

بررسی روابط ژنتیکی ارقام و ژنوتیپ های سیب ایران با گونه های وحشی جنس سیب و نمونه هایی از ارقام و پایه های قدیمی سیب از سایر نقاط جهان به کمک نشانگرهای ریز ماهواره (شفاهی)

علی قرقانی (۱)، ذبیح الله زمانی (۱)، علیرضا طلایی (۱)، نادوزی ان. اوراگوزی (۲)، محمد رضا فتاحی مقدم (۱)، حسن حاج نجاری (۳) و سوزان ای. گاردینر (۴)

۱- به ترتیب دانشجوی دکترا، دانشیار، استاد و استاد یار گروه علوم باغبانی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ۲- اسیستانت پروفیسور دانشگاه ایالتی واشنگتن، ۳- استاد یار بخش باغبانی مؤسسه اصلاح و تهیه بذر و نهال، کرج، ۴- پروفیسور بخش ژنومیکس مؤسسه تحقیقات باغبانی نیوزیلند

چکیده

برای روشن شدن نقش سرزمین ایران در اهلی شدن، تکامل و نقل و انتقال سیب، روابط ژنتیکی مجموعه ای مشتمل بر ۱۵۹ رقم و ژنوتیپ اهلی و وحشی سیب، شامل ارقام و ژنوتیپ های بومی ایران، تعدادی از گونه های وحشی منتخب و همچنین ارقام و پایه های قدیمی سیب از نقاط مختلف جهان مورد بررسی قرار گرفت. برای استخراج اطلاعات و پارامترهای ژنتیکی، تمامی مواد گیاهی به شش جمعیت تقسیم شدند و DNA تمامی نمونه های گیاهی با ۹ نشانگر ریز ماهواره انتخاب شده از مطالعات قبلی غربال گری شدند. از داده های آللی ریز ماهواره ها برای برآورد پارامترهای ژنتیکی جمعیت شامل: محاسبات آماری تغییرات ژنتیکی، محاسبات آماری رایت (Wrights F-statistics)، جریان ژن، تشابه ژنتیکی، فاصله ژنتیکی و نهایتاً آنالیز خوشه با استفاده از نرم افزار پاپ جین نسخه ۱/۳۲ استفاده شد. نتایج نشان داد که تمامی مکان های ریز ماهواره درجات بالایی از چند شکلی را به نمایش گذاشته اند و جمعیت های مورد ارزیابی نیز از نظر شاخص های تنوع آللی اختلافات قابل توجهی با همدیگر دارند. محاسبات آماری رایت و به خصوص جریان ژن نشان داد که، تنوع و تغییرات ژنتیکی درون جمعیت ها بسیار بیشتر از بین جمعیت هاست. برآورد تشابه و فاصله ژنتیکی جمعیت ها و همچنین دندرو گرام حاصل از آنالیز خوشه به روش میانگین ریاضی گروه های جفتی وزن نشده (UPGMA) نشان داد که جمعیت ارقام و ژنوتیپ های ایران، ارتباط ژنتیکی بسیار نزدیک تری با جمعیت های دو گونه وحشی *M. sieversii* از آسیای میانه (شرق ایران) و *M. orientalis* بومی شوروی سابق و ترکیه (در شمال و شمال غرب ایران) در مقایسه با جمعیت سایر گونه های وحشی داشت. ارقام قدیمی از نقاط مختلف جهان نیز ارتباط ژنتیکی نزدیک تری به ترتیب با ارقام و ژنوتیپ های ایران و گونه های وحشی *M. orientalis* و *M. sieversii* نسبت به سایر گونه های وحشی داشتند. براساس این نتایج به نظر می رسد که سیب های بومی ایران می تواند حد واسط ارقام اهلی و گونه های وحشی مهم در تکامل سیب باشد و ایران به عنوان یکی از مراکز مهم تنوع ژنتیکی سیب اهلی بوده و همچنین یکی از بازیگران اصلی در اهلی شدن، تکامل و نقل و انتقال سیب از آسیای میانه به غرب می باشد.

مقدمه

سیب تحت کشت امروزی با نام علمی (*Malus x domestica* Borkh.) یک مجموعه تاکسونومیک^۱ پیچیده ای است که تمام انواع تحت کشت جنس سیب (*Malus*) را در بر می گیرد. اگرچه منازعه در مورد منشاء واقعی سیب اهلی هنوز ادامه دارد و محققین در تکامل سیب اهلی گونه های متعددی را دخیل می دانند، اما مقبول ترین نظریه که عمدتاً بر پایه مدارک متعدد حاصل از مطالعات مورفولوژیکی و مولکولی است، گونه *M. sieversii* (Ledeb.) Roem. از

¹- Taxonomic

آسیای میانه را محتمل ترین نامزد برای نیای مادری سیب اهلی می داند (روبینسون^۲ و همکاران، ۲۰۰۱ و هریس و همکاران، ۲۰۰۲). شایان ذکر است که کشت و کار سیب در گذشته های بسیار دور از آسیای میانه به سمت غرب حرکت کرده و در طول انشعابات مختلف جاده ابریشم^۳ گسترش پیدا کرد. به عنوان مثال اعتقاد بر این است که کشت و کار سیب قبل از قرن نهم پیش از میلاد به یونان منتقل شده و بعد از آن توسط رومی ها در سراسر منطقه مدیترانه و اروپای مرکزی گسترش پیدا کرد (پونمارنکو، ۱۹۸۷). اما سؤال این است که سیب چگونه از آسیای میانه به غرب رسید؟ واقعیت هایی مثل سابقه تاریخی روشن، نزدیکی جغرافیایی ایران به آسیای میانه به عنوان مهمترین منشاء پیدایش و مرکز تنوع مورد اتفاق نظر سبب، عبور خط اصلی جاده ابریشم از سرزمین ایران و وجود ارتباطات متعدد سیاسی، نظامی و اقتصادی بین ایران و شرق و غرب از گذشته های بسیار دور، می تواند بیانگر نقش تعیین کننده و فعال ایران در اهلی شدن، تکامل و نقل و انتقال سیب باشد. باید متذکر شد که علی رغم اذعان محققین به نقش ایران در این فرایند (هریس و همکاران، ۲۰۰۲؛ جنیک، ۲۰۰۵ و مادج و همکاران، ۲۰۰۸) و وجود مستندات تاریخی و ادبی بسیار کهن دال بر کشت و کار سیب در ایران از گذشته های دور، ولی آنچنان که باید و شاید نقش ایران به طور جدی مطرح نشده و در هیچ یک از مطالعات متعدد قبلی توسط محققین خارجی از منابع ژنتیکی ایران استفاده نشده است. بنابراین برای روشن شدن نقش سرزمین ایران در اهلی شدن، تکامل و نقل و انتقال سیب، در یک مطالعه جامع روابط ژنتیکی مجموعه ای از ارقام و ژنوتیپ های اهلی و وحشی سیب، شامل ارقام و ژنوتیپ های بومی ایران، تعدادی از گونه های وحشی منتخب و همچنین ارقام و پایه های قدیمی سیب از نقاط مختلف جهان مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

برای این منظور ارزیابی روابط ژنتیکی مجموعه ای مشتمل بر ۱۵۹ رقم و ژنوتیپ اهلی و وحشی سیب به شرح جدول ۱ مورد توجه قرار گرفت. در انتخاب گونه های وحشی تأکید روی گونه های *M. sieversii* از قزاقستان، که به طور وسیع به عنوان نیای مادری اصلی سیب اهلی مورد اتفاق نظر می باشد، و *M. orientalis* از روسیه و ترکیه که، به عنوان یکی از نیای احتمالی، اما با اهمیت کمتر سیب اهلی از آن یاد می شود، بود که به ترتیب پراکنش آنها در سمت مرزهای شرقی و غربی ایران واقع شده است. در انتخاب ارقام قدیمی نیز تأکید اصلی روی کشور هایی مثل آمریکا، روسیه و کشور های اروپایی بود که به خاطر روابط سیاسی و اقتصادی نزدیکتر با ایران حداقل در چندین قرن اخیر، احتمال تبادلات گیاهی فی مابین بیشتر بوده است. برای سهولت مقایسه و انجام محاسبات آماری و با توجه به نزدیکی مکانی و گیاه شناختی، این مجموعه گیاهی در قالب شش جمعیت مجزا (جدول ۱) گروه بندی شد.

استخراج DNA از نمونه های برگ و تخمین غلظت DNA موجود در نمونه ها براساس دستور العمل تهیه شده توسط گاردینر و همکاران (۱۹۹۶) در آزمایشگاه تهیه نقشه های ژنتیکی موسسه تحقیقات باغبانی کشور نیوزیلند واقع در شهر پالمستون نورث^۴ انجام گرفت. تعداد ۱۰ نشانگر ریز ماهواره که عمدتاً متعلق به گروه های لینکاژی متفاوتی نیز بودند، بر اساس میزان چند شکلی آنها و قابلیت استفاده در دامنه وسیعی از گونه های سیب انتخاب شدند (لیبهارد و همکاران، ۲۰۰۲؛ سلتون و همکاران، ۲۰۰۸). واکنش PCR در حجم کلی ۱۵ میکرو لیتر با یک برنامه مشابه تاج داون^۵ برای تمامی مکان های ریز ماهواره و به شرح زیر انجام شد (سلتون و همکاران، ۲۰۰۸). برای تعیین طول آلل ها از یک

^۲- Robinson

^۳- Silk Trade Route

^۴- Palmerston North

^۵- Touch down

دستگاه توالی یاب اتوماتیک DNA از نوع ABI 377^۶ استفاده شد. سپس به کمک نرم افزار ژن اسکن^۷ نسخه ۲ و براساس استاندارد درونی استفاده شده، اطلاعات باند های موجود روی ژل آنالیز و استخراج می شد. از داده های آلی جهت محاسبه پارامتر های ژنتیکی جمعیت شامل شاخص های تغییرات، تنوع، تمایز ژنتیکی، همسانی و فاصله ژنتیکی و همچنین جریان ژن با استفاده از نرم افزار پاپ جین^۸ نسخه ۱/۳۲ (یه^۹ و همکاران، ۱۹۹۷) استفاده شد.

نتایج و بحث

به طور کلی بر اساس تمامی شاخص های تنوع آلی و ژنتیکی (جدول ۱)، مجموع جمعیت های مورد مطالعه از تنوع ژنتیکی نسبتاً بالایی برخوردار بودند (میانگین $n_e = 6/8$ ، میانگین $H_e = 0/83$ و میانگین $I = 2/17$). جمعیت سایر گونه های وحشی بالاترین میزان تغییرات و تنوع ژنتیکی را داشت ($n_e = 6/95$ ، $H_e = 0/$ و $I = 2/07$) و این در حالی است که جمعیت پایه های رویشی سبب کمترین تغییرات و تنوع ژنتیکی را به خود اختصاص داد ($n_e = 4/26$ ، $H_e = 0/76$ و $I = 1/63$). البته جمعیت گونه *M. orientalis* نیز با اندکی تفاوت بعد از جمعیت پایه های رویشی سبب قرار داشت. بر اساس شاخص های بحث شده تغییرات و تنوع ژنتیکی جمعیت ارقام و ژنوتیپ های ایران تقریباً در حد جمعیت های ارقام قدیمی خارجی و گونه *M. sieversii* بود (جدول ۱). با توجه به اینکه بیشتر شاخص های تغییرات و تنوع ژنتیکی، متأثر از اندازه جمعیت هستند، بنابراین جمعیت های کوچکتر (جمعیت گونه *M. orientalis* و پایه های رویشی سبب) مقادیر کمتر این شاخص ها را به خود اختصاص دادند. جمعیت سایر گونه های وحشی نیز خود شامل دامنه وسیعی از افراد متعلق به بیش از ۱۰ گونه مختلف سبب می باشد که بسیار متنوع هستند، بنابراین انتظار می رفت که بالاترین مقادیر این شاخص ها را به خود اختصاص دهد.

به طور کلی مقادیر محاسبه شده برای شاخص های تمایز و وضعیت هتروزیگوسیتی جمعیت ها و مکان های ریزوماهواره بویژه شاخص F_{ST} و جریان ژن، بیانگر مقدار کم تمایز بین جمعیت های مورد مطالعه می باشد. به این معنی است که بخش عمده (بیش از ۹۰ درصد) تغییرات و تنوع ژنتیکی مربوط به داخل جمعیت ها بوده و تنها بخش کوچکی (کمتر از ۱۰ درصد) از این تغییرات و تنوع ژنتیکی مربوط به تغییرات بین جمعیتی است. این مسئله بیانگر اختلاط ژنتیکی نسبتاً زیاد بین و میان جمعیتی و وجود روابط ژنتیکی نسبتاً بالای اغلب جمعیت های مورد بررسی با همدیگر می باشد. برآورد تشابه و فاصله ژنتیکی جمعیت ها و همچنین دندرو گرام حاصل از آنالیز خوشه به روش میانگین ریاضی گروه های جفتی وزن نشده (UPGMA) نشان می دهد که جمعیت ارقام و ژنوتیپ های ایران، ارتباط ژنتیکی بسیار نزدیک تری با جمعیت های دو گونه وحشی *M. sieversii* از آسیای میانه (شرق ایران) و *M. orientalis* بومی شوروی سابق و ترکیه (در شمال و شمال غرب ایران) در مقایسه با جمعیت سایر گونه های وحشی دارد. ارقام قدیمی از نقاط مختلف جهان نیز ارتباط ژنتیکی نزدیک تری به ترتیب با ارقام و ژنوتیپ های ایران و گونه های وحشی *M. sieversii* و *M. orientalis* نسبت به سایر گونه های وحشی دارند (شکل ۱). براساس این نتایج به نظر می رسد که سبب های بومی ایران می تواند حد واسط ارقام اهلی و گونه های وحشی مهم در تکامل سبب باشد و ایران به عنوان یکی از مراکز مهم تنوع ژنتیکی سبب اهلی و همچنین یکی از بازیگران اصلی در اهلی شدن، تکامل و نقل و انتقال سبب از آسیای میانه به غرب می باشد.

^۶- PE Applied Biosystem, Foster City, CA, USA

^۷- Gene Scan (PE Applied Biosystems)

^۸- Pop Gene

^۹- Yeh

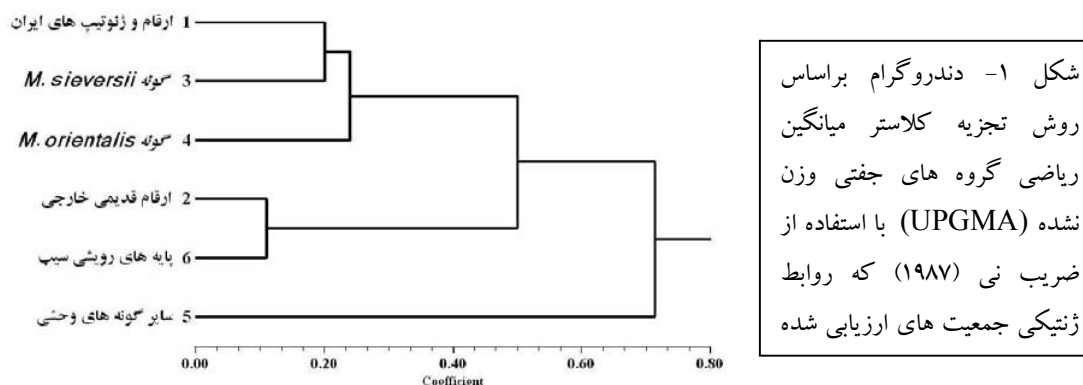
منابع

- Celton, J-M, D.S. Tustin, D. Chagné, and S.E. Gardiner. 2008. Construction of a dense genetic linkage map for apple rootstocks using SSRs developed from *Malus* ESTs and *Pyrus* genomic sequences. Tree Genetics and Genomes Online First DOI 10.1007/s11295-008-0171-z.
- Gardiner, S.E., H.C.M. Bassett, C. Madie and D.A.M. Noiton, 1996. Isozyme, random amplified polymorphic DNA (RAPD), restriction fragment-length polymorphism (RFLP) markers to deduce a putative parent for the 'Braeburn' apple. J. Am. Soc. Hort. Sci. 121: 996-1001.
- Harris, S.A., J.P. Robinson and B.E. Juniper. 2002. Genetic clues to the origin of the apple. Trends in Genetics 18: 426-430.
- Janick, J. 2005. The origins of fruits, fruit growing, and fruit breeding. Plant Breeding Reviews. 25: 255-320.
- Liebhard R, L. Gianfranceschi, B. Koller, C.D. Ryder, R. Tarchini, E. van de Weg and C. Gessler. 2002. Development and characterisation of 140 new microsatellites in apple (*Malus x domestica* Borkh.). Molecular Breeding 10: 217-241.
- Mudge, K., J. Janick, S. Scofield, and E. Goldschmidt. 2008. A history of grafting. Horticultural Reviews, Vol. 35: 437-493.
- Ponomarenko, V. 1987. History of *Malus domestica* Borkh., origin and evolution. (In Russian) Bot. J. USSR. 176:10-18.
- Robinson, J. P., S. A. Harris, and B. E. Juniper. 2001. Taxonomy of the genus *Malus* Mill. (Rosaceae) with emphasis on the cultivated apple, *Malus domestica* Borkh. Plant Syst. Evol. 226:35-58.
- Yeh, F.C., R.C. Yang and T. Boyle. 1997. POPGENE. CIFOR and University of Alberta, Canada, Version 1.21.

جدول ۱- خلاصه ای از پارامتر های ژنتیکی محاسبه شده برای مکان های ریزوماهواره و جمعیت های مورد ارزیابی

مکان ریزوماهواره	اندازه نمونه	n_b	n_e	I	H_o	H_e	F_{is}	F_{IT}	F_{ST}	N/n	
CH03d12	۱۵۷	۱۵	۸/۸۳	۲/۳۳	۰/۷۷	۰/۸۹	۰/۰۶۱	۰/۱۱۵	۰/۰۵۹	۳/۹۷	
CH05e03	۱۴۹	۲۲	۷/۴۲	۲/۳۷	۰/۴۵	۰/۸۶	۰/۴۰۱	۰/۴۴۰	۰/۰۶۴	۳/۶۷	
CH03d07	۱۵۱	۲۵	۱۱/۲۷	۲/۷۲	۰/۸۷	۰/۹۱	۰/۰۳۳	۰/۰۸۳	۰/۰۵۹	۳/۹۵	
CH05c07	۱۵۴	۱۶	۹/۷۴	۲/۴۲	۰/۸۶	۰/۹۰	۰/۰۲۷	۰/۰۹۶	۰/۰۷۴	۳/۱۳	
CH04a12	۱۵۲	۱۷	۶/۵۳	۲/۲۳	۰/۶۶	۰/۸۵	۰/۱۹۶	۰/۲۳۹	۰/۰۶۱	۳/۸۵	
CH03e03	۱۵۴	۲۰	۳/۴۷	۱/۸۸	۰/۴۷	۰/۷۱	۰/۱۹۸	۰/۳۵۲	۰/۱۴۲	۱/۵۱	
CH02a08	۱۴۸	۱۵	۵/۸۰	۲/۱۱	۰/۴۹	۰/۸۳	۰/۳۸۳	۰/۴۶۰	۰/۱۰۸	۲/۰۷	
NZmsEB146613	۱۴۳	۱۲	۴/۱۲	۱/۶۵	۰/۵۰	۰/۷۶	۰/۲۷۱	۰/۴۶۴	۰/۱۵۳	۱/۳۸	
NZmsEB134379	۱۵۷	۱۱	۴/۰۴	۱/۶۳	۰/۶۱	۰/۷۵	۰/۲۱۹	۰/۲۷۶	۰/۰۷۸	۲/۹۴	
میانگین	۱۵۱	۱۷	۶/۸۰	۲/۱۷	۰/۶۳	۰/۸۳	۰/۱۹۷	۰/۲۴۹	۰/۰۸۷	۲/۹۴	
جمعیت ها	= تعداد آل مشاهده شده										
۱- ارقام و ژنوتیپ های	۴۸	۱۰/۶۷	۵/۲۰	۱/۸۴	۰/۶۳	۰/۷۸	۰/۲۰۲				تعداد آل مؤثر
ایران											

قدیمی	۲- ارقام خارجی	۳۹	۱۰/۸۹	۵/۲۸	۱/۸۴	۰/۶۸	۰/۸۸	۰/۱۱۷	۱ = شاخص اطلاعات شانون
M.	۳- گونه <i>sieversii</i>	۲۳	۹/۳۳	۵/۷۲	۱/۸۰	۰/۶۲	۰/۸۷	۰/۱۸۵	H ₀ = هموزیگوسیتی مشاهده شده H _e = هموزیگوسیتی مورد انتظار
M.	۴- گونه <i>orientalis</i>	۱۰	۷/۲۲	۵/۱۴	۱/۶۲	۰/۵۱	۰/۸۶	۰/۲۹۸	F _S = ضریب خودگشتی
های وحشی	۵- سایر گونه های وحشی	۲۱	۱۱/۱۱	۶/۸۵	۲/۸۷	۰/۶۰	۰/۸۶	۰/۳۷۴	F _{IT} = ضریب خودگشتی کل F _{ST} = ضریب تمایز
روشنی	۶- پایه های روشن سبب	۱۸	۷/۶۷	۴/۲۶	۱/۶۳	۰/۶۷	۰/۸۶	۰/۱۰۹	N _m = جریان ژن



Abstract

in order to shed light on the role of Iran in apple evolution and domestication, we chose to investigate the relationships of a collection of 159 accessions of wild and domesticated apples including Iranian indigenous apple cultivars and landraces, selected wild species, and old apple scion and rootstock cultivars from different parts of the world. The accessions were assigned into six arbitrary populations for the purpose of generating information on genetic parameters and nine simple sequence repeat (SSR) loci selected from previous studies in apple were screened over DNA extracted from all the accessions. The SSR allelic data were then used for estimation of population genetic parameters, including genetic variation statistics, F-statistics, gene flow, genetic identity, genetic distance and then cluster analysis using POPGENE 1.32 software. Results showed that all SSR loci displayed a very high degree of polymorphism and investigated populations showed noticeable differences in genetic diversity parameters. The F-statistics and gene flow in particular, showed that there was more intra-population than between population's variation. The genetic identity and genetic distance estimates, and the dendrogram generated from the unweighted pair group arithmetic average (UPGMA) method of cluster analysis showed that the Iranian cultivars and landraces were more closely related to *M. sieversii* from Central Asia (east of Iran) and *M. orientalis* native to Turkey and Russia than to other accessions of *Malus* species. Also, the old apple cultivars from different parts of the world had a closer genetic relationship to *M. sieversii*, *M. orientalis* and the Iranian apples, than to other wild species. Based on these results, it is suggested that the Iranian apples may occupy an intermediate position between the domesticated varieties and wild species. Also it is proposed that Iran could be one of the main centers of diversity for domestic apples and also one of the major players in apple domestication, evolution and its transfer from Central Asia to the western countries.