جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد
مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۸ شماره ۱ صفحه های ۱۱۱ تا ۱۱۱ (۱۱/۷)

ارزیابی گوناگونی ژنتیکی جمعیت‌های نارون (*Ulmus* spp. L.) اصفهان با استفاده از نشانگر های RAPD و ISSR [1]

ASSESSMENT OF GENETIC DIVERSITY OF ISFAHAN ELMS (*ULMUS* SPP. L.) POPULATIONS USING RAPD AND ISSR MARKERS

بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی، مهدی رحیم‌ملک، مجید طالبی بداف، احد یامچی، نعمت اله اعتمادی و مصطفی مبلی [2]

چکیده

نارون (*Ulmus* L. spp.) از درختان مورد استفاده در فضای سبز مناطق مختلف جهان است که به وفور در فضای سبز اصفهان استفاده می شود. با توجه به مشاهده گوناگونی صفات بین درختان نارون موجود در سطح شهر اصفهان که ممکن است منشا محیطی یا ژنتیکی داشته باشد، در این پژوهش گوناگونی ژنتیکی ۲۰ نمونه مختلف نارون از نواحی مختلف شهر اصفهان با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD وISSR مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۱۰ آغازگر تصادفیRAPD ، ۷۳ نوار تکثیر نمود که ۷۰ نوار آن در بین نژادگان ها چندشکلی نشان دادند. الگوی نواربندی بر اساس وجود و عدم وجود نوارها به ترتیب با یک و صفر نشان داده شدند وداده‌ها توسط نرم افزار NTSYS (نسخه ۲/۰۲) تجزیه و تحلیل شدند. به منظور ارزیابی تشابه ژنتیکی بین نمونه ها، ضرایب تشابه مختلف مانند دایس، جاکارد و SM محاسبه شدند و سپس آزمون تطابق مانتل با هدف گزینش بهترین ضریب تشابه انجام گرفت و در نهایت دندروگرام بر اساس ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA ترسیم شد. نژادگان (DN4) در دندروگرام به دست آمده به طور کامل از سایر نمونه ها جدا شد. گروه بندی نژادگان ها نشان داد که تشابه به نسبت زیاد ژنتیکی در نمونه های هر منطقه بود. از بین ۱۶ آغازگر ISSR مورد استفاده، ۷ آغازگر چندشکلی قابل قبولی نشان دادند و در مجموع ۱۱۷ نوار چندشکل تولید نمودند. پس از تجزیه خوشه ای نژادگان ها، دو نمونه DN4 وAN5 از سایر نمونه ها جدا شدند که نشان دهنده تفاوت ژنتیکی این دو نمونه با سایرین می‌باشد. تجزیه به مولفه های اصلی نیز نتایج تجزیه خوشه ای را تایید نمود. نتایج به دست آمده از ترکیب داده های دو نشانگر در بیشتر موارد، نتایج به دست آمده از نشانگرها را به صورت انفرادی تایید نمود که می تواند به دلیل تشابه نسبی نتایج به دست آمده از تجزیه و تحلیل مستقل هر یک از نشانگرها باشد. نتایج کلی این پژوهش نشان داد که درختان ناحیه جنوبی اصفهان دارای یکنواختی ژنتیکی بیشتری هستند.

واژه های کلیدی: گوناگونی ژنتیکی، نارون، ISSR، RAPD

۱- تاریخ دریافت: ۸۶/۴/۱۳ تاریخ پذیرش: ۸۶/۸/۳۰

۲- به ترتیب دانشیار گروه بیوتکنولوژی ، دانشجویان دکتری گروه زراعت و اصلاح نباتات گرایش ژنتیک مولکولی، استادیار و دانشیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، جمهوری اسلامی ایران.

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

مقدمه

نارون (*Ulmus* spp. L.) از درختان مورد استفاده فضای سبز مناطق مختلف جهان است که بـه تقریـب در تمام شرایط آب و هوایی و جغرافیایی می روید (۱). رشد سریع، افزایش آسـان، تحمـل در برابـر آسـیب هـای فیزیکی، زیبایی و سایه دهی این درخت، سبب استفاده گسترده آن در فضای سبز شـهری شـده اسـت (۱). تعـداد چهار گونه نارون از مناطق مختلف ایران گزارش شده است (۲) که طبق آمار سازمان پارک ها و فضای سبز شهر اصفهان در سال ۱۳۷۸، سه گونه و واریته گیاه شناسی آن شامل گونـه‌هـای اوجـا یـا وسـک[۱]، نـارون چتـری[۲] و نارون مجنون[۳] در فضای سبز اصفهان وجود دارد (۱). وسک گونه غالب درختان نـارون اصـفهان را تشـکیل مـی دهد.

با توجه به پیشرفت‌های زیاد در نشانگرهای مختلف مولکولی، به نظر می‌رسـد اسـتفاده از ایـن روش‌هـا برای دسته بندی و تعیین دقیق تر شناسه گونه ها و رقم های گوناگون نارون در ایران و بررسی روابـط ژنتیکـی آن‌ها کمک شایانی نماید. در سال‌های اخیر پژوهش های اندکی در خارج از کشور برای بررسی گوناگونی ژنتیکی و مورفولوژیک گونه ها و رقم های نارون صورت پذیرفته است. این بررسی ها بر اساس نشانگرهای بیوشیمیایی شامل آیزوزایم ها (۵) و فلاونوئیدها (۱۱، ۱۲) و همچنین نشانگرهای DNA از جمله RAPD[۴] (۸)، AFLP[۵] (۱۰) و SSR[۶] (۶، ۱۳) انجام گرفته است.

جفرز[۷] (۷) گوناگونی مورفولوژیک برگ های جنس نارون را مورد بررسی قـرار داد. نتـایج او نشـان داد که جمعیت های نـارون دارای گونـاگونی پیوسـته و نزدیکـی مـی باشـند. ایـن گونـاگونی مورفولوژیـک پیوسـته، شناسایی رقم ها و گونه‌های این جنس را برای گیاه شناسان مشکل ساخته اسـت. کوگولـودو و همکـاران[۸] (۵) از نشانگرهای بیوشیمیایی آیزوزایم برای شناسایی نارون‌های اسپانیا استفاده نمودند. سه مکان آیزوزایمی بـین دو گونه *U. minor* Miller. و *U. pumila* L. توانسـت نـارون هـای بـومی و دورگـه را از یکـدیگر متمـایز نمایـد. کامالای و همکاران[۹] (۸) در بررسی گوناگونی ژنتیکی نارون آمریکایی (*U. americana* L.) با استفاده از نشانگر ملکولی RAPD نشان دادند که میزان چند شکلی در جمعیت های مختلف این گونـه نـارون بسـیار بالاسـت و ایـن گوناگونی را تا حدودی مرتبط به ماهیت چهارگانی (تتراپلوئیـدی) ایـن گونـه دانسـتند. پـولر و تانسـند[۱۰] (۱۰) بـه بررسی گوناگونی ژنتیکی ۴۳ جمعیت نارون (شامل ۱۹ جمعیت از گونه نارون آمریکایی و ۲۴ جمعیت از گونه‌های دیگر)، با استفاده از نشانگر AFLP پرداختند. نتایج این پژوهش در شناسایی برخی از دورگه ها اسـتفاده شـد و نارون جفرسن که یک همگروه (کلون) جدید نارون بود، منشاء آن آمریکا تشخیص داده شد. ویتلـی و همکـاران[۱۱] (۱۳) نشانگرهای ریزماهواره ای را در نارون سفید[۱۲] اروپایی طراحی نمودند. همچنـین سـایر گونـه هـای جـنس نارون را با استفاده از نشانگرهای طراحی شده مورد بررسی قرار دادند. کولادا و همکاران[۱۳] (۶) پنج ریزمـاهواره از گونه *U. minor* Miller طراحی نمودند. این آغازگرها ۳۰ نمونه جمعیتی نارون از شش جمعیت اسـپانیایی را متمایز ساختند. سه آغازگر از پنج آغازگر طراحی شده در گونه های *U. laevis* و *U. glabra* نیز کـارآیی خـود را نشان دادند.

۱- U. *carpinifolia* Borkh ۲- *U. carpinifolia* var. *umbraculifera* Rehd ۳- *U. glabra* Huds. var. *pendula*

٤- Random Amplified Polymorphic DNA ۵- Amplified Fragment Length Polymorphism

٦- Simple Sequence Repeat ۷- Jeffers ۸- Cogolludo *et al.* ۹- Kamalay *et al.*

۱۰- Pooler and Townsend ۱۱- Whiteley *et al.* ۱۲- *U. laevis* Pall ۱۳- Collada *et al.*

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

گونه *U. carpinifolia* Borkh دارای میوه فندقه بالدار واژ تخم مرغی پهن، با طول ۲-۵/ ۱سانتیمتر، گوشوارک ریزان، اغلب بدون کرک، برگ بیضی تا واژتخم مرغی، نوک تیز، قاعده مورب، حاشیه اره ای مضاعف، سطح تحتانی بدون کرک و لبه نامتقارن می باشد، نظر به وجود صفات مورفولوژیکی بسیار نزدیک به هم و با توجه به درصد بالای خودگشنی در نارون و از طرفی مشاهده گوناگونی برخی صفات مانند میزان رشد، تحمل به آفات و بیماری های رایج در منطقه بین درختان نارون موجود در سطح شهر اصفهان که ممکن است منشا محیطی یا ژنتیکی داشته باشد، در پژوهش حاضر تلاش شد که گوناگونی ژنتیکی تعدادی از این درختان از گونه *U. carpinifolia* Borkhبا استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR[1] بررسی و مورد مقایسه قرار گیرند تا در تصمیم‌گیری‌های آینده در مورد بهنژادی و گزینش نمونه های یکنواخت تر در فضای سبز موثر باشد.

مواد و روش ها

در این پژوهش چهار ناحیه مختلف شهر اصفهان (شمال، جنوب، غرب و شرق) انتخاب و از هر ناحیه جمعیتی شامل۶-۴ نمونه از گونه *U. carpinifolia* Borkh که از نظر صفات مختلف مانند میزان رشد، تحمل به آفات و بیماری های رایج در سطح شهر و شکل برگ و غیره تنوع نشان می دادند، انتخاب گردیدند. در نهایت ۲۰ نمونه از درختان انتخاب شده جهت آزمایش های مولکولی مورد استفاده قرار گرفتند. نمونه‌های برگی برداشت شده از هر درخت در نیتروژن مایع منجمد گردیدند و تا پیش از استخراج DNA در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

به دلیل وجود مواد پلی ساکاریدی و فنولی فراوان در گیاه نارون، استخراج DNA به روش های معمول و گزارش شده بازدهی مناسبی نداشت، بنابراین برای حذف آلودگی های پلی ساکاریدی در این پژوهش روشی برای استخراج DNA ابداع شد که شامل استفاده از دو بافر حاوی CTAB در دو مرحله مجزا و در ادامه برای حذف پلی ساکاریدهای بدون بار با چگالی بالا و همچنین RNA هایی با وزن مولکولی بالا (mRNA, rRNA) و پروتئین های خطی از نمک کلرید لیتیم با غلظت بالا (۲/۵ -۲ مولار) استفاده شد. در این روش ابتدا ۱۰۰ میلی گرم برگ به کمک نیتروژن مایع در هاون چینی پودر شد و پس از افزودن یک میلی لیتر بافر هضم کننده [شامل بتا-مرکاپتواتانول (۰/۴٪)، PVP 40000 (۲٪)، EDTA pH:8 (۲۰ میلی مولار)، Tris pH:8 (۱۰۰ میلی مولار)، NaCl (۱/۴ میلی مولار) و CTAB (۱٪)] به مدت ۳۰ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس نمونه ها در ۱۸۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه (۲۵ درجه سانتی گراد) سانتریفوژ شدند و هم حجم روشناور (فاز بالایی) برداشته شده، کلروفرم- ایزوآمیل الکل (۱:۲۴) اضافه شد و ۳۰ ثانیه به آرامی تکان داده شد و در ۱۸۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاهی سانتریفوژ شد. پس از آن ۲۰۰ میکرولیتر بافر CTAB (5% CTAB 0.7M NaCl)به روشناور (فاز بالایی) برداشته شده، افزوده شد و در ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد که هر ۵ دقیقه محتویات لوله تکان داده می شد. پس از ۳۰ دقیقه دوباره با کلروفرم- ایزوآمیل الکل (۱:۲۴) خالص سازی گردید و DNA موجود با هم حجم ایزوپروپانل رسوب داده شد. پس از دور ریختن ایزوپروپانول، رسوب به دست آمده در ۶۰۰ میکرولیتر آب مقطر سترون حل شد و سپس ۲۰۰ میکرولیتر کلرید لیتیم ۸ مولار اضافه شد و به مدت ۱۲ ساعت در ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. نمونه ها در ۱۸۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه سانتریفوژ شدند. در پایان با دو سوم حجم ایزوپروپانل رسوب داده شدند و پس

۱- Inter Simple Sequence Repeat

از دور ریختن ایزوپروپانول و شستشوی رسوب به دست آمده با الکل ۷۰٪ و خشک کردن نمونه‌ها، به رسوب DNA، ۵۰-۳۰ میکرولیتر آب مقطر سترون افزوده شد. کمیت و کیفیت DNA به دست آمده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز و همچنین اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر (به منظور تایید نتایج) اندازه‌گیری شد.

آزمایش های RAPD بر اساس روش ویلیامز و همکاران[۱] (۱۴) با تغییرات جزیی انجام شد. در این پژوهش از آغازگرهای شرکت اپرون (جدول ۱) استفاده گردید. آنزیم *Taq* پلیمراز و مخلوط نوکلئوتیدها (dNTPs) به اضافه بافر واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)[۲] از شرکت Roche تهیه شد. برای هر آمیخته واکنش، مقدار ۲ میکرولیتر از DNA تهیه شده با غلظت ۲۵ نانوگرم در میکرولیتر (در مجموع ۵۰ نانوگرم DNA) به ۲۳میکرولیتر از مخلوط واکنش PCR شامل Taq پلیمراز (۰/۷۵ واحد)، آغازگر (۰/۴μM)، کلرید منیزیم (۲mM)، مخلوط نوکلئوتیدها (۰/۲mM)، بافر PCR (۱X) و آب دوبار تقطیر سترون اضافه گردید که در پایان حجم محلول واکنش PCR به ۲۵ میکرولیتر رسید. پس از افزودن یک قطره روغن معدنی سترون آمیخته موجود به سرعت تحت واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه ترموسیکلر[۳] (Biometra مدل T-1) با برنامه دمایی مناسب قرار گرفت. واکنش PCR شامل دو دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد برای دناتوره کردن اولیه و پس از آن ۴۰ چرخه با دمای ۹۲ درجه سانتی گراد یک دقیقه، ۳۵ درجه سانتی گراد یک دقیقه و ۷۲ درجه سانتی گراد دو دقیقه و در پایان به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد قرار گرفت.

پس از انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز، به محتویات واکنش هر لوله مقدار سه میکرولیتر بافر بارگذاری افزوده شد و آمیخته به دست آمده در چاهک‌های ژل آگاروز ۱/۲٪ با بافر TBE ریخته شد. نمونه‌ها به مدت حدود چهار ساعت با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت الکتروفورز شدند. پس از این مرحله، ژل به مدت ۱۵ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید (۰/۵ میلی گرم بر لیتر) رنگ‌آمیزی شد و سپس توسط دستگاه عکس برداری از ژل (مدلUVIDOC F-590)، مشاهده قطعات تکثیر یافته DNA تحت نور فرابنفش و عکس برداری از ژل صورت گرفت.

آزمایش های ISSR با استفاده از آغازگرهای مکمل با توالی‌های ریزماهواره‌ای همراه با یک نوکلئوتید اضافی در انتهای '۳ یا '۵ شامل $(AG)_8T$، $(AG)_8YT$، $(AG)_8C$، $(GA)_8C$، $(GA)_8T$، $T(AG)_9$ و سه نوکلئوتید لنگری در انتهای'۵ آغازگر $CCA(CT)_8$ انجام گرفت. مقدار ۲ میکرولیتر از DNA تهیه شده با غلظت ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر (۲۰ نانوگرم DNA) به ۱۳ میکرولیتر از مخلوط واکنش PCR شامل *Taq* پلیمراز (۱ واحد)، آغازگرها (۱۰ pmol)، کلرید منیزیم (۲mM)، مخلوط نوکلئوتید (۰/۲mM)، فرمامید (۳٪)، بافر PCR (۱X) و آب دوبار تقطیر سترون افزوده شد و در پایان حجم محلول واکنش PCR به ۱۵ میکرولیتر رسید (۳). واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر اپندورف (Mastercycler gradient) با برنامه حرارتی یک سیکل ۳ دقیقه ای در ۹۴ درجه سانتی گراد و ۳۵ سیکل ۳۰ ثانیه ای در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۱ دقیقه در ۴۸-۵۲ درجه سانتی گراد بر حسب نوع آغازگر، یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد و مرحله تکثیر نهایی با ۳ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد. پس از انجام PCR مواد به دست آمده از مرحله قبل را با حجم مساوی (۱۰ میکرولیتر) از بافر بارگذاری فرمامید (۹۶٪ فرمامید، ۱۰mM EDTA، ۰/۲۵٪ برومونفل بلو و ۰/۲۵٪ زایلن سیانول) مخلوط نموده و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد نگهداری شد و سپس به سرعت روی یخ قرار داده شد. به منظور مشاهده الگوی نواری از ژل پلی اکریل آمید ۶٪ واسرشته با هفت مولار اوره استفاده گردید. قبل از بارگذاری

۱- Williams *et al.* ۲- Polymerase Chain Reaction ۳- Thermocycler

نمونه‌ها و به منظور رسیدن دمای ژل به حدود ۵۰ درجه سانتی گراد، الکتروفورز مقدماتی با دستگاه الکتروفورز عمودی Biometra مدل S2 به مدت ۳۰ دقیقه با توان ثابت ۱۰۰ وات و در دمای ۵۰-۵۵ درجه سانتی گراد صورت گرفت. الکتروفورز محصولات PCR نیز در همان شرایط و به مدت دو ساعت انجام شد. پس از الکتروفورز، رنگ آمیزی ژل به روش نیترات نقره (۴) انجام گرفت.

به منظور تجزیه و تحلیل نتایج، نوارهای چندشکل به دست آمده بر اساس وجود و عدم وجود نوارها به ترتیب با یک و صفر نشان داده شدند. گروه‌بندی نژادگان ها با استفاده از ضریب تشابه جاکارد[۱] و الگوریتم UPGMA انجام شد. پس از تشکیل ماتریس تشابه، محاسبات آماری با استفاده از نرم افزار NTSYS (نسخه ۲/۰۲) تکمیل گردید.

نتایج و بحث

در این پژوهش با استفاده از ۱۰ آغازگر تصادفیRAPD در مجموع تعداد ۷۳ نوار (محدوده ۳۰۰ تا ۲۵۰۰ جفت باز) به دست آمده شد که از این بین، ۷۰ نوار آن در بین دو یا چند نمونه چندشکلی نشان دادند (جدول ۱). از بین آغازگرهای مورد استفاده، آغازگر OPA16 و OPB10 هر کدام با ۱۰ نوار، بیشترین تعداد نوار و آغازگر MG16 با ۲ نوار، کمترین تعداد نوار را تولید نمودند. نام آغازگرها، تعداد نوارهای تولید شده توسط هر آغازگر و میزان چندشکلی آن ها در جدول ۱ آمده است. از بین ۱۶ آغازگر ISSR مورد استفاده، ۹ آغازگر نوارهای واضحی تولید نکردند و تنها ۷ آغازگر چندشکلی قابل قبولی نشان دادند (جدول ۲). در این پژوهش از آغازگرهای ترکیبی به علت وضوح پایین نوارها استفاده نشد. هفت آغازگر مورد نظر در مجموع ۱۹۶ نوار تشکیل دادند که ۱۱۷ نوار چندشکل بودند. بیشترین تعداد نوار چندشکل متعلق به آغازگر $CCA(CT)_8$ با ۳۲ نوار (۸۰٪) و کمترین تعداد نوار چندشکل متعلق به آغازگر$(AG)_8C$ با ۶ نوار (۴۳٪) بود و میانگین درصد چندشکلی در نشانگرهای مورد استفاده ۵۷/۱۴٪ به دست آمد (جدول۲). در میان آغازگرهای انتخاب شده، آغازگر $T(AG)_9$ بیشترین نوار تک شکل (۲۰ نوار) را در مقایسه با سایرآغازگرها نشان داد. در این پژوهش آغازگر $CCA(CT)_8$ که دارای ۳ نوکلئوتید اضافی در انتهای '۵ خود بود، تعداد نوار چند شکل بیشتری تولید نمود که با نتایج پرادیپ و همکاران (۹) مطابقت داشت. این پژوهشگران نیز به این نتیجه رسیده بودند که اگر از آغازگرهای اضافی در قسمت'۵ استفاده شود، قطعات تکثیر شده بیشتر و در نتیجه میزان چندشکلی بیشتری به دست آمده خواهد شد (۹). در مقابل، کوهی و همکاران (۳) در بررسی تنوع ژنتیکی رقم های زیتون اشاره نمودند که به طور معمول آغازگرهایی که دارای نوکلئوتیدهای اضافی در قسمت'۳ خود هستند نوارهای با وضوح بیشتر در مقایسه با آغازگرهایی که دارای نوکلئوتیدهای اضافی در قسمت'۵ خود هستند ایجاد می‌کنند. پرادیپ و همکاران (۹) عنوان نمودند که آغازگرهای با نوکلئوتیدهای اضافی در انتهای '۳ شبیه آغازگرهای اختصاصی عمل کرده و به نقاط خاصی ازDNA الگو متصل می شوند و الگوی نواری با وضوح بالاتر ولی تعداد نوار کمتر تولید می‌کنند. محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) برای کل نشانگرهای مورد استفاده در دامنه ۰/۵- ۰/۰۹۵ و با میانگین ۰/۳۳۲ به دست آمد.

۱- Jaccard ۲- Unweighted Pair Group Mathematical Average ۳- Pradeep *et al.*

جدول۱- تعداد نوارهای چندشکل و درصد چندشکلی مشاهده شده در ۲۰ نمونه نارون با استفاده از نشانگر RAPD.

Table 1. Number of polymorphic and total bands and polymorphism percentages in elm acessions using RAPD marker.

درصد چندشکلی Polymorphism %	تعداد کل نوار Total bands	تعداد نوار چندشکل No. of polymorphic bands	تعداد نوار تک شکل No. of monomorphic bands	نام آغازگر Primer name
100	7	7	0	OPA11
100	10	10	0	OPA16
100	7	7	0	OPA18
100	10	10	0	OPB10
100	9	9	0	OPAD02
100	8	8	0	OPAD04
87.5	8	7	1	OPAE13
100	8	8	0	OPC16
66.6	6	4	2	OPP02
100	2	2	0	MG16
–	75	72	3	مجموع (Sum)
95.41	7.3	7.2	0.3	میانگین (Mean)

جدول۲- تعداد نوارهای چندشکل و کل و درصد چندشکلی مشاهده شده در نمونه نارون با استفاده از نشانگر ISSR.

Table 2. Number of polymorphic and total bands and polymorphism percentages in elm acessions using ISSR marker.

درصد چندشکلی Polymorphism %	تعداد کل نوار Total bands	تعداد نوار چندشکل No. of Polymorphic bands	تعداد نوار تک شکل No. of Monomorphic bands	نام آغازگر Primer name
65	20	13	7	$(AG)_8T$
63	35	22	13	$(AG)_8YT^{\dagger}$
43	14	6	8	$(AG)_8C$
50	24	12	12	$(GA)_8C$
68	34	23	11	$(GA)_8T$
80	40	32	8	CCA(CT)8
31	29	9	20	T(AG)9
–	196	117	79	مجموع (Sum)
57.14	28	16.7	11.28	میانگین (Mean)

† Y=Pyrimidine

میزان چند شکلی بالا در نمونه هـای مختلـف نـارون نشـان دهنـده کـارایی دو نشـانگر RAPD و ISSR در طبقه‌بندی و شناسایی رقم های و گونه های مختلف نارون است. کامالای و همکاران (۸) نیـز در مطالعـه خـود بـا استفاده از نشانگر ملکولی RAPD در بررسی تنوع ژنتیکی نارون آمریکایی نشان دادند که میزان چنـد شـکلی در نمونه های جمعیتی این گونه نارون بسیار بالاست و از آنجایی که این گونه نارون چهارگـان مـی باشـد، بنـابراین این تنوع را تا حدودی مرتبط به ماهیت چهارگان بودن این گونه دانستند.

ضریب کوفنتیک[۱] برای تجزیه خوشه ای به روش UPGMA، سه ضریب تشابه تطابق ساده(SM)، جاکارد و دایس، نشان داد که گروه بندی بر اساس ضریب جاکارد در نشانگر RAPD با ضریب کوفنتیک ۰/۹۶ و در نشانگر ISSR ۰/۸۴ بهترین روش گروه بندی از بین روش‌های فوق است. از بین نمونه های مورد مطالعه، بیشترین تشابه بین ارقام DN2 و DN3 با تشابه ۹۰٪ و کمترین تشابه بین ارقام DN4 و CN3 با تشابه ۷٪ به دست آمد. با توجه به این که دو نژادگان DN2 و DN3 متعلق به یک ناحیه و در کنار یکدیگر قرار داشتنند، به احتمال دارای منشا ژنتیکی یکسانی می باشند.

با استفاده از نرم افزار NTSYS-pc ابتدا ضرایب تشابه بین نشانگرها محاسبه گردید و سپس تجزیه به مولفه های اصلی انجام شد. تجزیه به مولفه های اصلی روی داده های RAPD نشان داد که سه مولفه اول ۶۵٪ از کل واریانس را توجیه می کنند و بیانگر این است که نشانگرهای RAPD به دست آمده از این مطالعه به اندازه کافی پیوسته هستند و پراکندگی خوبی در ژنوم ندارند. از طرفی کاهش اطلاعات به دو یا سه مولفه اصلی نمی‌تواند همانند روش تجزیه خوشه ای نمونه ها را از هم جدا کند، بنابراین توصیه می شود در این موارد به روش خوشه ای توجه گردد (شکل ۱).

در گروه بندی به دست آمده در این پژوهش، نژادگان DN4 از بقیه نژادگان هـا بـه طـور کامـل جـدا گردیـد. همانطور که ذکر شد نارون وسک گونه غالب درختان نارون اصفهان را تشکیل می دهد اما در بررسی های انجام شده مشخص شد که نژادگان DN4 نارون چتری می باشد و به همـین دلیـل آن را از سـایر نژادگـان هـا متمـایز ساخته است. بنابراین با توجه به تفاوت های ژنتیکی بین گونه های مختلف نارون چنـین نتیجـه ای طبیعـی اسـت. لازم به ذکر است که این درخت نسبت به درختان اطراف خود متحمل به آفت چوبخوار نارون بود که نکته ای قابل تامل می باشد. در صورتی که آزمایش های تکمیلی بتواند مقاومت ژنتیکی این نژادگان را تایید کنـد، گیـاه افزایـی این درخت ممکن است بتواند در رفع مشکل آفت چوبخوار چاره ساز باشد.

با توجه به اینکه نمونه برداری از درختان سطح شهر در چهار منطقه مختلف انجام شد، در گروه بندی به دست آمده نیز بسیاری از نژادگان های مربوط به یک منطقه در یک گروه جای گرفتند. این مطلب نشان مـی دهـد که درختان هر منطقه نسبت به درختان موجود در مناطق دیگر شباهت بیشتری دارند و به احتمال از یک نهالستان نمونه برداری گردیده اند ولی از آنجا که تکثیر درختان نارون بیشتر از طریق بذر صورت می گیـرد، بنـابراین در پاره ای از موارد درختان متفاوتی نیز در یک منطقه مشاهده می گردد.

نمونه AN5 از شمال اصفهان جمع آوری گردیده بود که شباهت اندکی با نمونه های دیگر داشت. نمونه‌های BN1، BN2، BN3، BN4، BN5، BN6، BN7 و BN8 از غرب اصفهان جمع آوری شده بودند. همانطور که در شکل ۳ مشاهده می شود نمونه های BN4 و BN5 در یک خوشه قرار گرفتـه انـد و نمونـه هـای BN2، BN3 و BN8 نیز در خوشه دیگری و با یکدیگر قرار گرفته اند. نمونه های CN1، CN2، CN3، CN4، CN5، CN6 و

۱- Cophenetic

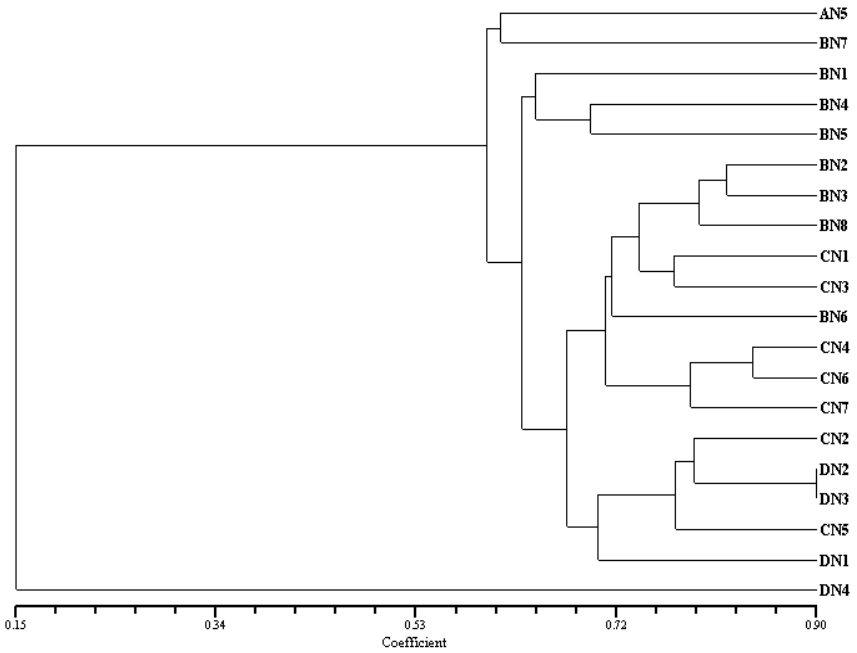

Fig. 1. Dendrogram of 20 elm genotypes using Jaccard similarity coefficient based on UPGMA algorithm using RAPD marker.

شکل۱- نمودار درختی گروه‌های به دست آمده نارون با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و بر اساس نشانگر RAPD.

CN7 از درختان موجود در جنوب اصفهان برداشت گردیدند. در این منطقه نیز نمونه های CN1 و CN3 در یک گروه و نمونه های CN4، CN6 و CN7 نیز در گروه دیگری خوشه بندی شده اند. چهار نمونه DN1، DN2، DN3 و DN4 از منطقه شرق اصفهان (باغ غدیر) نمونه‌برداری شدند که دو نمونه DN2 و DN3 شباهت بالایی را نشان دادند و DN4 نیز همانطور که ذکر شد گونه دیگری تشخیص داده شد که طبقه بندی به دست آمده از نشانگر RAPD نیز چنین مطلبی را تایید می نماید. در نشانگر ISSR پس از انجام آزمون تطابق مانتل و بررسی ضرایب کوفنتیک بیشترین ضریب همبستگی توسط ضریب جاکارد، ۸۴۳/. در مقایسه با سایر ضرایب به دست آمد. در گروه بندی به دست آمده، بیشترین تشابه بین ارقام DN2 و DN3 با ضریب تشابه ۸۸٪ و کمترین تشابه بین ارقام DN4 وAN5 با ضریب تشابه ۰/۶۵٪ می باشد (شکل ۲) . بر اساس دندروگرام به دست آمده در ضریب تشابه ۰/۶۸ شش گروه به دست آمده شد که این ۶ گروه از ۴ منطقه مختلف سطح شهر اصفهان نمونه برداری شده بودند که در بیشتر این گروه ها گیاهانی که متعلق به یک ناحیه بودند، در کنار هم قرار گرفتند. دو نمونه DN4 وAN5 در ضریب تشابه ۰/۶۵ از تمام نمونه ها جدا شدند که نشان دهنده تفاوت ژنتیکی این دو نمونه با سایرین می باشد. بر اساس نتایج تجزیه به مولفه های اصلی[۱] (PCA) ۳ مولفه اول ۶۲٪ تغییرات را توجیه نمودند که نشان دهنده پراکندگی نسبی نشانگرها در طول ژنوم می باشد.

۱- Principal Component Analysis

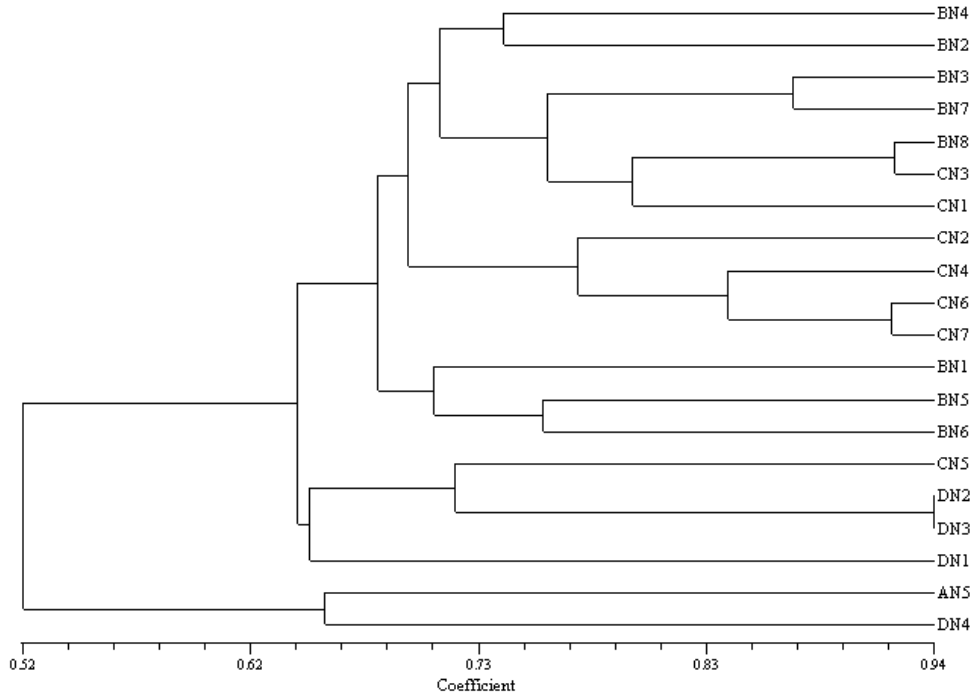

Fig. 2. Dendrogram of 20 elm genotypes using Jaccard similarity coefficient based on UPGMA algorithm using ISSR marker.

شکل۲- نمودار درختی گروه‌های به دست آمده نارون با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و بر اساس نشانگر ISSR.

نتایج به دست آمده از ترکیب دو نشانگر در بیشتر موارد، نتایج به دست آمده از نشانگرها را به صورت انفرادی تایید نمود ولی مزیت ترکیب دو نشانگر این بود که نمونه DN4 با فاصله ژنتیکی بیشتر در مقایسه با حالات انفرادی جدا گردید (شکل۳). نتایج PCA نشان داد که بیشتر نژادگان‌ها (۱۷ نژادگان از ۲۰ نژادگان) مورد پژوهش در یک ربع قرارگرفتند (شکل۴). در بین این نژادگان ها DN4 و AN5 در ربع اول قرار گرفتند و از تمام نمونه ها جدا شدند و نمونه CN6 به تنهایی در ربع دوم قرار گرفت. نتایج به دست آمده از این تجزیه و تحلیل تا حد زیادی نتایج قبلی را تایید نمود و بیشتر ارقامی که در دندروگرام در یک گروه قرار داشتند در PCA نیز در کنار هم قرار گرفتند و ارقام DN4 و AN5 به طور کامل از سایر نمونه ها فاصله گرفتند که تاییدی بر نتایج به دست آمده بود (شکل۴). در این پژوهش نیز هشت نشانگر اختصاصی برای رقم ها و نژادگان های مورد مطالعه یافت شد که پنج نشانگر آن اختصاصی نژادگان DN4 بود (نشانگرهای $OPAD02_{1500}$، $OPAD04_{830}$، $OPC16_{940}$، $OPC16_{300}$ و $OPB10_{1550}$) و نشانگر $OPA16_{1370}$ اختصاصی نژادگان CN7، نشانگر $OPA16_{550}$ اختصاصی نژادگان BN1 و نشانگر $OPC16_{560}$ اختصاصی نژادگان CN5 بود. البته تایید نشانگرهای معرفی شده نیازمند آزمایش های تکمیلی می‌باشد. نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان داد که استفاده از نشانگر RAPD و ISSR برای طبقه‌بندی و شناسایی رقم های نارون نشانگرهای مناسبی می باشند. به طور کلی با توجه به خودگشنی بالای نارون و تنوع مشاهده شده بین نمونه‌های بررسی شده در این پژوهش احتمال می‌رود.

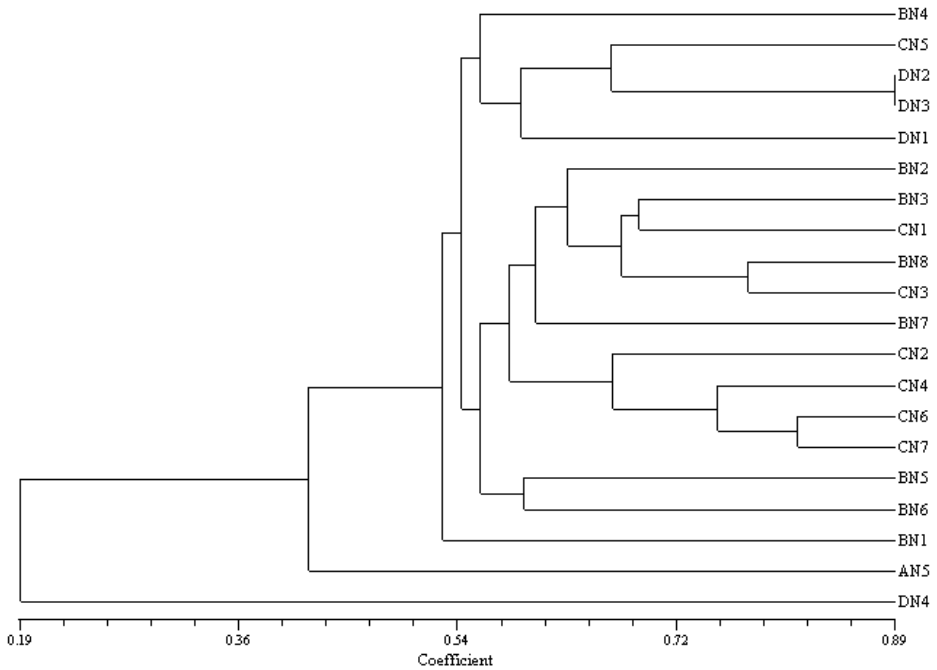

Fig. 3. Dendrogram of 20 elm genotypes using Jaccard similarity coefficient based on UPGMA algorithm using ISSR and RAPD markers.

شکل ۳- نمودار درختی گروه‌های به دست آمده نارون با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و بر اساس نشانگرهای RAPD و ISSR.

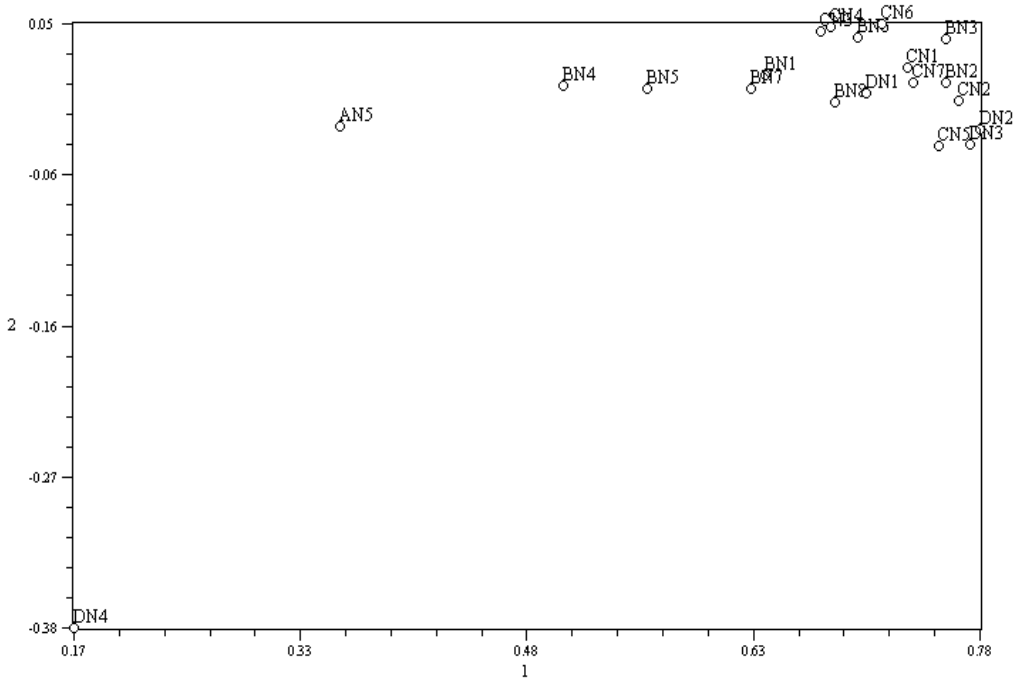

Fig. 4. Principal component analysis based on RAPD data.

شکل۴- تجزیه به مولفه های اصلی (PCA) بر اساس فراوانی داده های نشانگر RAPD.

بیشتر این تنوع مرفولوژیکی مشاهده شده، پایه ژنتیکی داشته باشد. سایر پژوهش های خارجی اغلب به بررسی نزدیکی ژنتیکی رقم های و دورگه‌های نارون اشاره نموده اند؛ ویتلی و همکاران (۱۳) و کولادا و همکاران (۶) نشانگرهای ریزماهواره ای در جنس *Ulmus* را طراحی نموده اند و با توجه به اختصاصی بودن، چندشکلی بالا و تکرارپذیری این نشانگرها استفاده از این نشانگرها در بررسی روابط ژنتیکی نارون‌های ایرانی در پژوهش های آتی پیشنهاد می گردد.

سپاسگزاری

امکانات مالی و تجهیزات این پژوهش توسط سازمان فضای سبز شهرداری اصفهان و دانشگاه صنعتی اصفهان فراهم گردیده است، که بدینوسیله مراتب قدردانی اعلام می گردد.

منابع REFERENCES

۱. آریاوند، ا. ۱۳٤۹. درختان و درختچه های اصفهان. چاپ ربانی. ۱۵۸ ص.

۲. قهرمان، ا. ۱۳۷۳. کروموفیت های ایران (سیستماتیک گیاهی). جلد اول، مرکز نشر دانشگاهی.۳۵۰ ص.

۳. کوهی دهکردی، م.، م. رحیم ملک، ب. ا. سید طباطبایی، ب. بانی‌نسب و م. مبلی. ۱۳۸۵. بررسی قرابت ژنتیکی ارقام زیتون ایرانی و برخی از ارقام خارجی با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR . مجله علوم و فنون باغبانی ایران. ۱۰۲-۹۳: ۷.

4. Bassam, B. J., G. Caetano-Anolles and P.M. Greesshoff. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 19: 680-683.
5. Cogolludo-Agustin, M.A., D. Agundez and L. Gil. 2000. Identification of native and hybrid elms in Spain using isozyme gene markers. Heredity 85:157–166.
6. Collada, C., P. Fuentes-Utrilla, L. Gil and M.T. Cervera. 2004. Characterization of microsatellite loci in *Ulmus minor* Miller and cross-amplification in *U. glabra* Hudson and *U. laevis* Pall. Mol. Ecol. Notes 4:731.
7. Jeffers, J. 1999. Leaf variation in the genus *Ulmus*. Forestry 72:183-190.
8. Kamalay, J.C. and D.W. Carey. 1995. Application of RAPD-PCR markers for identification and genetic analysis of American elm (*Ulmus americana* L.) selections. J. Environ. Hort. 13:155–159.
9. Pradeep, R.S and E.A. Siddiq. 2002. Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) and its application in plant breeding. Euphytica 128:9-17.
10. Pooler, M.R. and A.M. Townsend. 2005. DNA fingerprinting of clones and hybrids of American elm and other elm species with AFLP markers. J. Environ. Hort. 23:113–117.
11. Santamour, F.S. 1972. Flavonoid distribution in *Ulmus*. Bull. Torrey Bot. Club 99:217–131.
12. Sherman, S.L. and D.E. Giannasi. 1988. Foliar flavonoids of *Ulmus* in Eastern North America. Biochem. Syst. Ecol. 16:51–56.
13. Whiteley, R.E., S. Black-Samuelsson and D. Clapham. 2003. Development of microsatellite markers for the European white elm (*Ulmus laevis* Pall.) and cross-species amplification within the genus *Ulmus*. Mol. Ecol. Notes 3:598–600.

14. Williams, J.G.K., A.E. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.C. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res. 18:6531-6535.