شناسایی و تعیین تنوع ژنتیکی کلن‌های گونه‌های مختلف صنوبر با استفاده از نشانگر میکروساتلایت

. فرهاد اسدی، . محبت علی نادری شهاب و . حسین میرزائی ندوشن،
اعضای هیات علمی‌موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع

تاریخ دریافت: دی ماه ۱۳۸۰ تاریخ پذیرش: مهر ماه ۱۳۸۳

Email: fasadi@rifr-ac.ir

چکیده

شناسایی کلن‌های گونه‌های مختلف صنوبر با استفاده از صفات مورفولوژیکی به راحتی امکان پذیر نیست. در حالی که نشانگرهای ملکولی مبتنی بر پلی مورفیسم DNA مانند میکروساتلایت برای شناسایی کلن‌ها به ویژه در مراحل اولیه رشد، بسیار مناسب هستند. در این تحقیق تنوع ژنتیکی ۱۲ کلن از ۴ گونه صنوبر متعلق به مناطق مختلف ایران به همراه ۸۶ کلن از ۴ گونه صنوبر متعلق به جمعیت‌های طبیعی کشور هلند، با استفاده از نشانگر ملکولی میکروساتلایت بررسی گردید. ابتدا شرایط واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) بر روی DNA برگ‌های جوان همراه با ۷ جفت آغازگر جهت تکثیر توالی‌های تکراری ساده بهینه سازی شدند، سپس محصولات واکنش PCR بوسیله الکتروفورز ژل آگاروز و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید قابل رویت گشتند. برای تعیین پلی مورفیسم بین کلن‌ها، محصولات واکنشPCR بوسیله الکتروفورز ژل پلی اکریل آمید و رنگ آمیزی با نیترات نقره قابل رویت شدند. داده‌های حاصل در نرم افزار Pop Gene مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. بر اساس نتایج حاصله، در میان جمعیت‌های مورد بررسی کلن‌های دورگ صنوبر از بالاترین میزان هتروزیگوسیتی برخوردار بودند. همچنین تفکیک مناسب کلن‌ها و گونه‌ها مطابق با واقعیت‌های سیستماتیک صورت گرفت. تعداد آلل‌ها در مکان‌های ژنی توالی‌های تکراری بین ۹ تا ۱۳ و متوسط ۱۱/۱۱ برای هر مکان ژنی بود. هتروزیگوسیتی مشاهده شده بین ۰/۱۳ تا ۰/۹۸ و متوسط ۰/۷۱ برای هر مکان ژنی برآورد گردید. فاصله ژنتیکی جمعیت‌های مختلف نیز محاسبه شد. بر این اساس گونه **Populus alba** بیشترین فاصله ژنتیکی را از سایر گونه‌ها نشان داد. کلن‌های مشکوک به دورگ در این رابطه قرابت بیشتری را با کلن‌های گونه **P. nigra** نشان دادند.

کلمات کلیدی: صنوبر، میکروساتلایت، توالی‌های تکراری ساده، پلی مورفیسم DNA، انگشت‌نگاری DNA، ژنتیک جمعیت.

Pajouhesh & Sazandegi No 66 pp: 49-55

Identity and genetic diversity of populus species clones using microsatellite marker

By: Asadi, F., Naderi-Shahab, M. A., and Mirzaie-Nodoushan, H. Scientific Members of Research Institute of Forests and Ranglands

Identification of poplar clones isnot easily possible using morphological attributes. This approach however, does not render a proper differentiation. In order to recognize the clones especially on early growth stages, molecular markers based on DNA polymorphism are suitable. In this study, 12 clones from 4 species of Populus belonging to different area of Iran, as well as 86 clones from 4 species belonging to populations of Netherlands, were investigated for screening

Archive of SID
www.SID.ir

genetic diversity and their differentiation. For using microsatellite markers, following DNA extraction from young and fresh leaves, Polymerase Chain Reaction (PCR) conditions were optimized and conducted with 7 primer pairs to amplify Simple Sequences Repeats (SSR). The PCR products were visualized using agarose gel electrophoresis and detected by staining with ethidium bromide. For demonstration of polymorphism among clones, PCR products were visualized using polyacrylamid gels electrophoresis and detected by silver staining. The data were analyzed by pop Gene software. Results showed that, the number of alleles at the SSR loci ranged from 9 to 13, with an average of 11.11 alleles per locus. The observed heterozygosity ranged from 0.13 to 0.98, with average of 0.71 per locus. Furthermore, hybrid poplar clones have shown most heterozygosity among the poplar species. As well as poplar species and their clones has identity according to systematic classification. In this regard hybrid clones has shown most similarity with *P. nigra* clones. Meanwhile, similarity and genetic distance between populations has shown by a dendrogram.

Keywords: Populus, Microsatellite, Simple Sequences Repeats, DNA Polymorphism, DNA Fingerprinting, Population Genetics.

مقدمه

صنوبرها سریع‌الرشد ترین درختان نیمکره شمالی هستند که سالیانه مقادیر زیادی چوب تولید می‌نمایند. بیش از ۳۰ گونه در این جنس حضور دارند که درهر کدام از این گونه‌ها تعداد زیادی کلن وجود دارد.

با توجه به تکثیر غیر جنسی صنوبر و کاشت کلن‌های انتخاب شده در سطوح وسیعی از سرزمین به ویژه اراضی حاشیه رودخانه ای در کشور، سطح تنوع ژنتیکی این جنس ارزشمند شدیداً در حال کاهش است. این مساله در دراز مدت منجر به صدماتی در ساختار ژنتیکی این درختان مخصوصاً حساسیت زیاد به آفات و امراض و عدم مقاومت در شرایط طبیعی خواهد شد (۷).

فرآیند انتخاب کلن صنوبر برای کاشت، در شرایط عمومی‌مبتنی بر شناسایی ظاهری ارقام صنوبر است که به دلیل قرابت‌های بسیار زیاد بین این ارقام فرآیندی دشوار و بعضاً توام با اشتباه است که پس از کاشت نهال و طی مدت زمان نسبتاً طولانی ۱۰ تا ۱۵ ساله مشاهده می‌گردد که نهال کاشته شده دارای خصوصیات مطلوبی نبوده است. بنابراین شناسایی کلن‌های صنوبر در همان سنین اولیه و انتخاب پایه‌های مناسب می‌تواند نقش برجسته ای در کاهش هزینه‌های زمان و مکان ایفا نماید. نشانگرهای ملکولی مانند میکروساتلایت در رسیدن به این هدف ابزار مناسبی هستند. برای بررسی تنوع ژنتیکی صنوبرها روش تکثیر تصادفی پلی مورفیسم DNA (RAPD) علیرغم تفکیک مناسب کلن‌ها به دلیل تکرارپذیری کم در شرایط آزمایشگاهی مختلف قابل تعمیم و مقایسه با سایر نتایج گزارش نشد (۱). اما برای تمایز کلن‌های مختلف صنوبر و تعیین برخی از ویژگی‌های مهم جمعیت‌های طبیعی نظیر درصد هتروزیگوسیتی، فراوانی آللی و فاصله ژنتیکی آنها استفاده از توالی‌های تکراری ساده یا میکروساتلایت ابزار نوینی محسوب می‌گردد. میکروساتلایت‌ها که توالی‌های تکراری دی، تری، تترا، پنتا و حتی هگزانوکلئوتیدی در طول DNA موجودات مختلف گیاهی و جانوری هستند، حاوی پلی‌مورفیسم بالایی برای انگشت نگاری DNA افراد می‌باشند. این توالی‌ها تکرارهای متوالی خیلی کوتاه بین ۲ تا ۱۰ جفت بازهستند که توالی‌های ساده نیز خوانده می‌شوند (۹).

Smulders و همکاران(۸) ۱۲۰ پایه از جمعیت‌های طبیعی گونه *P. nigra* حاشیه رودخانه راین در کشور هلند و رودخانه‌های کشورهای آلمان، انگلستان و اطریش را توسط ۳ مارکر ژنی مطالعه نمودند. نتایج بررسی آنها نشان داد که تعداد ژنوتیپ‌های شناسایی شده در ۱۲۰ پایه فوق در سطح ۳ مارکر ژنی متفاوت است به طوری که مارکر میکروساتلایت (با استفاده از دو آغازگر از ۷ مکان ژنی) ۷۰ ژنوتیپ، مارکر AFLP ۷۰ ژنوتیپ و مارکر آنزیمی(با استفاده از ۵ مکان ژنی) ۲۳ ژنوتیپ را شناسایی نمودند(۷). Smulders و همکاران با استفاده از ۱۲ آغازگر میکروساتلایتی پلی مورفیسم DNAبالایی را در ۲۳ کلن از گونه *P. nigra* شناسایی نمودند، این آغازگرها برای ۲۳ کلن تحت بررسی بین ۱۰ تا ۱۹ آلل مختلف در هر مکان ژنی، تعیین نمودند. سطح هتروزیگوسیتی با ۸ آغازگر تعیین گردید که میزان آن به طور متوسط ۰/۷۱ بود، در حالی که دو کلن کمتر از ۵۰ درصد هتروزیگوسیتی را نشان دادند(۹).

Van der Schoot و همکاران، از هضم DNA ژنومی‌کلن‌های گونه *P. nigra* و با استفاده از آنزیم AluI آغازگرهای مناسب برای تکثیر میکروساتلایت‌های گونه *P. nigra* را طراحی کردند که نتایج کارآنها تولید آغازگرهای ۱ WPMS تا ۲۰ WPMS بود که در تحقیق حاضرمورد استفاده قرار گرفتند (۱۰). Dayanandan و همکاران با مطالعه ۱۶۰۰ پایه متعلق به گونه *P. tremuloides* ۱۴ مکان ژنی میکروساتلایت را شناسایی کرده و پس از جداسازی، موفق به توصیف تفاوت‌ها در آنها شدند (۳). در این بررسی ۲۹ آلل در ۳۶ فرد برای ۴ مکان ژنی میکروساتلایت شناسایی گردید. تعداد آلل‌ها از ۵ تا ۱۱ و فراوانی ۷/۲۵ آلل برای هر مکان ژنی بود. هتروزیگوسیتی مشاهده شده بین ۰/۱۹ تا ۰/۸۲ و متوسط آن ۰/۴۶ برای هر مکان ژنی در این گونه است. آغازگرهای طراحی شده با توالی‌های ۲۰ تا ۲۵ نوکلئوتیدی برای این گونه به نام PTR معروف است که توالی‌های دی و تری نوکلئوتیدی را تکثیر نمودند. در تحقیقات مشابه Rahman و همکاران ۸ آغازگر جدید برای گونه *P. tremuloides* را طراحی کردند (۶). نتایج آنها نشان داد که در ۶ آغازگر تولید شده ۲۵ آلل در ۳۸ فرد وجود دارد و تعداد آلل‌ها بین ۲ تا ۷ با متوسط ۴/۲ آلل در هرمکان ژنی بود. هتروزیگوسیتی مشاهده شده از ۰/۰۵ تا ۰/۶۱ ومتوسط ۰/۳۶ برای هر مکان ژنی است.

بررسی‌های مزبور عمدتاً بر روی توده‌های طبیعی صنوبر انجام گرفته وضمن شناسایی گونه‌ها و کلن‌های مختلف صنوبر، تنوع ژنتیکی بین و درون گونه‌ای گونه‌ها نیزمطالعه گردید. نتایج حاصل از تحقیقات فوق

Archive of SID
www.SID.ir

و تحقیقات مشابه دیگر در طول سال‌های اخیر ضمن دستیابی به اهداف مورد اشاره، لزوم فعالیت‌های اصلاحی و پرداختن به گونه‌های با اهمیت تر را مشخص می‌سازد.

مواد وروش‌ها

نمونه‌های مورد مطالعه

نمونه‌های مورد بررسی شامل ۴۵ کلن از گونه مشکوک به دورگ (*P. euramericana x P. deltoides*) با نام rb، ۱۱ کلن از گونه *P. euramericana* و ۳۰ کلن از گونه *P. deltoides* همگی از جمعیت‌های طبیعی حاشیه رودخانه راین در کشور هلند به همراه ۱۲ کلن از چهار گونه *P. euphratica*، *P. alba*، *P. nigra* و *P. deltoides* همگی از جمعیت‌های مناطق مختلف ایران بود. جدول شماره ۱ کلن‌های مورد مطالعه، تعداد و محل جمع آوری آنها را نشان می‌دهد. همچنین نتایج داده‌های جمعیت *P. nigra* اروپا در دسترس بود و در قسمت نتایج با داده‌های جدول زیر مقایسه گردید.

استخراج DNA

DNA ژنومی نمونه‌های متعلق به ایران از برگ‌های جوان و تازه رسته کلن‌های مختلف به روش Fulton و همکاران استخراج شد (۴). ضمن آن که DNA نمونه‌های مربوط به کشور هلند که با همین روش استخراج شده بود، در دسترس بود.

واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR)

واکنش PCR در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر طبق جدول شماره ۲ شامل مولفه‌ها و غلظت‌های آنها انجام گردید.

همانطور که در جدول شماره ۳ نشان داده شده است، دو نوع PCR برای تکثیر میکروساتلایت‌ها با استفاده از آغازگرهای مختلف اعمال گردید. در NPCR (PCR) کوتاه مخلوط واکنش به مدت ۳ دقیقه در معرض دمای ۹۴ درجه سانتی گراد قرار گرفت (گرمای اولیه)، سپس ۳۰ چرخه حرارتی به ترتیب ۵ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۱۵ ثانیه در درجه حرارت Annealing (۵۰، ۵۵ یا ۶۰ درجه سانتی گراد)، و یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد اعمال شد. در خاتمه برای ادامه مرحله بسط یا توسعه تکثیر، ۱۰ دقیقه دیگر در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. اما در LPCR پس از ۳ دقیقه که مخلوط‌های واکنش در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد نگهداری شده بودند، ۳۰ چرخه حرارتی به ترتیب ۴۵ ثانیه دمای ۹۴ درجه سانتی گراد، ۴۵ ثانیه درجه حرارت Annealing و ۱۰۵ ثانیه دمای ۷۲ درجه سانتیگراد اعمال گردید ودر خاتمه ۱۰ دقیقه دیگر در معرض دمای ۷۲ درجه سانتی گراد قرارگرفتند.

پس از خاتمه چرخه‌های حرارتی، ۱۰ میکرولیتر از محصول تکثیر شده با ۵ میکرولیتر ۱۰xSUDS شامل EDTA، SDS، Bromophenol Blue و Glycerol مخلوط شده و بر روی ژل آگاروز ۱/۵درصد به مدت ۲۵ دقیقه با ۱۰۰ میلی آمپر بارگزاری شدند و با اتیدیوم بروماید عمل رنگ آمیزی نمونه‌ها انجام شد. پس از ۲۵ دقیقه از ژل‌ها عکسبرداری گردید.

لازم به ذکر است که بر روی ژل آگاروز تنها تکثیر شدن قطعات میکروساتلایت مشاهده شد و جهت تعیین پلی مورفیسم و اندازه دقیق آنها، نمونه‌ها در ژل پلی اکریل آمید واسرشته بارگذاری شده و با نیترات نقره رنگ آمیزی گردیدند.

نتایج

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که با استفاده از آغازگرهای مختلف، میزان سطح هتروزیگوسیتی و فراوانی آلل‌ها تا حدودی متفاوت است که امری کاملاً طبیعی است. اما مساله مهم نتیجه نهایی از تفسیر داده‌های همه آغازگرهای مورد استفاده است.

در بررسی داده‌های تک تک جمعیت‌ها و آغازگرها با استفاده از آزمون مربع کای (χ^2)همانطور که در جدول شماره ۴ مشاهده می‌شود، تعدادی از جمعیت‌ها از نظر فراوانی آلل‌ها در تعادل Hardy-Weinberg نیستند.

بعد از حذف جمعیت‌های بدون تکثیر در PCR همچنین جمعیت‌های با تکثیر اندک یا به عبارتی نقاط پرت، تمامی‌داده‌ها از تعادل Hardy-Weinberg تبعیت کردند. در بررسی همه جمعیتها و آغازگرها به طور یک جا نیز مشاهده شد که تعادل مزبور مصداق دارد.

جدول شماره ۴ همچنین اندازه نمونه‌ها، تعداد آلل‌های مشاهده شده و تعداد آلل‌های موثر رابرای آغازگرهای مختلف نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌گردد اندازه نمونه‌ها که در واقع باید در بالاترین میزان خود،

جدول شماره ۱- کلنهای مورد مطالعه، تعداد و منشا آنها

ردیف	نام گونه	تعداد کلن	منشا (محل جمع آوری)
۱	کلن‌های دورگ rb	۴۵	هلند
۲	*P. euramericana*	۱۱	هلند
۳	*P. deltoides*	۳۰	هلند
۴	*P. alba*	۳	ایران
۵	*P. nigra*	۳	ایران
۶	*P. euphratica*	۳	ایران
۷	*P. deltoides*	۳	ایران

جدول شماره ۲: مولفه‌های PCR میکروساتلایت‌ها و غلظت‌های به کار رفته

ردیف	مولفه	غلظت	مقدار مورد استفاده به میکرولیتر
۱	DNA ژنومی	۲ نانو گرم بر میکرو لیتر	۸
۲	$MgCl_2$	۲۵ میلی مولار	۱/۲
۳	DNTPها	۱ میلی مولار	۲
۴	بافر واکنش	۲۰۰ میلی مولار	۲
۵	آغازگر Forward	۲ پیکومول بر میکرولیتر	۲
۶	آغازگر Reverse	۲ پیکومول بر میکرولیتر	۲
۷	آنزیم Taq	۵۰۰ واحد	۰/۲ ٪
۸	آب مقطر	-----	۲/۷۸
----	حجم نهایی	-----	۲۰

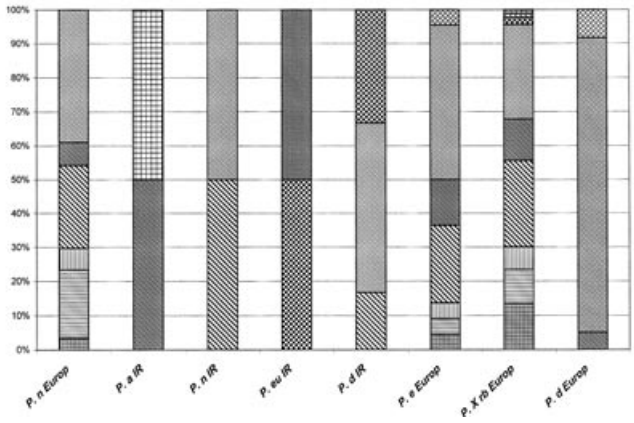
Archive of SID
www.SID.ir

دو برابـر تعداد نمونه‌های مورد مطالعه برای هر جمعیت را نشـان دهد (به خاطر تولید حداکثر دو باند برای کلن‌های هتروزیگوت) برای جمعیت‌های مختلف متفاوت اسـت. این امر به دلیل اسـتفاده از تعداد متفاوت نمونه‌ها برای جمعیت‌های مختلف است، به این ترتیب که برای یک جمعیت، مانند جمعیت *P. nigra* مربوط به اروپا تعداد نمونه ۱۲۰ پایه و برای جمعیت *P. nigra* ایران تنها ۳ پایه وجود داشت. برای برخی از جمعیت‌ها وجود عدد صفر نشـان دهنده عدم حضور توالی‌های تکراری مورد نظر در آن گونه‌ها یا عدم تکثیرمیکروسـاتلایت‌های آن جمعیت‌ها است. به همین ترتیب تعداد آلل‌های مشـاهده شـده و تعداد آلل‌های موثر قابل مطالعه وتفسیر هستند. برای نمونه آغازگرهای WPMS ۱۴ WPMS ۱۲ و WPMS ۲۰ برای کلیه جمعیت‌ها باندهای پلی مورفیک تولید نموده‌اند.

نمودار شـماره ۱ درصد فراوانی آلل‌ها و نوع آلل‌ها را در جمعیت‌های مختلف با استفاده از آغازگر WPMS ۲۰ نشان می‌دهد. برخی از آغازگرها ماننـد آغازگـر WPMS ۲۰، WPMS ۰۹ و WPMS ۱۸ بیشـترین تعداد آلل‌ها را نشـان دادند. طـوری که برای آغازگـر WPMS ۰۹ تعداد ۱۲ آلل و بـرای دو آغازگر دیگر هر کدام ۹ آلل قابل مشـاهده است. فراوانی نوع آلل‌هـای مشـترک در جمعیت‌های مختلف نیز قابل تامل اسـت. همانطور که در نمودار شـماره ۱ مشاهده می‌شود در استفاده از آغازگر WPMS ۲۰ ، جمعیت مشـکوک بـه دورگ rb دارای تعدادی از آلل‌های هر دو گونه *P. deltoides* و *P. euramericana* اروپا می‌باشـد. ضمن آن که کلیه آلل‌های گونه *P. nigra* نیز در آن به چشم می‌خورد. بنابر این فرضیه دورگ بودن تعدادی از ارقام مشکوک به دورگ در اینجا به اثبات می‌رسد.

جدول شـماره ۶ هتروزیگوسیتی مشاهده شـده و قابل انتظار رابرای جمعیت‌های مختلف با اسـتفاده از آغازگرها نشـان می‌دهـد. همانطور که در این جدول مشـاهده می‌گردد بالاترین میزان هتروزیگوسـیتی در میان جمعیت‌ها و آغازگرهای مختلف مربوط به جمعیت مشـکوک به دورگ rb توسط آغازگر WPMS ۲۰ است. در توافق با مبحث تعداد آلل‌های مشاهده شـده و موثر در مورد میزان هتروزیگوسیتی نیز آغازگر WPMS ۲۰ تقریباً برای همه جمعیت‌ها پلیمورفیک بود.

در نمـودار شـماره ۲ دندروگـرام جمعیت‌هـای مختلف نشـان داده شـده اسـت که برای همه جمعیت‌ها و با آنالیز همه آغازگرها توسـط نرم



نمودار ۱-: درصد فراوانی آلل‌ها در جمعیت‌های مختلف با استفاده از آغازگر WPMS 20

افزار PopGene رسـم شـده اسـت. همانطور که در این نمودار مشـاهده میگردد یک وضعیت نسـبتاً غیرعادی به چشم می‌خورد که همان نزدیکی جمعیت‌هـای *P. euphratica* ایران با جمعیت *P. nigra* ایران اسـت. این وضعیـت به احتمال خیلی قوی به علت کم بـودن تعداد نمونه‌های این دو جمعیت و عدم اختصاصی بودن آغازگرها برای گونه *P. euphratica* اسـت. چرا که این آغازگرها برای گونه‌های *P. nigra* و *P. trichocarpa* طراحی و ساخته شده بود. اما در مورد سایر گروهبندی‌ها می‌توان وضعیت‌های قابل انتظاری را مشاهده نمود.

همانطور که در شـکل شـماره ۱ مشـاهده می‌گردد، باندهای حاصل از تکثیـر میکروسـاتلایت‌های موجود در بین توالی‌های دو سـمت آغازگر WPMS۱۶ بـرای جمعیـت مشـکوک بـه دورگ rb، همچنیـن باندهای مربـوط بـه جمعیت‌هـای *P. euramericana* واغلب گونه‌هـای متعلق به ایـران (به جز *P. alba*) هر کدام دارای دو باند مجزا و قابل تشـخیص بوده و بنابرایـن هتروزیگوت می‌باشـند. در حالی که باندهای مربوط به جمعیت *P. deltoides* اروپـا، اغلب منفرد و بنابراین هوموزیگوت هسـتند که از این نظر شباهت بسیار بالایی را با جمعیت *P. deltoids* ایران نشان می‌دهند.با توجه به این که برای هر سه کلن مربوط به گونه *P. alba* متعلق به ایران، تنهـا یک باند منفرد وجود دارد، بنابراین تنهـا یک نوع آلل برای این گونه مشاهده می‌گردد

با توجه به این که آغازگر WPMS ۲۰ بیشـترین باندها را تولید نموده اسـت، دراینجا تنها به تشـریح نتایج این آغازگر پرداخته و از تشریح سایر آغازگرها اجتناب می‌گردد.

نتایج حاصل از آغازگر WPMS ۲۰

برای جمعیت *P. nigra* اروپا تعداد آلل‌های مشـاهده شده معادل ۶ و تعداد آلل‌های موثر برابر با ۳/۸۲ اسـت. اما برای جمعیت‌های *P. alba* ، *P. nigra* و *P. euphratica* ایـران تعداد آلل‌های مشـاهده شـده و آلل‌های موثـر معادل ۲ اسـت. و برای جمعیت *P. deltoides* ایـران تعداد آلل‌های مشـاهده شـده معادل ۳ و تعداد آلل‌های موثر ۲/۵۷ اسـت. برای جمعیت *P. euramericana* اروپا تعداد آلل‌های مشـاهده شـده ۷ و تعداد آلل‌های موثر ۳/۵اسـت. اما در مورد جمعیت مشـکوک به دورگ rb تعداد آلل‌های مشـاهده شـده ۹ و تعداد آلل‌های موثر ۵/۲۵ اسـت. همانطور که مشاهده می‌شـود آغازگر WPMS ۲۰ باندهای پلی مورفیک بیشـتری رانسـبت به سایر آغازگرها برای همه گونه‌های مورد مطالعه تولید نموده است.

از نظرهتروزیگوسـیتی، سـطح هتروزیگوسـیتی مشـاهده شده برای جمعیـت *P. nigra* اروپا معـادل ۰/۸۲ و برای گونـه *P. euramericana*، کلن‌های مشکوک به دورگ و جمعیت *P. deltoides* اروپا به ترتیب معادل ۰/۹۱، ۰/۹۸، و ۰/۱۳ اسـت. بنابرایـن سـطح هتروزیگوسـیتی در مورد کلن‌های مشـکوک به دورگ و گونه *P. euramericana* که خود نیز دورگ است ، بالاترین مقادیر هتروزیگوسیتی مشاهده می‌گردد.

از نظر صدق تعـادل Hardy-Weinberg بر داده‌ها باتوجه به اطلاعات ارائه شـده درجدول شـماره ۴، در مورد آغازگـر WPMS ۲۰، تعادل فوق برای جمعیت *P. nigra* اروپا در سـطح یـک درصد معنی دار بوده و برای جمعیت‌های *P. alba* و *P. nigra* ایران نیز در سـطح نسـبتا قابل قبولی معنی دار است. در بررسی داده‌های حاصل از تلفیق همه آغازگرها نیز تعادل

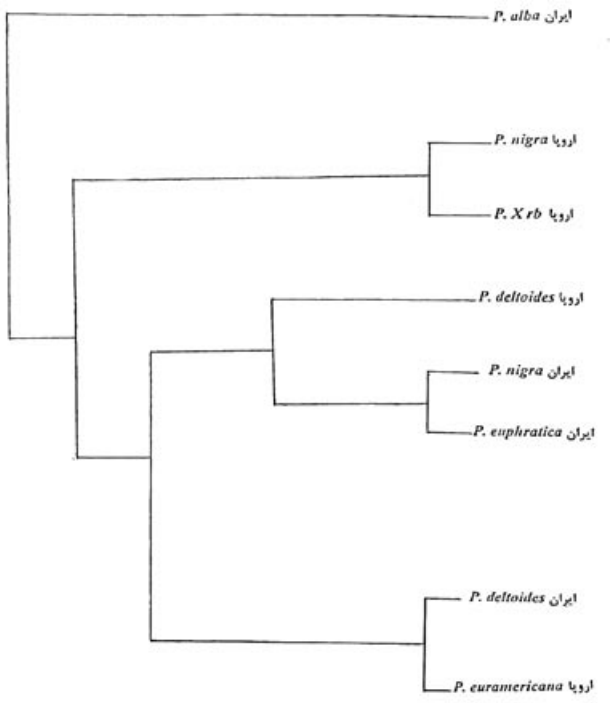
Archive of SID
www.SID.ir

Hardy-Weinberg مصداق دارد. همانطور که در شکل شماره ۱ مشاهده می‌شود باندهای تکثیر شده جمعیت مشکوک به دورگ rb دارای محدوده وسیع تری از اندازه‌های ملکولی DNA تکراری میکروساتلایت هستند و عمدتاً هتروزیگوس می‌باشند. این وضعیت در باندهای گونه (*P. deltoids*) *P.d Euro* متعلق به اروپا مشاهده نمی‌گردد. در مورد این گونه، باندها اغلب هموزیگوس بوده و قرابت ژنتیکی بیشتری بر آن حاکم است. گونه‌های صنوبر (*P. euramericana*) P.e. Euro ضمن دارا بودن باندهای مشترک با گونه *P. deltoids*، باندهای متعلق به گونه (*P. nigra P.n IR*) را نیز به همراه دارند (وضعیتی که بیانگر دورگ بودن گونه *P. euramericana* بین دو گونه *P. deltoids* و *P. nigra* می‌باشد. نتیجه جالب توجه در مورد پایه‌های *P. deltoids* ایران (*P.d IR*) این است که دو پایه اولی و دومی که دورگ طبیعی بین پایه سومی(به عنوان پایه ماده) و یک پایه ناشناخته از همان گونه است هر دو ضمن هتروزیگوس بودن دارای باند مشترک والدی با پایه مادری هستند و هرکدام باندی متفاوت از دیگری نیز دارند و می‌تواند نشان دهنده تلاقی پایه مادری با پایه‌های پدری جداگانه باشد. این چنین وضعیتی توسط آغازگرهای دیگر نیز حاصل شده است.

بحث

گونه‌های جنس صنوبر درختانی پیشاهنگ در اکوسیستم‌های رودخانه ای محسوب میگردند (۷). سطوح زیادی از جایگاه‌های طبیعی این گونه‌ها به خاطر مدیریت حاشیه رودخانه‌ها، نظیر توسعه معادن شن و ماسه، دامداری و قطع درخت توسط بهره برداران یا روستاییان به منظور تغییر کاربری در حال نابودی است. مقادیر باقیمانده از این سطوح به سبب تکثیر غیرجنسی از سطح تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار نبوده و حساسیت این گونه‌ها در مقابل آفات و امراض به ویژه در میان ارقام هوموزیگوت بیشتر به چشم می‌خورد. بنابراین شناسایی جمعیت‌های طبیعی از نظر میزان تنوع ژنتیکی و سطح هتروزیگوسیتی در میان گونه‌های مختلف به ویژه در حاشیه رودخانه‌ها جهت مدیریت کارآمد این منابع امری حیاتی به نظر می‌رسید که در این بررسی به آن پرداخته شده و آمارهای مختلف به دست آمده نشان دهنده تفاوت در ساختار تنوع بین و درون گونه ای است. طوری که در پایه‌ها و ارقام دورگ بالاترین میزان هتروزیگوسیتی و نتیجتاً بالاترین میزان تنوع ژنتیکی مشاهده می‌گردد. این واقعیت‌ها می‌تواند توجیهی بر ادامه فرآیندهای اصلاحی در صنوبرها باشد، که عمدتاً تکثیر رویشی دارند.

با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق برای تعیین آماره‌هایی مانند سطح هتروزیگوسیتی، فراوانی آلل‌ها و فاصله ژنتیکی، میکروساتلایت‌ها یک ابزار مناسب تشخیص داده شدند. در مورد امکان به کارگیری این نشانگر در مورد دیگر صنوبرها، جفت آغازگرهای مکمل با توالی دو جناح میکروساتلایت‌های این گونه‌ها توسط برخی از محققین توسعه یافته و طراحی شده اند(۲، ۳، ۱۰). نتایج کار آنها می‌تواند برای ادامه بررسی جهت تعیین تنوع ژنتیکی صنوبرهای متعلق به جمعیت‌های مختلف ایران بسیار سودمند باشد. چون این نشانگرها دارای تکرارپذیری بالایی بوده و بنابراین مقایسه نتایج حاصله با استفاده از آغازگرهای مشابه وحتی در شرایط آزمایشگاهی متفاوت امکان پذیر است. این در حالی است که با نشانگر ملکولی RAPD امکان انجام چنین کاری فراهم نیست.



نمودار -۲: دندروگرام جمعیت‌های مختلف صنوبر حاصل از بررسی میکروساتلایت‌ها

در مورد تاریخچه این درختان اطلاعات زیادی در دست نیست. اما به نظر می‌رسد که حضور کلنهای مشابه در مناطق مختلف به خاطر دخالت انسان و حمل کلن‌ها توسط آنها بوده است (وضعیتی که به ویژه در مورد پایه‌های جمع آوری شده گونه *P. nigra* از مناطق مختلف اروپا مشاهده گردید). وجود میزان قابل توجهی از گونه‌های دارای سطح هتروزیگوسیتی بالا که به خاطر احتمال وقوع تکثیر زایشی، آن هم به صورت طبیعی است، این نظریه را که ممکن است برخی از بذورصنوبرها توسط جریان آب رودخانه‌ها به مناطق پایین دست حمل شده باشند تایید می‌نماید. این مساله قبلاً توسط Legionnet و همکاران مطرح شده بود (۵).

در مورد میزان پلی مورفیسم موجود مشاهده می‌گردد که آغازگرهای WPMS ۰۹ و WPMS ۱۸ گونه *Populus deltoides* را هوموزیگوت نشان می‌دهد ونتیجتاً مونومورفیک می‌باشند. اما در مورد سایر گونه‌ها و آغازگرها وضعیت هتروزیگوسیتی را نشان داده و از سطح پلی مورفیسم بالاتری برخوردارند. وجود سطح هتروزیگوسیتی پایین در گونه مزبور، می‌تواند موید لزوم تمرکز فرآیندهای اصلاحی بیشتر بر روی این گونه جهت دستیابی به دورگ‌های بین و درون گونه‌ای باشد. فرآیندی که مانند تولید پایه‌های مشکوک به دورگ rb در این تحقیق، به صورت طبیعی نیز کم و بیش مشاهده می‌گردد.

منابع مورد استفاده

۱ - اسدی، فرهاد، نادری شهاب، محبت علی و حسین میرزایی ندوشن ۱۳۸۰. تنوع ژنتیکی کلن‌های صنوبر با استفاده از تکثیر تصادفی پلی مورفیسم DNA(RAPD). پژوهش و سازندگی، ۵۰: ۴۴-۳۶

2-Bradshaw, H. D.JR., Villar, M., Watson, B. D., Otto, K. G.,

Archive of SID
www.SID.ir

جدول شماره ۳: نام جفت آغازگرهای مورد استفاده، توالی نواحی دو جناح و توالی‌های تکراری آنها

نام آغازگر	توالی دو جناح	توالی تکراری هدف	شرایط PCR	منبع
PMGC 14	'F 5' -TTCAGAATGTGCATGATGG-3 'R 5'-GTGATGATCTCACCGTTTG-3	GT	50NP*	Bradshawو همکاران (۱۹۹۴)
WPMS 09	'F 5' -CTGCTTGCTACCGTGGAACA-3 'R 5'-AAGCAATTTGGGTCTGAGTATCTG-3	(GT) (GA)	60 ,55 ,50 Lp	Van der Schoot و همکاران(۲۰۰۰)
WPMS 12	'F 5'- TTTTTCGTATTCTTATCTATCC-3 'R 5'-CACTACTCTGACAAAACCATC-3	GT	50 NP	Van der Schoot و همکاران(۲۰۰۰)
WPMS 14	'F 5'-CAGCCGCAGCCACTGAGAAATC-3 'R 5'-GCCTGCTGAGAAGACTGCCTTGAC-3	CGT	60 ,55 ,50 Lp	Van der Schoot و همکاران(۲۰۰۰)
WPMS 16	'F 5'-CTCGTACTATTTCCGATGATGACC-3 'R 5'-AGATTATTAGGTGGGCCAAGGACT-3	NTC	50,55 Lp	Van der Schoot و همکاران(۲۰۰۰)
WPMS 18	'F 5'-CTTCACTAGGACATAGCAGCATC-3 'R 5'-CACCAGAGTCATCACCAGTTATTG-3	GTG	50,55,60 Lp	Van der Schoot و همکاران(۲۰۰۰)
WPMS 20	'F 5'-GTGCGCACATCTATGACTATCG-3 'R 5'-ATCTTGTAATTCTCCGGGGCATCT-3	TTCTGG	50,55,60 NP	

* در مورد شرایط PCR، اعداد ۵۰، ۵۵، و ۶۰ نشان دهنده درجه حرارت Annealing بوده و NP برای PCR کوتاه ، ولی LP برای PCR بلند است.

7-Smulders, M. J. M., Bredemeijer, G., Rus- Kortekaas, W. 1997; Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphism among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other Lycopersicon species. Theoretical and Applied Genetics. 97: 264-272.

8-Smulders, M. J. M., Van der Schoot, J., Ivens, B., Storm, V., Castiglione, S., Grassi, F., Fossati, T., Borenschen, J., Van Dam, B. C., and Vosman, B. 2001; a. Clonal propagation in Black poplar (*Populus nigra* L.). In Press. Journal of Ecology Oxford. 89 (1): 285-291.

9-Smulders, M. J. M., Van der Schoot, J., Pospiskova, M., and Vosman, B. 2001 b; Microsatellite markers in black Poplar (*Populus nigra* L.) Molecular Ecology Notes.l (3): 188-190.

10-Van der Schoot, J., Pospiskova, M., Vosman, B., and Smulders, M. J. M. 2000; Development and characterization of microsatellite markers in black poplar (*Populus nigra* L.). Theroetical and Applied Genetics. 101: 317-322.

Stewart, S., and Stettler, R.F. 1994; Molecular genetics of growth and development in populus. III. A genetic linkage map of a hybrid poplar composed of RFLP, STS, and RAPD markers. Theoretical and Applied Genetics. 89: 167-178.

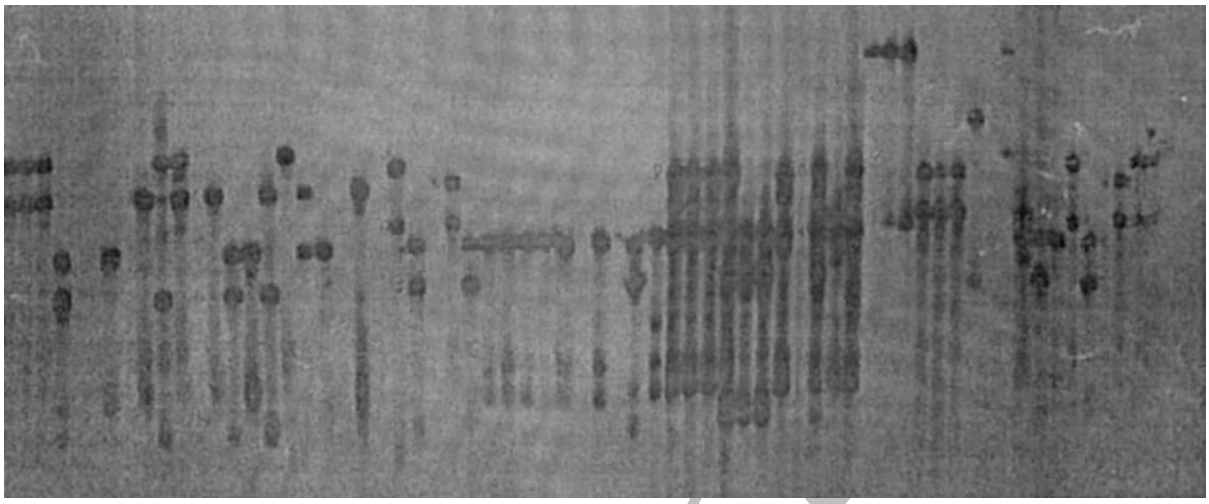
3-Dayanandan, S., Rajora, O., and Bawa, K. S. 1998. Isolation and characterization of microsatellites in trembling aspen (*Populus tremuloides*). Theoretical and Applied Genetics. 96: 950-956.

4-Fulton, T. M., Chunwongse, J., and Tanksley, S. D. 1995; Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. Plant Molecular Biology Reporter. 13: 207-209.

5- Legionnet, A., Faivre-Rampant, P., Villar, M., and Lefevre, F. 1997; Sexual and asexual reproduction in natural stands of *Populus nigra.* Bot Acta. 110: 257-263.

6-Rahman, M. H., Dayanandan, S., and Rajora, P. 2000; Microsatellite DNA markers in *Populus tremuloides*. Genome. 43: 293-297;

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۱- باندهای تکثیر شده میکروساتلایت برای جمعیت‌های مختلف صنوبر توسط آغازگر WPMS 16 بر روی ژل آکریل آمید

جدول شماره ۴ : برخی از داده های آماری برای جمعیت ها توسط جفت آغازگرهای مختلف

آغازگرها	اندازه نمونه	تعداد آلل های مشاهده شده	تعداد آلل های موثر	هتروزیگوسیتی مشاهده شده	هتروزیگوسیتی مورد انتظار	درجات آزادی	مربع X۲	سطح معنی داری
PMGC ۱۴	۳۱۴	۹	۴/۴۶۷	۰/۷۸۹	۰/۷۷۹	۳۶	۱۶۶/۷۶۵	۰/۰۰۰۰
WPMS ۰۹								
WPMS ۱۲	۳۶۲	۱۴	۶/۸۳۲	۰/۷۱۸	۰/۸۵۶	۹۱	۳۲۸/۸۹۸	۰/۰۰۰۰
WPMS ۱۴								
WPMS ۱۶	۳۳۴	۱۳	۴/۰۹۲	۰/۷۶۱	۰/۷۵۸	۷۸	۱۲۱/۵۵۷	۰/۰۰۱۲
WPMS ۱۸								
WPMS ۲۰	۳۶۲	۱۶	۶/۹۱۴	۰/۸۵۱	۰/۸۵۸	۱۲۰	۲۳۶/۲۵۶	۰/۰۰۰۰
میانگین								
انحراف معیار	۳۹۴	۱۰	۳/۲۰۹	۰/۵۷۹	۰/۶۹۰	۴۵	۱۱۵/۶۴۷	۰/۰۰۰۰
	۴۰۰	۱۱	۵/۷۷۳	۰/۶۷۵	۰/۸۲۹	۵۵	۲۴۰/۸۴۵	۰/۰۰۰۰
	۴۳۰	۱۰	۳/۸۶۰	۰/۷۷۲	۰/۷۴۳	۴۵	۹۶/۲۴۶	۰/۰۰۰۰
	۳۷۱	۱۱/۸۵۷	۵/۰۲۱	۰/۷۳۵	۰/۷۸۷			
		۲/۵۴۵	۱/۴۸۵	۰/۰۸۸	۰/۰۶۳			

Archive of SID
www.SID.ir

جدول شماره۵: اندازه نمونه ها، هتروزیگوسیتی مشاهده شده (Obs- Het) و مورد انتظار(Exp-Het)

آغازگر	PMGC ۱۴	WPMS ۰۹	WPMS ۱۲	WPMS ۱۴	WPMS ۱۶	WPMS ۱۸	WPMS ۲۰													
جمعیت	اندازه نمونه	Obs- Het	Exp - Het	اندازه نمونه	Obs- Het	Exp - Het	اندازه نمونه	Obs- Het	Exp - Het	اندازه نمونه	Obs- Het	Exp - Het	اندازه نمونه	Obs- Het	Exp - Het	اندازه نمونه	Obs- Het	Exp - Het	اندازه نمونه	Obs- Het	Exp - Het
P. nigra اروپا	۲۳۴	۰/۸۲	/۶۶	۲۲۴	۰/۸۹	۰/۷۶	۲۳۴	۰/۸۱	۰/۷۰	۲۳۴	۰/۸۷	/۸۰	۲۳۶	۰/۵۵	۰/۴۸	۲۱۴	۰/۷۷	۰/۷۱	۲۳۶	۰/۸۲	۰/۷۴
P. alba ایران	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۶	۰	۰	۶	۱	۰/۶	۶	۱	۰/۶
P. nigra ایران	۰	۰	۰	۶	۱	۰/۶	۲	۱	۱	۰	۰	۰	۶	۱	۰/۶	۶	۱	۰/۷۳	۶	۱	۰/۶
P. euph.. ایران	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۴	۵	۰/۸۳	۴	۱	۰/۶۷	۴	۱	۰/۶۷
P. del... ایران	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۶	۰/۶۷	۰/۶	۴	۰/۵	۰/۵	۶	۱	۰/۷۳
P. eura.. اروپا	۴۰	۰/۸۵	/۸۱	۷۲	۰/۷۲	۰/۸۳	۵۶	۰/۴۶	۰/۵۹	۷۴	۰/۷۶	/۸۵	۶۶	۰/۷۰	۰/۷۶	۸۴	۰/۸۸	۰/۸۴	۹۰	۰/۹۸	۰/۸۲
P. X rb اروپا	۴۰	۰/۵۵	/۴۵	۵۰	۰	۰	۳۰	۰/۹۳	۰/۹۰	۴۶	۰/۸۷	/۸۵	۵	۰/۴	۰/۴۳	۶۰	۰	۰	۶۰	۰/۱۳	۰/۲۴
P. del... اروپا																					

Archive of SID

www.SID.ir