Northeastern Spain assessed by microsatellite markers, *Tree genetics & genomes*, 8(6): 1163-1180.
- Vahedi, A. A., A. R. Bijani & E. Khatib-Nia, 2016. Spatial analysis and long-term dynamics for above-ground biomass of Caspian poplar (*Populus caspica* Bornm.) in developmental stages of natural stands in Nour Forest Park, *Forest Research and Development*, 2(3): 257-271.
- Van Treuren, R., H. Kemp, G. Ernsting, B. Jongejans, H. Houtman & L. Visser, 2010. Microsatellite genotyping of apple (*Malus domestica* Borkh.) genetic resources in the Netherlands: application in collection management and variety identification, *Genetic Resources and Crop Evolution*, 57(6): 853-865.
- Vranckx, G., H. Jacquemyn, J. Mergeay, K. Cox, V. Kint, B. Muys & O. Honnay, 2014. Transmission of genetic variation from the adult generation to naturally established seedling cohorts in small forest stands of pedunculate oak (*Quercus robur* L.), *Forest Ecology and Management*, 312: 19-27.
- Wang, H., X. E. Wang, P. Chen & D. Liu, 2007. Assessment of genetic diversity of Yunnan, Tibetan, and Xinjiang wheat using SSR markers, *Journal of Genetics and Genomics*, 34(7): 623-633.
- Wright, K. A., 1979. *Trichinella spiralis*: an intracellular parasite in the intestinal phase, *The Journal of parasitology*, 441-445.
- Zhuang, Y., H. T. Liu, C. M. Li, Y. Wang, Y. B. Zhao, D. M. Chen, Z. H. Han & X. Z. Zhang, 2011. Inheritance of and molecular markers for susceptibility of *Malus domestica* to fruit ring rot (*Botryosphaeria dothidea*), *Journal of Phytopathology*, 159(11-12): 782-788.

## Genetic diversity of wild apple (*Malus orientalis* Uglitz.) in hyrcanian Forests of Iran by SSR markers

R. Rostami<sup>1</sup>, N. Seyedi<sup>\*2</sup> and H. Yousefzadeh<sup>3</sup>

1- M.Sc. of Forestry, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Urmia, I. R. Iran. (roya4871@gmail.com)

2- Asistant Professor, Department of Forestry, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Urmia, I. R. Iran. (n.seyedi@urmia.ac.ir)

3- Asistant Professor, Department of Environment, Faculty of Natural Resources, Tarbiat Modares University, Noor, I. R. Iran. (h.yousefzadeh@modares.ac.ir)

Received: 13.01.2018

Accepted: 23.05.2018

### Abstract

Apple (*Malus orientalis*) has been distributed throughout the Hyrcanian forest from lowland regions to steep and mountainous areas. For evaluation of genetic diversity, leaf materials were collected from 60 individuals of 6 populations. DNA was extracted and studied by six SSR primers: (GD142), (GD12), (GD147), (GD96), (GD100) and (GD162). The results showed that 45 alleles with 0.39 heterozygosity were detected for six primers. The mean of heterozygosity was 0.39 and the lowest (0) and highest amount (1) were observed for (GD100) in “Afratakhte”, “kudir”, “Sourdar”, “Yoush bala”, “Yoush paein” population and for GD162 in “kudir”, “asalem”, “yoush miani” and “yoush paein” populations, respectively. The maximum Nei genetic distance was belonged to “asalem” and “sourdar” populations and the minimum was related to “Yoush bala” and “asalem”. The result of AMOVA indicated that the intra and inter population diversity were 97% and 3%, respectively that indicated significant diversity within population of this species. Because of different habitat conditions and long geographical distance among populations, The low genetic differentiation and similar heterozygosity within populations show high gene flow among populations of *Malus orientalis* in north of Iran.

**Keywords:** Hardy–Weinberg principle, Heterozygosity, Microsatelites markers.

---

\* Corresponding author

Tel: +984432770489

