

شناسایی تنوع سوماکلونال با استفاده از نشانگرهای پراکسیداز و میکروستلایت *Eucalyptus microtheca* F. Muell در

مرتضی شبان‌نژاد ممقانی^{۱*}، محمدحسن عصاره^۲، منصور امید^۳، محمد متینی‌زاده^۴، مسیح فروتن^۵،

عباس قمری زارع^۶، شکوفه شهرزاد^۷ و مریم جبلی^۸

*- نویسنده مسئول مکاتبات، کارشناس دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی - گروه اصلاح نباتات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج - صندوق پستی ۳۱۴۸۵-۳۱۳
پست الکترونیک: shabannejad.morteza@gmail.com

۲- استاد پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران

۳- استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

۴- استادیار پژوهش مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران

۵- مربی پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران

۶- استادیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران

۷- کارشناس، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران

۸- کارشناس ارشد، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، تهران

تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۳/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۲/۳

چکیده

هدف از این پژوهش ایجاد تنوع سوماکلون در کشت درون شیشه *Eucalyptus microtheca* بود. برای این منظور ریزنمونه‌های سرشاخه‌های سبز نهال یک‌ساله *E. microtheca* در محیط MS (با نیمی از مقادیر NH_4NO_3 و KNO_3) همراه با سطوح متفاوت هورمون‌های NAA (α -Naphthalene Acetic Acid)، Kin (Kinetin) و TDZ (Thidiazuron) کشت گردیدند. به‌عنوان نشانگر بیوشیمیایی، الگوی باندهای پراکسیداز به روش PAGE در گیاهچه‌های باززایی شده، بررسی شد تا تأثیر مقادیر متفاوت هورمون TDZ بر روی مکان‌های ژنی بیان‌کننده این آنزیم مشخص شود. به‌طوری‌که یک مکان ژنی دایمر، یک مکان ژنی تترامر و دو باند اپی‌ژنتیک وجود داشت و تغییرات ژنوم گیاهچه‌های سوماکلون با استفاده از نشانگر مولکولی SSR ارزیابی گردید. دو پرایمر استفاده شده نشان دهنده وجود چند شکلی بودند. تجزیه و تحلیل‌های آماری ناپارامتری وجود اثر معنی‌دار توالی‌های ساده تکرار شونده بر آلل‌های پراکسیداز را تأیید نمود. بنا به نتایج پایداری مکان ژنی دایمر در مقادیر مختلف TDZ کمتر از مکان ژنی تترامر بود، همچنین همبستگی بیشتری میان آلل‌های مکان ژنی تترامر و توالی‌های ساده تکرار شونده وجود داشت.

واژه‌های کلیدی: کشت بافت، تنوع سوماکلونال، پراکسیداز، توالی‌های ساده تکرار شونده

مقدمه

شرایط اکولوژیکی این مناطق سازگار شده است

(Mortazavi-Jahromi, 1994). این گونه از لحاظ شکل

ظاهری مطلوب نیست اما با آزمایش هیبریدهای جدید و

گونه *Eucalyptus microtheca* F. Muell. از جمله

گونه‌های وارداتی به استان‌های جنوبی ایران است که در

همچنین از این آنزیم به عنوان نشانگر برای انواع مقاومت‌ها نام برده شده است که در هنگام ایجاد تنش فعالیت بیشتری دارد (Ezaki et al., 1996).

چندشکلی در توالی‌های ساده تکرار شونده بر روی ایزوانزیم‌ها مؤثر است (Kinoshita & Ishikawa, 2003). در واکنش به تنش‌های وارد شده به توالی ژنتیکی پروموتور پراکسیداز در گیاه تنباکو، فیتوهورمون ABA نحوه بیان این پروموتور را تنظیم می‌نماید (Klotz & Lagrimini, 1997). مقایسه نشانگرهای مولکولی توسط Liu و Furnier (1993)، Rus-Kortekaas و همکاران (1994) و Russell و همکاران (1997) وجود همبستگی میان نشانگرهای آنزیمی و مولکولی را به اثبات رسانده است. همبستگی نشانگر مولکولی SSR با دیگر نشانگرهای مولکولی بر روی گیاهان سویا و جو مقایسه شده است (Powell et al., 1996 و Saghai-Marooof et al., 1994). همچنین همبستگی ایزوانزیم‌ها و نشانگر مولکولی SSR در گیاه تریتیکاله مورد بررسی قرار گرفته است (Sun et al., 1998). ضریب $r=0.8$ میان باندهای میکروستلایت و RAPD با استفاده از رتبه‌بندی Spearman، توسط Sun و همکاران (1997) گزارش گردیده است. با استفاده از آزمون Mental نیز همبستگی میکروستلایت‌ها و ایزوانزیم‌ها در گیاه تریتیکاله 0.164 بود (Sun et al., 1997). البته Shah و همکاران (1999) و Byrne و همکاران (1996) از آزمون Chi-square برای تعیین اثر معنی‌دار مکان‌های ژنی استفاده نموده‌اند.

در این پژوهش با استفاده از سطوح متفاوت هورمون TDZ، گیاهچه‌های باززایی شده از کالوس‌های *E. microtheca* بدست آمده و سپس تغییرات آنزیم پراکسیداز و توالی‌های ساده تکرار شونده و همبستگی آنها

انتخاب پایه‌های برتر، قابل اصلاح است (Assareh and Sardabi, 2007). حفظ ژنوتیپ‌های برتر در این گونه به علت دگرگشتن بودن آن بسیار دشوار می‌باشد. از آنجا که کشت بافت، تکثیر از طریق امکان شناخت و کنترل عوامل مؤثر در تمایززدایی، باززایی و تکثیر انبوه را فراهم می‌سازد، می‌تواند ابزاری مناسب برای حذف عوامل محیطی و یکسان‌سازی مواد گیاهی باشد (Morabito et al., 1996). باززایی غیرمستقیم در *E. gunnii* (Herve et al., 2001)، باززایی مستقیم در *E. tereticornis* (Sankara Rao, 1988) و جنین‌زایی سوماتیکی در *E. grandis* و *E. dunnii* (Watt et al., 1999) و *E. globulus* (Pinto et al., 2002) مثال‌هایی از پژوهش‌های انجام شده بر روی اکالیپتوس‌ها می‌باشند. پراکسیداز متأثر از شرایط محیطی، ژنوتیپ و اثر متقابل این دو می‌باشد. در این بررسی‌ها درون شیشه، کلیه عوامل محیطی و ژنوتیپی حذف و تغییرات متأثر از سطوح مختلف هورمون‌ها مطالعه شد.

از پراکسیداز به عنوان نشانگری برای شناسایی اندام‌زایی و جنین‌زایی نام برده شده است (Preetha et al., 1995). از طرفی تغییر معنی‌دار فعالیت پراکسیداز و کاتالاز به عنوان نشانگر در هنگام باززایی مستقیم صنوبر توسط هورمون TDZ تأیید شده است (Tang & Newton, 2005). مقدار فعالیت پراکسیداز در مراحل پریکوتیلدون و کوتیلدون اندک برآورد شده که متناظر با مراحل تشکیل جنین جنسی می‌باشد (Kormutak et al., 2003). افزایش فعالیت پراکسیداز در هنگام کال‌زایی و در کالوس‌های جنین‌زای کاهو مشاهده شده است (Xiaoli et al., 1992). از نقش‌های مهم این آنزیم می‌توان به نقش آن در تولید دیواره سلولی، اتصال عرضی پلی‌ساکاریدها و لیگنین‌سازی اشاره کرد (Fry et al., 1979; Castillo et al., 1995; Preetha et al., 1995).

ساعت روشنایی (۲۷ درجه سانتی‌گراد) و ۸ ساعت تاریکی (۱۹ درجه سانتی‌گراد) از آنها نگهداری شد. پس از این مدت از برگ‌های گیاهچه‌های سوماکلون برای مطالعات بعدی نمونه‌گیری گردید.

استخراج عصاره و الکتروفورز ژل پلی‌اکریلامید به روش SDS-PAGE با استفاده از روش Stich و Ebermann (1982) برای ۲۷ گیاهچه سوماکلون انجام شد. ۰/۱ گرم برگ تازه در ۰/۳ میلی‌لیتر محلول استخراج (pH=۷/۵) هموژنیزه گردید و به مدت ۴۸ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. نمونه‌ها با ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردیدند. محلول رویی برای الکتروفورز استفاده شد. الکتروفورز با استفاده از ژل جداکننده ۱۲٪ (۱۲۰ گرم در لیتر آکریلامید، ۲ گرم در لیتر بیس آکریلامید و ۴۵/۶ گرم در لیتر تریس) با pH=۸/۳ که توسط اسیدسیتریک تنظیم شده بود همراه با ژل جمع کننده ۵٪ (۵۰ گرم در لیتر آکریلامید، ۸/۳۳ گرم در لیتر بیس آکریلامید، ۱۵ گرم در لیتر تریس و ۸/۴۱ گرم در لیتر اسید سیتریک) و بافر الکترولیت (۷/۲ گرم در لیتر گلیسین و ۱/۵ گرم در لیتر تریس) با شدت جریان ۳۰۰ ولت و ۱۰۰ میلی‌آمپر به مدت ۴ ساعت بارگذاری گردید. برای سفت شدن هر دو ژل از ۱ میلی‌لیتر محلول آمونیوم پروکسودی سولفات (۱/۴ گرم در لیتر) و تمد استفاده شد. از هر نمونه به میزان ۵۰ میکرولیتر به درون هر چاهک تزریق شد. به منظور رنگ‌آمیزی از ۱۸۰۰ میکرولیتر محلول کاربازول (۰/۰۴ گرم کاربازول، ۱۲۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق و ۶۰۰ میکرولیتر اسید استیک) همراه با ۷۵۰ میکرولیتر H₂O₂ ۳٪ و ۱۰۰ میلی‌لیتر استات سدیم (۵۰ میلی‌مولار، pH=۴/۵) به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد. پس از این مدت ژل توسط آب مقطر شسته شده، عکس و زیموگرام از آن تهیه شد.

مورد ارزیابی قرار گرفت تا نحوه تأثیر این مکان‌های ژنی بر روی بیان آنزیم پراکسیداز مشخص گردد.

مواد و روشها

در اردیبهشت ماه سال ۱۳۸۶ سرشاخه‌های سبز فاقد بافت چوبی *Eucalyptus microtheca* F. Muell از یک گیاه حاصل از بذر که به مدت یک‌سال در گلخانه نگهداری شده بود، به‌عنوان ریزنمونه جدا شدند (بذر مورد استفاده در این آزمایش از پایه‌های کاشته شده در دهنو ممسنی در استان فارس با طول جغرافیایی ۵۱ درجه و ۳۱ دقیقه شرقی، عرض جغرافیایی ۳۰ درجه و ۸ دقیقه شمالی و ارتفاع ۱۱۴۰ متر از سطح دریا جمع‌آوری گردیده بود). ریزنمونه‌ها برای ضدعفونی سطحی، درون آب دارای چند قطره تویین به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند. سپس با آب مقطر شستشو شدند و توسط کلرومرکوریک ۰/۰۱٪ به مدت ۳۰ ثانیه تیمار گردیدند. ریزنمونه‌ها در نهایت سه مرتبه توسط آب دوبار تقطیر (هربار به مدت ۵ دقیقه و در زیر هود) شستشو شدند. برای بازرایی از محیط‌کشت MS با نیمی از مقادیر NH₄NO₃ و KNO₃ استفاده شد (Murashige & Skoog, 1962). مطابق جدول ۱، پنج تیمار متفاوت هورمونی به محیط‌ها اضافه گردید (جهت تعیین بهترین مقدار NAA و Kin از نتایج پژوهش Shabannejad و همکاران (۲۰۰۸) و برای بهترین مقادیر هورمون TDZ از نتایج پژوهش Ghamari-Zare و همکاران (2006) استفاده گردید). محیط کشت با pH ۵/۷±۰/۱ برای ۲۰ دقیقه در ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو گردید. ریزنمونه‌ها پس از ضدعفونی سطحی به طول ۱ تا ۱/۵ سانتی‌متر بریده شدند و درون محیط‌های کشت قرار گرفتند. از هر تیمار ۷ تکرار و در هر تکرار ۶ ریزنمونه کشت شد. به مدت ۴ هفته در دوره نوری ۱۶

به نشانگرهای مولکولی از اعداد ۱ (وجود باند) و ۰ (عدم مشاهده باند) استفاده شد. در تمامی برآوردهای آماری تنها ۲۷ گیاهچه‌ای که به وسیله هر دو نشانگر مورد بررسی قرار گرفته بودند، تجزیه و تحلیل شدند. از آزمون χ^2 برای شناسایی اثر معنی‌دار نشانگر مولکولی SSR بر روی آل‌های پراکسیداز استفاده شد (Shah *et al.*, 1999) و (Byrne *et al.*, 1996)، همچنین ضریب رتبه‌بندی میان باندهای این دو، توسط نرم‌افزار JMP از روش ناپارامتری Spearman بدست آمد (Lanner-Herrera *et al.*, 1996). جهت بدست آوردن ضریب همبستگی میان دو نشانگر پراکسیداز و SSR با استفاده از نرم‌افزار NTSYS ابتدا دو ماتریس ضریب‌های تشابه Jaccard برآورد شد و بعد با استفاده از آزمون Mental (1967) این همبستگی محاسبه گردید (Sun *et al.*, 1998). همچنین با استفاده از ماتریس ضریب‌های تشابه Jaccard تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA در نرم‌افزار NTSYS انجام شد.

استخراج DNA به روش Doyle و Doyle (1987)، برای ۳۳ گیاهچه سوماکلون انجام شد. آزمون PCR توسط آغازگرهای EMBRA06 (Brondani *et al.*, 1998) و EMCRC09 (Steane *et al.*, 2001) انجام شد (جدول ۲). اجزاء تشکیل‌دهنده مطابق جدول ۳ برای یک واکنش ۲۵ میکرولیتری استفاده گردید. برای انجام مراحل واکنش PCR از روش Byrne و همکاران (1996) استفاده گردید. جهت مشاهده باندها از ژل آگارز ۱٪ و رنگ‌آمیزی توسط اتیدیوم بروماید استفاده شد. شناسایی چند شکلی با استفاده از ژل واسرشته پلی آکرلامید ۶٪ با رنگ‌آمیزی نیترات نقره انجام گرفت.

داده‌های به دست آمده از باززایی تیمارهای متفاوت با استفاده از فرمول $\sqrt{(Y+0.5)}$ نرمال شد. سپس به وسیله روش GLM در نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل گردید. برای وضوح بیشتر باندهای پراکسیداز، با استفاده از نرم‌افزار Excel زیموگرام رسم گردید. به منظور نمره‌دهی

جدول ۱- تیمارهای هورمونی استفاده شده جهت باززایی در گیاه *E.microtheca*

تیمارها	هورمونها	متوسط تعداد باززایی (%)
B _۱	TDZ ۰/۰ (mg l ⁻¹) + Kin ۱/۰ (mg l ⁻¹) + NAA ۱/۰ (mg l ⁻¹)	۶
B _۲	TDZ ۰/۰ ۱ (mg l ⁻¹) + Kin ۰/۵ (mg l ⁻¹) + NAA ۴/۰ (mg l ⁻¹)	۲۰
B _۳	TDZ ۰/۱ (mg l ⁻¹) + Kin ۰/۵ (mg l ⁻¹) + NAA ۴/۰ (mg l ⁻¹)	۵۲
B _۴	TDZ ۰/۵ (mg l ⁻¹) + Kin ۱/۰ (mg l ⁻¹) + NAA ۱/۰ (mg l ⁻¹)	۱۹
B _۵	TDZ ۱/۰ (mg l ⁻¹) + Kin ۱/۰ (mg l ⁻¹) + NAA ۱/۰ (mg l ⁻¹)	۳

جدول ۲- آغازگر SSR استفاده شده (Fwd: Forward, Rev: Reverse)

نام آغازگر	تعداد ال	تعداد تکرار ال	محدوده اندازه ال‌ها	منابع
EMBRA06-Fwd	AG	۱۹	۱۷۰-۱۲۰	Brondani <i>et al.</i> , 1998
EMBRA06-Rev				
EMCRC 09-Fwd	TG	۱۴	۳۴۲-۲۸۶	Steane <i>et al.</i> , 2001
EMCRC 09-Rev				

اطلاعات مندرج در جدول فوق از منابع نقل قول شده است.

جدول ۳- مواد تشکیل دهنده یک واکنش PCR

مقدار بهینه شده برای یک واکنش PCR	غلظت استفاده شده	اجزاء واکنش
۲ μl	۵۰ ng/μl	DNA
۲/۷۵ μl	۵۰۰ mM KCl, ۲۰۰ mM AMS	Buffer PCR
۲ μl	۱۵ mM	MgCl ₂
۲ μl	۲ u/μl	Taq DNA Polymerase
۲/۵ μl	۰/۱ mM	dNTP Mix
۲ μl	۰/۴ μM	F. primer
۲ μl	۰/۴ μM	R. primer
۹/۷۵ μl	به مقدار کافی	sH ₂ O
۲۵ μl		مجموع

نتایج

تا ۹) (شکل ۲- A). در گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت دو باند جدید دیده شد. باند نخست که فعالیت بسیار کمی داشت، با استفاده از هورمون‌های NAA و Kin در تمامی نمونه‌ها (۱۰۰٪) در منطقه مولکول‌های سبک ظاهر شد (باند ۱۰). هنگامی که از مقادیر مختلف هورمون TDZ جهت تکمیل محیط کشت استفاده گردید، ۲۱ گیاهچه از ۲۴ نمونه بازرایی شده، باند جدید دیگری در محدوده مولکول‌های سنگین داشتند (باند ۱). در تیمار B_۱ همه آلل‌ها حضور داشته و آلل‌های ۳، ۴ و ۹ فعالیت بیشتری داشتند (شکل ۲- B). ولی در تیمارهای B_۲ و B_۳ آلل ۳ حذف گردید و از میزان فعالیت دیگر آلل‌ها نیز به نسبت کاسته شد (شکل ۲- C). در ۵۰٪ از گیاهچه‌های تیمار B_۴ همه آلل‌ها حضور داشتند و فعالیت مکان ژنی تترامر به شدت افزایش یافته بود، درحالی که در ۵۰٪ دیگر از فعالیت مکان ژنی دیمر به شدت کاسته شده بود (شکل ۲- D و E). آلل‌های پراکسیداز در گیاهچه‌های حاصل از بازرایی توسط تیمار B رفتارهایی مثل B_۴ از خود نشان دادند (شکل ۲- F).

پس از گذشت ۴ هفته، ریزنمونه‌ها در تیمار B_۱ به صورت مستقیم بازرایی شدند (شکل ۱- A). با اضافه شدن هورمون TDZ به NAA و Kin، مقدار بازرایی از ۶٪ در تیمار B_۱ به ۲۰٪ در تیمار B_۲ رسید. بیشترین بازرایی در تیمار B_۳ به مقدار ۵۲٪ وجود داشت. به طوری که در این تیمار، بازرایی به صورت جنین‌زایی سوماتیکی دیده می‌شد (شکل ۱- B). در تیمار B_۴ کال‌زایی به شدت افزایش یافته و بازرایی غیرمستقیم به بیشترین مقدار رسید، در حالی که بازرایی به صورت جنین‌زایی سوماتیکی کاهش یافت. بازرایی در تیمار B_۴ ۱۹٪ بود (شکل ۱- C). با استفاده از تیمار B_۵، کالوس‌ها متراکم و سخت شدند که در نتیجه آن بازرایی غیرمستقیم به ۳٪ تنزل یافت. پس از تمایززدایی، همه گیاهچه‌ها ظاهر طبیعی داشتند. بدین ترتیب تعداد ۲۷ گیاهچه سوماکلون به همراه گیاه مادر مورد ارزیابی کیفی قرار گرفتند (زیموگرام‌های ۱ و ۲). برای گیاه شاهد یک مجموعه ۳ آلی دیمر و یک مجموعه ۵ آلی تترامر وجود داشت (آلل‌های ۲ تا ۴ و ۵

نتایج حاصل از مارکر مولکولی SSR

آغازگر EMBRA06 بر روی ژل آگارز یک باند بسیار شفاف در حدود ۱۵۰ جفت بازی با تکرارپذیری بسیار بالا به وجود آورد (شکل ۳). آغازگر EMCRC09، در حدود ۲۵۰ جفت بازی باند شفاف دیگری را نشان داد (شکل ۴). پس از بارگذاری آغازگر EMBRA06 بر روی ژل واسرشته پلی اکریلامید تنها گیاهچه شماره ۲۳ فاقد باند بود (شکل ۵). وجود چند شکلی برای گیاهچه‌های ۱۴ و ۲۹ توسط آغازگر EMCRC09 بر روی ژل واسرشته پلی اکریلامید آشکار شد (شکل ۶)؛ این باند در حدود ۲۸۰ جفت بازی بود.

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل‌های آماری

آزمون χ^2 نشان داد که توالی‌های SSR بر روی دو باند اپی‌ژنتیک پراکسیداز اثر معنی‌داری نداشتند (جدول ۴)،

ولی بیشترین تأثیر بر روی آلل PDB3 به‌وسیله آغازگر EMBRA06 و آلل‌های PTB4 و PTB5 به‌وسیله آغازگر EMCRC09 بوده است (جدول ۴). ضریب رتبه‌بندی Spearman بیشترین مقدار ضریب را به آغازگر EMBRA06 همراه با آلل PDB3 اختصاص داد (جدول ۵). همچنین آزمون Mental ضریب همبستگی دو ماتریس تشابه پراکسیداز و توالی‌های ساده تکرار شونده را ۰/۱۸ محاسبه نمود. تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA به نحوی با خط برش تقسیم‌بندی شد که ژنوتیپ‌ها در ۴ خوشه قرار گرفتند. این خوشه‌ها مؤید این می‌باشند که گیاهچه‌های ۱۴ و ۲۳ هر کدام به‌عنوان یک خوشه، نمونه‌های ۲۰ و ۳۳ در خوشه دیگر و سایر نمونه‌ها به همراه ژنوتیپ گیاه مادری در خوشه چهارم قرار گرفته‌اند (شکل ۷).

جدول ۴- نتایج حاصل از آزمون χ^2 برای باندهای پراکسیداز

EMBRA06		EMCRC09		باند‌های پراکسیداز
Probability	Df	Probability	Df	
۰/۸۴۴ ^{n.s}	۱	۰/۸۴۴ ^{n.s}	۱	PEB2
۰/۸۴۴ ^{n.s}	۱	۰/۰۰۰۱ ^{**}	۱	PTB5
۰/۸۴۴ ^{n.s}	۱	۰/۰۰۰۱ ^{**}	۱	PTB4
-	-	-	-	PTB3
۰/۰۱۲۶ [*]	۱	۰/۰۱۲۶ [*]	۱	PTB2
۰/۰۷۷۸ ^{n.s}	۱	۰/۰۷۷۸ ^{n.s}	۱	PTB1
۰/۰۰۳۳ ^{**}	۱	۰/۷۲۴۳ ^{n.s}	۱	PDB3
۰/۳۷۷۸ ^{n.s}	۱	۰/۳۷۷۸ ^{n.s}	۱	PDB2
۰/۰۷۷۸ ^{n.s}	۱	۰/۵۵۶۶ ^{n.s}	۱	PDB1
۰/۵۵۶۶ ^{n.s}	۱	۰/۵۵۶۶ ^{n.s}	۱	PEB1

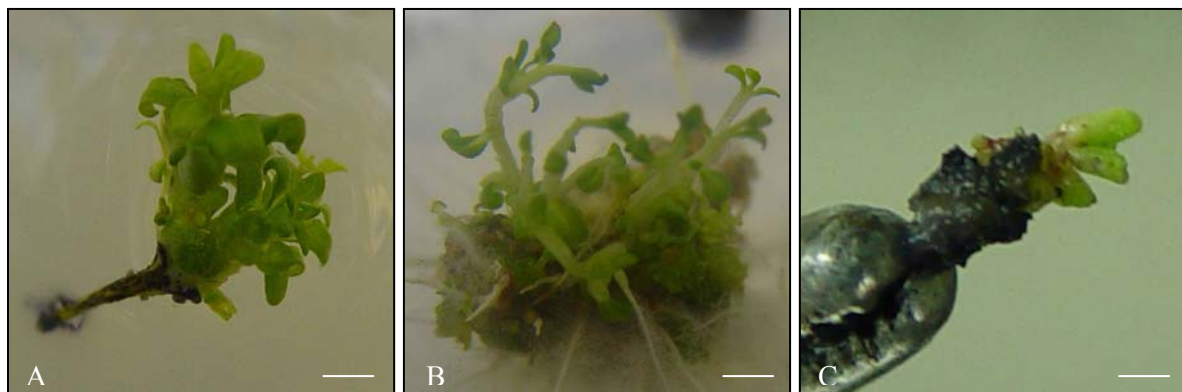
P: Peroxidase ;D: Dimer ;T: Tetramer ;E: Epigenetic ;B: Band

* معنی‌دار در سطح ۰/۰۵، ** معنی‌دار در سطح ۰/۰۱ و n.s عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

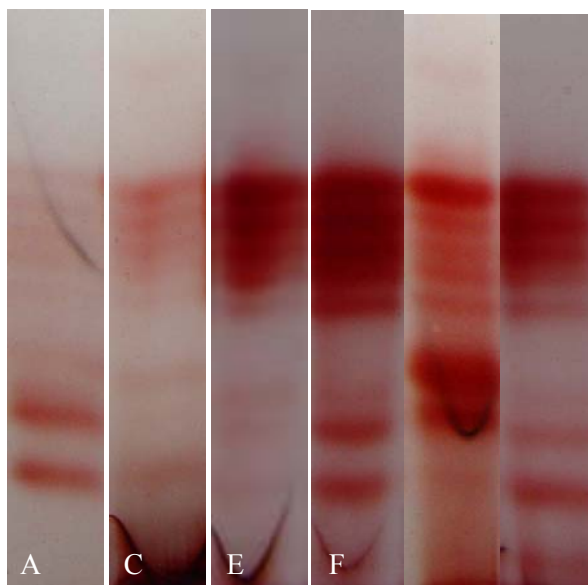
جدول ۵- ضریب‌های رتبه‌بندی Spearman برای باندهای پراکسیداز

آغازگر	باندهای پراکسیداز	ضریب رتبه‌بندی Spearman	آغازگر	باندهای پراکسیداز	ضریب رتبه‌بندی Spearman
EMCRC09	PEB2	037/-0	EMBRA06	PEB2	037/-0
EMCRC09	PTB5	1	EMBRA06	PTB5	037/-0
EMCRC09	PTB4	1	EMBRA06	PTB4	037/-0
EMCRC09	PTB3	-	EMBRA06	PTB3	-
EMCRC09	PTB2	0/4714	EMBRA06	PTB2	0/4714
EMCRC09	PTB1	0/3333	EMBRA06	PTB1	0/3333
EMCRC09	PDB3	0667/-0	EMBRA06	PDB3	0/5556
EMCRC09	PDB2	0/1667	EMBRA06	PDB2	0/1667
EMCRC09	PDB1	1111/-0	EMBRA06	PDB1	0/3333
EMCRC09	PEB1	1111/-0	EMBRA06	PEB1	1111/-0

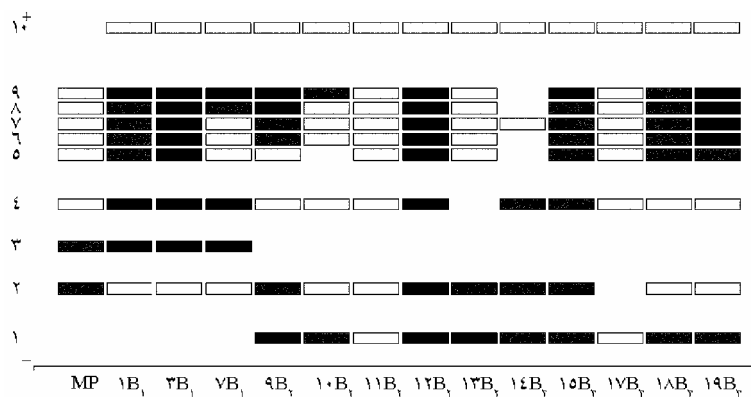
(Band :B .Epigenetic :E .Tetramer :T .Dimer :D .Peroxidase :P)



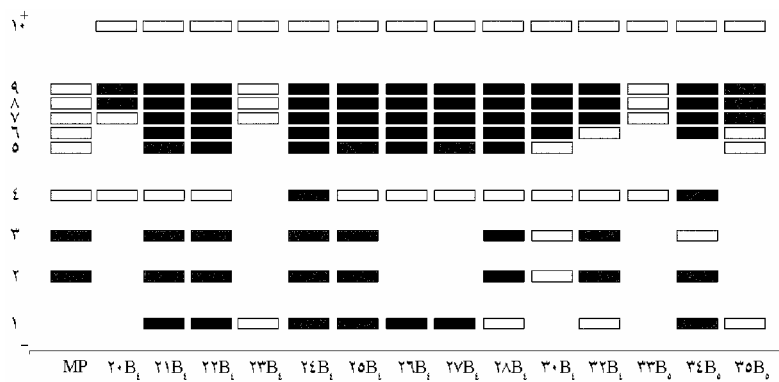
شکل ۱- تیپ‌های مختلف باززایی در کشت درون شیشه *E. microtheca* (A): باززایی مستقیم در تیمار B_۱، B_۲ وجود کالوس‌های جنین‌زا در تیمار B_۳، C: باززایی غیرمستقیم در تیمار B_۳).



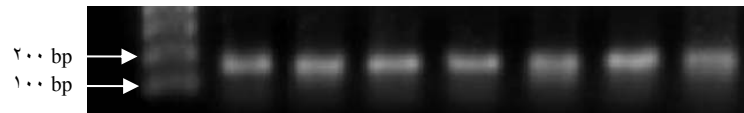
شکل ۲. باندهای پراکسیداز حاصل از گیاهچه‌های سوماکلون (A: گیاه مادر دارای دو مکان ژنی دایمر و تترامر، B: فعالیت آلل‌ها در تیمار B_۱ و ظاهر شدن باند جدید در محدوده مولکول‌های سبک، C: فعالیت آلل‌های حاصل از تیمار B_۲ و B_۳ همراه با حذف آلل هتروزیگوت از مکان ژنی دایمر و ظاهر شدن یک باند جدید دیگر در محدوده مولکول‌های سنگین، D: نمایان شدن مجدد آلل هتروزیگوت در تیمار B_۴، E: کاهش فعالیت مکان ژنی دایمر در B_۵، F: فعالیت شدید هر دو مکان ژنی در تیمارهای B_۶ و B_۷ (+ و - به ترتیب محدوده مولکول‌های سبک و سنگین می‌باشند)).



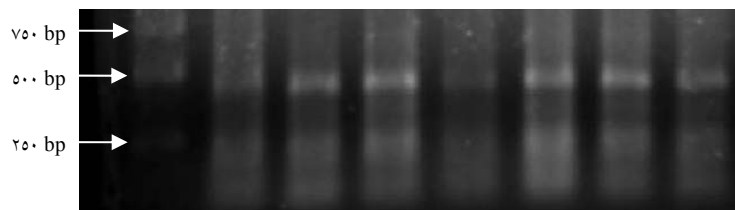
زیموگرام ۱. الگوی باندهای پراکسیداز برای ۱۳ گیاهچه سوماکلون *E. microtheca* بوسیله تیمارهای B_۱، B_۲ و B_۳. + و - به ترتیب محدوده مولکول‌های سبک و سنگین می‌باشند (چاهک اول گیاه مادر است).



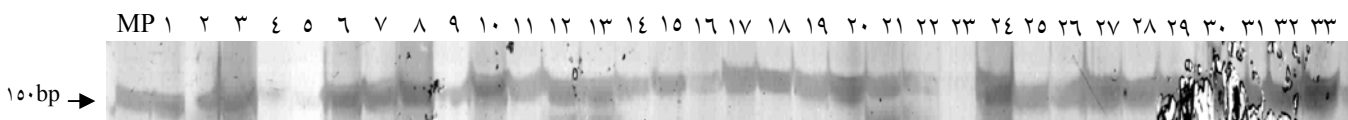
زیموگرام ۲- الگوی باندهای پراکسیداز برای ۱۴ گیاهیچه سوماکلون *E. microtheca* بوسیله تیمارهای B_۴ و B_۵.
+ و - به ترتیب محدوده مولکول‌های سبک و سنگین می‌باشند (چاهک اول گیاه مادر است).



شکل ۳- باندهای SSR مشاهده شده ۷ گیاهیچه سوماکلون *E. microtheca* توسط پرایمر EMBRA06 بر روی ژل آگارز (چاهک اول Size marker می‌باشد).



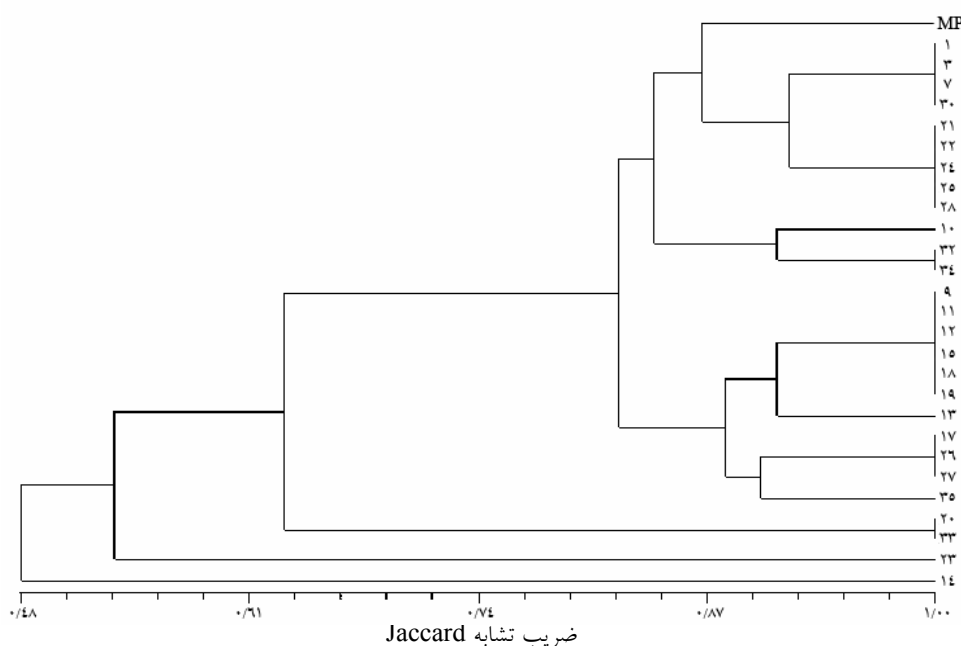
شکل ۴- باندهای SSR مشاهده شده ۷ گیاهیچه سوماکلون *E. microtheca* توسط پرایمر EMCRC09 بر روی ژل آگارز (چاهک اول Size marker می‌باشد).



شکل ۵- باندهای SSR پرایمر EMBRA06 بر روی ژل واسرشته آکرلامید ۶٪ برای ۳۳ گیاهیچه سوماکلون *E. microtheca* (چاهک اول گیاه مادر است).



شکل ۶- باندهای SSR پرایمر EMCRC09 بر روی ژل واسرشته آکرلامید ۶٪ برای ۳۳ گیاهیچه سوماکلون *E. microtheca* (چاهک اول گیاه مادر است).



شکل ۷- دندروگرام بدست آمده از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA، براساس ضریب تشابه Jaccard حاصل از مشاهده باندهای پراکسیداز و SSR برای ۲۷ گیاهچه سوماکلون *E. microtheca* (MP گیاه مادر می‌باشد).

بحث

E. microtheca تحت تأثیر TDZ است. TDZ توانایی بالایی در تحریک، سنتز و تجمع و تعدیل دیگر سیتوکینین‌های درون‌زاد دارد (Visser et al., 1992).

در باززایی مستقیم ریزنمونه‌های کوتیلدونی صنوبر سفید به وسیله هورمون TDZ میزان فعالیت پراکسیداز کاهش می‌یابد (Tang & Newton, 2005). این نتایج با یافته‌های این پژوهش کاملاً مطابقت و همسویی دارد، زیرا از فعالیت آلل‌ها کاسته شده و آلل ۳ نیز ناپدید شده است. همچنین با ورود به مرحله جنین‌زایی سوماتیکی که ارتباط بین جنین‌ها و کالوس به‌طور کامل از بین می‌رود، میزان پراکسیداز نیز به شدت کاهش یافت، اما اختلاف قابل ملاحظه‌ای بین B_۴ و B_۵ که باززایی غیرمستقیم در آنها دیده شد وجود نداشت. بنابراین با افزایش مقدار سیتوکینین (TDZ)، مقدار فعالیت پراکسیداز افزایش یافت.

هورمون‌های NAA و Kin (هر کدام به مقدار ۱ میلی‌گرم در لیتر) باززایی مستقیم را تحریک کرده و ریزنمونه‌های سرشاخه بدون ورود به مرحله کالزایی باززا می‌شوند. با اضافه کردن هورمون TDZ به مقدار ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر به تیمار B_۲ حجم کالوس اندکی افزایش یافته و باززایی به‌صورت جنین‌زایی سوماتیکی می‌باشد. به بیانی اثر NAA و Kin بر TDZ در مقادیر بسیار کم چیرگی دارد. در تیمار B_۲ که حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ است، باززایی از نوع جنین‌زایی سوماتیکی به بیشترین مقدار خود (۰/۵۲٪) می‌رسد. در مقادیر ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ کالوس‌ها متراکم و سخت شده، مقدار باززایی کاهش یافته و باززایی غیرمستقیم تحریک می‌گردد. نتایج نشان می‌دهند که انواع باززایی در

از سنتز یک بازدارنده برای پروموتور پراکسیداز (Klotz & Lagrimini, 1997) و یا جهش باشد (Larkin & Scowcroft, 1981). وجود همبستگی پایین میان ماتریس ضریب‌های تشابه ایزوآنزیم پراکسیداز و میکروستلایت‌ها ($r=0/18$) به واسطه استفاده از آزمون Mental تشابه زیادی با نتایج Sun و همکاران، (۱۹۹۷) دارد. دلیل این عدم وجود همبستگی می‌تواند قرار گرفتن مکان‌های ژنی میکروستلایت در قسمت‌های Nonfunctional توالی‌های دی.ان.ای باشد (Naghavi et al., 2005). بنابراین نظریه Klotz و Lagrimini (1997) مبنی بر اثر فیتوهورمون‌ها در کنترل پروموتور پراکسیداز می‌تواند صحیح باشد.

نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA نشان‌دهنده بیشترین فاصله ژنتیکی میان ژنوتیپ‌های ۱۴ و ۲۳ با گیاهچه مادر می‌باشد. دلیل این تنوع را می‌توان به عدم مشاهده ۵ آلل پراکسیداز و باندهای تولید شده توسط آغازگرهای EMCRC09 و EMBRA06 برای گیاهچه ۱۴ و ۲۳ نسبت داد. برای گیاهچه‌های ۲۰ و ۳۳ که در خوشه سوم قرار گرفته‌اند هیچ چندشکلی در نواحی SSR وجود ندارد ولی این دو ژنوتیپ از لحاظ تنوع در آلل‌های پراکسیداز کاملاً مشابه یکدیگر می‌باشند، بنابراین می‌توان علت فاصله کم ژنتیکی این دو نمونه را تنوع آنزیمی دانست. به طوری که سایر گیاهچه‌ها به همراه گیاه مادری در خوشه چهارم قرار گرفته‌اند ولی نکته قابل توجه در این خوشه فاصله کم ژنتیکی میان نمونه‌های ۱، ۳ و ۷ با گیاه مادر می‌باشد، زیرا که برای باززایی این نمونه‌ها از هورمون TDZ استفاده نشده است، بنابراین این تشابه به علت عدم وجود باند شماره ۱ است که معرف حضور هورمون TDZ در باززایی این گیاهچه‌ها می‌باشد.

این دلیلی آشکار جهت تأیید خصوصیت تعدیل‌کنندگی TDZ برای تیپ‌های متفاوت باززایی می‌باشد (Visser et al., 1992). براساس یافته‌های این بررسی، با افزایش مقدار هورمون TDZ فعالیت پراکسیداز در انواع باززایی افزایش می‌یابد، ولی در نتیجه‌گیری کلی به نظر می‌رسد تغییر فعالیت پراکسیداز نشانگری برای نوع باززایی باشد. از تغییر فعالیت پراکسیداز در اندام‌زایی و جنین‌زایی سوماتیکی به عنوان نشانگر یاد شده است (Xiaoli et al., 1992 و Preetha et al., 1995). با استفاده از هورمون‌های NAA و Kin یک باند اپی‌ژنتیک (PEB2) در تمامی باززایی‌ها ظاهر می‌گردد. همچنین گیاهچه‌های متأثر از هورمون TDZ باند اپی‌ژنتیک دیگری (PEB2) را به وجود می‌آورند. توالی‌های SSR اثر معنی‌داری بر روی این دو باند نداشته (جدول ۴) و کمترین ضریب رتبه‌بندی میان این دو باند و مارکر مولکولی وجود دارد (جدول ۵). بیشترین ضریب برای آغازگر EMBRA06 با آلل PDB3 از مکان ژنی دیمر به مقدار $r=0/56$ وجود دارد که نشان‌دهنده تأثیر نسبی توالی تکثیر شده به وسیله این آغازگر بر روی سنتز پراکسیداز می‌باشد. ولی توالی آغازگر EMCRC09 تأثیر معنی‌داری بر روی آلل‌های PTB4 و PTB5 داشته (جدول ۴) و برای آنها ضریب کامل وجود دارد (جدول ۵). بنابراین TDZ بر روی این توالی تأثیر گذاشته و آلل‌های یک مکان ژنی تترامر را متأثر ساخته است.

به طور کلی در تیمارهای B_۲ و B_۳ از فعالیت همه آلل‌ها کاسته شده و آلل PDB2 در تمامی گیاهچه‌ها ناپدید شده است. بنابراین می‌توان گفت TDZ در مقادیر ۰/۱ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر موجب عدم فعالیت یک آلل هتروزیگوت از یک مکان ژنی دیمر می‌گردد. این پدیده می‌تواند ناشی

- Ebermann, R. and Stich, K. 1982. Peroxidase and amylase isoenzymes in the sapwood and heartwood of trees. *Phytochemistry*, 21:2401-2402.
- Ezaki, B., Tsugua, S. and Matsumoto, H. 1996. Expression of moderately anionic peroxidase is induced by aluminum treatment in *Tobacco* cells: possible involvement of peroxidase isozymes in aluminium ion stress. *Physiologia Plantarum*, 96: 21-28.
- Fry, S.C. 1979. Phenolic components of the primary cell wall and their possible role in the hormonal regulation of growth. *Planta*, 146: 343-351.
- Ghamari-Zare, A., Asareh, M.H. Ghorbanli, M. Shahrzad, Sh. Allahverdi Mamaghani B. 2006. *In vitro* culture of two Damask rose genotypes from East and West Azarbayjan provinces. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 14: 155-162.
- Herve, P., Jauneau, A., Paques, M., Marien, J.N., Michel Boudet, A. and Teulieres, C. 2001. A procedure for shoot organogenesis *in vitro* from leaves and nodes of an elite *Eucalyptus gunnii* clone: comparative histology. *Plant Science*, 161: 645-653.
- Kinoshita, T. and Ishikawa, R. 2003. Genetical studies of isoenzymes in rice plants. II - Description of individual isozyme markers and several isozyme genes related to starch synthesis in rice. *Recent Research Developments in Genetics*, 3: 112-117.
- Klotz, K.L. and Lagrimini, L.M. 1996. Phytohormone control of the tobacco anionic peroxidase promoter. *Plant Molecular Biology*, 31:565-573.
- Kormutak, A., Salaj, T., Matusova, R. and Vookova, B. 2003. Biochemistry of zygotic and somatic embryogenesis in silver fir (*Abies alba* mill.). *ACTA Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 45: 59-62.
- Lanner-Herrera, C., Gustafsson, M., Falt, A.-S. and Bryngelsson, T. 1996. Diversity in natural populations of wild *Brassica oleracea* as estimated by isozyme and RAPD analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 43: 13-23.
- Larkin, P.J. and Scowcroft, W.R. 1981. Somaclonal variation - A novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 60:197-214.
- Liu, Z. and Furnier, G.R. 1993. Comparison of allozyme, RFLP, and RAPD markers for revealing genetic variation within and between trembling aspen and bigtooth aspen. *Theoretical and Applied Genetics*, 87: 97-105.
- Morabito, D., Mills, D., Prat, D. and Dizengremel, P. 1996. Response of clones of *Eucalyptus microtheca* to NaCl *in vitro*. *Tree Physiology*, 14: 201-210.
- Mortazavi-Jahromi, S.M. 1994. Introducing Adapted *Eucalyptus* in West Areas of Fars Province. *Forests*

در مجموع می‌توان گفت وجود هورمون TDZ در باززایی گیاهچه‌های *E. microtheca* باعث ایجاد چندشکلی در بیان آنزیم آل‌های پراکسیداز و توالی‌های SSR می‌گردد. همچنین ارتباط میان توالی‌های SSR و سنتز پراکسیداز کم می‌باشد، هر چند رابطه میکروستلایت‌ها با مکان ژنی تترامر پراکسیداز بیشتر از مکان ژنی دایمر است. همچنین آل‌های مکان ژنی تحت تأثیر TDZ، پایداری بیشتری نسبت به مکان ژنی دایمر دارند و نقش بیشتری در سنتز پراکسیداز ایفا می‌کنند.

سپاسگزاری

به این وسیله از استادان ارجمند جناب آقای دکتر محمدرضا بی‌همتا و دکتر محمدرضا نقوی که در تجزی و تحلیل‌های آماری همکاری داشتند، قدردانی به عمل می‌آید.

منابع مورد استفاده

- Assareh, M. H., and Sardabi, H., 2007. *Eucalypts*, V:1, Description, Illustration and Propagation by Advanced Techniques. *Forests and Rangelands Research Institute*, Tehran, Iran, 672 p.
- Brondani, R.P.V., Brondani, C., Tarchini, R. and Grattapaglia, D. 1998. Development, characterization and mapping of microsatellite markers in *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla*. *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 816-827.
- Byrne, M., Marquez-Garcia, M.I., Uren, T., Smith, D.S. and Moran, G.F. 1996. Conservation and genetic diversity of microsatellite loci in the genus *Eucalyptus*. *Australian Journal of Botany*, 44:331-341.
- Castillo, F.J. 1986. Extra cellular peroxidase as markers of stress? In: H. Greppin, C. Penel, and T. Gaspar (eds.). *Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*. University of Geneva, Geneva, pp. 419-426.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.

- Shah, J., Kachroo, P. and Klessig, D.F. 1999. The *Arabidopsis* *ssil* mutation restores pathogenesis-related gene expression in *npr1* plants and renders defensin gene expression salicylic acid dependent. *The Plant Cell*, 11: 191–206.
- Steane, D.A., Vaillancourt, R. E., Russell, J., Powell, W., Marshall, D. and Potts, B.M. 2001. Development and characterisation of microsatellite loci in *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae). *Silvae Genetica*, 50: 2, 89-91.
- Sun, G.L., Salomon, B. and von Bothmer, R. 1997. Analysis of tetraploid *Elymus* species using wheat microsatellite markers and RAPD markers. *Genome*, 40: 806–814.
- Sun, G.L., Salomon, B. and von Bothmer, R. 1998. Characterization and analysis of microsatellite loci in *Elymus caninus* (Triticeae). *Theoretical and Applied Genetics*, 96: 676–682.
- Tang, W. and Newton, R.J. 2005. Peroxidase and catalase activities are involved in direct adventitious shoot formation induced by thidiazuron in eastern white pine (*Pinus strobus* L.) zygotic embryos. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43: 760-769.
- Visser, C., Qureshi, J. A., Gill, R. and Saxena, P.K. 1992. Morphoregulatory role of thidiazuron, substitution of auxin and cytokinin requirement for the induction of somatic embryogenesis in *Geranium* hypocotyl cultures. *Plant Physiology*, 99: 1704-1707.
- Watt, M.P., Blakeway, F.C., Termignoni, R. and Jain, S.M. 1999. Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis* and *E. dunni*. In: Jain, S.M., Gupta, P.K. and Newton, R.J. (eds). *Somatic embryogenesis in woody plants*, Kluwer, UK, 5:63-78.
- Xiaoli, Z., Yang, H., Wenjie, Yang. and Ti, X. 1992. Somatic embryogenesis and analysis of peroxidase in cultured lettuce (*Lactuca Sativa* L.) cotyledons. *Annals of Botany*, 69: 97-100.
- and Rangelands Research Institute, Tehran, Iran, 83 p.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. Revised medium for rapid growth and bioassay with *Tobacco* tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-479.
- Naghavi, M.R., Gharayazi, B. and Hosseini-Salakdeh, Gh., 2005. *Molecular Markers*. Tehran University Publisher, Tehran Iran., 320 p.
- Pinto, G., Santos, C., Neves, L. and Araujo, C. 2002. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globulus* labill. *Plant Cell Reports*, 21:208-213.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalski, A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2: 225–238.
- Preetha, N., Yasodha, R. and Gurumurthi, K. 1995. Peroxidase isoenzymes as markers of organogenesis in *Azadirachta indica* Juss. *Indian Journal of Plant Physiology*, 38: 92–93.
- Rus-Kortekaas, W., Smulders, M.J.M., Arens, P. and Vosman, B. 1994. Direct comparison of levels of genetic variation in tomato detected by a GACA-containing microsatellite probe and by random amplified polymorphic DNA. *Genome*, 37: 375–381.
- Russell, J.R., Fuller, J.D., Macaulay, M., Hatz, B.G.B., Jahoor, A., Powell, W. and Waugh, R. 1997. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theoretical and Applied Genetics*, 95: 714–722.
- Saghai-Marouf, M.A., Biyashev, R.M., Yang, G.P., Zhang, Q. and Allard, R.W. 1994. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: Species diversity, chromosomal location and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91: 5466–5470.
- Sankara Rao, K. 1988. *In vitro* meristem cloning of *Eucalyptus tereticornis* Sm. *Plant Cell Reports*, 7:546-549.
- Shabannejad, M. Assareh, M.H. Omid, M, Ghamari Zare A., Shahrzad SH., 2008. Comparison of direct and indirect regeneration in *Eucalyptus microtheca*. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 16: 229-237.

Identification of somaclonal variation using peroxidase and microsatellite markers in *Eucalyptus microtheca* F. Muell

M. Shabannejad Mamaghani*¹, M.H. Assareh², M. Omid³, M. Matinizadeh⁴, M. Forootan⁵,
A. Ghamari Zare⁶, SH. Shahrzad⁷ and M. Jebelli⁸

1 – Corresponding author, M.Sc., Islamic Azad University of Karaj, I.R.Iran

E-mail address: shabannejad.morteza@gmail.com

2 – Prof., Forests and Rangelands Research Institute, Tehran, I.R.Iran

3 – Prof., Faculty of Agriculture, Tehran University, Karaj, I.R.Iran

4 – Assis. Prof., Forests and Rangelands Research Institute, Tehran, I.R.Iran

5 – Ph.D, Forests and Rangelands Research Institute, Tehran, I.R.Iran

6 – Assis. Prof., Forests and Rangelands Research Institute, Tehran, I.R.Iran

7 – B.Sc., Forests and Rangelands Research Institute, Tehran, I.R.Iran

8 – M.Sc., Forests and Rangelands Research Institute, Tehran, I.R.Iran

Received: 23.04.2009

Accepted: 02.06.2009

Abstract

The objectives of this study were to induce somaclonal variation and linked investigation of biochemical and molecular markers in *Eucalyptus microtheca* under *in vitro* culture. Explants derived from twigs obtained from of *E. microtheca* one year-old seedling were cultured on modified MS medium (without half-strength KNO₃ and NH₄NO₃), supplemented with different concentrations of NAA, Kin and TDZ hormones. Peroxidase patterns were studied among regenerated plantlets to investigate possible effects of TDZ concentrations on peroxidase activity. A dimer locus, a tetramer locus and two epigenetic bands were observed. Genome variation among somaclonal plantlets were investigated using microsatellite markers. Two SSR markers revealed polymorphism among the studied populations. Nonparametric statistical analysis showed significant effect of SSRs loci on peroxidase alleles. Results showed less stability of dimer locus in different concentrations of TDZ in comparison of the tetramer locus. Moreover, there was stronger correlation between tetramer locus alleles and simple sequence repeats than dimer ones.

Key words: Tissue culture, Somaclonal variation, Peroxidase, Simple Sequence Repeat, *Eucalyptus microtheca*