ارزیابی تنوعهای ژنتیکی در سوماکلونهای جدید در صنوبر پده
(*Populus euphratica* OLIV.)

علی جعفری مفیدآبادی[1] و عصمت جورابچی[1]

چکیده

به منظور مطالعه تنوع ژنتیکی در گیاهان باززایی شده از کشت کالوس در صنوبر پده ، اقدام به تولید پایه‌های سوماکلون و بررسیهای سیتوژنتیکی و الکتروفورزی ایزوآنزیم (پراکسیداز) در مورد پایه‌های سوماکلون گردید. جهت تولید پایه‌های سوماکلون، پینه‌زایی از گل آذین‌های نارس (حاوی دانه‌های گرده در مرحله سلول مادری) در محیط کشت MS حاوی ۳ میلیگرم در لیتر IBA بهمراه ۰/۱ میلیگرم در لیتر BAP صورت گرفت. جهت افزایش تنوع ژنتیکی، کشت طولانی مدت پینه در قالب روش سوسپانسیون سلولی به مدت ۸ ماه انجام شد. بیشترین درصد متوسط باززایی گیاهچه (۷۵/۵٪)، در محیط کشت MS جامد حاوی ۳ میلیگرم در لیتر BAP و ۰/۵ میلیگرم در لیتر NAA مشاهده شد. محیط کشت MS با نصف غلظت نیترات، حاوی ۰/۱ میلیگرم در لیتر IBA و ۰/۱ میلیگرم در لیتر NAA بیشترین درصد ریشه زایی را در گیاهان باززایی شده بهمراه داشت. گیاهان باززایی شده در مزرعه ، رفتارهای مورفولوژیکی (شکل ظاهری برگها، تنه ومیزان رشد آنها) متفاوتی را نسبت به کلن مبداء از خود نشان دادند. بررسیهای سیتوژنتیکی در مورد نوک ریشه تعدادی از گیاهان باززایی شده نیز بیانگر وجود گیاه هاپلوئید ، دیپلوئید ، پلی پلوئید و آنیوپلوئید بود. مطالعات الکتروفورزی در مورد آنزیم پراکسیداز با استفاده از ژل پلی اکریل آمید و

---

۱ - تهران – موسسه تحقیقات جنگلها ومراتع کد پستی ۱۱۶-۱۳۱۸۵

تجزیه کلاستر درباره باندهای بدست آمده بیانگر وجود تفاوتهای ژنتیکی در گیاهان باززایی شده با والد مادری می‌باشد.

مقدمه

تا قبل از دهه ۱۹۸۰، اصلاح کنندگان نباتی به نحو عمده از دو طریق دورگ گیری و یا جهش برای ایجاد تنوع ژنتیکی و تامین مواد پایه اصلاحی استفاده می‌کردند. تحقیقات انجام شده در دهه‌های اخیر در مورد کشتهای سلول رویشی و باززایی گیاه از آنها نشان دادند که این روشها نیز می‌توانند موجب تنوعهای فنوتیپی و ژنتیکی پایدار ودر نتیجه افزایش مواد پایه برای کارهای اصلاحی گردند (Heszky و همکاران ۱۹۹۲). تنوعی که در گیاهان باززایی شده از سلولهای رویشی ایجاد می‌شود به تنوع سوماکلون معروف است (Evans و Sharp ۱۹۸۶). تنوعهای بدست آمده شامل تغییرات کروموزومی، جهشهای وراثت‌پذیر سیتوپلاسمی و جهشهای هسته‌ای می‌باشد(Orton ۱۹۷۹). بعضی از این تنوعها وراثت پذیر بوده و با بازده بالایی نیز در یک دوره کشت سلولی اتفاق می‌افتد. مضاعف شدن کروموزومها ، آنئوپلوئید، تغییرات ساختمانی کروموزوم و دیگر تغییرات کمی و کیفی ژنتیکی در کشت سلول و پروتوپلاست گندم و سیب زمینی گزارش شده‌اند (Lindesy و Jones ۱۹۸۹). مطالعه حاضر به منظور بررسی امکان ایجاد تغییرات مورفولوژیکی در شکل رویشی و گزینش پایه‌های استوانه‌ای (سیلندریک) در صنوبر پده *Populus euphratica* OLIV. به وسیله یک دوره طولانی کشت پینه و ارزیابی تفاوتهای ژنتیکی آنها براساس بررسیهای سیتوژنتیک و مطالعه الکتروفورز ایزوآنزیم (پراکسیداز) انجام شد.

مواد و روش

جوانه‌های گل نر صنوبر پده (2n) دراواخر پاییز و اوایل زمستان ۱۳۷۸ از درخت بالغ جمع آوری و در شرایط ۴° C سانتیگراد به مدت ۶ روز نگهداری شد. تشخیص مراحل مختلف تکاملی دانه گرده هر چند روز یکبار به وسیله استو کارمن به منظور کشت میکروسپور در مرحله مادری (2n) انجام گرفت. ضد عفونی جوانه‌های گل نارس با فروبردن در اتانول ۷۰٪ به مدت یک دقیقه و متعاقب آن، به مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیپو کلریت سدیم و سپس با سه بار شستشو با آب مقطر استریل انجام شد. به منظور کال زایی از گل آذین نارس و قطعات بافتی آن، محیط کشت MS (Murashige and Skoog 1962) حاوی ترکیب هورمونهای رشد گیاهی 2,4-D با غلظتهای (۰، ۲ و ۳) میلیگرم در لیتر بهمراه Kinetin با غلظتهای (۰ و ۰/۰۱ میلیگرم) در لیتر، IBA (اسید ایندول بوتریک) با غلظتهای (۰ ، ۲ و ۳) میلیگرم در لیتر در ترکیب با هورمون رشد BAP (بنزیل آمینوپورین) با غلظتهای (۰ و ۰/۱) میلیگرم در لیتر مورد استفاده قرار گرفت. pH محیط کشت به میزان ۵/۸ قبل از سترون (۲۰ دقیقه در ۱۲۰ درجه سانتیگراد) تنظیم شد. مقدار ساکارز برای محیطهای کشت ۳۰ گرم در لیتر بود. کشتها در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی در شبانه روز و باشدت نور ۴۵۰۰-۵۰۰۰ لوکس نگهداری شدند. آزمایش پینه زایی در قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی با چهار تیمار هورمونی (ترکیبها و غلظتهای مختلف هورمونهای رشد گیاهی) و در سطح هشت تکرار انجام شد. تعداد ۲۰ قطعه بافتی از گل آذین نارس در هر پتری دیش (100mm × 15mm) روی محیطهای کشت پینه زایی به عنوان یک واحد آزمایشی قرار گرفت. کشت طولانی مدت پینه (۸ ماهه) در محیط کشت MS حاوی ۳ میلیگرم در لیتر IBA و ۰/۱ میلیگرم در لیتر BAP درقالب کشت سوسپانسیون سلولی انجام شد. پینه‌های ۸ ماهه سبز رنگ جهت باززایی گیاه مورد استفاده قرار گرفت. محیط کشت MS حاوی میزان، ۲ و ۳ میلیگرم در لتیر BAP و میزان ۰، ۰/۱ و ۰/۵ میلیگرم در لیتر

NAA برای انجام باززایی گیاه از کالوس بکار گرفته شد. تعداد پنج قطعه کالوس (توده کالوس) جهت باززایی گیاه در هر پتری دیش به عنوان یک واحد آزمایشی کشت شد. گیاهچه‌های باززایی شده در محیط کشت ریشه زایی MS با غلظت نصف نیترات بهمراه ترکیبهای و غلظتهای متفاوتی از هورمونهای تنظیم رشد گیاهی IBA و NAA هر کدام با غلظت ۰/۱ میلیگرم در لیتر ریشه دار شده و پس از انجام مرحله سازگاری تدریجی در گلدانهای حاوی خاک ، ماسه و پیت به نسبت ۱:۱:۱ به مزرعه انتقال یافتند. تعیین سطح پلوئیدی گیاهان باززایی شده ازیاخته‌های مریستمی نوک ریشه انجام شد. ریشه‌های سالم جمع آوری شده به مدت سه ساعت در محلول پیش تیمار ۸-هیدروکسی کینولین ۲ ۰/۰۰ مولار و ۰/۱ کلشی سین غوطه ور شد. بعد به مدت ۱۵-۲۴ در محلول ۳ به ۱ اتانول ۹۶ درصد و اسید استیک تثبیت شد. نمونه‌ها جهت مطالعه در محلول اسید کلریدریک یک نرمال به مدت ۶ الی ۱۰ دقیقه در دمای ۶۰° C دمای حمام آب گرم حرارت داده شده اند. پس ازرنگ آمیزی با محلول استواورسئین و استوکارمن به مدت ۱۵ الی ۲۰، سه ریشه ازهر گیاه برای تعیین سطح پلوئیدی مورد مطالعه قرار گرفت. به منظور ارزیابی میزان تنوعهای درونی گیاهان باززایی شده، مطالعه الکتروفورز در مورد آنزیم پراکسیداز استخراج شده از عصاره برگهای جوان هم سن و با استفاده از ژل پلی اکریل آمید جهت تعیین تفاوتهای ژنتیکی و دسته بندی گیاهان باززایی شده به همراه والد مادری صورت گرفت.

نتایج و بحث

پس از ۵-۷ روز از کشت گل آذین نارس در محیط پینه زایی، آثار اولیه پینه و تقسیمات سلولی آن در اطراف و محل برش گل ظاهر شدند. پینه حاصل به رنگهای کرم روشن تا سبز تیره و به صورت نرم و ترد و شکننده بود. ارزیابی پینه زایی با توجه به داده‌های یادداشت برداری شده، بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار درسطح ۰/۱ درصد

بین تیمارهای مختلف هورمونهای تنظیم کننده رشد بکار گرفته می‌باشد (جدول شماره ۱). اثر هورمونهای رشد در میزان پینه زایی بستگی به ترکیب و غلظتهای مختلف هورمونهای رشد داشته است. مقایسه میانگین اثرات هورمونهای رشد گیاهی جهت انتخاب بهترین ترکیب و غلظت هورمونی در پینه زایی ازگل آذین نارس، به روش دانکن ، نشان داد که محیط کشت MS با مقدار ۳ میلیگرم در لیتر IBA به همراه مقدار ۰/۱ میلیگرم در لیتر BAP بیشترین کال زایی را در کشت گل آذین نارس داشته و تنها دارای اختلاف معنی‌دار با تیمار هورمونی ۲ میلیگرم در لیتر 2,4-D به همراه ۰/۱ میلیگرم در لیتر Kinetin می‌باشد (جدول ۲). به رغم وجود اختلاف معنی‌دار بین دو غلظت IBA، کاهش میزان آن از ۳ میلیگوم در لیتر به ۲ میلیگرم به کاهش میزان پینه زایی منجر شد. ترکیب هورمونی ۳ میلیگرم در لیتر IBA به همراه مقدار ۰/۱ میلیگرم در لیتر BAP جهت کشت طولانی مدت کالوس مورد استفاده قرار گرفت. ترکیب هورمونهای رشد IBA به همراه BAP در میزان پینه زایی از گل آذین نارس موفق‌تر از ترکیب هورمونی 2,4-D به همراه Kinetin در ایجاد پینه از کشت بساک و میکروسپور در تحقیق محمودی کردی (۱۳۷۹) بر روی همین گونه بوده است. ممکن است تفاوت دو ترکیب هورمونی در ایجاد پینه به سطح پلوئیدی بافت‌های مورد نظر بستگی داشته باشد.ترکیب هورمونی 2,4-D و Kinetin در ایجاد کالوس از کشت بساک و میکروسپور در پیش توسط Ho و همکاران (۱۹۸۳)، Szuffa و Stoher (۱۹۹۰)، Jafari و همکاران (۱۹۹۵) و محمودی کردی (۱۳۷۹) گزارش شده است. پینه‌ها بعد ازکشت طولانی مدت در محیط باززایی گیاه قرارداده شدند. پس از دو هفته از کشت پینه‌ها بصورت فشرده و جوانه دار و به رنگ سبز در محیط کشت باززایی ظاهر گردید. به منظور تعیین اثرات تیمارهای هورمونی رشد گیاهی بر میزان باززایی گیاه، و انتخاب بهترین تیمار هورمونی برای این منظور، تجزیه واریانس درباره داده انجام شد. نتاج بدست آمده بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای هورمونی در میزان ساقه زایی بود

(جدول شماره ۳). به رغم عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای هورمونی، ترکیب هورمونی BAP با غلظت ۳ میلیگرم در لیتر به همراه ۰/۵ میلیگرم در لیتر NAA بیشترین میزان متوسط باززایی (۷۵٪) را ازخود نشان داد. بر خلاف گزارش Antonetti و Pinon (۱۹۹۳) که میزان باززایی گیاه از پینه‌های مسنُ کاهش یافت در این بررسی میزان باززایی متوسط ۷۵٪ از کالوسهای مسن بیانگر باززایی قابل توجه است. محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلیگرم در لیتر IBA به‌همراه ۰/۱ میلیگرم در لیتر NAA موجب بیشترین درصد ریشه زایی (۵۴/۶) در میان تیمارهای مختلف ریشه‌زایی شد.

تنوعات فنوتیپی

تنوع فنوتیپی اغلب بصورت تغییر شکلهای ظاهری برگها، میزان رشد و فرم رویشی تنه نهالها در گلخانه و مزرعه دیده شده است. (تصویر شماره ۱). پایه‌ها با تعداد کروموزومهای ناقص (آنئوپلوئید) دارای رشد ضعیف و نهالها با برگهای زرد باریک ناپایدار در برابر نوسانهای عوامل محیطی بودند. تنوع ظاهری در صنوبر کبوده *Populus alba* cv. 5972-38 توسط Antonetti و Pinon (۱۹۹۳) نیزگزارش شده است. تعدادی سوماکلون به عنوان کولتیوارهای جدید صنوبر بر اساس روش تنوع زایی سوماکلونی توسط Skirvin و همکاران (۱۹۹۴) معرفی شد.

تنوعهای سیتولوژیکی

شمارش کروموزومی موجود در روی نوک ریشه بیانگر وجود پایه‌های آنئوپلوئید ۱۹،۲۳، ۱۱، ۲۱ و ۴۷ و پلی پلوئید ۷۶ و دیپلوئید (۳۸)در میان گیاهان باززایی شده بود. سلولهای حاصل ازکشت بافتهای گیاهی و جانوری در تعداد کروموزومها و ساختارهایشان ناپایدار می‌باشند. این ناپایداری یا تنوع پذیری شامل ظهور انواع جهشهای ژنی و نقطه‌ای و اختلالات کروموزومی است و اغلب بصورت تغییر در سطح

پلوئیدی آشکار می‌گردد (Hu وChia ۱۹۸۷). این نتایج می‌تواند وجود حالتهای آنئوپلوئیدی و پلی پلوئیدی را در این آزمایش توجیه نمایند. Jacosen (۱۹۸۷) و Learp (۱۹۸۹) وجود تتراپلوئیدی و آنئوپلوئیدی را در گیاهچه‌های باززایی شده از پینه دیپلوئید گزارش نمودند.

تفاوتهای ژنتیکی گیاهان باززایی شده بر اساس مطالعه الکتروفورز آنزیم پراکسیداز

تحقیقات بی شماری در خصوص استفاده از تجزیه آنزیم پراکسیداز به عنوان یک مارکر بیوشیمیایی برای شناسایی و تعیین میزان قرابت توده‌های گیاهی انجام گرفته‌اند. جهت تعیین میزان تنوعهای ژنتیکی حاصل از کشت سلول و خوشه‌های سلولی در صنوبر پده، از روش الکتروفورز آنزیم پراکسیداز استفاده شد.

تجزیه خوشه‌ای (روش خوشه‌ای حداقل واریانس Ward) به منظور تعیین تفاوتهای ژنتیکی گیاه مادری با گیاهان باززایی شده ، و میان گیاهان باززایی شده بر اساس فعالیت آنزیم پراکسیداز (نمودار شماره ۱)، موید این است که در نقطه ESS (مجموع کل مربعات انحراف هر نقطه، از میانگین دسته‌ای که به آن تعلق دارد) برابر صفر، هر درخت انفرادی (گیاهان باززایی شده و والد مادری) به عنوان یک دسته مستقل و دارای یک عضو است. با افزایش میزان ESS به حداقل مقدار خود، اولین دسته از ادغام ژنوتیپ S3 و S4 شکل می‌گیرد. با افزایش مقدار ESS به ترتیب دسته‌های بعدی (S5 و S6)، { S2 و (S3 و S4)} با ادغام دیگر ژنوتیپهای مورد مطالعه تشکیل می‌شود که بیانگر وجود تفاوتهای ژنتیکی قابل ملاحظه در آنها می‌باشد. هرچه مقدار کل مجموع مربعات انحراف از میانگین (دامنه فاصله ژنتیکی) بیشتر می‌شود، ژنوتیپهای بیشتری در هم ادغام می‌شوند و در حداکثر مقدار ESS تمامی گیاهان باززایی شده به همراه والد مادری در یک دسته قرار می‌گیرند. به این ترتیب میزان تفاوتهای ژنتیکی بر مبنای فعالیت آنزیم پراکسیداز (همبستگی درونی گیاهان باززایی شده) در قالب

دسته‌های مختلف مشخص شده است (نمودار شماره ۱). Olsson ۱۹۷۵، با استفاده از تجزیه و تحلیل آنزیم پراکسیداز اقدام به تعیین میزان قرابت *Quercus petrora* با *Quercus robra*نموده است. Dancick و همکاران ۱۹۹۲، با استفاده از تجزیه و تحلیل ایزوآنزیمی هیبرید *Populus canesence* و گونه‌های *Populus termula* و *Populus alba* را مورد ارزیابی مقایسه‌ای قرار دادند. Stettler ۱۹۸۲، تغییرات ۱۱ ایزوآنزیم را به همراه آنزیم پراکسیداز در میان ۱۰جمیعت *Populus tricocarpa* مطالعه نموده است.

منابع

محمودی کردی، فاطمه، ۱۳۷۹. کشت بساک و ایجاد گیاه‌هاپلوئید در صنوبر پده و بررسی مقایسه‌ای تشریحی گیاهان‌هاپلوئید ایجاد شده با دیپلوئید طبیعی. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده علوم دانشگاه تربیت معلم.

Antonetti P.I.E. and J. Pinon, 1993. Somaclonal variation within poplar. Plant Cell Tissue and Organ Culture 35: 99-106.

Evans D.A. and W.R. Sharp, 1986. Somaclonal and gametoclonal variation. In: Evans, (Eds). Handbook of Plant Cell culture 4. Techniques and Application. Macmillan Pub. Comp. New York. PP. 97-130.

Heszky L.E, I. Simon–kiss, G. Gyulai, E. kiss and I. Geczki, 1986. New Rice varieties developed by pollenhaploid somaclone method. Proceedings of the first Scientific Symposium of Socialist Countries on Biotechnologe Volume 11,4-8 Sep.

Heszky L.E., I. Simon-Kiss, Do Quang-Binh, E. Kiss, J. Kiss and G. Gyulai, 1992 . New plant varieties developed by convention and haploid somaclone method. Proceeding of the First Egyption–Italian Symposium on Biothecnology, Assiut , Egypt Nov. 21-23.

Ho R.H., A.Y. Raj and L. Zsuffa, 1983. Poplar plants through anther culture. In: Eckert R.T. (ed) Proc. 28th North East Tree Improvement Conference P.P 294-300 Univ. Of New Hampshire .

Hu H. and S.E. Chia, 1987. Genetic stability and variability of pollen derived plants, in plant cell culture in crop improvment. New York and London Press.

Jafari M.A., J. Kiss, M. Mazik-tokei. and L. Heszky, 1995. Callus induction and haploid plant regeneration from anther culture of two poplar species. Silvae Genetica 44(2-3) 141-145.

Jacobsen E. 1978. Doubling dihaploid potato clones via leaf tissue culture. Zeitschrift Pflanzuchtung, 80: 80-82

Murashige T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-479.

Olsson V. 1975. Peroxidase isoenzymes in *Quercus pertraea* and *Q. robra.* Botaniska Notiser 1:408-411.

Orton T.J. 1984. "Somaclonal variation: theoretical and practical consideration". Gene Manipul. Plant Improv. 16th Stadler Genet. Symp., New york London, pp: 427-468. 144.

Ostry M.E. and D.D. Skilling, 1988. Somatic variation in resistance of *Populus* of septoria musiva. Plant Disease, 72 (8) 724-727.

Skirvin M., K.D. Mcpheeters, M. Norton, 1994. Sources and frequency of somoclonal variation. Hort. Science Application of the American Society for Horticultural science (USA) V. 29(11) P. 1232-1237.

Stoehr M.U. and L. Zsuffa, 1990. Induction of haploids in *Populus maximowiczii* via embryogenic callus, Plant Cell Tissue and Organ Culture, 23,49-58.

جدول شماره ۱- تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اثر هورمونهای رشد بر میزان کال‌زائی گل آذین نارس

منبع تغییرات	درجه آزادی	MS درصد کال‌زایی
تکرار	۷	۳۲/۹۲۴
تیمار	۳	۱۳۰۱۳/۲۸۱**
خطا	۲۱	۵۵/۵۴۳
کل	۳۱	۱۳۱۰۱/۷۴۸

ns= عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪

** = اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪= α

جدول شماره ۲- مقایسه میانگین تیمارهای مختلف هورمونی بر میزان کال‌زایی

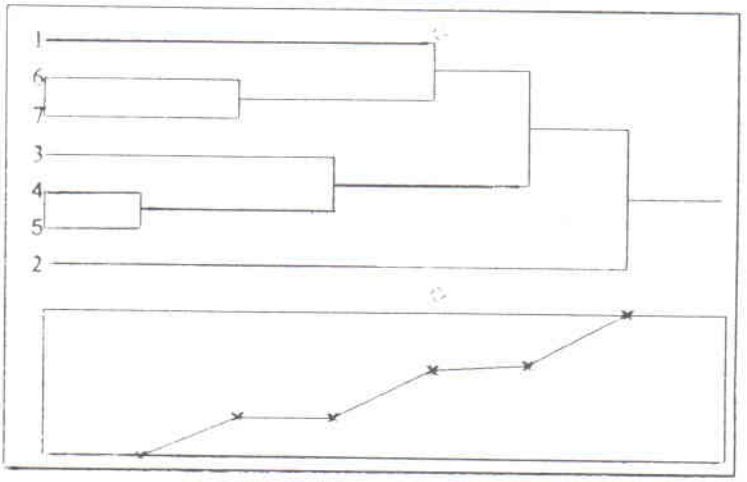
محیط‌های کشت کال زایی	میانگین (٪)	
MS1=IBA 3mg/1 + BAP 0.1mg/1	۱۰۰	A
MS2= IBA 2mg/1 + BAP 0.1mg/1	۹۲/۵۰	A
MS3= 2,4-D 3mg/l + Kin 0.1 mg/l	۸۰/۵۰	A
MS3= 2,4-D 2mg/l + Kin 0.1 mg/l	۱۱/۸	B

میانگین‌ها با حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار در سطح ۱٪ = α می‌باشد.

جدول شماره ۳- تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اثر هورمونهای رشد بر میزان باززایی گیاه از کالوس

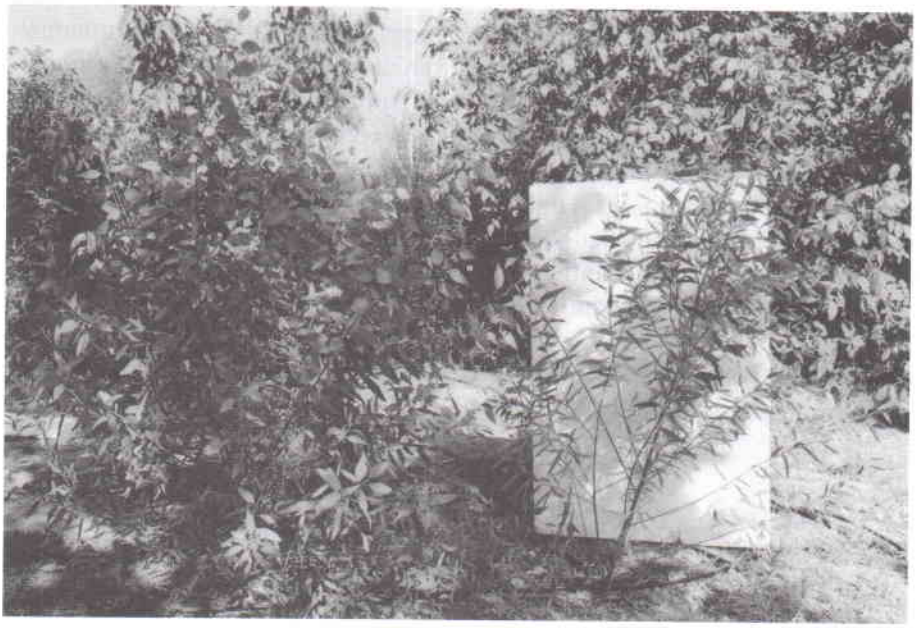
منبع تغییرات	درجه آزادی	MS
		درصد باززایی
تکرار	۹	۹۰۰/۶۲۵
تیمار	۳	۷۸۲/۲۹۲ns
خطا	۲۷	۶۹۳/۴۰۳
کل	۳۹	

ns= عدم اختلاف معنی‌دار



نمودار شماره ۱- دندوگرام نمونه‌های سوماکلون و شاهد(والد مادری)

1= S1, 2=والد مادری 3= S2 4=S3 5=S4 6=S5 7=S6



تصویر شماره ۱- گیاهان باززایی شده با سطوح مختلف پلوئیدی در صنوبر پده
***Populus euphratica* Oliv.**

Evaluation of genetic variation in new somaclons of *Populus euphratica* OLIV.

Jafari Mofidabadi[1] *A., and Jourabchi*[1] *E.,*

Abstract

In order to evaluate induced genetic variation of *Populus euphratica* Oliv. through cell culture, cytological and isozyme electrophrosis analysis were carried out. To induce genetic variation, immature inflorences of female tree containing microspore mother cells were isolated and cultured. Significant different was observed between growth regulator hormone treatment for callus induction at 0.01 level. MS medium supplemented with 2 mg/l 2,4-D and 0.1 mg/l kinetin produced higher callus from immature inflorences and showed significant differences with the other hormonal treatments at 0.01 level..The calli were subculture for8 month in MS medium to increase variation among regenerated plantlets. Higher plant regeneration (75.5 %) was observed in solidified MS medium containing 3 mg/l BA and 0.5mg/l NAA. High degree of morphological behavior (leaves and stems) were observed among regenerated plants. Cytological analysis on root tip of regenerated plantlets showed the presence of haploid, diploid, aneuploid and polyploid plantlets.

Key word: *Populus euphratica* Oliv, gametoclonal, tetrad- uninucleate, aneuploid, polyploid and haploid

[1] - Research Institute of Forests and Rangelands, P.O. Box: 13185-116, Tehran, Iran.