فصلنامه میکروبیولوژی کاربردی و بیوتکنولوژی
شماره پیاپی ۱، جلد ۱، شماره ۱، زمستان ۹۱، صفحه ۱ تا ۷

# بررسی تغییرات ژنتیکی القاء شده در هفت واکشت متوالی در رقم سی اکرا

فرزانه تفویضی[۱]
۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند tafvizi@piau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۱/۷/۲ تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۳۰

## چکیده

**پنبه تتراپلوئید (*Gossypium hirsutum* L.) از گیاهان زراعی با ارزش ایران می‌باشد که در مناطق مختلف کشور کشت می‌شود. کشت یکنواخت و انتخاب صفاتی خاص در ارقام پنبه می‌تواند منجر به یکنواختی ژنتیکی ارقام و در نهایت فرسایش ژنتیکی شود. به منظور اصلاح و انجام هیبریدگیری میان ارقام پنبه، شناخت تنوع ژنتیکی موجود در آن ها بسیار ضروری است؛ از طرفی با روش های مختلف تلاش می شود تا تنوع ژنتیکی مورد نیاز برای اصلاح نباتات در این ارقام تامین شود. یکی از روش‌های مناسب برای ایجاد تغییرات ژنتیکی مفید کاربرد تکنیک کشت بافت و ایجاد تنوع سوماکلونال است که معمولا در اصلاح نباتات و توسعه واریته های زراعی اصلاح شده مناسب مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این مطالعه، هورمون زآتین به میزان به همراه زغال فعال جهت ساقه زایی در رقم سی اکرا بهینه سازی شد. از نشانگرهای RAPD برای بررسی تنوع سوماکلونال ایجاد شده در کشت بافت استفاده شد. این تحقیق، بیانگر توانائی نشانگرهای RAPD در بررسی تنوعات بوجود آمده در واکشت‌های مختلف می‌باشد. بطوریکه نتایج، نشان دهنده حضور بعضی باندها در ژنوتیپ های والدینی و حذف آن ها در واکشت ها و بالعکس عدم حضور بعضی باندها در ارقام والدینی و وجود این باندها در واکشت ها می باشد.**

**واژه های کلیدی:** .Gossypium hirsotum L، کشت بافت، مارکر RAPD، زآتین.

## مقدمه

پنبه یکی از گیاهان استراتژیک و اقتصادی است که نقش بسیار مؤثری در نساجی، تغذیه انسان، دام و اقتصاد کشور بازی می‌کند و در ایران به عنوان یکی از مهمترین وعمده‌ترین محصولات صادراتی غیر نفتی شناخته شده است. با توجه به این مسئله، افزایش عملکرد و کیفیت پنبه بسیار حائز اهمیت است.کشت دائمی و پیوسته ارقام گیاهان که معمولاً با اهداف زراعی خاص انجام می‌گیرد پس از گذشت سالیان طولانی می‌تواند باعث فرسایش ژنتیکی شود. به همین علت شناسایی تنوع ژنتیکی موجود در ارقام یا جمعیت‌های مختلف گیاه پنبه به منظور بهره‌گیری از آن‌ها در هیبریداسیون و اصلاح پنبه بسیار مهم است. اختلافات مورفولوژیکی ممکن است متأثر از اختلافات محیطی یا اختلافات ژنتیکی باشد لذا از نظر اصلاح نباتات آن دسته از تنوعاتی حائز اهمیت هستند که منشأ ژنتیکی داشته باشند (۱). لذا شناسایی تنوع ژنتیکی موجود در ارقام پرمحصول پنبه و همچنین ایجاد تنوع جدید ژنتیکی از طریق کشت بافت (تنوع سوماکلونال) از اهداف تحقیق حاضر می‌باشد.یکی از روش‌های ایجاد تنوع ژنتیکی در گونه‌های زراعی استفاده از تکنیک کشت بافت می‌باشد. مشخص شده است که می‌توان با تغییر تیمارهای هورمونی وهمچنین شرایط کشت بافت گیاهان باززایی شده در طی واکشتهای مختلف تنوعات جدید ژنتیکی ایجاد نمود. از مارکرهای

RAPD برای بررسی تنوع سوماکلونال در بسیاری از گونه های گیاهی استفاده شده است (۸،۴،۲ و۹) لذا تحقیق حاضر سعی دارد با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD به بررسی وجود و میزان تنوع ژنتیکی موجود در رقم سی اکرا پنبه تتراپلوئید و همچنین امکان ایجاد تنوع ژنتیکی از طریق کشت بافت بپردازد. نتایج بدست آمده می‌تواند در برنامه‌ریزی اصلاحی آتی پنبه مورد استفاده قرار گیرند.

## مواد و روش ها

بعد از جوانه زنی بذرها در محیط کشت MS در شرایط کاملا استریل، جداسازی لپه‌ها از دانه رست‌های ۱۵-۱۰ روزه انجام شد. مریستم انتهایی از دانه رستهای ۲۰-۱۵ روزه جدا و به سه محیط کشت هورمون دار انتقال یافتند: محیط MS1 که شامل MS + (0.1mg/L) زآتین، محیط MS2 که شامل MS + (0.1mg/L) زآتین + (0.5 g/L) زغال فعال، محیط MS3 که شامل MS + (0.1mg/L) زآتین + (2 g/L) زغال فعال به تمام محیط ها (30 g/l) ساکارز و (6g/l) آگار اضافه شد و pH حدود ۵/۸ قبل از اتوکلاو تنظیم گردید. در هر محیط کشت ۳ ریز نمونه قرارگرفت. کشت ها به مدت ۳۰ روز در محفظه رشد در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در معرض۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرارگرفتند. ریز نمونه های حاصل از مریستم انتهایی بعد از ۳۰ روز به محیط جدید انتقال داده شدند و این عمل تا ۷ واکشت ادامه یافت. پس از آنکه گیاهان تا اندازه ای رشد کردند (پس از گذشت یک ماه)، به منظور تهیه ریزنمونه (جدا کردن تک گره از گیاه) در شرایط استریل با اسکالپل برشهایی از گیاه تهیه شد سپس ریزنمونه-ها به محیط کشت جدید با همان ترکیب انتقال یافتند تا گیاهچه های جدید از جداکشت‌های تک گره ای باززایی شوند. رشد گیاهچه ها وخصوصیات مورفولوژیکی مختلف از قبیل طول ساقه، تعداد برگ، تعداد گره و میزان ریشه زایی در هر رقم و در طی هر واکشت مورد بررسی قرار گرفت. پس از انتقال ریز نمونه به محیط کشت و بررسی رشد آن ها در محیط های مختلف، برگ‌های گیاهچه های رشد یافته در شرایط استریل برای استخراج DNA آن ها جدا شد و جداکشت های تک گره ای برای واکشت مجدد به محیط های تازه منتقل شدند. جداسازی برگ ها از گیاهچه های رشد یافته و انتقال جداکشت های تک گره‌ای به محیط کشت تازه تا ۷ واکشت تکرار شد. در هر واکشت باززایی گیاهچه ها و رشد آن ها مورد بررسی قرار گرفت. روش استخراج DNA مبتنی بر استفاده از CTAB می‌باشد روش تغییر یافته Murry & Tompson می‌باشد (۳). در این تحقیق از ۳۰ پرایمر ۱۰ نوکلئوتیدی مخصوص واکنش RAPD استفاده شد. کلیه پرایمرهای مورد استفاده از شرکت(Operon Technology (Alameda, CA تهیه شدند. واکنش PCR ۱نانوگرم DNA الگو، Buffer PCR 1x شامل(10 mM Tris Hcl pH 8.8, 250 mM kcl) ، dNTP 200 µM و0.8 µM پرایمرهای تصادفی۱۰ جفت بازی و ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase، در حجم نهایی ۲۵ µl در نظر گرفته شد. تکثیر DNA در دستگاه Palmcycler Gp- 001 (Corbet, Australia) انجام شد. واسرشت شدن DNA الگو در دمای ۹۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه انجام گرفت و به دنبال آن واکنش تکثیری DNA در ۳۵ سیکل به شرح زیر انجام شد: واسرشت شدن در۹۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه،اتصال پرایمر در ۳۶ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و گسترش پرایمر در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه.انکوباسیون نهایی به مدت ده دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد برای حصول اطمینان از تکمیل و گسترش پرایمرها صورت گرفت.جهت آشکار سازی محصولات PCR از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۲ درصد مورد استفاده قرار گرفت. داده های RAPD به صورت دو حالته می باشند.بدین صورت که حضور باندها با کد ۱ و عدم حضور باندها با کد صفر مشخص می‌شود.پس از ارزش گذاری نشانگرهای RAPD به طریق فوق، آنالیزهای آماری زیر بر روی داده ها انجام گرفت. ضریب تشابه Juccard و نیز فاصله ی ژنتیکی Neis (۵) در بین ارقام مورد مطالعه محاسبه شد و برای گروه بندی ژنوتیپ ها روش Neighbor Joining (NJ) مورد استفاده قرار گرفت. برای نشان دادن

ارتباط ارقام در یک فضای دو بعدی، رسته بندی ارقام با استفاده از آنالیزPCO(Principal Coordinate analysis) انجام گرفت(۷،۱۱).

## نتایج و بحث

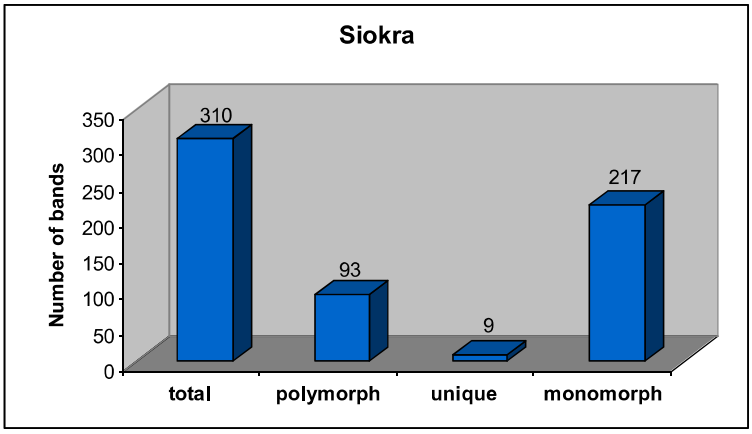
از ۳۰ پرایمر بکار رفته، ۲۱ پرایمر باندهای قابل کدگذاری ایجاد نمودند که در این میان، ۳۱۰ باند ایجاد شد، ۹۳ باند پلی مورف، ۲۱۷ باند مشترک و ۹ باناختصاصی بود (نمودار۱). نمودار تعداد کل باندها به همراه تعداد باندهای پلی مورف، باندهای مشترک و اختصاصی در رقم سی اکرا با هر پرایمر در نمودار۲ نمایش داده شده است.

پرایمر M۱۱ با ۲۱ باند، پرایمر M۱۷ با ۲۰ باند و پرایمر B۰۵ با ۱۹ باند بیشترین باندها را تولید کردند، در حالیکه پرایمر A۱۱ با ۴ باند کمترین باند را تولید نمود. پرایمرهای C۰۶، H02، H۱۶ با ۹ باند بیشترین باند پلی مورف و پرایمر B۰۷ ، H۰۷ ، H۱۴ با ۱ باند، کمترین باند پلی مورف را تولیدکردند. پرایمر H۰۷ هیچ باند پلی مورفی تولید نکرد.

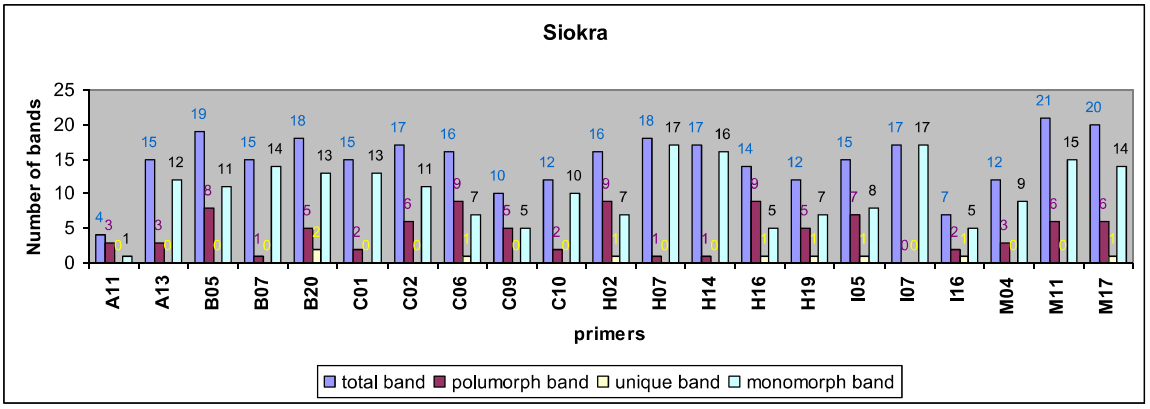
به طور کلی ۹ باند اختصاصی ایجاد شد. پرایمر B۲۰، ۲ باند اختصاصی و پرایمرهای C۰۶، H۰۲، H۱۶، H۱۹، I۰۵، I۱۶، M۱۷ هرکدام ۱ باند اختصاصی ایجاد کردند. باندهای اختصاصی توسط پرایمرهای (۳۲۰۰bp و ۶۰۰) B۲۰، (۱۴۰۰bp ) M۱۷ ، (۱۳۰bp )H۱۹، (۷۵۰bp ) I۰۵ در ژنوتیپ والدینی سی اکرا حاصل شد. بیشتر باندهای اختصاصی در ژنوتیپ والدینی سی اکرا تکثیر شدند.

باند ۲۷۰۰bp پرایمر I۱۶ ، باند ۴۰۰bp پرایمر C۰۶ و باند ۶۵۰bp پرایمر H۱۶ در گیاهان واکشت ششم دیده شدند و باند ۵۵۰bp پرایمر H۰۲ در گیاهان حاصل از واکشت سوم سی اکرا ایجاد شد. بعضی باندها در تمام ژنوتیپ ها به غیر از یک ژنوتیپ دیده شدند. برای مثال باند ۷۵۰bp پرایمر B۲۰ در تمام ژنوتیپ ها به غیر از گیاهان باززایی شده حاصل از واکشت ششم دیده شد. باندهای ۵۰۰bp، ۶۰۰bp ، ۷۲۰bp، ۸۵۰ bp و ۹۰۰bp در تمام واکشتها دیده شدند ولی در گیاهان حاصل از واکشت دوم حضور نداشتند، همین طور باندهای ۲۵۰bp، ۲۹۰۰bp پرایمر M۱۱ در تمام گیاهان باززایی شده بغیر از گیاهان حاصل از واکشت هفتم مشاهده شد. گروه بندیهای متفاوتی بر اساس داده های RAPD انجام گرفت و نتایج مشابهی حاصل شد در این قسمت دندورگرام با روش Nj توضیح داده می شود. دندروگرام مربوطه دارای ۳ خوشه ای اصلی بود. در خوشه اول، سی اکرای والدینی قرار گرفت. خوشه عمده دوم دارای گیاهان واکشتهای اول (SK۱ )، دوم (SK۲ )، سوم (SK۳ )، چهارم (SK۴) و پنجم (SK۵) بود (نمودار۳). در خوشه عمده سوم، گیاهان واکشتهای ششم و هفتم قرار گرفتند. بطوریکه ژنوتیپ والدینی و گیاهان حاصل از واکشت ششم و هفتم در یک گروه مجزا دور از سایر ژنوتیپها قرار گرفتند. بیشترین تشابه ژنتیکی بین گیاهان واکشتهای دوم (SK۲) و سوم (SK۳) بدست آمد و کمترین تشابه بین سی اکرا والدینی و واکشت ۶ مشاهده شد. آنالیز PCO نیز بر روی دادهها انجام گرفت و تفاوت ژنتیکی بین ژنوتیپ والدینی سی اکرا و گیاهان باززایی شده حاصل از واکشتها را تایید نمود. جدایی رقم والدینی و گیاهان حاصل از واکشتهای ۶ و ۷ از بقیه واکشتها در آنالیز PCO مشهود است (نمودار ۴). الگوی قطعات تکثیر شده با پرایمر OPI-05 در رقم سی اکرا وگیاهان باززایی شده در طی ۷ واکشت در شکل ۱نشان داده شده است.

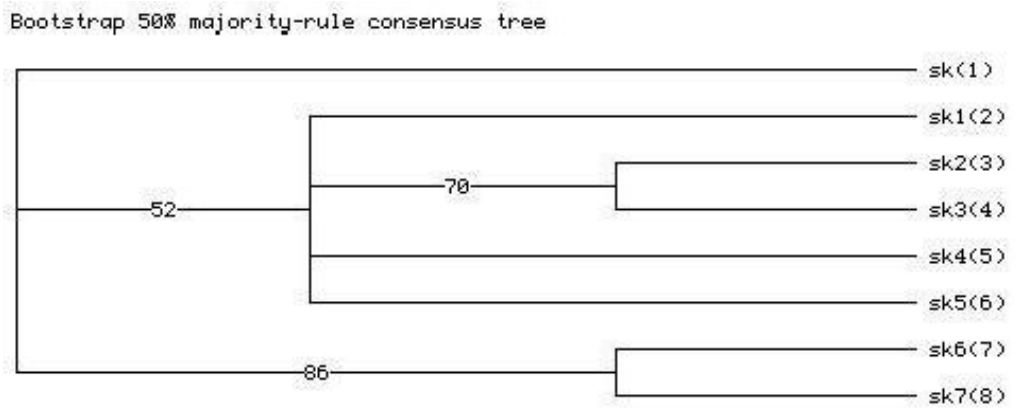
**نمودار۱- نمودار کل باندها به همراه باندهای مشترک، پلی مورف و اختصاصی در رقم سی اکرا**



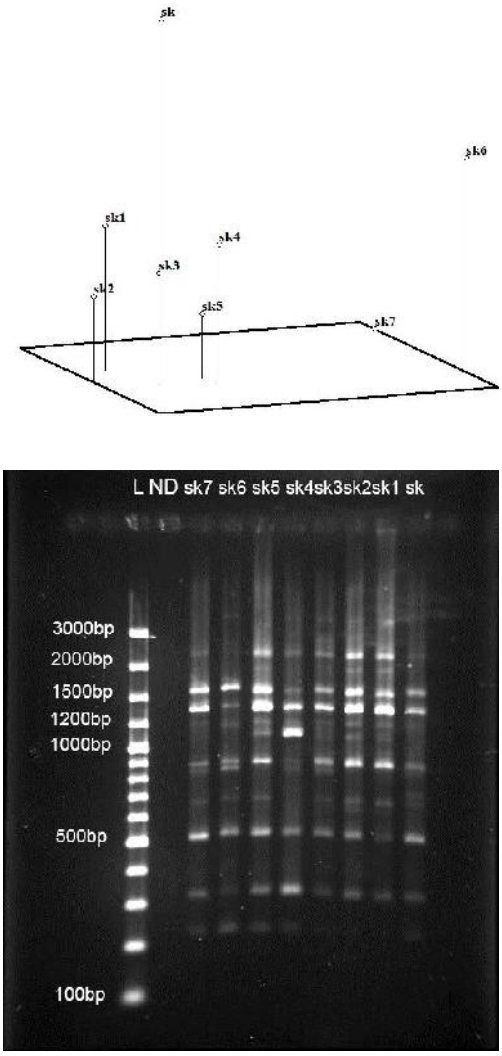

نمودار۲- نمودار تعداد کل باندها به همراه تعداد باندهای پلی مورف، باندهای مشترک و اختصاصی در رقم سی اکرا با هر پرایمر




نمودار۳- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه ای در رقم سی اکرا و گیاهان حاصل از واکشتهای آن با روشNJ




نمودار۴- نمودار رسته بندی PCO دررقم سی اکرا و گیاهان حاصل از واکشتهای آن بر اساس داده های مولکولی RAPD




**شکل ۱- الگوی قطعات تکثیر شده با پرایمر OPI-05 در رقم سی اکرا وگیاهان باززایی شده در طی ۷ واکشت**

رقم سی اکرا والدینی =SK، گیاهان واکشت اول سی اکرا=SK1،گیاهان واکشت دوم سی اکرا =SK2، گیاهان واکشت سوم سی اکرا =SK3، گیاهان واکشت چهارم سی اکرا =SK4، گیاهان واکشت پنجم سی اکرا =SK5، گیاهان واکشت ششم سی اکرا =SK6، گیاهان واکشت هفتم سی اکرا =SK7، M = مارکر 100bp (#SM0323)، ND= کنترل منفی.

تفاوت‌های مشاهده شده در تعداد کل باندهای RAPD و نیز باندهای اختصاصی در بین گیاهان والدینی وگیاهان باززایی شده حاصل از ۷ واکشت آن ها، بیانگر تفاوت ژنتیکی ژنوتیپ‌ها است که ناشی از کشت بافت و تنوع سوماکلونال است. حضور باند اختصاصی در گیاهان والدینی و فقدان آن در گیاهان باززایی شده حاصل از واکشت های مختلف، نشان دهنده فقدان جایگاه اختصاصی در روند کشت بافت است که ناشی از تنوع سوماکلونال است، در حالیکه پیدایش باندهای اختصاصی در گیاهان باززایی شده در واکشت های مختلف و نبود آن ها در گیاهان والدی، بیانگر وقوع تغییرات ژنتیکی است که منجر به تشکیل جایگاه اتصالی جدید در این گیاهان شده است. چنین جایگاههای اتصالی از اهمیت بالایی در شناسایی ژنتیکی ژنوتیپ ها یا سوماکلون ها از یکدیگر دارند. حتی تغییرات تک بازی در جایگاه اتصال پرایمر، در تشکیل و عدم تشکیل باندهای

RAPD تاثیر گذار است و تفاوت‌های مشاهده شده در الگوی RAPD ممکن است ناشی از عوامل مختلف همچون، ایجاد جایگاه اتصال جدید پرایمر و یا از بین رفتن جایگاه اتصال آن در اثر وقوع موتاسیون های نقطه ای یا دخالت عناصر ترانسپوزونی باشد (۶). بنابراین می توان اظهار کرد شرایط کشت بافت باعث القاء تغییرات ژنتیکی متنوعی در گیاهان باززایی شده مختلف شده است. تشکیل باندهای اختصاصی در گیاهان باززایی شده در واکشت‌های مختلف، وجود تنوع ژنتیکی و کاربرد کشت بافت در ایجاد تنوع ژنتیکی در این گیاهان را نشان می‌دهد. به نظر می رسد که تنوع ژنتیکی القاء شده در گیاهان باززایی شده رقم سی اکرا با گذشت زمان واکشت ها افزایش یافته است، چرا که گیاهان باززایی شده حاصل واکشت‌های بعدی، از ژنوتیپ-های والدینی و گیاهان حاصل از واکشت‌های اولیه فاصله دارند. بررسی‌های مولکولی بر روی ژنوم گیاهان مختلف که تنوع سوماکلونال را نشان دادند ثابت کرده است که قسمتی از ژنوم گیاه حساس و مستعد به استرس است و میزان وقوع موتاسیون در این قسمت نسبت به بقیه ژنوم بیشتر است (۱۰). بنابراین به نظر می رسد که تنوع سوماکلونال یک پدیده تصادفی نباشد، بلکه جایگاه خاصی از ژنوم نسبت به وقوع موتاسیون در مقایسه با قسمت‌های دیگر ژنوم مستعدتر می-باشد (۱۵،۱۲،۱۰). همچنین نتایج نشان می دهد که بعضی باندها تا واکشت هفتم دیده نشدند و در واکشت هفتم تکثیر یافتند و یا بعضی باندها تا واکشت سوم دیده نشدند و در واکشت های بعدی حضور داشتند. این یافته ها نشان دهنده ایجاد ژن جدید می‌باشد که در نتیجه آن باندهای جدید حاصل شده اند و به نظر می رسد که باندهای جدید در فرآیند تغییرات سوماکلونال ایجاد شده باشند.

## منابع


1. Agrawal, D.C., Banerjee, A.K., Kolala, R.R. (1997). In vitro induction of multiple shoots and plant regeneration in cotton (Gossypium hirsutum L). Plant Cell Reports, 16,647-652.

2. Hashmi, G., Huettel, R., Meyer, R., Krusberg. L., Hammerschlag, F. (1997). RAPD analysis of somaclonal variants derived from embryo callus cultures of peach. Plant Cell Reports, 16, 624 – 627.

3.Murry, M.G., Tompson, W.F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acid Reserch, 8,4321-4325.

4. Munthali, M. T., Newbury, H. J., Ford-Lloyd, B. V. (1996). The detection of somaclonal variants of beet using RAPD. Plant Cell Reports, 15( 7), pp 474-478

5.Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. American Naturalist, 106,283-92.

6.Peschke, V.M., Philip, R.L., Gengenbach, B.G. (1991). Genetic and molecular analysis of tissue-culture-derived Ac elements. Theor Appl Gene, 82,121-129.

7-Podani, J.(2000). Introduction to the Exploration of Multivariate Data. Backhuys. Publishers, Leiden, 404-409.

8. Rani, V., Parida, A., Raina, S.N. (1995). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of Populus deltoids. Marsh Plant Cell Report, 14,459-462.

9. Soniya, E.V., Banerjee, N.S., Das, M.R (2001). Genetic analysis of somaclonal variation among callus-derived plants of tomato. Cur Sci, 80, 1213-1215.

10-Thomas, J., Cullis, M.A., Kunert, K., Engelborghs, I., Swennen. R., Cullis, C.A. (2002). DNA markers for the

detection of genomic antegrity. 3rd Int. Symp. on Molecular and Cellular Biology of Banana, September 9-11, Leuven, Belgium. Abstracts; 18.

11-Weising, K., Nybom, H., Wolf, K., Kahl, G. DNA Finger Printing in Plants. Second edition. CRC Press- Taylor & Francis; 2005. Pp. 444.

12- Xie, Q. J., Oard, J. H., Rush, M. C. (1995). Genetic analysis of an unstable, colored-hull rice mutation derived for rice tissue culture. J. Heredity, 86, 154-156.

13- Xie, Q. J., Rush, M. C., Cao, J.(1990). Somaclonal variation for disease resistance in rice (Oryzae sativa L.), p. 491-509. In: Grayson, B. T., et al. (Eds.). Pest Management in Rice. Elsevier Applied Science, London and New York

14- Xie, Q. J., Rush, M. C., Linscomb, S.D. (1996). Inheritance of homozygous somaclonal variation in rice. Crop Sci, 36,1491-1495.

15-Xie, Q.J., Rush, M.C., Oard, J.H. (1995). Homozygous variation in rice somaclones:nonrandom variation instead of mitotic recombination.Crop Sci, 35,954–957.