غربالگری سیب جنگلی (*Malus orientalis Uglitz.*) به بیماری لکه سیاه سیب و سفیدک پودری در یک گرادیان ارتفاعی در غرب جنگل هیرکانی

نرجس امیرچخماقی[۱]، حامد یوسف‌زاده[۲*]، بتول حسین‌پور[۳]، کامبیز اسپهبدی[۴] و مجید الداغی[۵]

[۱] **ایران، نور، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده منابع طبیعی، گروه جنگل‌شناسی و اکولوژی جنگل**

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

[۳] **ایران، تهران، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی، پژوهشکده کشاورزی، گروه تولیدات گیاهی و کشاورزی پایدار**

[۴] **ایران، ساری، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان مازندران**

[۵] **ایران، ساری، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان مازندران**، بخش تحقیقات گیاهپزشکی

تاریخ دریافت: ۹۶/۸/۶ تاریخ پذیرش: ۹۷/۸/۱۵

چکیده

استفاده از ژرم پلاسم وحشی و شناسایی ژنوتیپ‌های مقاوم به بیماری، راهکاری کارآمد جهت کاهش خسارت‌های اقتصادی ناشی از بروز بیماری‌های قارچی در رقم‌های زراعی است. دراین تحقیق، به‌منظور بررسی حضور ژن‌های مقاومت به دو بیماری لکه سیاه سیب و سفیدک پودری در سیب جنگلی، سه جمعیت سیاه بیل، ماسال و اسالم در یک گرادیان ارتفاعی در غرب جنگل هیرکانی انتخاب شدند. پس از استخراج DNAی ژنومی، غربالگری حضور نه ژن مقاومت به این دو بیماری (شش ژن *Vf*، *Vr*، *Vr1*، Vr2، *Vm*و *Vbj* مربوط به بیماری لکه سیاه سیب و سه ژن *Pl-1*، *Pl-w* و *Pl-d* مربوط به بیماری سفیدک پودری) صورت پذیرفت. نتایج نشان داد که برای بیماری لکه سیاه سیب، تمامی شش ژن مورد مطالعه در هر سه جمعیت (بجز ژن *Vf* در جمعیت سیاه بیل) حضور داشتند و ژن‌های *Vr* و *Vf* به ترتیب بیشترین و کمترین میزان حضور را در درختان مورد مطالعه را داشتند. همچنین برای بیماری سفیدک پودری، تنها ژن (*Pl-d*) در هر سه جمعیت مشاهده شد. ژن *Pl-w* در برخی از درختان اسالم وجود داشت، در حالی‌که ژن *Pl-1* در هیچکدام از درختان (جمعیت‌های مورد مطالعه) مشاهده نشد. نتایج این تحقیق حاکی از غنای بالای ژن‌های کاندید مقاومت به بیماری لکه سیاه سیب و حضور اندک ژن‌های کاندید مقاومت به بیماری سفیدک پودری در جمعیت‌های سیب غرب هیرکانی است. این امر بیانگر آسیب‌پذیری بالای جمعیت‌های مورد مطالعه به‌ویژه جمعیت‌های واقع در ارتفاعات پایین‌تر در صورت شیوع بیماری سفیدک پودری می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: جنگل‌های هیرکانی، سیب وحشی، لکه سیاه سیب، سفیدک پودری

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

مقدمه

یکی از اهداف کلیدی در مطالعات علوم زیستی پیش‌بینی تغییرات تنوع زیستی در پاسخ به تغییرات اقلیم جهانی است (۶، ۲۰، ۲۱، ۴۸ و ۵۰)، که به کاهش آثار تخریب انسانی، کاهش آسیب به جوامع بیولوژیکی (۴۴ و ۴۸) و حفاظت از منابع ژنتیکی (۲۶) منتهی می‌گردد. از جمله اثرات تغییرات اقلیمی می‌توان به شیوع پاتوژن‌های جدید و در نهایت انقراض گونه‌ها (۳۳) و یا تهدید پایداری اکوسیستم‌های کشاورزی (۴) اشاره کرد. تعیین میزان شیوع

پاتوژن‌ها و حساسیت جمعیت‌های میزبان نکته کلیدی در مدیریت پایدار ژرم‌پلاسم‌های موجود به شمار می‌رود.

کاربرد برنامه‌های اصلاحی در زمان بروز جدی تغییرات اقلیمی، که منجر به تغییرات پیچیده و عمیق در ارتباط با شیوع یا شدت بیماری قارچی می‌گردد، بسیار حائز اهمیت است (۵، ۱۱، ۲۹، ۳۴ و ۵۷). در این برنامه‌ها غالباً جمعیت‌های شاخص ازنظر ژنتیکی برای بهبود سازگاری محلی کولتیوارها یا افزایش مقاومت آن‌ها به عوامل بیماری‌زا از بین پایه‌های مقاوم به بیماری در جمعیت‌های وحشی انتخاب شده و مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۵).

ایران یکی از مهمترین هات اسپات‌های تنوع زیستی در منطقه خاورمیانه به شمار می‌رود (۴۱). سیب وحشی قفقازی (*Malus orientalis*) دارای گسترش وسیعی در سرتاسر منطقه قفقاز (شامل آذربایجان، ارمنستان، ایران و پاکستان) و عموماً در نواحی میان‌بند به بالا می‌باشد. در ایران این‌گونه در جنگل هیرکانی از ارتفاعات پایین‌بند تا بالابند، در ارسباران و ناحیه رویشی زاگرس گسترش دارد (۵۹).

سیب وحشی به دلیل کاربرد میوه آن به‌عنوان غذای محلی، نوشیدنی و دارو از گونه‌های بسیار مهم جنگلی منطقه قفقاز به شمار می‌رود (۳۲ و ۳۷). ازآنجایی‌که پیش‌بینی‌های تغییرات اقلیمی جهانی بیانگر شرایط آب و هوایی غیرقابل پیش‌بینی به همراه سیلاب‌ها و خشکسالی‌های مکرر و شدید می‌باشد (۳)، تهدید جمعیت‌های سیب وحشی دراین مناطق خطری جدی محسوب می‌شود. مطالعات صورت پذیرفته براساس نشانگرهای ماهواره‌ای بر روی چندین جمعیت سیب وحشی در قفقاز (۱۷، ۱۸، ۵۵ و ۵۶) بیانگر تنوع ژنتیکی بالای این‌گونه در ارمنستان، آذربایجان، ترکیه و گرجستان بوده است که می‌تواند منبع مهمی برای تشکیل واحدهای حفاظتی در برنامه‌های مدیریتی به شمار رود (۵۶).

ایران یکی از ۱۰ کشور اصلی تولیدکننده سیب در دنیا به شمار می‌رود، اما حساسیت به بیماری در بسیاری از ارقام تجاری سیب منجر به کاهش شدید تولید سیب در نواحی معتدله با فصل رشد مرطوب می‌گردد (۴۶). بیماری‌های لکه سیاه سیب و سفیدک پودری با عامل قارچی *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter و *Podosphaera leucotricha* (Ellis and Everh.) E.S. Salmon از رایج‌ترین بیماری‌های سیب هستند. ژرم‌پلاسم سیب‌های وحشی می‌تواند به‌عنوان منبع جدیدی در مشارکت ژن‌های مقاومت در ارقام سیب اهلی به کار گرفته شود (۸و ۴۷)، لذا غربالگری ژن‌های مقاومت در ژرم‌پلاسم‌های وحشی برای توسعه مقاومت به بیماری در برنامه‌های اصلاحی سیب امری ضروری است (۵۶). در طی سال‌های اخیر، چندین ژن مقاومت به بیماری لکه سیاه سیب شامل *Rvi6* (*vf*) (۵۴)، *Rvi5* (*Vm*) (۱۶)، *Rvi12* (*Vb*) (۱۲)، *Rvi11* (*Vbj*) (۳۱)، *Vr* (۷) و *Rvi10* (*Va*) (۳۵) و سفیدک پودری *Pl-1* از *Malus robusta* (۳۹)، *Pl-w* از *Malus zumi* (۵۳) و *Pl-d* از ‘*White Angel*’ (۲۴) در ارقام وحشی و اهلی سیب شناسایی شده است (۱۳و ۱۴). بااین‌حال، تاکنون هیچ مطالعه متمرکزی بر روی سیب وحشی در ایران و جنگل‌های هیرکانی در ارتباط با این دو بیماری انجام‌نشده است. غربالگری حضور یا عدم حضور ژن‌های مقاومت به دو بیماری لکه سیاه سیب و سفیدک پودری باتوجه به تغییرات اقلیم جهانی ضروری است و به تعیین هدف آینده برنامه‌های حفاظتی و منابع ژنی مقاوم به این بیماری‌ها در برنامه‌های اصلاحی سیب کمک می‌کند. این مطالعه باهدف بررسی حضور و عدم حضور ژن‌های مقاومت به دو بیماری لکه سیاه سیب (شش ژن) و سفیدک پودری (سه ژن)، در جمعیت‌های سیب در سه رویشگاه (سیاه بیل، ماسال و اسالم) در گرادیان ارتفاعی (۵۰ تا ۱۸۰۰ متر ارتفاع از سطح دریا) در غرب جنگل هیرکانی با استفاده از نشانگرهای مولکولی صورت پذیرفته است.

مواد و روشها

تهیه نمونه و استخراجDNA: نمونه‌های برگ سیب از سه رویشگاه در گرادیان ارتفاعی در غرب هیرکانی شامل: رویشگاه سیاه بیل (۵۰ متر ارتفاع از سطح دریا)، ماسال (۹۰۰-۸۰۰ متر ارتفاع از سطح دریا) و اسالم (۱۸۲۴ متر ارتفاع از سطح دریا) از هشت درخت در هر جمعیت با حداقل فاصله ۱۰۰ متر از یکدیگر به روش مایلز و همکاران (۱۹۹۵) (۴۰)، تهیه شد. سپس استخراج DNA از بافت برگ نمونه‌ها با استفاده از روش موری و تامسون (۴۲) انجام شد.

غربالگری حضور و عدم حضور ژن‌های مقاومت به بیماری لکه سیاه سیب و سفیدک پودری: دراین مطالعه حضور و عدم حضور شش ژن اصلی کنترل مقاومت به بیماری لکه سیاه سیب در سیب شامل (*Vf*، *Vr*، *Vr1*، *Vr2*، *Vm*و *Vbj*) (۱۰، ۱۲، ۱۶، ۳۰، ۴۵و ۵۴) و سه ژن شناسایی شده در زمینهٔ مقاومت به بیماری سفیدک پودری در سیب شامل (*Pl-1*، *Pl-w* و *Pl-d*) (۳۶، ۲۴و ۳۹) مورد بررسی قرارگرفت. اطلاعات مربوط به ژن‌ها، توالی آغازگر، نوع آغازگر و اندازه قطعات در جدول یک ارائه شده است. واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر با کیت Accu Power HotStart PCR Premix (بیونیر، کره جنوبی) انجام شد. سیکل PCR مورد استفاده در تکثیر نشانگرها براساس منابع و مطالعات ذکر شده در جدول۱ صورت پذیرفت. محصول نهایی PCR توسط ژل آگارز ۲ درصد و ژل پلی‌اکریل آمید شش درصد الکتروفورز شدند و اتیدیوم بروماید و نیترات نقره (۶) به ترتیب در هرکدام برای رنگ‌آمیزی ژل‌ها مورد استفاده قرارگرفت (۵۱). حضور و عدم حضور باندها در هر نمونه با کد صفر و یک ثبت شد. درصد و میانگین حضور ژن‌های مقاومت به دو بیماری در جمعیت‌های مورد مطالعه، بر اساس میانگین باندهای مشاهده‌شده مربوط به نشانگرهای مرتبط با ژن‌های مقاومت با استفاده از نرم‌افزار Excel 2013 محاسبه شد.

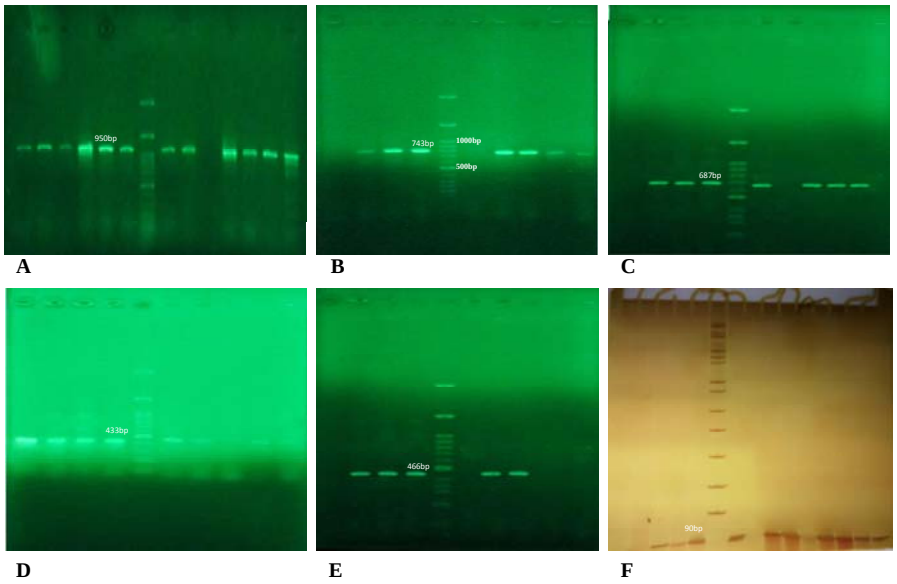
نتایج

در این مطالعه برای نخستین بار حضور چندین ژن مقاومت به دو بیماری لکه سیاه سیب و سفیدک پودری در سه جمعیت سیب وحشی، در سه رویشگاه سیاه‌بیل، ماسال و اسالم، در گرادیان ارتفاعی غرب جنگل هیرکانی مورد بررسی قرارگرفته است.

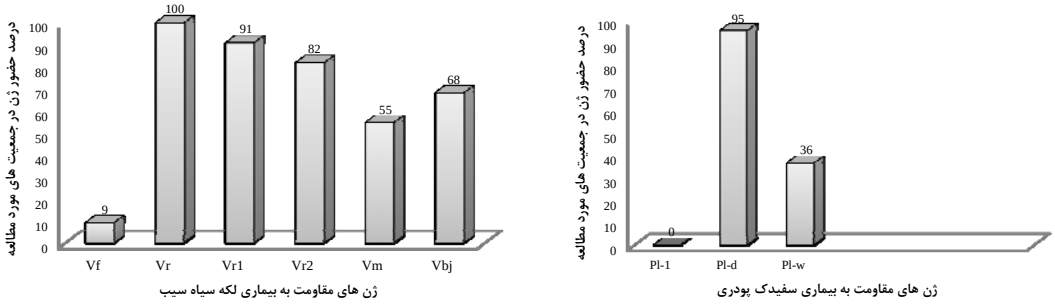
جدول۱- لیست ژن‌ها و آغازگرهای مورد استفاده برای غربالگری مقاومت به بیماری لکه سیاه سیب (scab) و سفیدک پودری (powdery mildew) در *Malus orientalis*

نام ژن	نام نشانگر	توالی آغازگر	نوع نشانگر	اندازه قطعه (جفت باز)	منبع
Vr	OPL 19	5-ACCTGCACTACAATCTTCACTAATC-3 5-GACTCGTTTCCACTGAGGATATTTG-3	SCAR	۴۳۳	(۱۲)
Vr1	AD13	5-GGT TCC TCT GTA AAG CTA G -3 5-GGT TCC TCT GCC CAA CAA-3	SCAR	۹۵۰	(۱۰)
Vr2	Ch02c02	5-CTT CAA GTT CAG CAT CAA GAC AA-3 5-TAG GGC ACA CTT GCT GGT C-3	SSR	۱۷۶	(۴۵)
Vbj	K08	5-GAA CAC TGG GCA AAG GAA AC-3 5-TAA AAG CCA CGT TCT CTC GC-3	SCAR	۷۴۳	(۳۱)
Vm	Vm	5-CCTTGACGCAGCTT-3 5-CCTTGACGCATCTACG-3	SCAR	۶۸۷	(۱۶)
Vf	VfT	5-TGGAAGAGAGATCCAGAAAGTG-3 5-CATCCCTCCACAAATGCC-3	SCAR	۴۶۶	(۵۴)
Pl-w	EM 02	5-CTGCAGACTGTTTGTAAGT TGG-3 5-AACTCCTTGATTTCTCCTATTGTT-3	SCAR	۲۵۰	(۲۴)
Pl-d	EMDM 01	5-AGGATAATAATCTATCTTGTAAAGG-3 5-CCATTCAGCCCAACGAGT-3	SCAR	۹۰	(۳۶)
Pl-1	OPAT 20	5-ACA TCAGCC C-3	RAPD	۴۵۰	(۳۹)

تصاویر مربوط به الکتروفورز حاصل از تکثیر نشانگرهای مرتبط با ژن‌های مقاومت با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در شکل ۱ ارائه شده است. در نتایج بدست آمده براساس نشانگرهای مولکولی مربوط به ژن‌های مقاومت به بیماری لکه سیاه سیب در سه جمعیت مورد مطالعه ژن *Vr* و *Vf* به ترتیب بیشترین و کمترین میزان حضور را در پایه‌های مورد مطالعه دارا بودند (شکل ۲). این درحالی است که حضور تمامی شش ژن مورد مطالعه در ارتباط با این بیماری در هر سه جمعیت، بجز ژن *Vf* در جمعیت سیاه‌بیل، قابل‌مشاهده بود (شکل ۳).



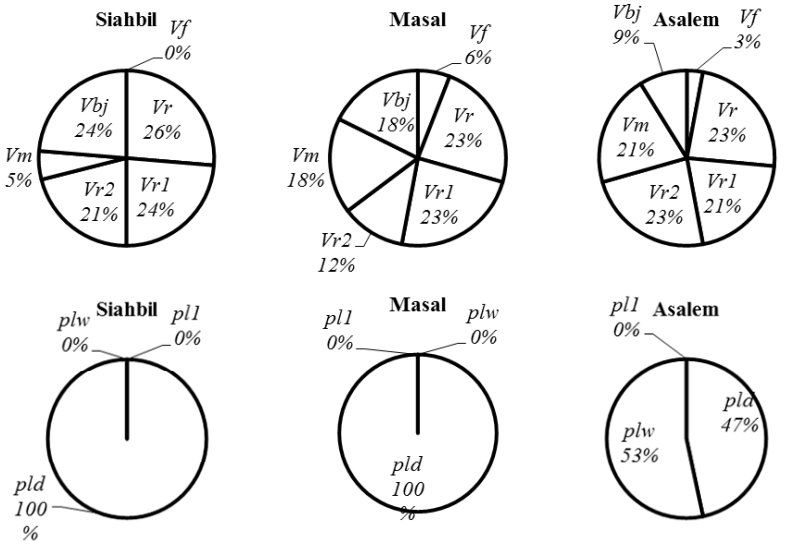
شکل ۱- الکتروفورز حاصل از PCR نشانگرهای مرتبط با ژن‌های مورد مطالعه: شکل‌های بالا مربوط به باندهای حاصل از تکثیر نشانگرهای مرتبط با ژن‌های *Vr1*(A)، *Vbj* (B) و *Vm* (C) و سه شکل پایین مربوط به باندهای حاصل از تکثیر نشانگرهای مرتبط با ژن‌های *Vr* (D)، *Vf* (E) و *pl-d* (F) در جمعیت‌های سیب وحشی مورد مطالعه می‌باشد.



شکل ۲- میانگین درصد حضور ژن‌های مقاومت به دو بیماری در جمعیت‌های مورد مطالعه: نمودار سمت چپ بیماری لکه سیاه سیب و سمت راست بیماری سفیدک پودری

حضور ژن *Vf* در کمتر از ۳۰ درصد پایه‌های دو جمعیت اسالم و ماسال مشاهده شد در حالیکه هیچکدام از پایه‌های جمعیت سیاه‌بیل (ارتفاع پایین‌بند) این ژن را به همراه نداشتند. بیشترین میزان حضور در بین ژن‌های مقاومت به این بیماری مربوط به ژن *Vr* بود به‌طوری که حضور آن در تمامی هشت پایه مورد مطالعه در هر سه جمعیت ثبت شد. بالاترین میزان حضور ژن‌های *Vr2* و *Vm* در جمعیت اسالم (بالابند)، ژن *Vr1* در جمعیت ماسال (میان‌بند) و *Vbj* نیز در جمعیت سیاه‌بیل (پایین‌بند) مشاهده شد. برخلاف فراوانی بالای ژن‌های مقاومت به بیماری لکه سیاه سیب، از

بین ژن‌های مربوط به بیماری سفیدک پودری تنها حضور ژن (*Pl-d*) در هر سه جمعیت مشاهده شد. این ژن در تمام پایه‌های مربوط به جمعیت‌های سیاه‌بیل و ماسال و در بیش از ۸۰ درصد پایه‌های جمعیت اسالم حضور داشت، در حالیکه تنها همگی پایه‌های مربوط به جمعیت اسالم ژن *Pl-w* را به همراه داشتند (شکل۳). حضور ژن *Pl-d* نیز در هیچکدام از جمعیت‌های مورد مطالعه مشاهده نشد.



شکل ۳- درصد حضور ژن‌های مقاومت به دو بیماری در هر جمعیت به تفکیک: سه شکل بالا:بیماری لکه سیاه سیب و سه شکل پایین بیماری سفیدک پودری

بحث

دراین مطالعه برای نخستین بار حضور ژن‌های مقاومت به بیماری‌های لکه سیاه سیب و سفیدک پودری در جمعیت‌های سیب وحشی در منطقه هیرکانی ایران مورد بررسی قرارگرفته است. مطالعات قبلی دراین زمینه تاکنون بر روی سیب اهلی (*Malus domestica*) (۱۴و ۱۹) و سایر گونه‌های سیب وحشی (مثل *M. baccata, M. sieversii, M. prunifolia, M. robusta*) (۲۷) و بر روی *M. orientalis* در ترکیه و روسیه (۵۲ و ۵۶) متمرکز بوده است.

براساس نتایج به‌دست‌آمده در ارتباط با بیماری لکه سیاه سیب، اکثر پایه‌های مورد مطالعه چندین ژن مقاومت را به‌طور همزمان دارا بودند. این سطح بالای مقاومت به بیماری لکه سیاه سیب در برخی جمعیت‌های *M.orientalis* در حوزه دریای سیاه سابقاً گزارش‌شده است (۵۶). تاکنون تنها ژن مقاومت *Vf* در برنامه‌های اصلاحی مورد استفاده قرارگرفته است (۳۸). نتایج تحقیق حاضر، سیب وحشی ناحیه هیرکانی در دامنه پراکنش خود را به‌عنوان منبعی ناشناخته از ژن‌های مقاومت به بیماری لکه سیاه سیب اثبات می‌کند. برخلاف حضور گسترده و همزمان ژن‌های مقاومت به بیماری لکه سیاه سیب در جمعیت‌های مورد مطالعه، پایه‌های اندکی در جمعیت‌های تحت مطالعه، ژن‌های مقاومت به بیماری سفیدک پودری را به همراه داشتند. ژن (*Pl-d*) در هر سه جمعیت سیاه‌بیل (در۱۰۰ درصد پایه‌ها)، ماسال (در۱۰۰ درصد پایه‌ها) و اسالم (در۸۷/۵ درصد پایه‌ها) مشاهده شد در حالیکه از دو ژن دیگر تنها ژن *Pl-w* در جمعیت اسالم (در۱۰۰ درصد پایه‌ها) حضور داشت. نتایج بدست آمده دراین مطالعه بر نتایج تحقیقات قبلی (۴۶)، که به تنوع گسترده حضور ژن‌های مقاومت به بیماری لکه سیاه سیب و حضور ژن‌های مقاومت به بیماری سفیدک پودری در تعداد محدودی از ۲۷۹ کولتیوار سیب مورد مطالعه آن‌ها اشاره

دارد، منطبق است. شناخت اکولوژی و تاریخچه تکاملی پاتوژن‌ها مستلزم مطالعات اصلاحی گسترده‌تر و انجام مطالعات تکمیلی با کاربرد نشانگرهای بیشتر و افزایش تعداد نمونه می‌باشد.

از آنجایی که یکی از پیامدهای مهم و اساسی پدیده تغییر اقلیم ظهور بیماری‌های جدید به‌واسطه تغییر در فاکتورهای اقلیمی نظیر رطوبت و دما و به‌تبع آن تغییر در لایه‌های سطحی خاک و میکروارگانیسم‌های آن می‌باشد، بررسی میزان آسیب‌پذیری جمعیت‌های موجود برای بهبود برنامه‌های مدیریتی و اصلاحی امری ضروری است. میزان استرس‌های زیستی و غیرزیستی وابسته به شرایط محیطی خصوصاً گرادیان‌های محیطی است (۱، ۲و ۴۳). گرادیان ارتفاعی به‌عنوان شرایط طبیعی ایجادکننده تغییرات در فاکتورهای اقلیمی، که در نظر گرفتن آن امکان ارزیابی تغییرات زیستی را نیز فراهم می‌کند (۵۸ و ۶۰)، ابزاری مناسب برای ارزیابی پویایی تغییرات اقلیم به شمار می‌رود (۵، ۲۸و ۴۹). مطالعات نشان داده در ارتفاعات بالاتر به دلیل تراکم کمتر میزبان و شرایط نامطلوب فاکتورهای اقلیمی مؤثر بر رشد جمعیت‌های عوامل بیماری‌زا نظیر رطوبت و گرما، میزان خسارت این عوامل بر گیاه میزبان نسبت به ارتفاعات پایین‌تر کاهش می‌یابد (۱۵و ۲۱). البته ممکن است این موضوع در مورد گونه‌هایی مانند سیب که رویشگاه اصلی آن در ارتفاعات بالابند است و تراکم بالای درختی آن در مناطق کوهستانی مشاهده می‌گردد، صادق نباشد. دراین راستا، در تحقیق حاضر با در نظر گرفتن شرایط ارتفاعی سه رویشگاه، ازنظر میانگین حضور ژن‌های مقاومت به هر دو بیماری مورد مطالعه، جمعیت اسالم (ارتفاع بالابند) وضعیت بهتری را در مقایسه با دو رویشگاه دیگر دارا است. به‌ویژه در ارتباط با بیماری سفیدک پودری که حضور ژن مقاومت آن در جمعیت‌های مورد مطالعه کمتر و بیشتر به جمعیت اسالم محدود بود. در حالیکه دو جمعیت سیاه بیل (پایین‌بند) و ماسال (میان‌بند) واقع در ارتفاعات پایین‌تر علیرغم دارا بودن تقریباً تمامی ژن‌های مقاومت به بیماری لکه سیاه سیب فاقد دو ژن از سه ژن مربوط به بیماری سفیدک پودری بودند. این امر پتانسیل بالای رویشگاه‌های مرتفع‌تر (جمعیت اسالم) را برای در نظر گرفتن آن به‌عنوان واحدهای موردنیاز برای برنامه‌های اصلاحی و مدیریتی به‌ویژه در ارتباط با بیماری سفیدک پودری در آینده آشکار می‌سازد که البته اثبات دقیق آن مستلزم انجام مطالعات گسترده‌تر با کاربرد نشانگرهای مولکولی متعدد و تعداد نمونه مورد مطالعه بیشتر می‌باشد.

درمجموع نتایج این تحقیق حاکی از غنای بالای ژن‌های کاندید مقاومت به بیماری لکه سیاه سیب و حضور اندک ژن‌های کاندید مقاومت به سفیدک پودری در جمعیت‌های سیب غرب هیرکانی بود. بنابراین احتمالاً می‌توان گفت که در صورت شیوع بیماری سفیدک پودری بخصوص جمعیت‌های ارتفاعات پایین‌تر، آسیب‌پذیر خواهند بود. براین اساس در جمعیت‌های واقع در ارتفاعات کمتر به‌ویژه در جمعیت‌هایی مانند سیاه‌بیل به دلیل استقرار در ارتفاع پایین (۵۰ متر از سطح دریا) و در شرایط ویژه محیطی مانند شرایط غرقاب و رطوبت بالا و از طرف دیگر عدم حضور ژن‌های مقاومت به این بیماری میزان آسیب‌پذیری نسبت به جمعیت اسالم (بالا بند) بیشتر خواهد بود. ازاین‌رو توجه ویژه به حفاظت این جمعیت‌ها در برابر عوامل بیماری‌زا در صورت شیوع بیماری مذکور به دلیل حساسیت بیشتر آن‌ها امری ضروری است.

اگرچه کاربرد نشانگرهای مولکولی در ارزیابی وجود ژن‌های مقاومت نسبت به بیماری در گیاهان مختلف اطلاعات ارزشمند و مفیدی را دراین راستا در اختیار محققین قرار می‌دهد، اما انجام مطالعات تکمیلی و غربالگری ارقام مختلف تجاری و وحشی در جهت تأیید نتایج موجود نیز امری ضروری است. لذا انجام تست‌های بیماری‌زایی و مطالعات گسترده‌تر بر روی جمعیت‌های وحشی مورد مطالعه در این تحقیق و ارقام تجاری مقاوم و حساس به بیماری‌های مذکور، جهت اثبات تأثیر حضور

ژن‌های مقاومت و دستیابی به نتایج قطعی و مستدل پیشنهاد می‌گردد.

منابع

۱- جهانبازی گوجانی، ح.، حسینی نصر، س. م.، ثاقب طالبی، خ.، و حجتی، س. م.، ۱۳۹۳. تأثیر تنش شوری بر فاکتورهای رویشی، پرولین، رنگیزه‌های گیاهیو جذب عناصر در اندام هوایی چهار گونه بادام وحشی، مجله پژوهش‌های گیاهی (زیست‌شناسی ایران)، ۲۷ (۵)، صفحات ۷۷۷-۷۸۷.

۲- گل‌محمدی، ف.، حسن‌زاده ناورودی، ا.، بنیاد، ا. ا.، و میرزایی، ج.، ۱۳۹۶. تأثیر برخی عوامل محیطی برشدت خشکیدگی درختان در زاگرس میانی (مطالعه موردی: تنگه دالاب، استان ایلام)، مجله پژوهش‌های گیاهی (زیست‌شناسی ایران)، ۳۰ (۳)، صفحات ۶۳۳-۶۴۳.

3- Allen, C. D., Macalady, A. K., Chenchouni, H., Bachelet, D., McDowell, N., Vennetier, M., and Gonzalez, P., 2010. A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests.Forest ecology and management, 259: 660-684.

4- Anderson, P. K., Cunningham, A. A., Patel, N. G., Morales, F. J., Epstein, P. R., and Daszak, P., 2004. Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. Trends in Ecology & Evolution, 19: 535-544.

5- Baker-Austin, C., Trinanes, J. A., Taylor, N. G., Hartnell, R., Siitonen, A., and Martinez-Urtaza, J., 2013. Emerging Vibrio risk at high latitudes in response to ocean warming. Nature Climate Change, 3: 73-77.

6- Bassam BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Analytical biochemistry. 1991;196(1):80-3.

7- Beaumont, L. J., Pitman, A., Perkins, S., Zimmermann, N. E., Yoccoz, N. G., and Thuiller, W., 2011. Impacts of climate change on the world's most exceptional ecoregions. Proceedings of the National Academy of Sciences, 108: 2306-2311.

8- Beier, C., Beierkuhnlein, C., Wohlgemuth, T., Penuelas, J., Emmett, B., Körner, C., and Hansen, K., 2012. Precipitation manipulation experiments–challenges and recommendations for the future. Ecology Letters, 15: 899-911.

9- Belfanti, E., Silfverberg-Dilworth, E., Tartarini, S., Patocchi, A., Barbieri, M., Zhu, J., and Sansavini, S., 2004. The *HcrVf2* gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101: 886-890.

10- Boudichevskaia, A., Flachowsky, H., Peil, A., Fischer, C., and Dunemann, F., 2006. Development of a multiallelic SCAR marker for the scab resistance gene *Vr1/Vh4/Vx* from R12740-7A apple and its utility for molecular breeding. Tree Genetics and Genomes, 2: 186-195.

11- Burge, C. A., Eakin, C. M., Friedman, C. S., Froelich, B., Hershberger, P. K., Hofmann, E. E., and Ford, S. E., 2014 Climate change influences on marine infectious diseases: implications for management and society. Annual Review of Marine Science, 6: 249-277.

12- Bus, V. G. M., Rikkerink, E. H. A., Van de Weg, W. E., Rusholme, R. L., Gardiner, S. E., Bassett, H. C. M., and Plummer, K. M., 2005. The *Vh2* and *Vh4* scab resistance genes in two differential hosts derived from Russian apple R12740-7A map to the same linkage group of apple. Molecular Breeding, 15: 103-116.

13- Bus, V. G., Bassett, H. C., Bowatte, D., Chagné, D., Ranatunga, C. A., Ulluwishewa, D., and Gardiner, S. E., 2010. Genome mapping of an apple scab, a powdery mildew and a woolly apple aphid resistance gene from open-pollinated Mildew Immune Selection. Tree genetics & genomes, 6: 477-487.

14- Bus, V. G., Rikkerink, E. H., Caffier, V., Durel, C. E., and Plummer, K. M., 2011. Revision of the nomenclature of the differential host-pathogen interactions of *Venturia inaequalis* and Malus. Annual Review of Phytopathology, 49: 391-413.

15- Busby, P. E., Newcombe, G., Dirzo, R., and Whitham, T. G., 2014. Differentiating genetic and environmental drivers of plant–pathogen community interactions. Journal of Ecology, 102: 1300-1309.

16- Cheng, F. S., Weeden, N. F., Brown, S. K., Aldwinckle, H. S., Gardiner, S. E., and Bus, V. G., 1998. Development of a DNA marker for *Vm*, a gene conferring resistance to apple scab. Genome, 41: 208-214.

17- Cornille, A., Gladieux, P., and Giraud, T.,2013 Crop-to-wild gene flow and spatial genetic structure in the closest wild relatives of the cultivated apple. Evolutionary Applications, 6: 737-748.

18- Cornille, A., Giraud, T., Smulders, M. J., Roldán-Ruiz, I., and Gladieux, P., 2014. The domestication and evolutionary ecology of apples. Trends in Genetics, 30: 57-65.

19- Cova, V., Lasserre-Zuber, P., Piazza, S., Cestaro, A., Velasco, R., Durel, C. E., and Malnoy, M., 2015. High-resolution genetic and physical map of the *Rvi1* (*Vg*) apple scab resistance locus. Molecular breeding, 35: 16.

20- Dawson, T. P., Jackson, S. T., House, J. I., Prentice, I. C., and Mace, G. M., 2011. Beyond predictions: biodiversity conservation in a changing climate. science, 332: 53-58.

21- Dantec, C. F., Ducasse, H., Capdevielle, X., Fabreguettes, O., Delzon, S., and Desprez-Loustau, M. L., 2015. Escape of spring frost and disease through phenological variations in oak populations along elevation gradients. Journal of Ecology, 103: 1044-1056.

22- Dillon, M. E., Wang, G., and Huey, R. B., 2010. Global metabolic impacts of recent climate warming. Nature, 467: 704-708.

23- Ebrahimi, L., Fotuhifar, K. B., Nikkhah, M. J., Naghavi, M. R., and Baisakh, N., 2016. Population Genetic Structure of Apple Scab (*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter) in Iran. PloS one, 11: e0160737.

24- Evans, K., and James, C., 2003. Identification of SCAR markers linked to *Pl-w* mildew resistance in apple. TAG Theoretical and Applied Genetics, 106: 1178-1183.

25- Feuillet, C., Langridge, P., and Waugh, R., 2008. Cereal breeding takes a walk on the wild side. Trends in Genetics, 24: 24-32.

26- Frankham, R., 2010. Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. Biological conservation, 143: 1919-1927.

27- Gao, Y., Liu, F., Wang, K., Wang, D., Gong, X., Liu, L., and Volk, G. M., 2015. Genetic diversity of Malus cultivars and wild relatives in the Chinese National Repository of Apple Germplasm Resources. Tree genetics & genomes, 11: 106.

28- Garibaldi, L. A., Kitzberger, T., and Chaneton, E. J., 2011. Environmental and genetic control of insect abundance and herbivory along a forest elevational gradient. Oecologia, 167: 117-129.

29- Garrett, K. A., Dobson, A. D. M., Kroschel, J., Natarajan, B., Orlandini, S., Tonnang, H. E., and Valdivia, C., 2013. The effects of climate variability and the color of weather time series on agricultural diseases and pests, and on decisions for their management. Agricultural and Forest Meteorology, 170: 216-227.

30- Gessler, C., Patocchi, A., Sansavini, S., Tartarini, S., and Gianfranceschi, L., 2006. *Venturia inaequalis* resistance in apple. Critical Reviews in Plant Sciences, 25: 473-503.

31- Gygax, M., Gianfranceschi, L., Liebhard, R., Kellerhals, M., Gessler, C., and Patocchi, A., 2004. Molecular markers linked to the apple scab resistance gene *Vbj* derived from *Malus baccata* jackii. Theoretical and Applied Genetics, 109: 1702-1709.

32- Hanelt, P. INSTITUTE OF PLANT GENETICS AND CROP PLANT RESEARCH (Eds.), 2001: Mansfeld's Encyclopedia of Agricultural and Horticultural Crops. Springer, Berlin etc, 1: 3716.

33- Harvell, C. D., Mitchell, C. E., Ward, J. R., Altizer, S., Dobson, A. P., Ostfeld, R. S., and Samuel, M. D., 2002. Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. Science, 296: 2158-2162.

34- Harvell, D., Altizer, S., Cattadori, I. M., Harrington, L., and Weil, E., 2009. Climate change and wildlife diseases: when does the host matter the most?. Ecology, 90: 912-920.

35- Hemmat, M., Brown, S. K., Aldwinckle, H. S., Weeden, N. F., and Mehlenbacher, S. A., 2003. Identification and mapping of markers for resistance to apple scab from'Antonovka'and'Hansen's baccata# 2'. Acta horticulturae.

36- James, C. M., Clarke, J. B., and Evans, K. M., 2004. Identification of molecular markers linked to the mildew resistance gene *Pl-d* in apple. Theoretical and applied genetics, 110: 175-181.

37- Khoshbakht, K., and Hammer, K., 2006. Savadkouh (Iran)–an evolutionary centre for fruit trees and shrubs. Genetic Resources and Crop Evolution, 53: 641-651.

38- Leˆ Van, A., Gladieux, P., Lemaire, C., Cornille, A., Giraud, T., Durel, C. E., and Le Cam, B., 2012. Evolution of pathogenicity traits in the apple scab fungal pathogen in response to the domestication of its host. Evolutionary applications, 5: 694-704.

39- Markussen, T., Krüger, J., Schmidt, H., and Dunemann, F., 1995. Identification of PCR-based markers linked to the powdery-mildew-resistance gene *Pl1* from Malus robusta in cultivated apple. Plant Breeding, 114: 530-534.

40- 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.

41- Mittermeier, R. A., Myers, N., Mittermeier, C. G., and Robles, G., 1999. Hotspots: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions. CEMEX, SA, Agrupación Sierra Madre, SC. pp.431.

42- Murray, M. G., and Thompson, W. F., 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic acids research, 8: 4321-4326.

43- Pau, S., Wolkovich, E. M., Cook, B. I., Davies, T. J., Kraft, N. J., Bolmgren, K., and Cleland, E. E., 2011. Predicting phenology by integrating ecology, evolution and climate science. Global Change Biology, 17: 3633-3643.

44- Parmesan, C., Burrows, M. T., Duarte, C. M., Poloczanska, E. S., Richardson, A. J., Schoeman, D. S., and Singer, M. C., 2013. Beyond climate change attribution in conservation and ecological research. Ecology letters, 16: 58-71.

45- Patocchi, A., Bigler, B., Koller, B., Kellerhals, M., and Gessler, C., 2004. *Vr2*: a new apple scab resistance gene. Theoretical and Applied Genetics, 109: 1087-1092.

46- Patzak, J., Paprštein, F., and Henychová, A., 2011. Identification of apple scab and powdery mildew resistance genes in Czech apple (*Malus*× *domestica*) genetic resources by PCR molecular markers. Czech J. Genet. Plant Breed, 47: 156-165.

47- Perazzolli, M., Malacarne, G., Baldo, A., Righetti, L., Bailey, A., Fontana, P., and Malnoy, M., 2014. Characterization of resistance gene analogues (RGAs) in apple (*Malus*× *domestica* Borkh.) and their evolutionary history of the Rosaceae family. PLoS One, 9: e83844.

48- Pereira, H. M., Leadley, P. W., Proença, V., Alkemade, R., Scharlemann, J. P., Fernandez-Manjarrés, J. F., and Chini, L., 2010. Scenarios for global biodiversity in the 21st century. Science, 330: 1496-1501.

49- Rasmann, S., Alvarez, N., and Pellissier, L., 2014. The Altitudinal Niche-Breadth Hypothesis in Insect-Plant Interactions. Annual Plant Reviews, 47: 339-359.

50- Salamin, N., Wüest, R. O., Lavergne, S., Thuiller, W., and Pearman, P. B., 2010. Assessing rapid evolution in a changing environment. Trends in ecology and evolution, 25: 692-698.

51- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., 1989. Molecular cloning: a laboratory manual (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.

52- Savel'ev, N. I., Lyzhin, A. S., and Savel'eva, N. N., 2016. Genetic diversity of genus Malus Mill. for scab resistance genes. Russian Agricultural Sciences, 42: 310-313.

53- Seglias, N. P., and Gessler, C., 1997. Genetics of apple powdery mildew resistance from *Malus zumi* (P/2). IOBC WPRS BULLETIN, 20: 195-208.

54- Tartarini, S., Gianfranceschi, L., Sansavini, S., and Gessler, C., 1999. Development of reliable PCR markers for the selection of the *Vf* gene conferring scab resistance in apple. Plant breeding, 118: 183-186.

55- Volk, G. M., Henk, A. D., Baldo, A., Fazio, G., Chao, C. T., and Richards, C. M., 2015. Chloroplast heterogeneity and historical admixture within the genus Malus. American journal of botany, 102: 1198-1208.

56- Volk, G. M., Richards, C. M., Reilley, A. A., Henk, A. D., Reeves, P. A., Forsline, P. L., and Aldwinckle, H. S., 2008. Genetic diversity and disease resistance of wild Malus orientalis from Turkey and Southern Russia. Journal of the American Society for Horticultural Science, 133: 383-389.

57- Wu, X., Lu, Y., Zhou, S., Chen, L., and Xu, B., 2016. Impact of climate change on human infectious diseases: Empirical evidence and human adaptation. Environment international, 86: 14-23.

58- Yarnes, C. T., and Boecklen, W. J., 2005. Abiotic factors promote plant heterogeneity and influence herbivore performance and mortality in Gambel's oak (*Quercus gambelii*). Entomologia experimentalis et applicata, 114: 87-95.

59- Yousefzadeh, H., Colagar, A. H., Akbarzadeh, F., and Tippery, N. P., 2014. Taxonomic status and genetic differentiation of Hyrcanian Castanea based on noncoding chloroplast DNA

sequences data. Tree genetics & genomes, 10: 1611-1629.

60- Zehnder, C. B., Stodola, K. W., Joyce, B. L., Egetter, D., Cooper, R. J., and Hunter, M. D., 2009. Elevational and seasonal variation in the foliar quality and arthropod community of Acer pensylvanicum. Environmental entomology, 38: 1161-1167.

Screening of wild apples (*Malus orientalis* Uglitz.) to Scab and Powdery mildew along an altitudinal gradient in the west of Hyrcanian forest

Amirchakhmaghi N.,[1] Yousefzadeh H.,[2] Hosseinpoor B.,[3] Espahbodi K.[4] and Aldaghi M.[5]

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

[2] Dept. of Environmental Science, Faculty of Natural Resources and Marine Science, Tarbiat Modares University, Noor, Mazandaran, I.R. of Iran.

[3] Dept. of Agriculture, Institute of Agriculture, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, I.R. of Iran.

[4] Mazandaran Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Sari, Iran.

[5] Dept. of Plant Protection Research, Mazandaran Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Sari, I.R. of Iran

Abstract

The use of wild germplasm and identification of resistant genotypes is an effective strategy to reduce the economic damage caused by the occurrence of fungal diseases in domesticated cultivars. In this study, three populations of wild apples in the west of Hyrcanian forest, Siahbil, Masal and Asalem were selected and the presence of resistance genes of two fire and powdery mildew diseases in trees were considered along an altitudinal gradients. After DNA extraction, screening for the presence of nine resistance genes (six genes: *Vf, Vr*, *Vr1*, *Vr2*, *Vm* and *Vbj* and the three genes: *Pl-1*, *Pl-w* and *Pl-d* associated with Scab and powdery mildew diseases, respectively) was done. The results showed that all of the six genes studied in all three populations (except for the *Vf* gene in the Siahbil population) were present and the genes. *Vr* and *Vf* had the highest and lowest levels of presence in the studied trees, respectively. Also, for powdery mildew, *Pl-d* gene was observed in all three populations. *Pl-w* gene was present in some trees of Asalem population, while *Pl-1* gene was not found in any of the trees. Our study showed the high prevalence of candidate genes for resistance to scab disease and the rare presence of candidate resistance genes to Powdery mildew in western populations of wild apple in Hyrcanian forest. This indicates a high vulnerability of the populations studied, especially populations located at lower altitudes in facing to an outbreak of powdery mildew in apple habitats.

Key words: Hyrcanian forest, *Malus orientalis*, Scab, Powdery mildew