

تنوع سوماکلونال در گیاهان باززایی شده لیلکی (*Gleditsia caspica* Desf.) با استفاده از نشانگرهای بین ریزماهواره ژنومی (ISSR-PCR)

مجتبی ایمانی راستابی^{۱*}، سیدمحمد حسینی نصر^۲، غلامعلی رنجبر^۳ و مصطفی خوشحال سرمست^۴

*- نویسنده مسئول، دانش آموخته دکتری، گروه علوم و مهندسی جنگل، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
پست الکترونیک: m_imani_m@yahoo.com

۲- دانشیار، گروه علوم و مهندسی جنگل، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

۳- دانشیار، گروه اصلاح نباتات، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

۴- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۲۹

چکیده

تنوع سوماکلونال، آزمایش ژنتیکی است که با استفاده از آن می‌توان تغییرات ژنی و ثبات ژنتیکی گیاه تکثیرشده را نسبت به گیاه مادری ارزیابی کرد. هدف این پژوهش، بررسی تنوع سوماکلونال در گیاهان باززایی شده لیلکی (*Gleditsia caspica* Desf.) تحت تأثیر تنظیم‌کننده رشد BAP و بازدارنده رشد CPZ بود. پس از بذرگیری از یک درخت لیلکی در باغ گیاه‌شناسی دانشکده منابع طبیعی در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ژنوتیپ‌های پایه مادری و گیاهان باززایی شده در محیط‌های کشت حاوی BAP (۲۰ میکرومول) و CPZ (۰/۳، سه و ۱۵ میکرومول) با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR مقایسه شدند. بیشترین درصد شاخه‌زایی و تعداد شاخساره در تیمار BAP با غلظت ۲۰ میکرومول مشاهده شد. وجود بازدارنده رشد CPZ در محیط کشت به شدت سبب کاهش درصد شاخه‌زایی ریزنمونه‌ها شد. همچنین، روند کاهشی مشخصه‌های مورد مطالعه با افزایش غلظت CPZ تشدید یافت. استفاده از ۱۰ نشانگر مولکولی ISSR در مجموع، ۱۰۷ نوار DNA تولید کرد که ۸۷/۹ درصد آن‌ها، چندشکلی بودند. دارنگاره تجزیه خوشه‌ای براساس ماتریس تشابه جاکارد به روش UPGMA نشان داد که ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با ضریب تشابه ۰/۲۷ در دو گروه قرار گرفتند. به نظر می‌رسد که وجود بازدارنده رشد CPZ به‌رغم اثر منفی بر رویش گیاه سبب افزایش تنوع و کاهش شباهت ژنتیکی بین گیاهان باززایی شده و پایه مادری می‌شود.

واژه‌های کلیدی: بازدارنده رشد، تنظیم‌کننده رشد، تنوع ژنتیکی، کشت بافت.

مقدمه

طبیعی و هجوم آفات در حال تخریب هستند. این بوم‌سازگان‌ها برای سازگاری با تهدیدهای زیستی و غیرزیستی به شدت به تنوع ژنتیکی درون‌گونه‌ای وابسته

جنگل‌ها به علت عواملی مانند بهره‌برداری بی‌رویه، تغییر اقلیم، آلودگی، تکه‌تکه شدن زیستگاه، حوادث

آنتی‌سایتوکینین‌ها همانند کلرپرومازین (CPZ: *Chlorpromazine*) اشاره کرد (Bagga *et al.*, 1987; Zhao & Hasenstein, 2010) که استفاده از آن‌ها برای بررسی سازوکار سایتوکینین‌ها مورد توجه زیادی قرار گرفته است (Bianco-Colomas, 1983). تلاش زیادی برای ساخت مواد دارای فعالیت آنتی‌سایتوکینین انجام شده است که تعدادی از آن‌ها اکنون در دسترس هستند. این ترکیب‌ها به‌طور رقابتی مانع فعالیت سایتوکینین می‌شوند و اثرات آن‌ها، خاص و برگشت‌پذیر است. پژوهش‌هایی درمورد امکان استفاده از این ترکیب‌ها و نیز بررسی آنتی‌اکسین‌ها و آنتی‌سایتوکینین‌ها بر عملکرد رویش پینه، سلول، اندام و تنوع سوماکلونال گیاهان در کشت درون‌شیشه‌ای انجام شده‌اند (Yanosaka *et al.*, 1989; Karanov *et al.*, 1992). Bagga و همکاران (۱۹۸۷) نشان دادند که حضور CPZ در محیط کشت و در شرایط درون‌شیشه‌ای از گسترش سطح برگ و تقسیم سلولی در *Brassica oleracea* L. جلوگیری می‌کند.

برای بررسی تنوع سوماکلونال از نشانگرهای مختلفی استفاده می‌شود. به‌عنوان مثال، کاربرد نشانگر مولکولی توالی‌های تکراری ساده میانی (ISSR: Inter Simple Sequence Repeats) به‌دلیل دقت زیاد، جواب‌دهی سریع‌تر، تکرارپذیری زیاد، هزینه کمتر و دسترسی آسان در پژوهش‌های مختلف گزارش شده است (Akdemir *et al.*, 2016; Singh *et al.*, 2016; Pastelín Solano *et al.*, 2019). هدف از پژوهش پیش‌رو، بررسی اثرات تنظیم‌کننده رشد بنزیل‌آمینوپورین (BAP) (*benzylaminopurine*) و بازدارنده رشد CPZ بر مشخصه‌های رویش شاخه و تنوع سوماکلونال در گیاهان باززایی‌شده لیلکی (*Gleditsia caspica* Desf.) به‌عنوان یک گونه بومی ایران در مقایسه با گیاهان مادری بود. این پژوهش در شرایط درون‌شیشه‌ای و با استفاده از نشانگرهای بین ریزماهواره ژنومی (ISSR-PCR) انجام شد.

هستند (Geburek, 1997). تنوع ژنتیکی، پایه و اساس بقای گونه‌ها است (Hamrick & Godt, 1996). درحالی‌که یکنواختی ژنتیکی سبب آسیب‌پذیری گیاهان نسبت به متغیرهای محیطی می‌شود و ذخایر مفید ژنی را از بین می‌برد (Sharma *et al.*, 1996). با توجه به اهمیت حفاظت از ژرم‌پلاسم درختان در بوم‌سازگان‌های جنگلی، روش‌های به‌نژادی درختان به‌ویژه گونه‌های بومی و طبیعی به‌منظور حفظ و توسعه این سرمایه درحال‌تخریب مورد توجه قرار گرفته‌اند.

اطلاع از فاصله ژنتیکی بین افراد و جمعیت‌ها و آگاهی از رابطه‌های خویشاوندی گونه‌های مورد نظر در برنامه‌های اصلاح‌نژاد، امکان سازمان‌دهی منابع توارث، نمونه‌گیری کارآمد از ژنوتیپ‌ها و بهره‌برداری بهتر از تنوع ژنتیکی را میسر می‌کند (Sharma *et al.*, 1996). همچنین، باززایی گیاهان در شرایط درون‌شیشه‌ای، ابزاری مؤثر برای پرآوری (*Proliferation*) و تولید گیاهان همسان و عاری از بیماری به‌شمار می‌رود (Azman *et al.*, 2014). تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی در گیاهان باززایی‌شده، تنوع سوماکلونال نامیده می‌شوند (Larkin & Scowcroft, 1981) که با وجود مزایای زیاد آن ممکن است مشکلاتی همچون بی‌ثباتی ژنتیکی را به‌همراه داشته باشد (Lazaro-Castellanos *et al.*, 2019; Pastelín Solano *et al.*, 2018). با این حال، تغییرات ژنتیکی، ابزاری مهم برای تولید انواع جدید گیاهان پرمحصول و مقاوم به بیماری‌ها و استرس‌های زیستی محسوب می‌شوند (Krishna *et al.*, 2016).

کاربرد برخی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مانند اکسین و سایتوکینین در کشت بافت و تکثیر درون‌شیشه‌ای سبب افزایش جهش‌های گیاهی و تنوع سوماکلونال می‌شوند (D'amato, 1978; Ando *et al.*, 1986; Bagheri & Saffari, 1997). البته برخی از تغییرات به‌وجودآمده در کشت درون‌شیشه‌ای به موتاسیون ارتباطی ندارند. به‌طوری‌که تنوع اپی‌ژنتیکی ایجادشده، برگشت‌پذیر و غیرموروثی است (Bagheri & Saffari, 1997). از تنظیم‌کننده‌های دیگر رشد گیاهی می‌توان به

مواد و روش‌ها

تهیه و ضدعفونی مواد گیاهی

بذرهای لیلکی از یک پایه درخت در باغ گیاه‌شناسی دانشکده منابع طبیعی در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تهیه شد. برای شکستن خواب فیزیولوژیک بذرهای نمونه از اسیدسولفوریک ۹۸ درصد به مدت ۲۰ دقیقه استفاده شد. به منظور گندزدایی سطحی، بذرها در زیر هود لامینار به مدت ۱۰ دقیقه در کلریدجیوه (HgCl₂) ۰/۵ درصد (Khosh-Khui, 1998) قرار داده شدند و پس از آب‌کشی با آب مقطر استریل، به مدت ۶۰ ثانیه با اتانول ۷۰ درصد تیمار شدند. بذرهای ضدعفونی شده در محیط کشت DKW دارای سه درصد ساکارز و ۰/۸ درصد آگار کشت شدند. سپس، آن‌ها در دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی با منبع لامپ فلورسنت سفید و شدت ۲۵۰۰ لوکس نوری نگهداری شدند.

پس از گذشت ۲۰ روز، بذرها به دانهال (گیاهچه‌هایی چندبرگی حاصل از بذر) تبدیل شدند. ریزنمونه‌های دارای اندازه مناسب (طول بیشتر از پنج سانتی‌متر) برای تهیه نمونه گیاهی حاصل از دانهال انتخاب شدند. ژنوتیپ‌های مورد مطالعه شامل پنج تیمار بودند که از ریزنمونه‌های پایه مادری (P)، شاهد یا محیط کشت حاوی تنظیم‌کننده رشد BAP با غلظت ۲۰ میکرومول (C1) و محیط کشت‌های حاوی CPZ با غلظت‌های ۰/۳ (C2)، سه (C3) و ۱۵ میکرومول (C4) تهیه شدند. برای این منظور از محیط کشت MS استفاده شد. تعداد

رابطه (۱)

ضریب رقت (۵۰) × عکس رقت × مقدار جذب در ۲۶۰ نانومتر (میکروگرم در میکرولیتر DNA) = غلظت DNA (نانوگرم در میکرولیتر)

دفعه‌های زیرکشت ریزنمونه‌ها نیز شش‌بار (هر ۲۵ الی ۳۵ روز یک‌بار) بود. نمونه‌ها با استفاده از ازلت مایع در ظرف‌های ضدعفونی چینی کوبیده شدند. سپس، برگ‌های پودر شده مربوط به هر تیمار در تیوپ‌های کدگذاری شده ریخته شدند و تا زمان استخراج DNA در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج DNA و تعیین کمیت و کیفیت آن

استخراج DNA به روش CTAB (Murray & Thompson, 1980) و با اندکی تغییرات (اضافه کردن فنول ۰/۵ مولار پس از افزودن کلروفرم: ایزوآمیل‌الکل) انجام شد. DNA به دست آمده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس، کیفیت و کمیت آن به ترتیب با استفاده از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۷ درصد بررسی شد. الکتروفورز در میدان الکتریکی با ولتاژ ۱۰۰ ولت انجام شد. سپس، کیفیت ژل با استفاده از دستگاه Geldoc شرکت UVP آمریکا ارزیابی شد.

غلظت DNA به دست آمده با اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری و با استفاده از رابطه (۱) محاسبه شد. برای اطمینان از غلظت DNA و پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، ژل آگارز یک تا ۱/۵ درصد برای بررسی محصولات PCR به کار برده شد. سپس، زیر نور UV در دستگاه اسکنر GS-800™, Calibrated, Densitometer, BIO-RAD, (USA) از این ژل عکس‌برداری شد.

(تک‌رشته‌ای شدن DNA)، ۴۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه (اتصال آغازگر به DND تک‌رشته‌ای)، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه (تکثیر آغازگر) و در نهایت، تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه (تکثیر نهایی آغازگر) انجام شد.

بهینه‌سازی و آنالیز مولکولی با استفاده از نشانگر ISSR در این پژوهش از ۱۵ آغازگر ISSR استفاده شد که توالی آن‌ها در جدول ۲ آمده است. برنامه PCR برای آغازگرهای ISSR با آزمون و خطای فراوان شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه (واسرشت‌سازی اولیه DNA)، ۳۵ چرخه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای ISSR استفاده شده در پژوهش پیش‌رو

ردیف	نام آغازگر	توالی	دمای اتصال آغازگر (درجه سانتی‌گراد)
۱	ISSR1	ACACACACACACACACG	۵۴
۲	ISSR2	ACACACACACACACACC	۵۴
۳	ISSR3	ATG ATGATGATGATG ATGG	۵۸
۴	ISSR4	ATA ATAATAATAATA ATAT	۵۷
۵	ISSR5	CCC GGA TCCCTCTCTCTCTCTCTCT	۵۴
۶	ISSR6	GATC TGG TGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG	۵۷
۷	ISSR7	GATC GAG GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG	۵۶
۸	ISSR8	AGAGAGAGAGAGAGAGG	۵۵
۹	ISSR9	GAGAGAGAGAGAGAGAA	۵۴
۱۰	ISSR10	TCTCTCTCTCTCTCTCC	۵۲
۱۱	ISSR11	AGAGAGAGAGAGAGAGC	۵۵
۱۲	ISSR12	TGTGTGTGTGTGTGTGA	۵۴
۱۳	ISSR13	ATC ATCATCATCATC ATCC	۵۷
۱۴	ISSR14	GAGAGAGAGAGAGAGAGAC	۵۴
۱۵	ISSR15	GTGTGTGTGTGTGTGTGT	۵۲

در مرحله شاخه‌زایی، مشخصه درصد شاخه‌زایی از پینه (RS) براساس رابطه (۲) محاسبه شد (Ayadi *et al.*, 2011). در این فرمول، *ncps* بیانگر تعداد پینه‌های تولیدکننده شاخه و *N* نشان‌دهنده تعداد کل پینه‌های کشت شده است. همچنین، تعداد شاخساره براساس میانگین تعداد شاخه تولیدشده در هر ریزنمونه محاسبه شد. آزمون مقایسه میانگین نیز با روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در نرم‌افزار SAS انجام شد.

$$RS = \left(\frac{ncps}{N} \right) \times 100 \quad \text{رابطه (۲)}$$

به‌منظور بررسی تنوع سوماکلونال ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، ابتدا براساس عکس‌های گرفته‌شده از روی ژل آگارز و باتوجه به حضور یا عدم حضور نوار DNA

نمره‌دهی صورت گرفت. در مرحله بعد، داده‌های نمره‌دهی شده با استفاده از نرم‌افزار Excel به یک ماتریس مشخص منتقل شد. این ماتریس در پژوهش پیش‌رو با استفاده از نرم‌افزار NTSYS و براساس سه ضریب تشابه شامل جاکارد، اتصال ساده و دایس که هرکدام الگوریتم خاصی دارند، تشکیل شد. بررسی کارایی الگوریتم‌های مختلف در تجزیه خوشه‌ای براساس ضریب‌های همبستگی انجام گرفت. برای تعیین تعداد مطلوب خوشه‌ها نیز از روش تجزیه واریانس مولکولی استفاده شد. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCoA: Principal Coordinate Analysis) به‌منظور طبقه‌بندی افراد براساس بیشترین واریانس در یک نمودار دوبعدی ارائه شد.

محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC: Polymorphic Information Content) با استفاده از رابطه (۳) محاسبه شد

(Buchanan & Thue, 1998).

تنوع شانون و نی و مقدار PIC مشخص شد. براین اساس و با استفاده از نرم‌افزار Popgen 32، تشابه ژنتیکی محاسبه شد.

$$PIC = \frac{N(1-\sum p_i^2)}{N-1} \quad \text{رابطه (۳)}$$

نتایج

اثر تنظیم‌کننده و بازدارنده رشد بر شاخه‌زایی براساس نتایج این پژوهش، حضور آنتی‌سایتوکینین CPZ در محیط کشت سبب کاهش معنی‌دار نرخ شاخه‌زایی و تعداد شاخه در ریزنمونه‌های ساقه لیلیکی شد (جدول ۲). میانگین شاخه‌زایی و تعداد شاخساره در تیمار BAP با غلظت ۲۰ میکرومول به ترتیب ۳۳/۲۸ درصد و ۳/۳۸ عدد در هر ریزنمونه به دست آمد، درحالی‌که کمترین مقدار این متغیرها (به ترتیب ۰/۵۱ درصد و ۰/۲۶ عدد در ریزنمونه) در محیط کشت حاوی ۱۵ میکرومول CPZ مشاهده شد. به‌طور متوسط، یک تا چهار شاخه روی هر ریزنمونه ایجاد شد (شکل ۱).

که در آن، p_i فراوانی باند i ام و N تعداد کل باندها برای هر آغازگر است. شاخص تنوع ژنتیکی شانون (H') نیز از طریق رابطه (۴) به دست آمد (Shannon & Weaver, 1949).

$$H' = -\sum P_i \times \log_2 P_i \quad \text{رابطه (۴)}$$

که در آن P_i فراوانی آلی در یک یا گروهی از نمونه‌ها است. درنهایت، درجه چندشکلی با استفاده از شاخص‌های

جدول ۲- اثرات BAP و CPZ بر درصد شاخه‌زایی و تعداد شاخساره در لیلیکی

تیمار	غلظت (میکرومول)	درصد شاخه‌زایی در هر ریزنمونه	تعداد شاخساره در هر ریزنمونه
BAP	۲۰	33.28 ± 7.1	3.38 ± 0.9
CPZ	۰/۳	0.51 ± 0.05	0.26 ± 0.04
CPZ	۳	0.51 ± 0.05	0.26 ± 0.03
CPZ	۱۵	0.51 ± 0.04	0.26 ± 0.02

براساس نتایج آزمون LSD، اعداد دارای حرف‌های یکسان انگلیسی در هر ستون بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد هستند.

ارزیابی مولکولی تنوع سوماکلونال

به‌منظور تأیید و اطمینان از تنوع سوماکلونال گیاهان باززایی‌شده، انگشت‌نگاری DNA با استفاده از ۱۵ آغازگر ISSR انجام شد. فقط ۱۰ آغازگر، الگوی باندهای مناسبی

برای نمره‌دهی تولید کردند (جدول ۳). در بین آن‌ها، کمینه (هشت) و بیشینه (۱۵) تعداد باندها به ترتیب در آغازگرهای ISSR2 و ISSR5 مشاهده شد (جدول ۳). متوسط تعداد باندهای تولیدشده به‌ازای هر آغازگر ۱۰/۷ به دست آمد.



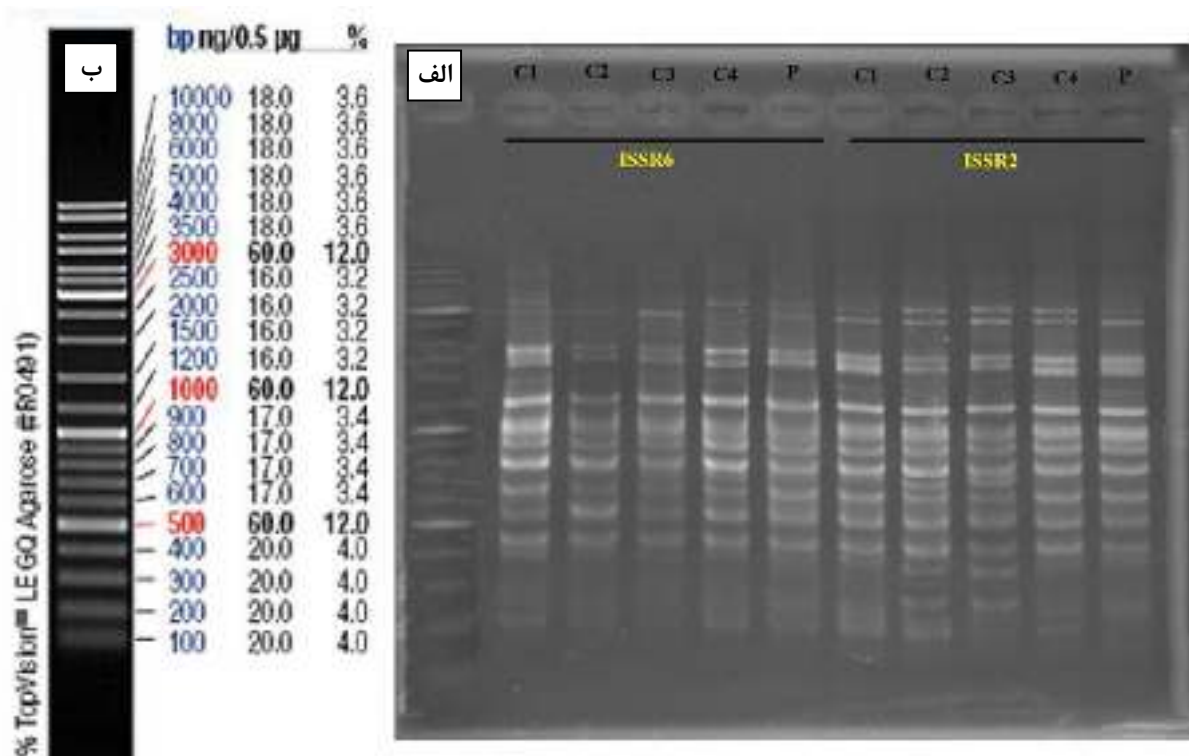
شکل ۱- مراحل مختلف باززایی لیلکی از ساقه: (۱) کشت بذر و رشد در محیط کشت، (۲) ریزنمونه تهیه شده و القای کالوس پس از یک هفته، (۳) کالوس زایی، (۴) ریشه زایی از شاخه های تولید شده و (۵) انتقال به گلدان (۱) کشت بذر و رشد در محیط کشت، (۲) ریزنمونه تهیه شده (۳) القای کالوس پس از یک هفته، (۴) کالوس زایی، (۵) ریشه زایی از شاخه های تولید شده و (۶) انتقال به گلدان

جدول ۳- تعداد باند تولید شده به ازای هر آغازگر ISSR و مقدار عددی PIC آن‌ها

مقدار PIC	درصد چندشکلی	تعداد باند چندشکلی	تعداد باند	نام آغازگر
۰/۴۷	۱۰۰	۱۱	۱۱	ISSR1
۰/۴۹	۸۶/۶۷	۱۳	۱۵	ISSR2
۰/۴۵	۸۰	۸	۱۰	ISSR3
۰/۴۶	۱۰۰	۱۰	۱۰	ISSR4
۰/۴۳	۸۷/۵	۷	۸	ISSR5
۰/۴۳	۸۳/۳۳	۱۰	۱۲	ISSR6
۰/۳۹	۸۸/۸۹	۸	۹	ISSR7
۰/۴۱	۸۰	۸	۱۰	ISSR8
۰/۴۳	۹۰/۹	۱۰	۱۱	ISSR10
۰/۴۳	۸۱/۸۱	۹	۱۱	ISSR11
۴/۳۹	۸۷۹/۱	۹۴	۱۰۷	جمع
۰/۴۴	۸۷/۹	۹/۴	۱۰/۷	متوسط

به دست آمده با آغازگرهای استفاده شده است. متوسط مقدار PIC برای این ده آغازگر ۰/۴۴ محاسبه شد (جدول ۳). شکل ۲ نشان دهنده پروفیل‌های به دست آمده با آغازگرهای استفاده شده است.

برای ۱۰ آغازگر مذکور در مجموع ۱۰۷ باندها امتیازدهی شد. بیشترین و کمترین مقدار PIC به ترتیب برای آغازگرهای ISSR2 (۰/۴۹) و ISSR7 (۰/۳۹) به دست آمد. متوسط مقدار PIC برای این هفت آغازگر ۰/۴۴ محاسبه شد (جدول ۳). شکل ۲ نشان دهنده پروفیل‌های



شکل ۲- الف) نمایش فراورده‌های PCR روی ژل آغازگر ۰/۷ درصد و ب) راهنمای خط کش بیولوژیک

P: پایه مادری، C1: ژنوتیپ باززایی شده در محیط کشت فاقد CPZ و حاوی تنظیم کننده رشد BAP با غلظت ۲۰ میکرومول، C2، C3 و C4: ژنوتیپ‌های باززایی شده در محیط کشت حاوی CPZ به ترتیب با غلظت‌های ۰/۳، ۰/۳ و ۱۵ میکرومول.

درصد تنوع مربوط به درون ژنوتیپ‌ها و ۵۶ درصد مربوط به تنوع بین گیاهان باززایی شده و پایه مادری است. به عبارت دیگر می‌توان گفت که بین گیاهان باززایی شده و پایه مادری، هتروزیگوسیتی قابل ملاحظه‌ای وجود دارد. با توجه به نتایج به دست آمده به منظور بررسی کارایی الگوریتم UPGMA خوشه‌بندی از ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA استفاده شد. ضریب تشابه جاکارد با الگوریتم UPGMA برابر با ۰/۸ محاسبه شد (جدول ۵).

در جدول ۴، مقدار شاخص‌های تنوع ژنی و شانون در آنتی‌سایتوکینین‌های مورد مطالعه آمده است. کمینه و بیشینه هر دو شاخص مذکور به ترتیب در تیمار پایه مادری و C4 مشاهده شد. با توجه به میانگین شاخص‌های نی (۴۶/۲) و شانون (۲۶/۶۱) در مجموع می‌توان گفت که بین تیمارهای آنتی‌سایتوکینین، تنوع وجود داشت. نتایج آنالیز واریانس مولکولی نشان داد که مقدار تنوع بین گیاهان باززایی شده و پایه مادری بیشتر از تنوع درون ژنوتیپ‌ها (گیاهان باززایی شده و پایه مادری) است. ۴۴

جدول ۴- میانگین شاخص‌های تنوع ژنی نی و اطلاعات شانون برای تیمارهای مورد مطالعه براساس نشانگر ISSR

تیمار	شاخص تنوع ژنی نی (درصد)	شاخص تنوع ژنی شانون (درصد)
P	۲۳/۳۵	۴۳/۴۳
C1	۲۵/۴۱	۴۶/۲۴
C2	۲۷/۲۴	۴۵/۰۴
C3	۲۵/۲۹	۴۶/۰۸
C4	۳۱/۷۴	۵۰/۱۹
میانگین	۲۶/۶۱	۴۶/۲

P: پایه مادری، C1: ژنوتیپ باززایی شده در محیط کشت فاقد CPZ و حاوی تنظیم‌کننده رشد BAP با غلظت ۲۰ میکرومول، C2، C3 و C4: ژنوتیپ‌های باززایی شده در محیط کشت حاوی CPZ به ترتیب با غلظت‌های ۰/۳، ۳ و ۱۵ میکرومول.

جدول ۵- ضریب همبستگی کوفنتیک حاصل از الگوریتم‌ها با ضریب‌های تشابه

الگوریتم دورترین همسایه	الگوریتم نزدیک‌ترین همسایه	الگوریتم UPGMA	ضریب تشابه
۰/۷۶	۰/۷۶	۰/۷۸	ضریب تشابه دایس
۰/۷۸	۰/۷۶	۰/۸	ضریب تشابه جاکارد
۰/۷۸	۰/۷۴	۰/۷۹	ضریب تطابق ساده

براساس نتایج حاصل از ماتریس تشابه در جدول ۶، کمترین تشابه (۰/۱۸) بین C1 و C4 مشاهده شد، درحالی‌که بیشترین تشابه (۰/۳۹) بین P و C2 به دست آمد. میانگین ضریب تشابه جاکارد بین کل نمونه‌ها نیز برابر با ۰/۳۱ بود که تنوع زیاد بین تیمارهای مورد بررسی را نشان می‌دهد.

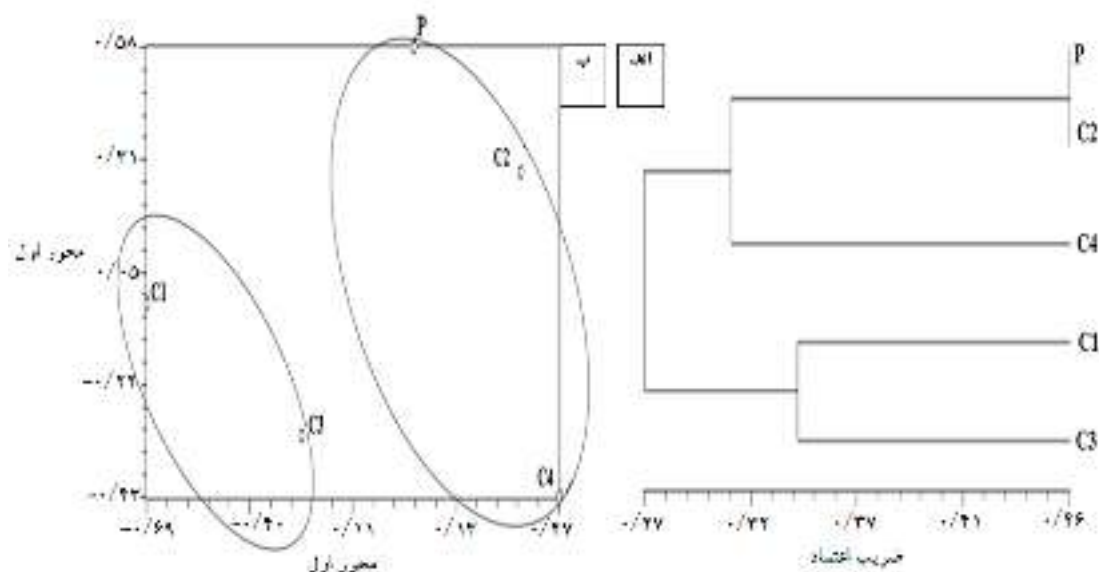
جدول ۶- ماتریس ضریب تشابه جاکارد براساس نشانگر ISSR در تیمارهای مورد مطالعه

نمونه‌ها	P	C1	C2	C3	C4
P	۱				
C1	۰/۳۲	۱			
C2	۰/۳۹	۰/۲۳	۱		
C3	۰/۳۱	۰/۳۵	۰/۳۴	۱	
C4	۰/۲۷	۰/۱۸	۰/۳۸	۰/۳۲	۱

P: پایه مادری، C1: ژنوتیپ باززایی شده در محیط کشت فاقد CPZ و حاوی تنظیم‌کننده رشد BAP با غلظت ۲۰ میکرومول، C2، C3 و C4: ژنوتیپ‌های باززایی شده در محیط کشت حاوی CPZ به ترتیب با غلظت‌های ۰/۳، ۳ و ۱۵ میکرومول.

درحالی که مؤلفه‌های دوم و سوم به ترتیب در ۱۲/۲۹ و ۷/۵۷ درصد از واریانس نقش داشتند. در شکل ۳-ب، نمودار پراکنش تیمارها به صورت دوبعدی آمده است. باتوجه به اینکه بیشتر تیمارها در تجزیه خوشه‌ای در گروه یک جایی دارند، در نمودار پراکنش نیز این تیمارها در کنار یکدیگر قرار گرفتند.

دارنگاره به دست آمده از تجزیه خوشه‌ای براساس ماتریس تشابه جاکارد به روش UPGMA در شکل ۳-الف نشان داده شده است. تیمارهای مورد مطالعه با ضریب تشابه ۰/۲۷ در دو گروه قرار گرفتند. گروه اول شامل تیمارهای P، C2 و C4 و گروه دوم شامل تیمارهای C1 و C3 بودند. براساس نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی دوبعدی نیز مؤلفه اول در مجموع ۴۶/۳۲ درصد از واریانس کل را توجیه کرد،



شکل ۳- دارنگاره حاصل از تجزیه خوشه‌ای براساس نشانگر ISSR در تیمارهای آنتی‌سایتوکینین، ب- نمودار پراکنش تیمارهای آنتی‌سایتوکینین براساس نشانگر مولکولی ISSR

P: پایه مادری، C1: ژنوتیپ باززایی شده در محیط کشت فاقد CPZ و حاوی تنظیم‌کننده رشد BAP با غلظت ۲۰ میکرومول، C2، C3 و C4: ژنوتیپ‌های باززایی شده در محیط کشت حاوی CPZ به ترتیب با غلظت‌های ۰/۳، ۰/۳ و ۱۵ میکرومول.

بحث

براساس تعداد آلل‌های هر جایگاه ژنی و فراوانی نسبی آن‌ها در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، PIC محتوای اطلاعات چندشکلی آغازگرها را نشان می‌دهد. برای به دست آوردن چندشکلی کافی، نوع رابطه خویشاوندی، مواد مورد مطالعه و انتخاب نوع نشانگر، اهمیت زیادی دارد. باتوجه به اینکه از بین ۱۵ آغازگر ISSR، ده آغازگر توانایی زیادتری نسبت به آغازگرهای دیگر داشتند، از آن‌ها برای بررسی چندشکلی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه استفاده شد. در پژوهش پیش‌رو، آغازگر ISSR2 برای آنتی‌سایتوکینین، PIC بیشتری را نشان داد. همچنین، میانگین درصد چندشکلی ۸۷/۹ درصد به دست آمد (جدول ۳). Ghandehari و همکاران (۲۰۱۳)

تنوع سوماکلونال و یکنواختی ژنتیکی گیاهان باززایی شده در شرایط درون شیشه‌ای، اهمیت زیادی دارد (Khawale et al., 2006). الگوی باند تولیدشده با نشانگر ISSR برای آنتی‌سایتوکینین در پژوهش پیش‌رو نشان داد که ۹۴ باند از ۱۰۷ باند ایجادشده، چندشکل هستند (جدول ۳). وجود دامنه باند چندشکل حاکی از پتانسیل زیاد نشانگر ISSR برای ایجاد باندهای پلی‌مورف در این پژوهش است. چنین نتایجی در پژوهش‌های دیگر نیز گزارش شده است (Akdemir et al., 2016; Singh et al., 2016; Pastelín et al., 2019).

(*al.*, 2016) گزارش شد.

نتایج درصد واریانس مولکولی برای ژنوتیپ‌های ساقه تحت تأثیر آنتی‌سایتوکینین در پژوهش پیش‌رو نشان داد که تنوع درون و بین ژنوتیپ‌ها به ترتیب برابر با ۴۴ و ۵۶ درصد هستند، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که پس از شش واکشت، تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های ساقه افزایش می‌یابد. نتایج مذکور بر این دلالت دارند که تیمارها تاحدودی متمایز شده‌اند. این الگوی ساختار ژنتیکی در گیاهان دگرگشن دیگر نیز تأیید شده است (Hamrick & Godt, 1996).

دارنگاره ترسیم‌شده براساس ماتریس تشابه جاکارد و برای ژنوتیپ‌های پایه مادری و ژنوتیپ‌های تحت تأثیر آنتی‌سایتوکینین با ضریب تشابه ۰/۲۷ نشان داد که تیمارهای مورد مطالعه در دو گروه قرار دارند (شکل ۳-الف). گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها نشان داد که واکشت چندباره ریزنمونه‌ها سبب ایجاد تنوع ژنتیکی می‌شود. به طوری که تنوع سوماکلونال بین پایه مادری با بیشتر ژنوتیپ‌های دیگر مشاهده شد که دلیل‌های مختلفی می‌تواند داشته باشد. از جمله اینکه ژنوتیپ گیاه مادر در ایجاد تنوع سوماکلونال بسیار اهمیت دارد که در پژوهش‌های پیشین نیز تأکید شده است (Sarmast *et al.*, 2011). دوم اینکه کشت درون‌شیشه‌ای می‌تواند به طور بالفعل به عنوان سازوکاری در ایجاد تنوع ژنتیکی عمل کند و سبب استرس و جهش در ریزنمونه‌ها شود (Jain, 2001; Sarmast, 2016). از دلایل دیگر می‌توان به افزایش تعداد واکشت اشاره کرد که احتمال ایجاد تنوع سوماکلونال را افزایش می‌دهد. با توجه به عدم بررسی نتایج پژوهش پیش‌رو به تفکیک هر واکشت، این موضوع را نمی‌توان ارزیابی کرد. هرچند که نتایج پس از واکشت ششم حاکی از اثرگذاری قابل ملاحظه این عامل بود. Saito و همکاران (۲۰۰۳) تجمیع تنظیم‌کننده‌های رشد از واکشت قبل و انتقال آن به واکشت بعد را گزارش کردند که این موضوع نیز می‌تواند بر ایجاد تنوع سوماکلونال تأثیرگذار باشد. یکی دیگر از مهم‌ترین عوامل ایجاد تنوع ژنتیکی در بین پایه مادری و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را می‌توان به راهبرد انتخاب‌شده به منظور باززایی لیلیکی در پژوهش

با بررسی سه جمعیت طبیعی شمشاد (*Buxus hyrcana* Pojark.) در شمال ایران با استفاده از ۱۰ آغازگر ISSR مقدار چندشکلی را ۹۰/۵ درصد گزارش کردند. با توجه به میانگین PIC به دست آمده (۰/۴۴) در پژوهش پیش‌رو می‌توان گفت که فراوانی متعادل چندشکلی برای آن جایگاه در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه وجود دارد. چون مقدار زیاد محتوای چندشکلی بیانگر تنوع ژنتیکی بیشتر بین جمعیت‌ها است (Saito *et al.*, 2003). البته تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها با تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی نیز به اثبات رسید. به طور کلی نشانگر ISSR بسیار چندشکل و روشی ساده، سریع و قابل تکرار است که به اطلاعات پیشین در مورد ژنوم نیاز ندارد (Peng *et al.*, 2015)، بنابراین می‌توان با استناد به آن، نتایج این پژوهش را بسیار دقیق دانست.

میانگین شاخص‌های تنوع ژنی نی و شانون برای تیمارهای آنتی‌سایتوکینین در پژوهش پیش‌رو به ترتیب ۲۱/۶۱ و ۴۶/۲ درصد را نشان داد. به طور کلی، این نتایج بیانگر وجود تنوع بین ژنوتیپ‌ها است. در پژوهش‌های پیشین با استفاده از نشانگرهای ISSR، میانگین شاخص‌های تنوع ژنی نی و شانون برای شمشاد به ترتیب ۳۴/۱۴ و ۵۰/۴۷ درصد (Ghandehari *et al.*, 2013)، زالزالک (*Crataegus pontica* K.Koch) ۲۵ و ۳۷ درصد (Rahmani *et al.*, 2015) و بلوط ایرانی (*Quercus brantii* Lindl.) ۱۴/۷ و ۲۲/۷ درصد (Shabanian *et al.*, 2016) گزارش شد.

میانگین شاخص‌های تنوع ژنی نی و شانون برای تیمارهای آنتی‌سایتوکینین در پژوهش پیش‌رو به ترتیب ۲۶/۶۱ و ۴۶/۲ درصد را نشان داد. به طور کلی، این نتایج بیانگر وجود تنوع بین ژنوتیپ‌ها است. در پژوهش‌های پیشین با استفاده از نشانگرهای ISSR، میانگین شاخص‌های تنوع ژنی نی و شانون برای شمشاد به ترتیب ۳۴/۱۴ و ۵۰/۴۷ درصد (Ghandehari *et al.*, 2013)، زالزالک (*Crataegus pontica* K.Koch) ۲۰ و ۳۱ درصد (Rahmani *et al.*, 2015) و بلوط ایرانی (*Quercus brantii* Lindl.) ۱۴/۷ و ۲۲/۷ درصد (Shabanian *et al.*, 2016) گزارش شد.

- Azman, A.S., Mhiri, C., Grandbastien, M.A. and Tam, S., 2014. Transposable elements and the detection of somaclonal variation in plant tissue culture: a review. *Malaysian Applied Biology*, 43(1): 1-12.
- Bagga, S., Das, R. and Sopory, S.K., 1987. Inhibition of cell proliferation and glyoxalase-I activity by calmodulin inhibitors and lithium in *Brassica oleracea*. *Journal of Plant Physiology*, 129(1-2):149-153.
- Bagheri, A. and Saffari, M., 1997. In Vitro Culture of Higher Plants (translation). Ferdowsi University of Mashhad Press, Mashhad, 406p (In Persian).
- Bairu, M.W., Aremu, A.O. and Van Staden, J., 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation*, 63(2): 147-173.
- Bianco-Colomas, J., 1983. Effect of a cytokinin antagonist on cytokinin and light-dependent amaranthin synthesis in *Amaranthus tricolor* seedlings. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2(1-4): 281.
- Buchanan, F.C. and Thue, T.D., 1998. Intrabreed polymorphic information content of microsatellites in cattle and sheep. *Canadian journal of animal science*, 78(3): 425-428.
- D'amato, F., 1978. Chromosome number variation in cultured cells and regenerated plants: 287-295. In: Thorpe, T.A. (Ed.). *Frontiers of Plant Tissue Culture*. International Association for Plant Tissue Culture, Alberta, 556p.
- Geburek, T., 1997. Isozymes and DNA markers in gene conservation of forest trees. *Biodiversity and Conservation*, 6(12): 1639-1654.
- Ghandehari, V., Ahmadikhah, A. and Payamnoor, V., 2013. Genetic diversity of *Buxus hyrcana* populations in north of Iran using ISSR markers. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 21(1): 1-12 (In Persian).
- Hamrick, J.L. and Godt, M.J.W., 1996. Conservation genetics of endemic plant species: 281-304. In: Avise, J.C. and Hamrick, J.L. (Eds.). *Conservation Genetics: Case Histories from Nature*. Chapman and Hall, New York, 512p.
- Jain, S.M., 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica*, 118(2): 153-166.
- Karanov, E., Alexieva, V. and Sergiev, I., 1992. Cytokinin antagonists-chemistry and action. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 1: 97-107.
- Khawale, R.N., Singh, S.K., Vimala, Y., Minakshi, G., 2006. Assessment of clonal fidelity of micropropagated grape (*Vitis vinifera* L.) plants by RAPD analysis. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 12(2): 189-192.
- Khosh-Khui, M., 1998. Tissue Culture Techniques for

پیش‌رو دانست. ایجاد تنوع سوماکلونال به‌دلیل راهبرد اندام‌زایی به‌روش غیرمستقیم در پژوهش‌های گذشته به‌اثبات رسیده است (Bairu *et al.*, 2011). براین‌اساس، باززایی غیرجنسی می‌تواند سبب ایجاد تنوع سوماکلونال شود (Larkin & Scowcroft, 1981).

به‌طورکلی، نتایج پژوهش پیش‌رو نشان داد که حضور بازدارنده رشد CPZ در محیط کشت سبب کاهش معنی‌دار شاخه‌زایی و تعداد شاخساره در باززایی گیاهان لیلیکی می‌شود، درحالی‌که بیشینه مقدار مشخصه‌های مذکور در حضور تنظیم‌کننده رشد BAP مشاهده شد. همچنین، وجود BAP و CPZ در طولانی‌مدت و پس از شش واكشت باعث ایجاد تنوع سوماکلونال در لیلیکی شد. فاصله ژنتیکی (تنوع بیشتر) بین گیاهان باززایی‌شده تحت تأثیر CPZ بیانگر آن است که با افزایش غلظت بازدارنده رشد ممکن است تنوع سوماکلونال بیشتر شود. درانتها، پیشنهاد می‌شود که پژوهش‌های بیشتری در زمینه تنوع سوماکلونال و نیز تنوع ژنتیکی درختان جنگلی به‌ویژه درختان بومی طبیعی ایران انجام گیرد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از مسئولان و کارشناسان پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان برای همکاری علمی تشکر می‌شود.

منابع مورد استفاده

- Akdemir, H., Suzerer, V., Tilkat, E., Onay, A. and Ciftci, Y.O., 2016. Detection of variation in long-term micropropagated mature pistachio via DNA-based molecular markers. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 180(7): 1301-1312.
- Ando, T., Akiyama, Y. and Yokoi, M., 1986. Flower colour sports in saintpaulia cultivars. *Scientia Horticulturae*, 29(1-2): 191-197.
- Ayadi, R., Hamrouni, L., Hanana, M., Bouzid, S., Trifi, M. and Khouja, M.L., 2011. In vitro propagation and regeneration of an industrial plant kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). *Industrial Crops and Products*, 33(2): 474-480.

- Nakano, M., 2003. Ploidy estimation in *Hemerocallis* species and cultivars by flow cytometry. *Science Horticulture*, 97(2): 185-192.
- Sarmast, M.K., 2016. Genetic transformation and somaclonal variation in conifers. *Plant Biotechnology Reports*, 10(6): 309-325.
 - Sarmast, M.K., Salehi, H. and Khosh-Khui, M., 2011. Nano silver treatment is effective in reducing bacterial contaminations of *Araucaria excelsa* R. Br. var. *glauca* explants. *Acta Biologica Hungarica*, 62(4): 477-484.
 - Shabaniyan, N., Havasi, A. and Mehrabi, A.A., 2016. Genetic differentiation in Persian oak (*Quercus brantii*) populations using genomic inter-microsatellite markers. *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 24(1): 66-78 (In Persian).
 - Shannon, C.W. and Weaver, W., 1949. *The Mathematical Theory of Communication*. University of Illinois Press, Urbana, 131p.
 - Sharma, S.K., Knox, M.R. and Ellis, T.H.N., 1996. AFLP analysis of the diversity and phylogeny of *Lens* and its comparison with RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 93(5-6): 751-758.
 - Singh, R., Kashyap, S.P., Kumari, N. and Singh, M., 2016. Regeneration of soapnut tree through somatic embryogenesis and assessment of genetic fidelity through ISSR and RAPD markers. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 22: 381-389.
 - Yanosaka, K., Iwamura, H. and Fujita, T., 1989. Flower induction in seedlings of *Asparagus officinalis* L. by N-phenylcarbamates. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 44(3-4): 226-232.
 - Zhao, Y. and Hasenstein, K.H., 2010. Physiological interactions of antiauxins with auxin in roots. *Journal of Plant Physiology*, 167(11): 879-884.
 - Horticultural Crops (translation). Shiraz University Press, Shiraz, 438p (In Persian).
 - Krishna, H., Alizadeh, M., Singh, D., Singh, U., Chauhan, N., Eftekhari, M. and Sath, R.K. 2016. Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. *3 Biotech*, 6(1): 54.
 - 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(4): 197-214.
 - Lazaro-Castellanos, J.O., Mata-Rosas, M., González, D., Arias, S. and Reverchon, F., 2018. In vitro propagation of endangered *Mammillaria* genus (Cactaceae) species and genetic stability assessment using SSR markers. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 54(5): 518-529.
 - Murray, M.G. and Thompson, W.F., 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8(19): 4321-4325.
 - Pastelín Solano, M.C., Salinas Ruíz, J., González Arnao, M.T., Castro, O.C., Galindo Tovar, M.E. and Bello Bello, J.J., 2019. Evaluation of in vitro shoot multiplication and ISSR marker based assessment of somaclonal variants at different subcultures of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 25(2): 561-567.
 - Peng, X., Zhang, T.T. and Zhang, J., 2015. Effect of subculture times on genetic fidelity, endogenous hormone level and pharmaceutical potential of *Tetrastigma hemsleyanum* callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 122(1): 67-77.
 - Rahmani, M.Sh., Shabaniyan, N., Khadivi-Khub, A., Woeste, K.E., Badakhshan, H. and Alikhani, L., 2015. Population structure and genotypic variation of *Crataegus pontica* inferred by molecular markers. *Gene*, 572(1): 123-129.
 - Saito, H., Mizunashi, K., Tanaka, S., Adachi, Y. and

Somaclonal diversity in Caspian honey locust (*Gleditsia caspica* Desf.) regenerated plants using genomic microsatellite markers (ISSR-PCR)

M. Imani Rastabi ^{1*}, S.M. Hosseini-Nasr ², Gh. Ranjbar ³ and M. Khoshhal Sarmast ⁴

1* - Corresponding author, Ph.D. Graduated, Department of Forestry Science and Engineering, Faculty of Natural Resources, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. E-mail: m_imani_m@yahoo.com

2- Associate Prof., Department of Forestry Science and Engineering, Faculty of Natural Resources, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

3- Associate Prof., Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Crop Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

4- Assistant Prof., Department of Horticultural Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Received: 09.11.2021

Accepted: 20.12.2021

Abstract

Somaclonal diversity is a genetical test that can be used to study the genetic variation and genetic stability of a propagated plant relative to the mother plant. The aim of this study was to investigate the genetic stability of Caspian honey locust (*Gleditsia caspica* Desf.) regenerated plants under the influence of BAP growth regulator and CPZ growth inhibitor. For this purpose, native and regenerated plants genotypes were compared in culture media containing growth regulator BAP (20 μmol) and CPZ (0.3, 3 and 15 μmol) used by molecular marker of ISSR. The highest percentage of shoot proliferation and number of shoots was observed in 20 μmol BAP treatment. The presence of CPZ in the culture medium greatly reduced the shoot proliferation percentage and with increasing CPZ concentration, the decreasing trend of the studied characteristics increased. The results showed that the use of 10 ISSR molecular markers produced a total of 107 DNA bands that had 87.9% polymorphism. Cluster analysis dendrogram based on Jaccard similarity matrix by UPGMA method showed that the studied genotypes were divided into two groups with similarity coefficient of 0.27. It seems that the presence of CPZ, despite the growth inhibitory effect on the plant, will increase diversity and reduce the genetic affinity between the regenerated plants and the mother plant.

Keywords: Genetic diversity, growth inhibitor, growth regulator, tissue culture.