ژنتیک نوین
دوره پنجم، شماره ٤، زمستان ١٣٨٩
صفحه ٦٧-٥٩

همبستگی آلل‌های پراکسیداز و توالی‌های ساده تکرار شونده در تنوع سوماکلونال حاصل از کشت درون شیشه

Eucalyptus microtheca F. Muell

مرتضی شبان‌نژاد ممقانی*[1]، منصور امیدی[2]، محمدحسن عصاره[3]، محمد متینی‌زاده[4]، مسیح فروتن[5]، عباس قمری‌زارع[6]، شکوفه شهرزاد[7]، مریم جبلی[8]

۱- کارشناسی‌ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه اصلاح نباتات

۲- استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، گروه زراعت و اصلاح نباتات

۳،۴،۵،۶،۷و۸- عضو هیأت علمی موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع ایران

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m.shabannejad@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۸۷/۱۱/۵ - تاریخ پذیرش:)

چکیده

هدف این پژوهش بررسی همبستگی آلل‌های پراکسیداز و توالی‌های ساده تکرار شونده در تنوع ایجاد شده بوسیله هورمون TDZ (Thidiazuron) در کشت درون شیشه *Eucalyptus microtheca* بود. به این منظور ریزنمونه‌های سرشاخه‌های سبز نهال یک ساله *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 کشت گردیدند. بعنوان نشانگر بیوشیمیایی، الگوی باندهای پراکسیداز به روش PAGE در گیاهچه‌های باززایی شده، بررسی شد تا تأثیر مقادیر متفاوت هورمون TDZ بر روی مکان‌های ژنی بیان کننده این آنزیم مشخص شود. یک مکان ژنی دیمر، یک مکان ژنی تترامر و دو باند اپی‌ژنتیک وجود داشت. تغییرات ژنوم گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت با استفاده از نشانگر مولکولی SSR ارزیابی گردید. آغازگرهای استفاده شده نشان دهنده وجود چند شکلی بودند. آنالیزهای آماری ناپارامتری وجود اثر معنی‌دار توالی‌های ساده تکرار شونده بر آلل‌های پراکسیداز را تایید نمود. ولی همبستگی دو ماتریس تشابه پراکسیداز و SSR بوسیله آزمون Mental، ۰/۱۸ بود.

واژه‌های کلیدی

همبستگی نشانگرها،
پراکسیداز،
میکروستلایت،
Thidiazuron،
Eucalyptus

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.4.1]

مقدمه

Eucalyptus microtheca F. Muell. از جمله گونه‌های وارداتی به استان‌های جنوبی ایران است که در شرایط اکولوژیکی این مناطق سازگار شده است (۱). این گیاه دارای شاخه‌های فرعی و نازک بسیار زیاد می‌باشد به نحوی که بیشتر جهت بیابان‌زدایی و جلوگیری از طوفان‌های شن و پیشروی آن بکار می‌رود (۲). همچنین کیفیت چوب آن مطلوب نبوده و مقدار مقاومت آن به سرما کم می‌باشد (۱) این گونه بومی استرالیا بوده و از لحاظ شکل ظاهری مطلوب نیست اما با آزمایش هیبریدهای جدید و انتخاب پایه‌های برتر، قابل اصلاح است (۱). حفظ ژنوتیپ‌های برتر در این گونه به علت دگرگشن بودن آن بسیار دشوار می‌باشد. از آنجا که کشت بافت درون شیشه 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 (۱۹). باززایی غیرمستقیم در *E. gunnii* (۱۱)، باززایی مستقیم در *E. tereticornis* (۲۷) و جنین‌زایی سوماتیکی در *E. dunnii* و *E. grandis* (۳۵) و *E. globulus* (۲۱) مثال‌هایی از پژوهش‌های انجام شده بر روی کشت بافت اکالیپتوس‌ها می‌باشند.

آنزیم پراکسیداز در تولید دیواره سلولی، اتصال عرضی پلی‌ساکاریدها و لیگنین سازی نقش دارد (۶، ۱۰و ۲۳). از این آنزیم به عنوان نشانگری برای شناسایی اندام‌زایی و جنین‌زایی نام برده شده است (۲۳). از طرفی تغییر معنی‌دار فعالیت پراکسیداز و کاتالاز به‌عنوان نشانگر در هنگام باززایی مستقیم صنوبر توسط هورمون TDZ تایید شده است (۳۳). مقدار فعالیت پراکسیداز در مراحل پریکوتیلدون و کوتیلدون کشت بافت گیاه صنوبر اندک برآورد شده که متناظر با مراحل تشکیل جنین جنسی در همین گیاه می‌باشد (۱۴). افزایش فعالیت پراکسیداز در هنگام کال‌زایی و در کالوس‌های جنین‌زای کاهو مشاهده شده است (۳۶). همچنین از این آنزیم به‌عنوان نشانگر برای انواع مقاومت‌ها نام برده شده است که در هنگام ایجاد تنش فعالیت بیشتری دارد (۹). بنابراین، فعالیت پراکسیداز متأثر از شرایط محیطی، ژنوتیپ و اثر متقابل این دو می‌باشد. ما در کشت درون شیشه کلیه عوامل محیطی و ژنوتیپی را حذف کرده و به بررسی تغییرات متأثر از سطوح مختلف هورمون‌ها پرداختیم.

مقایسه نشانگرهای مولکولی توسط Liu و Furnier (۱۷)، Rus-Kortekaas و همکاران (۲٤) و Russell و همکاران (۲۵)، وجود همبستگی در نقشه‌های ژنتیکی نشانگرهای آنزیمی و مولکولی را به اثبات رسانده است. همبستگی نشانگر مولکولی SSR با دیگر نشانگرهای مولکولی بر روی گیاهان سویا و جو (۲۲ و ۲٦) مقادیر کم همبستگی را نشان می‌دهد، همچنین با استفاده از آزمون Mental (۱۸) همبستگی ایزوآنزیم‌ها و نشانگر مولکولی SSR در گیاه تریتیکاله ۰/۱۶۴ بوده است (۳۲). Sun و همکاران (۳۱) با استفاده از آزمون Spearman (۲۹) ضریب همبستگی رتبه‌ای r=٪۸۰ را برای همبستگی میکروستلایت‌ها و RAPD گزارش نموده‌اند. البته Shah و همکاران (۲۸) و Byrne و همکاران (۵) از آزمون Chi-square برای تعیین اثر معنی‌دار مکان‌های ژنی استفاده نموده‌اند. بررسی این همبستگی‌ها می‌تواند در افزایش دقت نقشه‌های ژنتیکی، انتخاب نشانگر مناسبتر، شناسایی توالی‌های موثر در بیان ژن‌ها و اصلاح نباتات بکار برده شود.

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

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در اردیبهشت (۱۳۸۶) سرشاخه‌های سبز فاقد بافت چوبی *E. microtheca* از یک گیاه حاصل از بذر که به مدت یک سال در گلخانه نگهداری شده بود، به عنوان ریزنمونه جدا شدند. ریزنمونه‌ها برای ضدعفونی سطحی، درون آب حاوی چند قطره توین به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. سپس با آب مقطر شستشو شدند و توسط کلرومرکوریک (با غلظت یک در ده هزار) به مدت ۳۰ ثانیه تیمار گردیدند. ریزنمونه‌ها در نهایت سه مرتبه توسط آب دوبار تقطیر (هربار به مدت ۵ دقیقه و در زیر هود)

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.4.1]

شستشو شدند. برای باززایی از محیط کشت MS با نیمی از مقادیر NH_4NO_3 و KNO_3 استفاده شد (۲۰). مطابق جدول (۱) پنج تیمار متفاوت هورمونی به محیط‌ها اضافه گردید (در این مقاله به اختصار از B_1 تا B_5 برای این تیمارها استفاده شده است). پس از تنظیم pH (۵/۷±۰/۱)، محیط‌های کشت به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو گردیدند. پس از ضد عفونی، ریزنمونه‌ها به طول ۱ تا ۱/۵ سانتی‌متر برش داده شده و درون محیط‌های کشت قرار گرفتند. از هر تیمار ۷ تکرار و در هر تکرار ۶ ریزنمونه کشت شده و به مدت ۴ هفته در چرخه‌نوری ۱۶ ساعت روشنایی (۲۷ درجه سانتی‌گراد) و ۸ ساعت تاریکی (۱۹ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد. پس از این مدت، از برگ‌های گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت برای مطالعات بعدی نمونه‌گیری انجام گرفت.

بررسی کیفی پراکسیداز

استخراج عصاره و الکتروفورز ژل پلی آکریلامید به روش PAGE با استفاده از روش Ebermann و Stich (۸) برای ۲۷ گیاهچه حاصل از کشت بافت صورت گرفت. 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 به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه 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 درصد (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 گلایسین 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 پروکسو دی سولفات (۱/۴ گرم در لیتر) و چند قطره تِمد 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 H_2O_2 ۳ درصد 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.

بررسی تغییرات توالی‌های ساده تکرار شونده

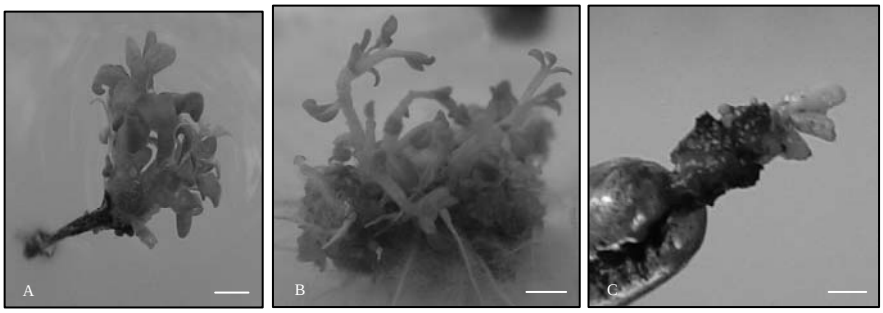
استخراج DNA به روش Doyle و Doyle (۷)، برای ۳۳ گیاهچه حاصل از کشت بافت انجام شد. آزمون PCR توسط آغازگرهای EMBRA06 (۴) و EMCRC09 (۳۰) انجام گرفت. اجزای تشکیل دهنده یک واکنش ۲۵ میکرولیتری PCR شامل ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر DNA ژنومی به عنوان الگو، بافر PCR به مقدار ۲/۷۵ میکرولیتر، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۲ میلی‌مولار از هر کدام از dNTP ها، ۰/۴ میکرومولار از هرکدام از آغازگرها و ۲ واحد آنزیم Taq DNA polymerase (سیناژن، تهران) بودند. برای انجام مراحل واکنش PCR از روش Byrne و همکاران (۵) استفاده گردید. جهت مشاهده باندها از ژل آگارز ۱/۷ درصد و رنگ آمیزی توسط اتیدیوم بروماید استفاده شد. شناسایی چند شکلی با استفاده از ژل واسرشته پلی آکریلامید ۶ درصد با رنگ آمیزی نیترات نقره انجام گرفت.

جدول ۱- تیمارهای هورمونی استفاده شده جهت باززایی

تیمارها	هورمون‌ها	متوسط تعداد باززایی (درصد)
B_1	TDZ۰/۰($mg\ l^{-1}$)+Kin۱/۰($mg\ l^{-1}$)+NAA۱/۰($mg\ l^{-1}$)	۶
B_2	TDZ۰/۰۱($mg\ l^{-1}$)+Kin۰/۵($mg\ l^{-1}$)+NAA۴/۰($mg\ l^{-1}$)	۲۰
B_3	TDZ۰/۱($mg\ l^{-1}$)+Kin۰/۵($mg\ l^{-1}$)+NAA۴/۰($mg\ l^{-1}$)	۵۲
B_4	TDZ۰/۵($mg\ l^{-1}$)+Kin۱/۰($mg\ l^{-1}$)+NAA۱/۰($mg\ l^{-1}$)	۱۹
B_5	TDZ۱/۰($mg\ l^{-1}$)+Kin۱/۰($mg\ l^{-1}$)+NAA۱/۰($mg\ l^{-1}$)	۳

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.4.1]



شکل ۱- تیپ‌های مختلف باززایی در کشت درون شیشه *E. microtheca* A: باززایی مستقیم در تیمار B_1، B: وجود کالوس‌های جنین‌زا در تیمار B_3، C: باززایی غیرمستقیم در تیمار B_3.

آنالیزهای آماری

داده‌های به‌دست آمده از باززایی تیمارهای متفاوت با استفاده از فرمول $\sqrt{(Y+0/5)}$ نرمال شد. سپس بوسیله رویه GLM در نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل گردید. برای وضوح بیشتر باندهای پراکسیداز، با استفاده از نرم افزار Excel زیموگرام رسم گردید. بمنظور نمره‌دهی به نشانگرهای مولکولی از عدد یک (وجود باند) و صفر (عدم مشاهده باند) استفاده شد. در تمامی برآوردهای آماری تنها ۲۷ گیاهچه‌ای که بوسیله هر دو نشانگر مورد بررسی قرار گرفته بودند، آنالیز شدند. از آزمون χ^2 برای شناسایی اثر معنی‌دار نشانگر مولکولی SSR بر روی آلل‌های پراکسیداز استفاده شد (۵ و ۲۸)، همچنین ضریب همبستگی رتبه‌ای میان باندهای این دو، توسط نرم‌افزار JMP از روش ناپارامتری Spearman (۲۹) بدست آمد (۱۵). جهت بدست آوردن ضریب همبستگی میان دو نشانگر پراکسیداز و SSR با استفاده از نرم افزار NTSYS، ابتدا دو ماتریس ضرائب تشابه Jaccard برآورد شدند و سپس با استفاده از آزمون Mental (۱۸) این همبستگی محاسبه گردید (۳۲).

نتایج

کشت بافت

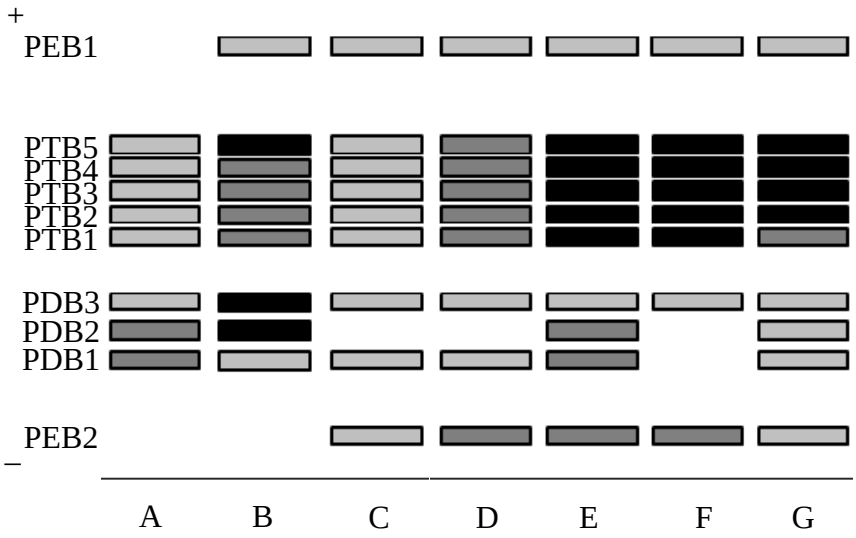
پس از گذشت ۴ هفته، ریزنمونه‌ها در تیمار B_1 به صورت مستقیم باززایی شدند (شکل ۱- A). با اضافه شدن هورمون TDZ به NAA و Kin، مقدار باززایی از ۶ درصد در B_1 به ۲۰ درصد در B_2 رسید. بیشترین باززایی در B_3 به مقدار ۵۲ درصد مشاهده شد. در این تیمار، باززایی به صورت جنین‌زایی سوماتیکی دیده شد (شکل ۱- B). در B_4 کال‌زایی به شدت افزایش یافته و باززایی غیرمستقیم به بیشترین مقدار رسید، در حالی‌که باززایی به صورت جنین‌زایی سوماتیکی کاهش یافت. باززایی در B_4 ۱۹ درصد بود (شکل ۱- C). در تیمار B_5 کالوس‌ها متراکم و سخت شدند که در نتیجه، باززایی غیرمستقیم به ۳ درصد کاهش یافت. پس از تمایززدایی، همه گیاهچه‌ها دارای مورفولوژی طبیعی بودند.

نتایج حاصل از آزمایشات کیفی پراکسیداز

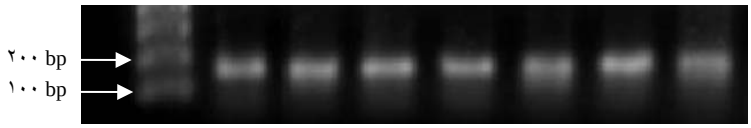
۲۷ گیاهچه حاصل از کشت بافت به همراه گیاه مادر مورد ارزیابی کیفی قرار گرفتند (شکل ۲). برای گیاه شاهد یک مجموعه ۳ آللی دیمر و یک مجموعه ۵ آللی تترامر وجود داشت (شکل ۲- A). در گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت دو باند جدید دیده شد. باند نخست که فعالیت بسیار کمی داشت، با استفاده از هورمون‌های NAA و Kin در تمامی نمونه‌ها (۱۰۰٪) در منطقه مولکول‌های سبک ظاهر شد (باند PEB1). هنگامی که از مقادیر مختلف هورمون TDZ جهت تکمیل محیط کشت استفاده گردید، ۲۱ گیاهچه از ۲۴ نمونه باززایی شده، باند جدید دیگری در محدوده مولکول‌های سنگین داشتند (باند PEB2). در تیمار B_1 همه آلل‌ها حضور داشته و آلل‌های PDB2، PDB3 و PTB5 فعالیت بیشتری یافتند (شکل ۲- B). ولی در تیمارهای B_2 و B_3 آلل PDB2 حذف گردید و از میزان فعالیت دیگر آلل‌ها نیز به نسبت کاسته شد (شکل ۲- C). در ۵۰ درصد از گیاهچه‌های تیمار B_4 همه آلل‌ها حضور داشتند و فعالیت مکان ژنی تترامر به شدت افزایش یافته بود، در ۵۰ درصد دیگر نیز از فعالیت مکان ژنی دیمر به شدت کاسته شده بود (شکل ۲- D و E). آلل‌های پراکسیداز در گیاهچه‌های حاصل از باززایی توسط تیمار B_5 رفتارهایی به مانند B_4 از خود نشان دادند (شکل ۲- F و G).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

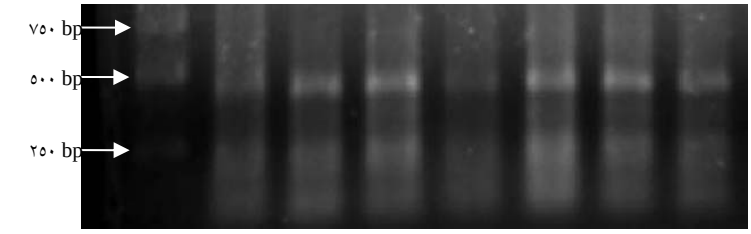
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.4.1]



شکل ۲- زیموگرام باندهای پراکسیداز گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت A: گیاه مادر دارای دو مکان ژنی دیمر و ترامر، B: فعالیت آلل‌ها در تیمار B_1 و ظاهر شدن باند جدید (PEB1) در محدوده مولکول‌های سبک، C: فعالیت آلل‌ها حاصل از تیمارهای B_2 و B_3 که با حذف آلل هتروزیگوت (PDB2) از مکان ژنی دیمر و ظاهر شدن یک باند جدید دیگر (PEB2) در محدوده مولکول‌های سنگین همراه بودند (تیمارهای B_2 و B_3 بصورت جدا از یکدیگر بارگذاری شدند)، D: نمایان شدن مجدد آلل هتروزیگوت (PDB2) در تیمار B_4، E: کاهش فعالیت مکان ژنی دیمر در B_5، F و G: فعالیت شدید هر دو مکان ژنی در تیمارهای B_4 و B_5 (مقدار فعالیت باندها در ۳ سطح شدید: سیاه، متوسط: خاکستری و کم: خاکستری روشن نشان داده شده است، P: Peroxidase، D: Dimer، T: Tetramer، E: Epigenetic، B: Band، + و − به ترتیب محدوده مولکول‌های سبک و سنگین می‌باشند).



شکل ۳- باندهای SSR مشاهده شده ۷ گیاهچه حاصل از کشت بافت *E. microtheca* توسط آغازگر EMBRA06 بر روی ژل آگاروز (چاهک اول Size marker می‌باشد).



شکل ۴- باندهای SSR مشاهده شده ۷ گیاهچه حاصل از کشت بافت *E. microtheca* توسط آغازگر EMCRC09 بر روی ژل آگاروز (چاهک اول Size marker می‌باشد).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.4.1]

جدول ۲- نتایج حاصل از آزمون χ^2

		EMBRA06		EMCRC09	
		Df	Probability	Df	Probability
باندهای پراکسیداز	PEB1	۱	۰/۸۴۴۶$^{n.s}$	۱	۰/۸۴۴۶$^{n.s}$
	PTB5	۱	۰/۸۴۴۶$^{n.s}$	۱	۰/۰۰۰۱**
	PTB4	۱	۰/۸۴۴۶$^{n.s}$	۱	۰/۰۰۰۱**
	PTB3	-	-	-	-
	PTB2	۱	۰/۰۱۲۶*	۱	۰/۰۱۲۶*
	PTB1	۱	۰/۰۷۷۸$^{n.s}$	۱	۰/۰۷۷۸$^{n.s}$
	PDB3	۱	۰/۰۰۳۳**	۱	۰/۷۲۴۳$^{n.s}$
	PDB2	۱	۰/۳۷۷۸$^{n.s}$	۱	۰/۳۷۷۸$^{n.s}$
	PDB1	۱	۰/۰۷۷۸$^{n.s}$	۱	۰/۵۵۶۶$^{n.s}$
	PEB2	۱	۰/۵۵۶۶$^{n.s}$	۱	۰/۵۵۶۶$^{n.s}$

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

* معنی‌دار در سطح ۵ درصد، ** معنی‌دار در سطح یک درصد و n.s عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد.

نتایج حاصل از مارکر مولکولی SSR

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

نتایج حاصل از آنالیزهای آماری

آزمون χ^2 نشان داد که توالی‌های SSR تکثیر یافته توسط آغازگرهای EMCRC09 و EMBRA06 بر روی دو باند اپی‌ژنتیک پراکسیداز (PEB1 و PEB2) اثر معنی‌داری نداشته‌اند (جدول ۲) ولی بیشترین تاثیر بر روی آلل PDB3 بوسیله آغازگر EMBRA06 و آلل‌های PTB4 و PTB5 بوسیله آغازگر EMCRC09 بوده است (جدول ۲). برآورد ضریب همبستگی رتبه‌ای Spearman (۲۹) بیشترین مقدار را به آغازگر EMBRA06 همراه با آلل PDB3 با مقدار ۰/۵۶ اختصاص داد (جدول ۳). همچنین آزمون Mental (۱۸) ضریب همبستگی دو ماتریس تشابه پراکسیداز و توالی‌های ساده تکرار شونده را ۰/۱۸ محاسبه نمود.

بحث

NAA و Kin (هر کدام به مقدار ۱/۰ میلی‌گرم در لیتر) باززایی مستقیم را تحریک کرده و ریزنمونه‌های سرشاخه بدون ورود به فاز کال‌زایی باززا شدند. با اضافه کردن TDZ به مقدار ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر به تیمار B_2 حجم کالوس اندکی افزایش یافته و باززایی به صورت جنین‌زایی سوماتیکی بود. به بیانی اثر NAA و Kin بر TDZ در مقادیر بسیار کم چیرگی داشت. در تیمار B_3 که حاوی ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ بود، باززایی از نوع جنین‌زایی سوماتیکی به بیشترین مقدار خود (۵۲ درصد) رسید. در مقادیر ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در لیتر TDZ کالوس‌ها متراکم و سخت شد، مقدار باززایی کاهش یافت و باززایی غیرمستقیم تحریک گردید. نتایج نشان داد که انواع باززایی در *E. microtheca* تحت تاثیر TDZ است. TDZ توانایی بالایی در تحریک، سنتز و تجمع و تعدیل دیگر سیتوکنین‌های درون‌زاد دارد (۳۴).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.4.1]

جدول ۳. ضرایب همبستگی رتبه‌ای Spearman

آغازگر	باندهای پراکسیداز	ضریب رتبه‌ای Spearman	آغازگر	باندهای پراکسیداز	ضریب رتبه‌ای Spearman
EMBRA06	PEB1	−۰/۰۳۷	EMCRC09	PEB1	−۰/۳۷
EMBRA06	PTB5	−۰/۰۳۷	EMCRC09	PTB5	۱
EMBRA06	PTB4	−۰/۰۳۷	EMCRC09	PTB4	۱
EMBRA06	PTB3	−	EMCRC09	PTB3	−
EMBRA06	PTB2	۰/۴۷۱۴	EMCRC09	PTB2	۰/۴۷۱۴
EMBRA06	PTB1	۰/۳۳۳۳	EMCRC09	PTB1	۰/۳۳۳۳
EMBRA06	PDB3	۰/۵۵۵۶	EMCRC09	PDB3	−۰/۰۶۶۷
EMBRA06	PDB2	۰/۱۶۶۷	EMCRC09	PDB2	۰/۱۶۶۷
EMBRA06	PDB1	۰/۳۳۳۳	EMCRC09	PDB1	−۰/۱۱۱۱
EMBRA06	PEB2	−۰/۱۱۱۱	EMCRC09	PEB2	−۰/۱۱۱۱

در باززایی مستقیم ریزنمونه‌های کوتیلدونی صنوبر سفید بوسیله هورمون TDZ میزان فعالیت پراکسیداز کاهش می‌یابد (۳۳). این گزارش کاملاً با یافته‌های این پژوهش مطابقت و همسویی دارد زیرا از فعالیت آلل‌ها کاسته شده و آلل PDB2 نیز ناپدید شده است. همچنین با ورود به فاز 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_4 و B_5 که باززایی غیرمستقیم در آنها دیده شد وجود نداشت. بنابراین با افزایش مقدار سیتوکنین TDZ مقدار فعالیت پراکسیداز افزایش داشته است. این دلیلی آشکار جهت تأیید خصوصیت تعدیل کنندگی TDZ برای تیپ‌های متفاوت باززایی می‌باشد (۳۴). در یافته‌های ما 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 (۲۳ و۳۵). با استفاده از هورمون‌های NAA و Kin یک باند اپی‌ژنتیک (PEB1) در تمامی باززایی‌ها ظاهر می‌گردد. همچنین گیاهچه‌های متاثر از هورمون TDZ باند اپی‌ژنتیک دیگری (PEB2) را به وجود می‌آورند. توالی‌های SSR اثر معنی‌داری بر روی این دو باند نداشته (جدول ۲) و کمترین ضریب همبستگی رتبه‌ای میان این دو باند و مارکر مولکولی وجود دارد (جدول ۳). بیشترین ضریب برای آغازگر EMBRA06 با آلل PDB3 از مکان ژنی دیمر به مقدار r=۰/۵۶ وجود دارد که نشان دهنده تاثیر نسبی توالی تکثیر شده بوسیله این آغازگر بر روی سنتز پراکسیداز می‌باشد. ولی توالی آغازگر EMCRC09 تاثیر معنی‌داری بر روی آلل‌های PTB5 و PTB4 داشته (جدول ۲) و برای آنها ضریب کامل وجود دارد (جدول ۳). بنابراین TDZ بر روی این توالی تاثیر گذاشته و آلل‌های یک مکان ژنی تترامر را متأثر ساخته است.

در تیمارهای B_2 و B_3 از فعالیت همه آلل‌ها کاسته شده و آلل PDB2 در تمامی گیاهچه‌ها ناپدید شده است. بنابراین می‌توان گفت TDZ در مقادیر ۰/۰۱ و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر موجب عدم فعالیت یک آلل هتروزیگوت از یک مکان ژنی دیمر می‌گردد. این پدیده می‌تواند ناشی از سنتز یک بازدارنده برای پروموتر پراکسیداز (۱۳) و یا جهش باشد (۱۶). وجود همبستگی پایین میان ماتریس ضرائب تشابه ایزوآنزیم پراکسیداز و میکروستلایت‌ها (r=۰/۱۸) بواسطه استفاده از آزمون Mental (۱۸) تشابه زیادی با نتایج Sun و همکاران (۳۱) دارد. دلیل این

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.4.1]

عدم وجود همبستگی می‌تواند قرار گرفتن مکان‌های ژنی میکروستلایت در قسمت‌های غیرفعال[1] توالی‌های DNA باشد (۳).

چند شکلی در توالی‌های ساده تکرار شونده برروی ایزوانزیم‌ها موثر است (۱۲). بیان پروموتر پراکسیداز که در نواحی غیرفعال DNA گیاه تنباکو قرار دارند توسط فیتوهورمون ABA تنظیم می‌گردد (۱۳). با توجه به نتایج پژوهش حاضر مبنی بر تأثیر هورمون TDZ در حذف و جلوگیری از بیان یک آلل خاص پراکسیداز (در مقادیر کم) و یا بیان مجدد آلل مذکور (در مقادیر بیشتر) می‌توان بیان داشت، نظریه Klotz و Lagrimini (۱۳) مبنی بر اثر فیتوهورمون‌ها در کنترل پروموتر پراکسیداز می‌تواند صحیح باشد.

در مجموع، بدلیل قرار گرفتن توالی‌های پروموترهای پراکسیداز در ناحیه غیرفعال DNA (۱۳)، وجود ارتباط میان چند شکلی موثر در توالی‌های SSR جهت تأثیر بر روی سنتز پراکسیداز در گیاه *E. microtheca* کم می‌باشد. هر چند رابطه میکروستلایت‌ها با مکان ژنی تترامر پراکسیداز بیشتر از مکان ژنی دیمر برآورد گردید. همچنین آلل‌های مکان ژنی تترامر تحت تاثیر TDZ، پایداری بیشتری نسبت به مکان ژنی دیمر دارند و نقش بیشتری در سنتز پراکسیداز ایفا می‌کنند.

سپاسگزاری

این پژوهش با هزینه موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع ایران انجام گردیده است. نویسندگان به این وسیله از دکتر محسن مردی و مهندس مصطفی پیرسیدی جهت ارائه تجربیاتشان قدردانی می‌نمایند.

منابع

۱. عصاره م ح و سردابی ح (۱۳۸۶) اکالیپتوس، شناخت، معرفی و ازدیاد با استفاده از فناوری‌های نوین. جلد اول، انتشارات مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، ۶۷۲ صفحه.

۲. مرتضوی جهرمی س م (۱۳۷۳) معرفی گونه‌های سازگاری اکالیپتوس در مناطق غربی استان فارس. مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، شماره ۹۹، ۸۳ صفحه.

۳. نقوی م ر، قره‌یاضی ب و حسینی سالکده ق (۱۳۸۴) نشانگرهای مولکولی. انتشارات دانشگاه تهران، شماره ۲۷۱۶، ۳۲۰ صفحه.

4. Brondani RPV, 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.

5. Byrne M, Marquez-Garcia MI, Uren T, Smith DS and Moran GF (1996) Conservation and genetic diversity of microsatellite loci in the genus *Eucalyptus*. Australian Journal of Botany, 44:331-341.

6. Castillo FJ (1986) Extra cellular peroxidase as markers of stress? In: Greppin H, Penel C and Gaspar T (Eds.) Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases. University of Geneva, Geneva, pp. 419-426.

7. Doyle JJ and Doyle JL (1987) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12: 13-15.

8. Ebermann R and Stich K (1982) Peroxidase and amylase isoenzymes in the sapwood and heartwood of trees. Phytochemistry, 21:2401–2402.

9. 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(1):21-28.

10. Fry SC (1979) Phenolic components of the primary cell wall and their possible role in the hormonal regulation of growth. Planta, 146:343-351.

11. Herve P, Jauneau A, Paques M, Marien JN, 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(4):645-653.

12. 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.

13. Klotz KL and Lagrimini LM (1996) Phytohormone control of the tobacco anionic peroxidase promoter. Plant Molecular Biology, 31:565–573.

14. 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(1): 59–62.

15. Lanner-Herrera C, Gustafsson M, Falt AS 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.

[1] Nonfunctional

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.4.1]

for plant improvement. Theoretical and Applied Genetics, 60:197-214.
17. Liu Z and Furnier GR (1993) Comparison of allozyme, RFLP, and RAPD markers for revealing genetic variation within and between trembling aspen and big tooth aspen. Theoretical and Applied Genetics, 87: 97–105.
18. Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Research, 27: 209–220.
19. Morabito D, Mills D, Prat D and Dizengremel P (1994) Response of clones of *Eucalyptus microtheca* to NaCl *in vitro*. Tree Physiology, 14: 201-210.
20. Murashige T and Skoog F (1962) Revised medium for rapid growth and bioassay with *Tobacco* tissue culture. Physiologia Plantarum, 15: 473-479.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. Rus-Kortekaas W, Smulders MJM, 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.
25. Russell JR, Fuller JD, Macaulay M, Hatz BGB, 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.
26. Saghai-Maroof MA, Biyashev RM, Yang GP, Zhang Q and Allard RW (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.
27. Sankara Rao K (1988) *In vitro* meristem cloning of *Eucalyptus tereticornis* Sm. Plant Cell Reports, 7:546-549.
28. Shah J, Kachroo P and Klessig DF (1999) The Arabidopsis *ssi1* mutation restores pathogenesis-related gene expression in *npr1* plants and renders defensin gene expression salicylic acid dependent. The Plant Cell, 11: 191–206.
29. Spearman C (1904) The proof and measurement of association between two things. American Journal of Psychology, 15: 72–101.
30. Steane DA, Vaillancourt RE, Russell J, Powell W, Marshall D and Potts BM (2001) Development and characteristion of microsatellite loci in *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae). Silvae Genetica, 50: 2, 89-91.
16. Larkin PJ and Scowcroft WR (1981) Somaclonal variation – A novel source of variability from cell cultures
31. Sun GL, Salomon B and von Bothmer R (1997) Analysis of tetraploid *Elymus* species using wheat microsatellite markers and RAPD markers. Genome, 40: 806–814.
32. Sun GL, Salomon B and von Bothmer R (1998) Characterization and analysis of microsatellite loci in *Elymus caninus* (*Triticeae*). Theoretical and Applied Genetics, 96: 676–682.
33. Tang W and Newton RJ (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.
34. Visser C, Qureshi JA, Gill R and Saxena PK (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.
35. Watt MP, Blakeway, FC, Termignoni R and Jain SM (1999) Somatic embryogenesis in *Eucalyptus grandis* and *E. dunni*. In: Jain SM, Gupta PK and Newton RJ (Eds) Somatic embryogenesis in woody plants, Kluwer, UK, 5:63-78.
36. Xiaoli Z, Yang H, Wenjie Y and Ti X (1992) Somatic embryogenesis and analysis of peroxidase in cultured lettuce (*Lactuca Sativa* L.) cotyledons. Annals of Botany, 69: 97-100.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.4.1]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1389.5.4.4.1]
[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]