بررسی رابطه ژنتیکی چنارهای کهنسال و جوان (*Platanus* spp. L.) با استفاده از نشانگر SRAP

میلاد ارجلو [1*]، نعمت الله اعتمادی [2]، مجید طالبی [3]، علی نیکبخت [4]، بدرالدین ابراهیم سید طباطبایی [5]، صدیقه رضایی [1]

1- دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه صنعتی اصفهان. 2- دانشیار گروه علوم باغبانی دانشگاه صنعتی اصفهان. 3- استادیار گروه بیوتکنولوژی دانشگاه صنعتی اصفهان. 4- استادیار گروه علوم باغبانی دانشگاه صنعتی اصفهان. 5- استاد گروه بیوتکنولوژی دانشگاه صنعتی اصفهان.

چکیده

بررسی تنوع ژنتیکی جوامع گیاهی همواره برای اصلاح کنندگان گیاهی از اهمیت فراوانی برخوردار بوده است و درختان کهنسال در هر کشور یکی از مهمترین ذخایر ژنتیکی گیاهی آن کشور محسوب می شود. در این پژوهش تنوع ژنتیکی 79 نمونه مختلف چنار نواحی مرکزی ایران شامل 15 نمونه کهنسال و 64 نمونه جوان با استفاده از نشانگر مولکولی SRAP مورد بررسی قرار گرفت. تعداد 13 آغازگر تصادفی SRAP، 237 نوار تکثیر نمود که 61 نوار آن چند شکلی نشان دادند. الگوی نواربندی بر اساس وجود و یا عدم وجود نوارها به ترتیب با یک و صفر نشان داده شده و داده ها توسط نرم افزار NTSYS نسخه (2/02) تجزیه و تحلیل گردید، نتایج نشان داد در بین نمونه های کهنسال و نمونه های جوان تفاوت ژنتیکی وجود ندارد.

واژه های کلیدی: تنوع ژنتیکی، درخت چنار، نشانگر مولکولی، SRAP.

مقدمه:

برای اتخاذ تدابیر اصلاحی مناسب، بهنژادگر بایستی از تنوع ژنتیکی صفات گیاه مورد نظر شناخت کافی داشته باشد تا برنامه های بهنژادی خود را با وسعت نظر بیشتری تدوین نماید، بنابراین تنوع ژنتیکی اساس و پایه کار اصلاح نباتات می باشد. درختان کهنسال در هر کشور یکی از مهمترین ذخایر ژنتیکی گیاهی آن کشور محسوب می شود که حفظ این منابع از دیدگاه تاریخی و فرهنگی نیز دارای اهمیت فراوان است. درخت چنار از خانواده Platanaceae می باشد. انواع درخت چنار تقریباً در تمام مناطق جهان وجود دارند و به خوبی خود را با شرایط آب و هوایی تطبیق می دهند(6).درخت چنار یکی از درختان بسیار مقاوم بوده و می تواند سال ها در مقابل عوامل نامساعد طبیعی ، از جمله کم آبی، آفات و بیماری ها پایدار باشد.(1) از نظر گیاه شناسی، تعداد گونه های چنار متفاوت است. به نظر عده ای، چنار دارای دوگونه اصلی *Platanus orientalis* L. و *P. occidentalis* L. است و گونه *P. acerfolia* Wild را هیبرید گونه های اول و دوم می دانند و بقیه را زیرگونه تلقی می کنند. عده ای نیز، تعداد گونه های چنار را بین 7 تا 10 ذکر می کنند. در بین گونه‌های چنار، گونه *P. orientalis* L. تنها گونه‌ای است که احتمالاً بومی ایران است(2و 4). با توجه به نقش مهمی که درختان چنار در فضای سبز بر عهده دارند، انجام مطالعه در مورد ارقام و واریته های موجود دارای اهمیت به سزایی می باشد. در همین راستا در پژوهش حاضر تلاش شده است تا گوناگونی ژنتیکی درختان چنار کهنسال ناحیه مرکزی ایران با سایر درختان موجود در سطح شهر با استفاده از نشانگر SRAP مورد بررسی قرار گیرد. انجام مطالعاتی نظیر این پژوهش می تواند در یافتن نمونه های مناسب برای فضای سبز شهری و به دست آوردن اطلاعاتی سودمند درباره این گونه گیاهی و بهنژادی آن و گزینش نمونه های یکنواخت تر در فضای سبز مفید باشد.

مواد و روش:

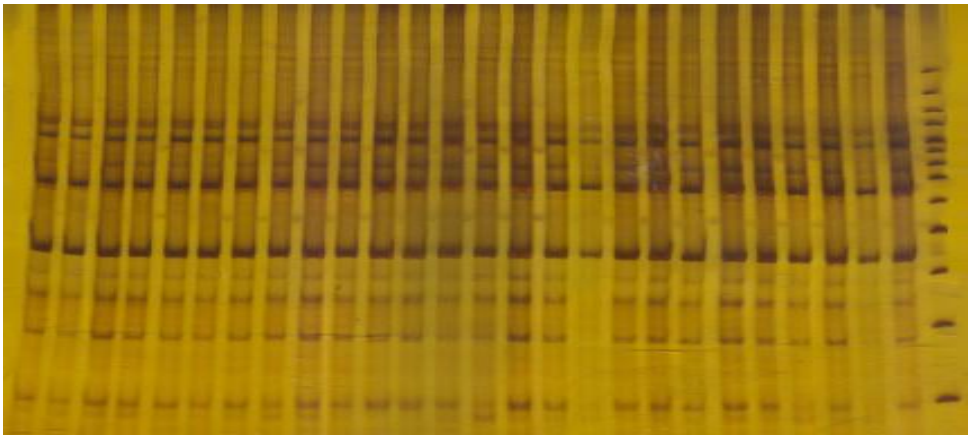
در این پژوهش نمونه هایی از مناطق مرکزی ایران شامل شهرهای: اراک، اصفهان، کرج، محلات، کاشان و نطنز از گونه های *P. orientalis* L. و *P. occidentalis* L. انتخاب گردیدند. در نهایت 79 نمونه از نمونه های جمع آوری شده جهت آزمایشات مولکولی

مورد استفاده قرار گرفتند. نمونه های برگی برداشت شده از هر درخت در نیتروژن مایع منجمد گردیدند و تا زمان استخراج DNA در دمای 80- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. استخراج DNA به روش موری و تامسون (5) در سال 1980 به منظور استخراج DNA از برگ مورد استفاده قرار گرفت. در این پژوهش از آغازگرهای شرکت Macrogene استفاده گردید. برای هر مخلوط واکنش مقدار 2 میکرولیتر از DNA تهیه شده با غلظت 25 نانوگرم در لیتر (در مجموع 50 نانوگرم DNA) به 13 میکرولیتر از مخلوط واکنش PCR شامل *Tag* پلیمراز یک میکرولیتر (به غلظت U 1/4)، آغازگر یک میکرولیتر (به غلظت pmol 5)، کلرید منیزیم یک میکرولیتر (به غلظت mM 2/6)، مخلوط نوکلئوتیدها 0/3 میکرولیتر (به غلظت mM 0/2)، بافر PCR 1/5 میکرولیتر (به غلظت X 1) و 7/2 میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل اضافه گردید که در پایان حجم محلول واکنش PCR به 15 میکرولیتر رسید. پس از اضافه کردن یک قطره روغن معدنی استریل، آمیخته موجود به سرعت تحت واکنش زنجیره ای پلیمراز در دستگاه Biometra T-1 Thermoblock با برنامه دمایی مناسب قرار گرفت(جدول1). پس از انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز، به حجم مساوی (5 میکرولیتر) از بافر بارگذاری فرمامید (96% فرمامید، 10 mM EDTA، 0/25 % بروموفنل بلو و 0/25 % زایلن سیانول) مخلوط نموده. به منظور مشاهده الگوی نواری از ژل پلی اکریل آمید 8% واسرشته استفاده گردید. الکتروفورز با دستگاه الکتروفورز عمودی Atto Corporation AE-6220 به مدت 2 ساعت انجام شد، سپس رنگ آمیزی ژل به روش نیترات نقره انجام گرفت(3)(شکل1). و در نهایت الگوی نواربندی بر اساس وجود و یا عدم وجود نوارها به ترتیب با یک و صفر نشان داده شده و داده ها توسط نرم افزار NTSYS نسخه (2/02) تجزیه و تحلیل گردید.

جدول 1- زمان و دمای مناسب لازم برای سه مرحله مختلف (باز شدن، اتصال و بسط) برای آغازگرهای SRAP

تعداد چرخه	مرحله انجام	زمان	درجه حرارت
1 چرخه	واسرشت اولیه	5 دقیقه	94°C
5 چرخه	تک رشته ای شدن DNA	1 دقیقه	94°C
	اتصال آغازگر به DNA تک رشته ای	1 دقیقه	35°C
	بسط آغازگر	1 دقیقه	72°C
35 چرخه	تک رشته ای شدن DNA	1 دقیقه	94°C
	اتصال آغازگر به DNA تک رشته ای	1 دقیقه	50°C
	بسط آغازگر	1 دقیقه	72°C
1 چرخه	گسترش بسط	10 دقیقه	72°C

شکل1- رنگ آمیزی ژل به روش نیترات نقره.



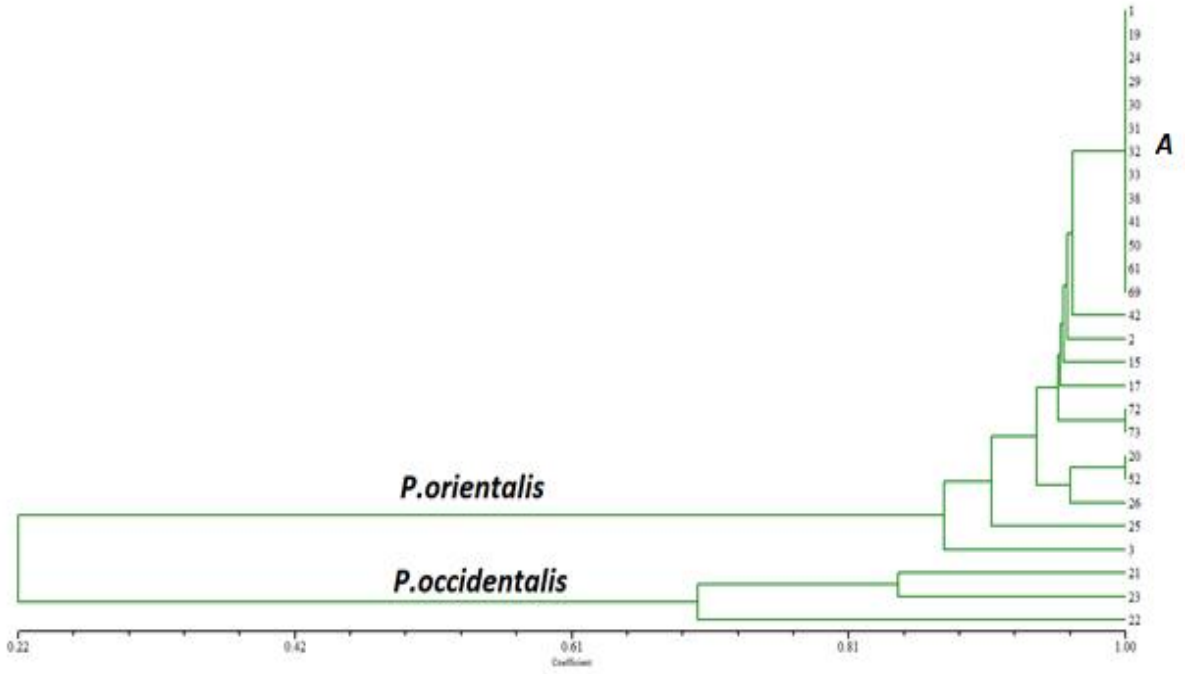
نتایج:

در این پژوهش با استفاده از 10 آغازگر تصادفی SRAP در مجموع تعداد 237 نوار به دست آمده. که از این بین 61 نوار در بین دو یا چند نمونه چندشکلی نشان دادند (جدول2).از بین آغازگرهای مورد استفاده M5E4 و M1E17 هر کدام به ترتیب با 32 و 31 نوار، بیشترین تعداد نوار و آغازگرهای M2E1 و M2E17 هر کدام با 7 نوار کمترین تعداد نوار را تولید نمودند. به دلیل شباهت فراوان بین نمونه ها از 79 نمونه تنها 27 نمونه در شکل 2 آمده است و سایر نمونه ها که شامل درختان کهنسال می باشد در بخش A قرار گرفته اند.همان طور که در شکل 2 مشاهده می شود درختان کهنسال و جوان مورد بررسی در این پژوهش از نظر ژنتیکی تفاوت چندانی با هم نداشته و در یک دسته طبقه بندی شده‌اند، که احتمال می رود این شباهت بالا به دلیل تکثیر چنار از روش غیرجنسی باشد.

جدول2- تعداد نوارهای چند شکل و درصد چندشکلی مشاهده شده در بین 79 نمونه چنار با استفاده از نشانگر SRAP

نام آغازگر	تعداد نوار تک شکل	تعداد نوار چندشکل	تعداد کل نوار	درصد چند شکلی
M1E17	23	8	31	25/80
M1E2	8	1	9	11/11
M2E6	8	3	11	27/27
M2E17	5	2	7	28/57
M3E6	12	5	17	29/41
M3E17	14	7	21	33/33
M4E4	19	10	29	34/48
M5E1	7	4	11	36/36
M5E4	26	6	32	18/75
M5E5	7	1	8	12/50
M5E17	17	9	26	34/61
M6E2	15	3	18	16/66
M6E5	15	2	17	11/76
مجموع	176	61	237	-
میانگین	13/53	4/69	18/23	24/66

شکل2 –گروه بندی 27 ژنوتیپ چنار بر اساس الگوی باندی نشانگرSRAP با استفاده از ضریب تشابه جاکارد، روشUPGMA.



منابع:

[1] ثابتی، ح.، 1355. *درختان و درختچه های ایران*، انتشارات سازمان تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی.

[2] شریفی نیا، م. 1372. *چنار*. واحد آموزش و پژوهش سازمان پارک ها و فضای سبز شهر تهران، تهران. ایران. 46ص.

[3] 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.

[4] FAO, 1980. Poplars and Willows in Wood Production and Land use. Rome, FAO Forestry and Forest Products Studies, 328 p.

[5] Morales, F., R. Grasa, and A. Abadia. 1998. The iron chlorosis paradox in fruit trees. *J. Plant nutr.* 21:815-825.

[6] Sutton, D. 2002. *Tree of Britain and Europe*, Kingfisher, IWC., HongKong.

Genetic relationships of old and young plane (*Platanus orientalis* L.) using SRAP marker

M. Orojloo[1*], N. A. Etemadi[2], M. Talebi[3], A. Nikbakht[4], B. E. Sayed Tabatabaei[5], S. Rezaei[1]

1-MSc. Students of Horticulture College of Isfehan University and Technologhy, 2,4- Faculty member of Horticulture College of Agriculture of Isfehan University and Technologhy, 3,5- Faculty member of Biotechnology College of Agriculture of Isfehan University and Technologhy

Abstract

Assessment of genetic variation among plant populations is important for plant breeders and old trees in each country is one of the most important genetic resources. In this research genetic variation among 79 different *Platanus* orientalis L. genotypes from central regions of Iran including 15 old samples was evaluated using SRAP molecular marker. Thirteen SRAP primer combinations were amplified 237 total bands, which 61 of them were

polymorphic. Banding pattern on the base of presence or absence of bands was scored by 1 and 0, respectively and data were analyzed using NTSYS software (version 2.02). The results showed that there were no significant differences between old and young samples.
Keywords: Genetic variation, plane tree, molecular marker, SRAP.