

## تنوع سوماکلونال در گیاهک‌های باززایی شده از اندام‌های ساقه، ریشه و لپه لیلکی ایرانی (*Gleditschia capsica* Desf.)

مجتبی ایمانی‌راستابی<sup>۱</sup>، سیدمحمد حسینی نصر<sup>۲\*</sup>، غلامعلی رنجبر<sup>۲</sup> و مصطفی خوشحال سرمست<sup>۳</sup>

۱- دانش‌آموخته دکتری، گروه علوم و مهندسی جنگل، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران

۲- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشیار، گروه علوم و مهندسی جنگل، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران

پست الکترونیک: mhn1946@gmail.com

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

۴- استادیار، گروه مهندسی علوم باغبانی و فضای سبز، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گلستان

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۴/۲۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۳

### چکیده

حفاظت از ژرم پلاسما گونه‌های درختی بومی جنگل‌های هیرکانی به‌ویژه لیلکی ایرانی (*Gleditschia capsica* Desf.)، در اولویت پژوهش قرار دارد. مطالعات مولکولی درختان جنگلی در شرایط درون‌شیشه‌ای به‌ویژه در ایران بسیار اندک است. در این پژوهش، تنوع سوماکلونال در گیاهان باززایی شده از ریزنمونه‌های مختلف لیلکی ایرانی در شرایط درون‌شیشه‌ای با استفاده از نشانگر مولکولی تکرار توالی ساده (ISSR) بررسی شد. برگ پایه مادری (طبیعی) و ریزنمونه‌های ساقه، ریشه و لپه به‌عنوان ژنوتیپ‌های مورد مطالعه انتخاب و در محیط کشت MS حاوی ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر TDZ و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D کشت شدند. پس از شش واکنش متوالی، تنوع سوماکلونال گیاهان باززایی شده از این ریزنمونه‌ها بررسی گردید. مشخصه‌های درصد چندشکلی (PIC)، تنوع نی و شانون برای بررسی تنوع بین ژنوتیپ‌ها استفاده شد و بعد با استفاده از الگوریتم UPMGA و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) خوشه‌بندی و تفکیک ژنوتیپ‌ها انجام شد. با استفاده از ۱۰ آغازگر، درصد چندشکلی بین گیاهان باززایی شده به‌میزان ۸۷/۹ درصد به‌دست آمد. تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA)، ۱۶ درصد تنوع بین ژنوتیپ‌ها با پایه مادری را نشان داد. نتایج آنالیز خوشه‌ای به روش UPGMA، ژنوتیپ‌ها را در سه دسته مجزا گروه‌بندی کرد. بر این اساس ژنوتیپ‌های پایه مادری و ژنوتیپ‌های ساقه در یک گروه قرار گرفتند. پایه مادری بیشترین و کمترین ضریب تشابه را به ترتیب با ژنوتیپ‌های ساقه و ریشه داشت. بنابراین پیشنهاد می‌شود برای مطالعات کشت بافت لیلکی ایرانی از ریزنمونه‌های ساقه که تشابه ژنتیکی بالایی با ژنوم مادری دارد استفاده شود. به‌طورکلی نتایج نشان داد که تنوع سوماکلونال در بین گیاهان باززایی شده با افزایش تعداد دفعات واکنش افزایش خواهد یافت.

واژه‌های کلیدی: پینه‌زایی، تنظیم‌کننده‌های رشد، تنوع ژنتیکی، ریززایی، نشانگر مولکولی.

### مقدمه

*capsica* Desf از تیره بقولات، زیرتیره سزالپینوئیده

(Caesalpinaceae) و تنها گونه از جنس *Gleditsia* است

که به‌طور طبیعی در جنگل‌های هیرکانی انتشار دارد. لیلکی

جنس *Gleditschia* شامل ۱۴ گونه است که لیلکی

ایرانی با نام علمی *Gleditschia* (Caspian Locust)

شیشه‌ای به موتاسیون مربوط نبوده و تنوع اپی ژنتیکی برگشت پذیر و غیر ارثی می‌باشند (Bagheri and Safari, 1997). به‌رحال، در القای پینه، کشت سلول و پروتوپلاست و امکان ایجاد جهش بسیار زیاد است (D'amato, 1978). امروزه به کمک آزمایش‌های ژنتیک می‌توان تغییرات ژنی و ثبات ژنتیکی گیاهان باززایی شده را نسبت به گیاه مادری بررسی کرد. بررسی تنوع سوماکلونال ابزار مناسبی برای اصلاح گونه و ایجاد تنوع ژنتیکی دلخواه و تولید گیاهان یکسان از نظر ژنتیکی است. Shabannejad Mamaghani و همکاران (2009) در پژوهشی با عنوان شناسایی تنوع سوماکلونال با استفاده از نشانگرهای پراکسیداز و ریزماهواره در اکالیپتوس سیاه (*Eucalyptus microtheca* F. Muell.)، ریزنمونه‌های سرشاخه‌های سبز نهال یکساله اکالیپتوس سیاه را در محیط MS همراه با سطوح متفاوت NAA، KIN و TDZ کشت کردند. تغییرات ژنوم گیاهچه‌های سوماکلون با استفاده از نشانگر SSR، وجود چندشکلی را نشان دادند. Esmaeili Sharif (2016) در پژوهشی تنوع سوماکلونال گیاهان باززایی شده گونه بارانک ایرانی (*Sorbus persica* Hedl.) را با استفاده از ۱۰ آغازگر SRAP مورد ارزیابی قرار داد. او نشان داد که از ۱۵۲ نوار ایجاد شده توسط این نشانگر، ۴۰ درصد نوارها چند شکلی بودند. همچنین نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که تنوع بین گونه بارانک ایرانی کمتر از تنوع درون گونه‌ای بود. Hassanein و همکاران (2018) تنوع سوماکلونال گز روغنی (*Moringa oleifera*) را در محیط کشت MS با غلظت‌های مختلف سایتوکینین BAP و بازدارنده آنتی‌اتیلن، سالسیلیک اسید و کبالت کلراید مورد بررسی قرار دادند. نشانگرهای مولکولی مورد استفاده شامل SSR، ISSR و RAPD بود. بعد از ۱۴ بار واگشت ریزنمونه‌ها، نتایج چندشکلی به‌دست آمده نشان داد که تنوع سوماکلونال بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه ایجاد شد. Bradai و همکاران (2019) در پژوهشی با عنوان تنوع سوماکلونال در زیتون (*Olea europaea* L.) باززایی شده از طریق جنین‌زایی سوماتیک، تأثیر ژنوتیپ و سن کشت

ایرانی از جمله گونه‌هایی است که از آن به‌عنوان گونه در حال انقراض یا نادر نام برده می‌شود و عوامل اصلی محدود کننده پراکنش آن چرای شدید دام، بهره‌برداری بی‌رویه برای سوخت، پایه کندوج (انبار برنج)، پایه بنا، پایه یل، پایه‌های حصار و تبدیل مناطق پوششی این گونه به شالیزارها و باغ‌های کیوی، چای و ایجاد طرح‌های جنگل‌کاری برای گونه‌های دیگر می‌باشد (Asadi et al., 1988).

برای جلوگیری از انقراض گونه‌های بومی نادر و ارزشمند، می‌توان از روش‌های نوین ازدیاد گیاهان استفاده کرد. این روش‌ها امکان صرفه‌جویی را در وقت برای توسعه درختان میسر و بستر مناسبی را برای حفظ و نگهداری گونه‌ها و ژنوتیپ‌های مادری و در حال انقراض به‌عنوان منابع با ارزش ژرم‌پلاسمی بالا فراهم می‌کند. تغییرات ژنتیکی و ریختی در گیاهان باززایی شده از کشت بافت و سلول گیاهی به تنوع سوماکلونال مشهور است (Sarmast, 2016). منشأ و روش وقوع تنوع مشاهده شده در بافت‌ها و گونه‌های مختلف تفاوت دارد و فرض بر این است که سلول‌های غیرجنسی گیاهان خصوصیات یکسانی دارند (Sarmast, 2016). نتایج پژوهش‌ها بیانگر این موضوع است که حدود ۳۰٪ از تنوع موجود در گیاهان باززایی شده از قبل در بافت گیاهی مورد استفاده وجود داشته‌است. بیشتر محققان گزارش کرده‌اند که ۶۵-۷۵ درصد تغییرات در هنگام مراحل انجام کشت بافت انجام می‌شود و هرچه دوره کشت بافت طولانی‌تر گردد میزان تنوع بیشتر خواهد شد (Martinez-Estrada et al., 2017; Mamedes-Rodrigues et al., 2018). در آزمایش‌های ژنتیکی می‌توان تفاوت و تغییرات گیاه افزایش یافته را نسبت به گیاه مادری و در نتیجه ثبات ژنتیکی مورد بررسی قرار داد. در منابع مختلف علمی بیان شده که کاربرد برخی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی می‌تواند در القاء جهش‌های گیاهی تأثیرگذار باشد (Bagheri and Safari, 1997). برای نمونه، افزایش غلظت سایتوکینین در محیط کشت، احتمال وقوع جهش و ایجاد تنوع سوماکلونال را افزایش می‌دهد (D'amato, 1978). البته برخی از تغییرات بوجود آمده در کشت درون-

بودند و در دمای  $25 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی با منبع لامپ فلورسنت سفید با شدت ۲۵۰۰ لوکس نوری نگهداری شدند.

#### تیمار تنظیم‌کننده‌های رشد

پس از گذشت ۲۰ روز، بذرها تبدیل به گیاهچه‌های چند برگی شدند. ریزنمونه‌ها از ریشه، ساقه و هیپوکوتیل سه دانه‌ال تهیه شد. ریزنمونه‌ها با هدف باززایی در محیط کشت MS حاوی غلظت برابر ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D و TDZ کشت شدند. همچنین ریزنمونه‌ها هر ۲۸ روز در محیط کشت جدید واکشت شدند و در مجموع شش بار واکشت انجام شد. ژنوتیپ‌های مورد مطالعه شامل برگ پایه مادری در طبیعت (PM) و گیاهچه‌های باززایی شده از سه قسمت ساقه (SP1، SP2 و SP3)، ریشه (RP1، RP2 و RP3) و لپه (CP1، CP2 و CP3) تهیه شدند. برگ گیاهان باززایی شده با استفاده از ازت مایع در ظروف چینی که از قبل ضدعفونی شده است کوبیده و برگ‌های پودر شده مربوط به هر تیمار در تیوپ‌های کدگذاری شده ریخته و تا زمان استخراج DNA در دمای ۸۰- نگهداری شدند.

#### استخراج DNA

استخراج DNA به روش CTAB با اندکی تغییرات (Murray & Thompson, 1980) انجام شد. بدین‌منظور حدود ۰/۱ گرم از بافت پودر شده به یک ویال دو میلی‌لیتری منتقل شد. سپس به ازای هر میلی‌گرم وزن بافت مورد نظر ۷۵۰ میکرولیتر بافر استخراج از پیش گرم شده به ویال اضافه گردید. ویال‌ها در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ تا ۶۰ دقیقه در حمام آبگرم (بن‌ماری) قرار داده شده و ویال‌ها هر ۱۰ تا ۱۵ دقیقه یکبار به آرامی ورتکس (Vortex) شدند. حجم مخلوط کلروفورم: ایزوآمیل الکل (۱:۲۴) در دمای اتاق به هریک از ویال‌ها اضافه و ۱۰ دقیقه به آرامی ورتکس گردید. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰ rpm در دمای اتاق برای جدا کردن فازها از هم سانتریفوژ شدند و فاز رویی با استفاده از یک پیپت دهان‌گشاد و سترون از ویال‌ها خارج و به ویال

بر ثبات ژنتیکی با هدف بررسی تأثیر ژنوتیپ و سن کشت را بر پایداری ژنتیکی گیاه زیتون بررسی کردند. گیاهان مشتق شده از هشت لاین جنینی که توسط واکشت‌های تکراری به مدت دو (لاین T) و هشت سال (لاین P) نگه‌داری می‌شدند با استفاده از نشانگرهای RAPD و SSR مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد اگرچه تنوع در گیاهان مشتق شده از لاین‌هایی که برای مدت زمان بیشتری در شرایط درون شیشه‌ای نگهداری می‌شوند کمی بیشتر بود اما به نظر می‌رسد که بی‌ثباتی ژنتیکی عمدتاً وابسته به ژنوتیپ گونه بود. Mirani و همکاران (2020) در پژوهشی با عنوان شناسایی تنوع سوماکلونال در کشت‌بافت خرما (*Phoenix dactylifera L*) از نشانگرهای IRPA و MINT مرتبط با ترانسپوزون استفاده کردند. تحلیل نشانگر DNA تأیید کرد که انتقال‌پذیری هر دو رتروترانسپوزون LTR و MITE در ژنوم خرما در طول فرایند کشت‌بافت فعال و منجر به وقوع رویدادهای جدید در انواع سوماکلونال می‌شود. بنابراین بررسی تنوع سوماکلونال و ثبات ژنتیکی گیاهان در شرایط کشت بافت دارای اهمیت است. ازاین‌رو، این پژوهش با هدف بررسی تنوع سوماکلونال در گیاهک‌های باززایی شده از اندام‌های ساقه، ریشه و لپه لیلکی ایرانی انجام شد.

#### مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی و گندزدایی سطحی نمونه‌ها  
بذرهای لیلکی ایرانی از یک پایه درخت در باغ گیاه‌شناسی دانشکده منابع طبیعی ساری تهیه شد. برای شکستن خواب فیزیولوژیک بذر لیلکی ایرانی از اسید سولفوریک ۱۰۰ درصد به مدت ۲۰ دقیقه استفاده گردید. برای گندزدایی سطحی، بذرها در زیر هود لامینار به مدت ۱۰ دقیقه در کلرید جیوه (HgCl<sub>2</sub>) نیم درصد (Khosh-Khui, 1998) قرار داده شدند و پس از آبکشی با آب مقطر استریل، به مدت ۶۰ ثانیه با اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی تکمیلی شدند. بذرها از ضدعفونی شده در محیط کشت DKW دارای سه درصد ساکارز و ۰/۸ درصد آگار کشت

نگهداری شد.

### تعیین کمیّت و کیفیت DNA

پس از استخراج DNA کمیّت و کیفیت آن با استفاده از دو روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۷ درصد بررسی شد. الکتروفورز در میدان الکتریکی با ولتاژ ۱۰۰ انجام شد و پس از اتمام الکتروفورز کیفیت ژل با استفاده از دستگاه ژل داگ Geldoc شرکت UVP آمریکا بررسی گردید.

در این تحقیق از ۱۵ آغازگر ISSR استفاده شد که توالی آنها در (جدول ۱) آورده شده است. برنامه PCR برای آغازگرهای ISSR به ترتیب شامل ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۴۸ درجه سانتی گراد به مدت ۳۵ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ ثانیه و سرانجام ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

جدیدی منتقل شد. سپس ۲/۳ حجم محلول ایزوپروپانول سرد به هر ویال اضافه گردید و ۱۰ تا ۱۵ بار به آرامی تکان داده شد و به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه برای رسوب DNA در فریزر قرار داده شد. پس از این مرحله ویالها به مدت پنج دقیقه در ۵۰۰۰ rpm در دمای چهار درجه سانتی گراد سانتریفوژ شده و مایع رویی حذف گردید. ۱/۵ میلی لیتر بافر شستشوی سرد به ویالها اضافه شده و به مدت دو تا پنج دقیقه به آرامی ورتکس شد. دوباره ویالها به مدت پنج دقیقه در ۵۰۰۰ rpm در دمای چهار درجه سانتی گراد سانتریفوژ شده و مایع رویی حذف گردید. رسوب DNA بدست آمده به مدت دو تا پنج دقیقه در زیر هود برای ۱۵ تا ۳۰ دقیقه خشک شد. سپس DNAها با ۵۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE به حالت سوسپانسیون درآمده و غلظت آنها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین گردید. برای حذف RNA، محلول DNA با یک میکرولیتر RNase به ازاء هر ۱۰۰ میکرولیتر DNA تیمار شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برای حذف RNA انکوبه شد. محلول DNA به دست آمده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد

جدول ۱- مشخصات پرایمرهای ISSR استفاده شده

Table 1. Specifications of ISSR primers used

ردیف Row	نام آغازگر ISSR primers	توالی Sequence
1	ISSR1	ACACACACACACACAG
2	ISSR2	ACACACACACACACACC
3	ISSR3	ATG ATGATGATGATG ATGG
4	ISSR4	ATA ATAATAATAATA ATAT
5	ISSR5	CCC GGA TCCCTCTCTCTCTCTCTCT
6	ISSR6	GATC TGG TGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG
7	ISSR7	GATC GAG GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG
8	ISSR8	AGAGAGAGAGAGAGAGG
9	ISSR9	GAGAGAGAGAGAGAGAA
10	ISSR10	TCTCTCTCTCTCTCC
11	ISSR11	AGAGAGAGAGAGAGAGC
12	ISSR12	TGTGTGTGTGTGTGTGA
13	ISSR13	ATC ATCATCATCATC ATCC
14	ISSR14	GAGAGAGAGAGAGAGAGAC
15	ISSR15	GTGTGTGTGTGTGTGTGT

## تجزیه و تحلیل مولکولی

رابطه ۲:

$$PIC_i = 2f_i (1-f_i)$$

رابطه ۳:

$$MI = PIC.N.\beta$$

که:  $p_i$  فراوانی باند  $\lambda_i$ ،  $N$  تعداد کل باندها برای هر آغازگر و  $\beta$  درصد چند شکلی (تعداد جایگاه‌های چند شکل تقسیم بر تعداد کل جایگاه‌ها) برای هر آغازگر است. ضریب تشابه‌ای که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت، ضریب جاکارد بود که فرمول آن در رابطه ۴ آمده است.

رابطه ۴:

$$S_j = \frac{n_{ab}}{n_a + n_b + n_{ab}}$$

در این رابطه  $n_a$  و  $n_b$  تعداد باندهای موجود در نمونه-های  $a$  و  $b$  است.  $n_{ab}$  بیانگر باندهای مشترک هر دو نمونه است. مقدار  $S$  می‌تواند بین صفر تا یک متغیر باشد.

تجزیه و تحلیل‌های آماری شامل تجزیه مؤلفه‌های اصلی و تجزیه خوشه‌ای روی داده‌های به‌دست آمده با هدف گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها انجام شد. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از میانگین متغیرهای استاندارد شده انجام شد. مربع فاصله اقلیدسی به‌عنوان معیار تشابه مورد استفاده قرار گرفت. از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی برای رسیدن به اهداف تشریح و توجیه تنوع موجود در نتایج، تعیین سهم هر مؤلفه در تنوع و کاهش تعداد متغیرهای اصلی از طریق محاسبه مؤلفه‌های غیرهمبسته که ترکیبی از متغیرهای اصلی هستند، می‌باشد. به‌دلیل کیفی بودن داده-های نشانگر، از تجزیه به مؤلفه‌ها برای ترسیم پلات استفاده شد. همچنین نتایج تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) ارزیابی شد.

## نتایج

از ۱۷ آغازگر ISSR مورد استفاده ۱۰ آغازگر (۵۸/۸ درصد) توانستند الگوی باندی مناسبی برای امتیازدهی تولید کنند (شکل ۱). این ۱۰ آغازگر عبارتند از: ISSR2، ISSR1، ISSR3، ISSR4، ISSR5، ISSR6، ISSR7، ISSR8.

در این مرحله بر اساس عکس‌های گرفته شده از روی ژل امتیازدهی کمی انجام شد. برای این منظور از نرم‌افزار NTSYS استفاده گردید. از آنجایی که داده‌های به‌دست آمده ماهیت کیفی داشتند، نمونه برای تجزیه آماری بر اساس وجود یک باند در یک جایگاه ژنی و عدم وجود در همان جایگاه (صفر و یک) امتیازدهی شد. به‌طوری‌که به وجود یک باند امتیاز یک و به عدم وجود امتیاز صفر داده شد. در مرحله بعد داده‌های امتیازدهی شده با استفاده از نرم‌افزار Excel به یک ماتریکس مشخص منتقل گردید. سپس تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار NTSYS اجرا شد. در این تحقیق با استفاده از نرم‌افزار NTSYS ماتریس بر اساس سه ضریب تشابه جاکارد، اتصال ساده و دایس که هر یک دارای الگوریتم خاصی هستند تشکیل شد. الگوریتم‌های اتصال ساده، اتصال کامل و خوشه‌ای اتصال متوسط (UPGMA) برای تجزیه خوشه‌ای استفاده شد. با استفاده از نرم‌افزار NTSYS ضریب کوفنتیک برای سه الگوریتم انتخابی و سه ضریب ماتریس تشابه بررسی گردید. روش آماری مناسب برای تعیین همبستگی بین دو ماتریس (با ابعاد یکسان) و مقایسه ضرایب تشابه آنها به‌وسیله نرم‌افزار NTSYS انجام شد. درجه چند شکلی با استفاده از شاخص تنوع و میزان اطلاعات چندشکل (Polymorphic Information Content (PIC) مشخص شد. تشابه ژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار 32 Popgen محاسبه شد. از جمله پارامترهای متنوعی که در این پژوهش استفاده گردید، پارامتر شاخص تنوع ژنتیکی شانون بود که از رابطه ۱ به-دست آمد.

رابطه ۱:

$$H' = -\sum P_i \cdot \log_2(P_i)$$

که در آن  $P_i$  فراوانی آللی در یک یا گروهی از نمونه‌هاست. همچنین دو شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) با استفاده از رابطه ۲ و ۳ (Roldan-Ruiz *et al.*, 2000) و شاخص نشانگر Marker Index (MI) (Varshney *et al.*, 2008) برای هر جفت آغازگر محاسبه شد.

ISSR11 و ISSR10. در بین این ۱۰ آغازگر، آغازگر باندها (۱۵ عدد) را تولید کردند (جدول ۲).  
ISSR5 کمترین تعداد باندها (۸ عدد) و ISSR3 بیشترین تعداد

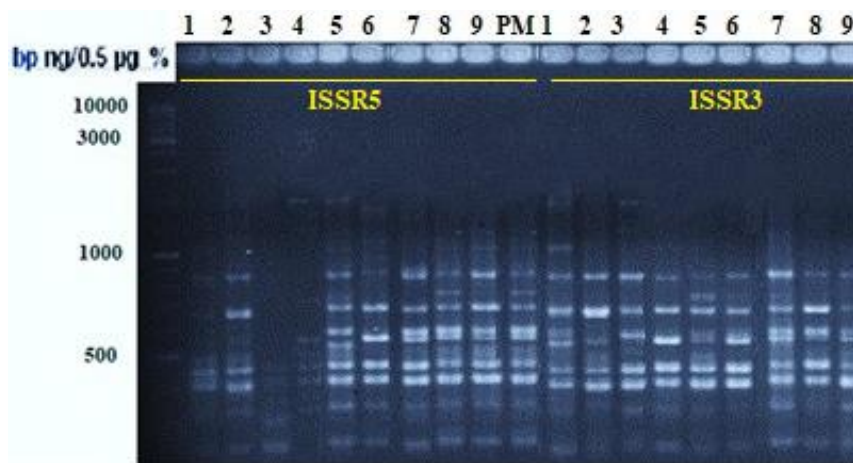
جدول ۲- تعداد باندها تولید شده به ازای هر آغازگر ISSR و مقدار عددی PIC آنها

Table 2. Number of bands generated for each ISSR primer and their PIC numeric value

نام آغازگر ISSR primers	تعداد باندها Number of bands	تعداد باندها چند شکلی Number of polymorphism bands	درصد چند شکلی Polymorphism%	مقدار PIC PIC values
ISSR1	11	11	100.00	0.47
ISSR2	10	8	80.00	0.45
ISSR3	15	13	86.67	0.49
ISSR4	10	10	100.00	0.46
ISSR5	8	7	87.50	0.43
ISSR6	12	10	83.33	0.43
ISSR7	9	8	88.89	0.39
ISSR8	10	8	80.00	0.41
ISSR10	11	10	90.90	0.43
ISSR11	11	9	81.81	0.43
Total	107	94	879.10	
Mean	10.7	9.4	87.90	0.44

آغازگر ISSR7 (۰/۳۹) و آغازگر ISSR3 (۰/۴۹) محاسبه گردید. متوسط میزان PIC برای این هفت آغازگر ۰/۴۴ عدد به دست آمد (جدول ۲).

متوسط تعداد باندها تولید شده به ازای هر آغازگر ۱۰/۷ به دست آمد. برای این ۱۰ آغازگر در مجموع ۱۰۷ باندها امتیازدهی شد. کمترین و بیشترین میزان PIC به ترتیب برای



شکل ۱- انگشت نگاری DNA ژنوتیپ‌های لیلیکی ایرانی توسط ISSR3 و ISSR5 شامل برگ پایه مادری (PM)، ۱، ۲ و ۳ به ترتیب ریشه (RP1، RP2 و RP3)، ۴، ۵ و ۶ به ترتیب لپه (CP1، CP2 و CP3) و ۷، ۸ و ۹ به ترتیب ساقه (SP1، SP2 و SP3)

Figure 1. DNA fingerprinting of *G. capsica* Desf. genotypes by ISSR5 and ISSR3 include maternal base leaves (PM), 1, 2 and 3 root respectively (RP1, RP2 and RP3), 4, 5 and 6 cotyledon respectively (CP1, CP2 and CP3) and 7, 8 and 9 stem respectively (SP1, SP2 and SP3)

حاصل از دو شاخص تنوع نی و شانون، در مجموع تنوع بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه وجود داشت که به‌طور میانگین به-میزان ۲۷/۶۶ درصد بر اساس شاخص نی و ۴۶/۲۰ درصد بر اساس شاخص شانون به‌دست آمد (جدول ۳).

میزان شاخص تنوع ژنی نی در تیمار ساقه SP3 به‌میزان ۲۵/۱۹ درصد دارای کمترین و در RP1 به‌میزان ۳۱/۴۱ درصد دارای بیشترین متغیر بوده است. کمترین و بیشترین میزان شاخص تنوع ژنی شانون به‌ترتیب برای ریشه RP2 و SP3 با ۴۴/۵۱ و ۴۹/۲۳ مشاهده شد (جدول ۳). بر اساس اطلاعات

جدول ۳- میانگین تنوع ژنی نی و شاخص اطلاعات شانون در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با نشانگر مولکولی ISSR

**Table 3. Mean of Nei gene diversity and Shannon information index in studied genotypes with ISSR molecular marker**

ژنوتیپ Genotype	مخفف Abbreviation	تنوع ژنی نی (درصد) Nei gene diversity	شاخص اطلاعات شانون Shannon information index
برگ پایه مادری	PM	29.43	47.83
لپه ۱	SP1	31.34	45.15
لپه ۲	SP2	28.52	45.07
لپه ۳	SP3	25.19	49.23
ریشه ۱	RP1	28.35	47.94
ریشه ۲	RP2	26.35	45.52
ریشه ۳	RP3	31.41	44.51
ساقه ۱	CP1	26.19	44.54
ساقه ۲	CP2	24.34	46.52
ساقه ۳	CP3	25.52	45.75
میانگین	Mean	27.66	46.20

اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه وجود دارد (جدول ۴).

برای خوشه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بر اساس داده‌ها از ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA با ضریب تشابه ۰/۸۴ استفاده شد. همچنین نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی در جدول ۵ آمده است، به‌طوری‌که نشان داد سه مؤلفه اول بیش از ۶۲ درصد از واریانس بین گروه‌ها را نشان داده است.

میزان تنوع ژنتیکی درون ژنوتیپ‌های باززایی‌شده از یک دانه‌ال و بین ژنوتیپ‌ها نسبت به پایه مادری به‌کمک نرم‌افزار GenAlex محاسبه شد (جدول ۴). نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی نشان داد که میزان تنوع درون ژنوتیپ‌ها بیشتر از تنوع بین ژنوتیپ‌هاست، به‌گونه‌ای که ۱۶ درصد تنوع مربوط به بین ژنوتیپ‌ها با گیاهچه مادری و ۸۴ درصد آن مربوط به تنوع درون ژنوتیپ‌هاست. به‌عبارتی دیگر ژنوتیپ‌های متعلق به یک گیاهچه دارای هتروزیگوسیتی بالا و ناهمگن بودند. نتایج تجزیه واریانس بیانگر آن است که

جدول ۴- تجزیه AMOVA در ژنوتیپ‌های پایه مادری و ریزنمونه‌های مختلف لیلیکی ایرانی

**Table 4. AMOVA in basic maternal genotypes and different explants of *G. capsica* Desf.**

منبع تغییرات	S.O.V	درجه آزادی Df	میانگین مربعات ± (اشتباه معیار) Mean Square ± (Standars error)	درصد واریانس Variance percentage
بین ژنوتیپ‌ها	Between of genotypes	2	0.39** ± 3.49	16 %
درون ژنوتیپ‌ها	Within genotypes	9	3.54** ± 16.82	84%
کل	Total	11	5.74** ± 20.31	100%

\*\* : معنی‌دار در سطح یک درصد (P<0.01)

## تحلیل ماتریس تشابه

نتایج ماتریس تشابه ژنتیکی و ضرایب تشابه به دست آمده با استفاده از ضریب تشابه جاکارد در جدول ۶ آمده است. نتایج نشان داد که بیشترین تشابه بین ژنوتیپ‌های PM و SP2 با ضریب تشابه ۰/۶۶ و بعد از آن بین ژنوتیپ‌های PM و SP3 با ضریب ۰/۶۱ وجود داشته است.

کمترین شباهت بین ژنوتیپ‌های SP2 و RP2 با ضریب ۰/۳۰ مشاهده شد. کمترین تشابه ژنتیکی پایه مادری با ژنوتیپ‌های ریشه مشاهده شد و پایه مادری بیشترین تشابه ژنتیکی را با ژنوتیپ‌های ساقه داشته است. میانگین تشابه بین کل تیمارها برابر با ۰/۴۱ به دست آمد که نشان‌دهنده تنوع بالا بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه است.

## جدول ۵- تجزیه به مؤلفه‌های اصلی مربوط به نشانگر

Table 5. PCA related to markers

مؤلفه	مقادیر ویژه	درصد واریانس نسبی	درصد واریانس تجمعی
Component	Eigen values	Percentage of relative variance	Cumulative variance percentage
مؤلفه اول PCA1	5.46	45.47	45.47
مؤلفه دوم PCA2	1.07	8.92	54.39
مؤلفه سوم PCA3	1.01	8.40	62.79

## جدول ۶- ماتریس تشابه ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بر اساس فرمول جاکارد

Table 6. Genetic similarity matrix between studied genotypes based on Jacquard formula

Genotype	PM	RP1	RP2	RP3	SP1	SP2	SP3	CP1	CP2	CP3
PM	1									
RP1	0.32	1								
RP2	0.39	0.44	1							
RP3	0.37	0.42	0.49	1						
SP1	0.58	0.33	0.36	0.36	1					
SP2	0.66	0.36	0.30	0.40	0.52	1				
SP3	0.61	0.32	0.41	0.36	0.46	0.35	1			
CP1	0.44	0.55	0.39	0.47	0.38	0.44	0.44	1		
CP2	0.42	0.39	0.48	0.31	0.36	0.42	0.46	0.48	1	
CP3	0.48	0.44	0.33	0.52	0.34	0.35	0.35	0.39	0.38	1

## تجزیه خوشه‌ای مولکولی

تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های مولکولی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به روش UPGMA با ضریب تشابه جاکارد انجام شد (شکل ۲). در دندروگرام ترسیم شده ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با ضریب تشابه ۰/۴۳ در سه گروه قرار گرفتند. گروه اول شامل ژنوتیپ‌های برگ و ساقه PM، SP3، SP1 و SP2، گروه دوم شامل ژنوتیپ‌های لپه CP1،

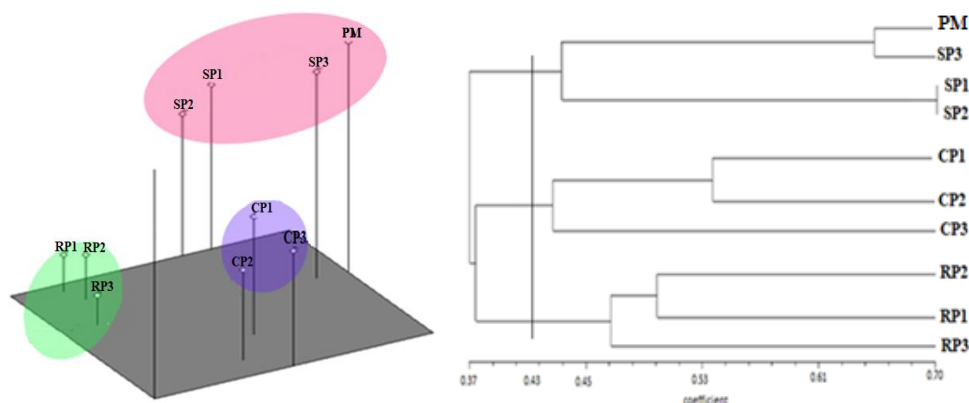
CP2 و CP3 و گروه سوم شامل ژنوتیپ‌های ریشه RP1، RP2 و RP3 بودند. نتایج تجزیه خوشه مولکولی مانند ماتریس تشابه ژنتیکی نشان داد که پایه مادری بیشترین تشابه ژنتیکی را با ژنوتیپ‌های ساقه داشته است.

## تجزیه به مؤلفه اصلی (PCA)

نتایج تجزیه به مؤلفه اصلی شامل مقادیر ویژه، واریانس



برای نمایش سه بعدی الگوی تنوع در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، نمودار سه بعدی بر اساس سه مؤلفه اول، دوم و سوم رسم شد (شکل ۲). همان‌طور که در شکل مشخص است نتایج مؤلفه اصلی با نتایج خوشه‌ای مطابقت دارد.



شکل ۲- گروه‌بندی سه پایه مادری و ریزنمونه‌های مختلف لیلکی ایرانی با استفاده از ضریب تشابه جاکارد بر اساس الگوریتم

UPGMA و نمودار سه بعدی مربوط به تجزیه مختصات اصلی براساس تشابه جاکارد برای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

**Figure 2. Grouping of basic maternal genotypes and different explants of *G. capsica* Desf. Jaccard similarity coefficient and based on UPGMA algorithm and Three-dimensional diagram of principal coordinate analysis based on Jaccard similarity for the studied genotypes**

## بحث

باززایی گیاهان در شرایط درون‌شیشه‌ای ابزار مؤثر برای پرآوری و تولید گیاهان هم‌گروهی شبیه به اصل و عاری از بیماری به‌شمار می‌رود (Azman et al. 2014). با این حال، حتی در افزایش هم‌گروهی با توجه به نوع ریزنمونه، تنظیم‌کننده‌های رشد، شرایط کشت و موارد دیگر احتمال بی‌ثباتی ژنتیکی در گیاهان باززایی شده وجود دارد (Solano et al., 2019). برخلاف اثرهای منفی تنوع سوماکلونال، تغییرات ژنتیکی می‌تواند ابزار مهم برای تولید انواع جدید گیاهان مقاوم به بیماری، مقاوم به تنش‌های زیستی و گیاهان با عملکرد محصول بالا محسوب گردد (Krishna et al., 2016). تنوع سوماکلونال به‌عنوان تغییرات ژنتیکی و اپی-ژنتیکی باززایی گیاهان در شرایط درون‌شیشه‌ای شناخته شده است (Larkin & Scowcroft, 1981).

نتایج بالا بودن دامنه باندهای چندشکل تولید شده نشان

از ظرفیت بالای نشانگر ISSR برای ایجاد باندهای پلی-مورف را نشان داد (جدول ۲). در پژوهش‌های مختلف نیز موفقیت‌آمیز بودن و توان بالای این نشانگر در تشخیص باندهای پلی‌مورف به اثبات رسیده است (Martinez-Solano et al., 2018; Estrada et al., 2009; Babu et al., 2019).

شاخص‌های دیگری که در این تحقیق بررسی شد، شاخص تنوع ژنی و شانون است. در این مطالعه تنوع بین ژنوتیپ‌های مختلف از ریزنمونه‌های ساقه، ریشه، لپه و پایه مادری (جدول ۴) با استفاده از نشانگر ISSR برابر ۲۷/۶۶ درصد براساس شاخص نی و ۴۶/۲۰ درصد بر اساس شاخص شانون محاسبه شد. نتایج نشان داد که شاخص تنوع نی و شانون برای ژنوتیپ‌های ساقه کمتر از ریشه و لپه بوده است. این مقادیر نشان می‌دهد در مجموع تنوع بین ژنوتیپ‌ها وجود داشته است. Ghandehari و

بیشتر ریزنمونه‌های ساقه برای کشت‌بافت لیلکی ایرانی محسوب می‌شود.

تجزیه به مؤلفه اصلی نشان داد که سه مؤلفه اول برای پایه مادری و اندام‌های مختلف، ژنوتیپ‌ها تحت تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد ۶۲/۷۹ درصد از تغییرات واریانس را توجیه کردند (جدول ۵). بنابراین می‌توان گفت که تجزیه به مؤلفه‌های اصلی توانسته است اثر تیمارها را بر ایجاد تنوع سوماکلونال به نمایش بگذارد. Mohammadi و Prasanna (2003) نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی برای گروه‌بندی افراد را قابل استنادتر از الگوریتم‌های تجزیه خوشه‌ای برای گروه‌بندی مواد ژنتیکی سوماکلونال بیان کرده‌اند.

به‌طورکلی تنوع سوماکلونال ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در تمامی مراحل پژوهش نشان داد که تنوع بین تیمارها وجود دارد. در پژوهش‌های مختلف تنوع سوماکلونال در بین گونه‌های گیاهی گزارش شده است (Martinez-Estrada et al., 2017؛ Babu et al., 2018). البته پژوهش‌هایی نیز وجود دارد که گزارش کرده‌اند در طی چندین واکشت بین ژنوتیپ‌های گیاهی تنوع سوماکلونال ایجاد نشده است (Gantait et al., 2009). در این پژوهش از سطوح غلظت مختلف و انواع تنظیم‌کننده در شش زیرکشت و هر واکشت به مدت ۲۸ روز استفاده شد که این انتظار وجود داشت که دلیل تنوع سوماکلونال بین تیمارها همین شرایط باشد. در طی واکشت آزمایشگاهی، نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد، روش‌های پرآوری، تعداد دفعات و زمان واکشت در فراوانی تنوع سوماکلونال بسیار تأثیرگذار هستند (Krishna et al., 2016). البته، تعداد واکشت به‌طور معنی‌داری با سطح تنوع سوماکلونال ارتباط دارد (Sarmast et al., 2012؛ Martinez-Estrada et al., 2017؛ Mamedes-Rodrigues et al., 2018).

نتایج خوشه‌بندی ژنوتیپ‌ها (شکل ۲) در بیشتر موارد اندام مربوط به هر گیاه مادری را با ژنوتیپ همان گیاه مادر در یک گروه نشان می‌دهد. گروه‌بندی‌های ژنوتیپ نشان داد که در طی چندین واکشت ریزنمونه‌ها تنوع ژنتیکی پیدا

همکاران (2013) با استفاده از نشانگر ISSR بر روی جمعیت شمشاد تنوع ژنتیکی را با استفاده از شاخص شانون ۵۰/۴۷ درصد و براساس شاخص نی ۳۴/۱۴ درصد به‌دست آوردند. Shabaniyan و همکاران (2009) بر روی بلوط ایرانی (*Quercus brantii*) با استفاده از نشانگرهای ISSR، تنوع ژنتیکی به‌وسیله شاخص شانون ۲۲/۷ درصد و بر اساس شاخص نی ۱۴/۷ درصد محاسبه کردند. در بررسی دیگری که توسط Rahmani و همکاران (2015) انجام شد، میزان تنوع ژنتیکی جمعیت‌های *Crataegus pontica* را با استفاده از نشانگر ISSR، ۳۷ درصد براساس شاخص شانون و ۲۵ درصد براساس شاخص نی تخمین زدند.

تجزیه واریانس مولکولی ژنوتیپ‌های گیاهچه‌ها مادری و ژنوتیپ‌های مختلف لیلکی ایرانی تنوع ۱۶ درصد بین تیمارها و ۸۴ درصد درون تیماری را نشان داد (جدول ۴). از آنجا که ژنوتیپ‌ها نسبت به پایه مادری مورد بررسی قرار گرفت، توقع کاهش تنوع بین ژنوتیپ‌های یک گیاهچه قابل انتظار بود اما تنوع درون ژنوتیپی بعد از شش زیرکشت عدد بالایی را به ثبت رساند. به‌عبارت دیگر، تنوع سوماکلونال درون تیمارها بسیار بالا بود. بنابراین به نظر می‌رسد که بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بعد از شش واکشت تنوع ژنتیکی افزایش خواهد یافت. این موضوع دلالت بر این دارد که تیمارها به‌طور نسبتاً محدود متمایز شده‌اند. البته، این الگوی ساختار ژنتیکی در دیگر گیاهان دگرگشن نیز تأیید شده است (Hamrick & Godt, 1996). ساختار ژنتیکی گیاهان بازتاب برهم‌کنش فاکتورهای مختلف مانند فرسایش ژنتیکی، سیستم تلاقی، جریان ژنی و گزینش می‌باشد (Eastham & Sweet, 2002؛ Keller & Waller, 2002). در طی چندین واکشت ممکن است یک یا چند فاکتور در تغییر ساختار ژنتیکی لیلکی ایرانی ایجاد تنوع سوماکلونال کرده باشد. البته نتایج خوشه‌بندی ژنوتیپ‌ها (شکل ۲) و جدول تشابه ژنتیکی (جدول ۶) نشان داد که ریزنمونه‌های باززایی شده از ساقه (SP1، SP2 و SP3) شباهت زیادی با ژنوتیپ پایه مادری دارند که این موضوع بیانگر موفقیت

Martinez-) جوانه رویشی (Rani & Raina 2000)، (Estrada et al., 2017) و گره و میان‌گره (Soliman et al., 2014) گزارش شده است.

### نتیجه‌گیری

نظر به اینکه پیشتر گزارشی در مورد نقش منبع ریزنمونه در ایجاد تنوع سوماکلونال پس از زیر کشت‌های پی در پی در لیلکی ایرانی گزارش نشده بود، این مطالعه آشکار کرد که تنوع ژنتیکی طی چندین واکشت متوالی بین گیاهان باززایی‌شده لیلکی ایرانی افزایش یافته است. از سویی گیاهان باززایی شده از ریزنمونه‌های ساقه بیشترین تشابه ژنتیکی را با پایه مادری دارند و می‌توان نتیجه گرفت که بهترین نوع ریزنمونه برای راهبردهای کشت بافت لیلکی ایرانی است.

### منابع مورد استفاده

- Asadi, M., 1998. Autecology, Seed germination ecophysiology and chemical analysis of different parts of fruit in *Gleditschia capsica* Desf. MSc. Thesis, Faculty of science, University of Shahid Beheshti, Tehran, Iran, 133p (In Persian).
- 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 Journal*, 43(1): 1-12.
- Babu, G.A., Vinoth, A. and Ravindhran, R., 2018. Direct shoot regeneration and genetic fidelity analysis in finger millet using ISSR markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 132(1): 157-164.
- Bagheri, A. and Saffari, M., 1997. Basics of Plant Tissue Culture. Ferdowsi University of Mashhad Press, 406 p (In Persian).
- Bairu, M.W., Aremu, A.O., Staden, J.V., 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Grow Regul*, 63: 147-173.
- Bradaï, F., Sanchez-Romero, C. and Martín, C., 2019. Somaclonal variation in olive (*Olea europaea* L.) plants regenerated via somatic embryogenesis: Influence of genotype and culture age on genetic stability. *Scientia Horticulture*, 251: 260-266.
- D'amato, F., 1978. Chromosome number variation in

خواهند کرد. این تفاوت در تمامی موارد از پایه مادری ایجاد شده است. به عبارت دیگر، اغلب گروه‌بندی‌ها تنوع سوماکلونال بین پایه مادری را با دیگر ژنوتیپ‌ها نشان داد. البته، ژنوتیپ گیاه مادر در ایجاد تنوع سوماکلونال حائز اهمیت است (Sarmast et al., 2012). بدون تردید کشت درون‌شیشه‌ای باعث ایجاد تنوع سوماکلونال بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه شده است. Sarmast (2016) شرایط کشت درون‌شیشه‌ای را برای ریزنمونه‌ها تنش‌زا دانست. Jain (۲۰۰۱)، معتقد است که کشت درون‌شیشه‌ای به‌عنوان فرایند جهش‌زا عمل می‌کند و با هر بار واکشت برنامه جهش جدید در بازسازی گیاه ایجاد می‌کند. این احتمال بسیار قوی است که با افزایش تعداد واکشت انواع جدید تنوع سوماکلون ایجاد گردد. احتمال دیگر، تجمع تنظیم‌کننده‌های رشد (Sales & Butardo, 2014) و بازدارنده‌های رشد که باعث تمایز یا مهار رشد گیاهچه می‌شوند، در طول زیر کشت باشد. به‌طور ساده، زمانی که کشت اول انجام می‌شود یک سطحی از غلظت تنظیم‌کننده و بازدارنده رشد در محیط کشت وجود دارد، حال با افزایش تعداد زیر کشت این غلظت در گیاهچه به‌صورت تجمعی افزایش می‌یابد (Saito et al., 2002). علاوه بر تمامی مواردی که اثبات می‌کند تنوع سوماکلونال در شرایط درون‌شیشه‌ای ایجاد می‌گردد، راهبرد پرآوری نباید فراموش گردد. در این پژوهش از راهبرد اندام‌زایی به روش غیرمستقیم استفاده شد. Bairu و همکاران (۲۰۱۱) تنوع سوماکلونال ایجاد شده در راهبرد اندام‌زایی غیرمستقیم را بیشتر از باززایی مستقیم بیان کرده‌اند. در پژوهش‌های مختلف نیز غلظت بالای تنظیم‌کننده‌های رشد 2,4-D (Sales & Butardo, 2014) و BAP (Sales & Butardo, 2014؛ Saito et al., 2002) و هر دو تنظیم‌کننده رشد (Sarmast et al., 2012) را دلیل تنوع سوماکلونال بیان کردند. 2,4-D ممکن است با ایجاد میتلاسیون DNA (Sarmast, 2016) و با تولید اتیلن، میتلاسیون سیتوزین را تغییر دهد (Shemer et al., 2015) و در نهایت منجر به تنوع سوماکلونال گردد. همچنین وجود تنوع سوماکلونال در اندام مختلف گیاه، برای نمونه مریستم

- Cruz, C.D., Viccini, L.F., Nogueira, F.T.S., Otoni, W.C., 2018. Regenerative potential, metabolic profile, and genetic stability of *Brachypodium distachyon* embryogenic Calli as affected by successive subcultures. *Protoplasma*, 255: 655–667.
- Martinez-Estrada, E., Caamal-Velazquez, J.H., Salinas-Ruiz, J. and Bello Bello, J.J., 2017. Assessment of somaclonal variation during sugarcane micropropagation in temporary immersion bioreactors by intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *In vitro Cell Development Biology Plant*, 53(6): 553-560
- Mirani, A.A., Teo, C.H., Markhand, G.S., Abul-Soad, A.A. and Harikrishna, J.A., 2020. Detection of somaclonal variations in tissue cultured date palm (*Phoenix dactylifera* L.) using transposable element-based markers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 141, 119-130.
- Mohammadi, S.A. and Prasanna, B.M., 2003. Analysis of genetic diversity in crop plants-salient statistical tools and considerations. *Crop science*, 43(4): 1235-1248.
- Murray, M.G., and Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research's*, 8(19): 4321-4325.
- Noormohammadi, Z., Ghasempour, B. and Farahani, F., 2018. Somaclonal variation of tissue culture regenerated plants of *Aloe barbadense* Mill. *Nova Biologica Reperta*, 5: 72-81 (In Persian).
- 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 Organ Culture*, 122(1): 67-77
- Rahmani, M.S., 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.
- Rani, V. and Raina, S.N., 2000. Genetic fidelity of organized meristem derived micro-propagated plants: a critical reappraisal. *In Vitro Cell Development Biology Plant*, 36(5): 319–330.
- Roldan-Ruiz, I., Dendauw, J., Vanbockstaele, E., Depicker, A. and De Loose, M., 2000. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). *Molecule Breed*, 6: 125-134.
- Saito, H., Mizunashi, K., Tanaka, S., Adachi, Y., Nakano, M., 2003. Ploidy estimation in *Hemerocallis* species and cultivars by flow cytometry. *Sci. Hortic*, 97: 185–192.
- Sales, E.K. and Butardo, N.G., 2014. Molecular analysis of somaclonal variation in tissue culture cultured cells and regenerated plants. *Frontiers of plant tissue culture*. TA Thorpe, 287-295.
- Eastham, K. and Sweet, J., 2002. Genetically modified organisms (GMOs): The significance of gene flow through pollen transfer Copenhagen: European Environment Agency, 1-74.
- Esmaeili Sharif, M., 2016. Investigating the propagation method of Persian Mountain Ash (*Sorbus persica* Hedl.) and evaluation of somaclonal variation in regenerated plantlets. PhD. Thesis, Faculty of Natural Resources, Sari Agriculture Science and Natural Resources University, 130p (In Persian).
- Gantait, S., Mandal, N., Bhattacharyya, S., Das, P.K. and Nandy, S., 2009. Mass multiplication of *Vanilla planifolia* with pure genetic identity confirmed by ISSR. *The International journal of developmental biology*, 3: 18-23.
- 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(2): 1-12 (In Persian).
- Hamrick, J.L. and Godt, M.J.W., 1996. Conservation genetics of endemic plant species. Chapman and Hall, New York, 281-304.
- Hassanein, A.M., Salem, J.M., Faheed, F.A. and El-nagish, A., 2018. Effect of anti-ethylene compounds on isoenzyme patterns and genome stability during long term culture of *Moringa oleifera*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 132(1): 1-12.
- Jain, S.M., 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica*, 118(2): 153–166.
- Keller, L.F. and Waller, D.M., 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends in ecology and evolution*, 17(5): 230-241.
- Khosh-Khui, M., 1998. Application of Tissue Culture Techniques to Horticultural Crops (Translation). University of Tehran Press, 438p (In Persian).
- Kiani, B., 2004. Forest genetic. Haghshenas Press, Iran, 212p. (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 Biotechnology*, 6(1): 54-65.
- Larkin, P.J. and Scowcroft, W.R., 1981. Somaclonal variation- a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theory Application Genetics*, 60(4): 197-214.
- Mamedes-Rodrigues, T.C., Batista, D.S., Vieira, N.M., Matos, EM., Fernandes, D., Nunes-Nesi, A.,

- microtheca* F. Muel. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 17(2): 195-208 (In Persian).
- Shemer O., Landau U., Candela H., Zemach A., Williams L.E., 2015. Competency for shoot regeneration from Arabidopsis root explants is regulated by DNA methylation. Plant Science, 238: 251-261.
  - Solano, M.C.P., Ruiz, J.S., Arnao, M.T.G., Castro, O.C., Tovar, M.E.G. and Bello, J.J.B., 2019. Evaluation of *in vitro* shoot multiplication and ISSR marker-based assessment of somaclonal variants at different subcultures of vanilla. Physiology and Molecular Biology of Plants, 25(2): 561-567.
  - Soliman, H.I.A., Metwali, E.M.R., Almaghrabi, O.A.H., 2014. Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Betroni and assessment of genetic stability of *in vitro* regenerated plants using inter simple sequence repeat (ISSR) marker. Plant Biotechnology, 31(3): 249-256.
  - Varshney, R.K., Chabane, K., Hendre, P.S., Aggarwal, R.K., Graner, A., 2007. Comparative assessment of EST-SSR, EST-SNP and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of genetic resources using wild, cultivated and elite barleys. Plant Science, 173: 638-649.
  - derived bananas using MSAP and SSR markers. International Journal of Agricultural and Biological Engineering, 8(6): 615-622.
  - Sarmast, M.K., 2016. Genetic transformation and somaclonal variation in conifers. Plant Biotechnology Reports, 10(6): 309-325.
  - Sarmast, M.K., Salehi, H., Ramzani, Abolimoghadam, A.A., Niazi, A., Khosh-Khui, M., 2012. RAPD fingerprint to appraise the genetic fidelity of *in vitro* propagated *Araucaria excelsa* R. Br var. *glauca* plantlets. Molecular Biotechnology, 50: 181-188
  - Schnabel, A. and Krutovskii, K.V., 2004. Conservation genetics and evolutionary history of *Gleditsia caspica*: Inferences from allozyme diversity in populations from Azerbaijan. Conservation genetics, 5(2): 195-204.
  - Shabaniyan, N, Havasi, A. and Mehrabi, A.A., 2009. 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).
  - Shabannejad Mamaghani, M., Assareh, M.H., Omidi, M., Matinizadeh, M., Forootan, M., Ghamari Zare, A., Shahrzad, SH. and Jebelli, M., 2009. Identification of somaclonal variation using peroxidase and microsatellite markers in *Eucalyptus*

## Somaclonal diversity in regenerated plants from stem, root and cotyledons of Caspian locust (*Gleditschia capsica* Desf.)

M. Imani Rastabi<sup>1</sup>, S. M. Hosseini Nasr<sup>\*2</sup>, G. A. Ranjbar<sup>2</sup> and M. Khoshhal Sarmast<sup>3</sup>

1- Ph.D. graduated, Dept Forest Science and Engineering, Agricultural Science Faculty, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Mazandaran, I.R. Iran

2\* - Corresponding author, Assoc. Prof., Department of Forest Science and Engineering, Agricultural Science Faculty, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Mazandaran, I.R. Iran, Email: mhn1946@gmail.com

3- Assoc. Prof., Dept. Plant Breeding, Agricultural Science Faculty, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Mazandaran, I.R. Iran.

4- Assist Prof, Dept. Horticultural and Green Space Engineering, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Golestan, I.R. Iran.

Received: 20.07.2021

Accepted: 02.02.2022

### Abstract

Conservation the germplasm of native tree species of the Caspian hyrcanian forests, especially the Caspian locust (*Gleditschia capsica* Desf.) is a priority of the research. In this study, somaclonal diversity in regenerated plants from different explants of Caspian locust was investigated using the Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) marker under *in vitro* condition. Mother leaf (natural) and stem, root and cotyledon explants from the regenerated plants as studied genotypes were selected and they were cultured in MS culture medium containing 0.5 mgL<sup>-1</sup> TDZ and 0.5 mgL<sup>-1</sup> 2,4-D. Somaclonal diversity was examined after six subculture inoculations. Polymorphism (PIC), Nei and Shannon diversity traits were used to investigate the diversity between genotypes and then clustering of genotypes was performed using UPMGA algorithm and Principal Component Analysis (PCA). The polymorphism percentage was 87.9% using 10 primers. Molecular Analysis of Variance (AMOVA) showed 16% diversity between genotypes and maternal origin. The results of cluster analysis grouped the genotypes into three distinct categories, which was also confirmed by principal component analysis (PCA). Accordingly, the mother basal and stem genotypes were grouped in a group. The mother basal had the highest and lowest similarity coefficients with stem and root genotypes, respectively. Therefore, it was suggested to use stem explants that have high genetic similarity with the mother genome for studies of Caspian locust tissue culture. In general, the results showed that somaclonal diversity among regenerated plants will increase with increasing number of sub-cultured.

**Keywords:** Callusing, Plant growth regulators PGRs, genetic diversity, micropropagation, molecular marker.