

همبستگی آلل‌های پراکسیداز و توالی‌های ساده تکرار شونده

در تنوع سوماکلونال حاصل از کشت درون شیشه

Eucalyptus microtheca F. Muell

مرتضی شبان‌نژاد ممقانی^{*}، منصور امیدی^۲، محمدحسن عصاره^۳، محمد متینی‌زاده^۴، مسیح فروتن^۵، عباس قمری‌زارع^۶، شکوفه شهرزاد^۷، مریم جبلی^۸

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

۲- استاد پرديس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، گروه زراعت و اصلاح نباتات
۳- عضو هیأت علمی موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع ایران
۴- 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 هورمون‌های در محیط MS (با نیمی از مقادیر NH_4NO_3 و KNO_3) همراه با سطوح متفاوت هورمون‌های NAA (α-Naphthalene Acetic Acid) و TDZ (Kinetin) در گیاهچه‌های بازیابی 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 χ^2 بود.

واژه‌های کلیدی

همبستگی نشانگرها،
پراکسیداز،
میکروستلات،
Thidiazuron
Eucalyptus

مقدمه

ژنتیکی 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 (۲۴) و Russell و همکاران (۲۵)، وجود همبستگی در نقشه‌های ژنتیکی نشانگرهای آنژیمی و مولکولی را به اثبات رسانده است. همبستگی نشانگر مولکولی SSR با دیگر نشانگرهای مولکولی بر روی گیاهان سویا و جو (۲۶ و ۲۷) مقادیر کم همبستگی را نشان می‌دهد، همچنین با استفاده از آزمون Mental (۱۸) همبستگی ایزوآنژیم‌ها 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 $r = .80$ 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 برد شود.

در این پژوهش با استفاده از سطوح متفاوت هورمون TDZ گیاه‌چهای باززایی شده از کالوس‌های *E. microtheca* بدست آمده و سپس تغییرات آنژیم پراکسیداز و توالی‌های ساده تکرار شونده و همبستگی آنها مورد ارزیابی قرار گرفت تا نحوه تأثیر این مکان‌های ژنی بر روی بیان آنژیم پراکسیداز مشخص گردد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در اردیبهشت (۱۳۸۶) سرشاخه‌های سبز فاقد بافت چوبی در یک گیاه حاصل از بذر که به مدت یک سال در گلخانه نگهداری شده بود، به عنوان ریزنمونه جدا شدند. ریزنمونه‌ها برای ضدغوفنی سطحی، درون آب حاوی چند قطره تویین به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. سپس با آب مقطر شستشو شدند و توسط کلرومکوریک (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)

آنژیم پراکسیداز در تولید دیواره سلولی، اتصال عرضی پلی‌ساقاریدها و لیگنین سازی نقش دارد (۶، ۱۰ و ۲۳). از این آنژیم به عنوان نشانگری برای شناسایی اندامزایی و جنین‌زایی نام برده شده است (۲۳). از طرفی تغییر معنی‌دار فعالیت پراکسیداز و کاتالاز به عنوان 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 برآورده 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 آنژیم به عنوان نشانگر برای انواع مقاومت‌ها نام برده شده است که در هنگام ایجاد تنش فعالیت بیشتری دارد (۹). بنابراین، فعالیت پراکسیداز متأثر از شرایط محیطی، ژنتیک و اثر متقابل این دو می‌باشد. ما در کشت درون شیشه کلیه عوامل محیطی و

اسید سیتریک) و بافر الکتروولیت (۷/۲ گرم در لیتر گلایسین و ۱/۵ گرم در لیتر تریس) با شدت جریان ۳۰۰ ولت و ۱۰۰ میلی آمپر به مدت ۴ ساعت بارگذاری گردید. برای سفت شدن هر دو ژل از ۱ میلی لیتر محلول آمونیوم پروکسو دی سولفات (۱/۴) گرم در لیتر) و چند قطره تمد استفاده شد. از هر نمونه به میزان ۵۰ میکرولیتر به درون هر چاهک تزریق شد. به منظور رنگ آمیزی از ۱۸۰۰ میکرولیتر محلول کاربیازول، ۰/۰۴ گرم کاربیازول، ۱۲۰۰ میکرولیتر اتانول مطلق و ۶۰۰ میکرولیتر اسید استیک) همراه با ۷۵۰ میکرولیتر H_2O_2 ۳ درصد و ۱۰۰ میلی لیتر استات سدیم (۵۰ میلی مولار، 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 توالی های ساده تکرار شونده

استخراج DNA به روش Doyle و Doyle (۷)، برای ۳۳ گیاهچه حاصل از کشت بافت انجام شد. آزمون PCR توسط آغازگرهای EMCRC09 (۳۰) و EMBRA06 (۴) و شکلی 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 میلی مولار MgCl_2 ، ۰/۲ میلی مولار از هر کدام از dNTP ها، ۰/۴ میکرومولار از هر کدام از آغازگرهای 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 واسرتونه پلی آکریلامید ۶ درصد با رنگ آمیزی نیترات نقره انجام گرفت.

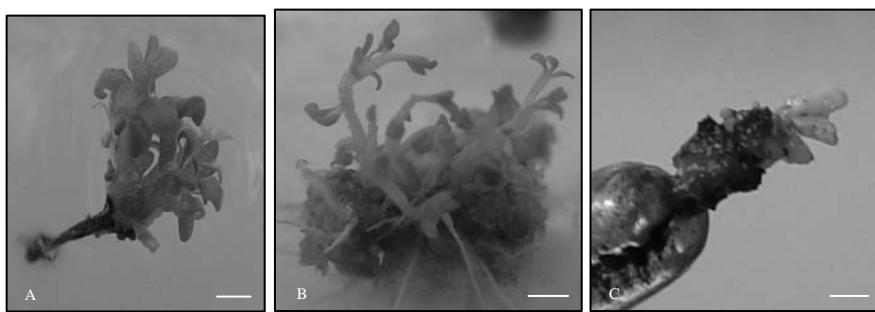
جدول ۱- تیمارهای هورمونی استفاده شده جهت بازبایی

تیمارها	هورمون ها	متوسط تعداد بازبایی (درصد)
B _۱	TDZ0/0(mg l ⁻¹)+Kin1/0(mg l ⁻¹)+NAA1/0(mg l ⁻¹)	۶
B _۲	TDZ0/01(mg l ⁻¹)+Kin0/5(mg l ⁻¹)+NAA4/0(mg l ⁻¹)	۲۰
B _۳	TDZ0/1(mg l ⁻¹)+Kin0/5(mg l ⁻¹)+NAA4/0(mg l ⁻¹)	۵۲
B _۴	TDZ0/5(mg l ⁻¹)+Kin1/0(mg l ⁻¹)+NAA1/0(mg l ⁻¹)	۱۹
B _۵	TDZ1/0(mg l ⁻¹)+Kin1/0(mg l ⁻¹)+NAA1/0(mg l ⁻¹)	۳

شستشو شدند. برای بازبایی از محیط کشت MS با نیمی از مقادیر NH_4NO_3 استفاده شد (۲۰). مطابق جدول (۱) پنج تیمار متفاوت هورمونی به محیطها اضافه گردید (در این مقاله به اختصار از B_۱ تا B_۵ برای این تیمارها استفاده شده است). پس از تنظیم pH (۵/۷±۰/۱)، محیطهای کشت به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۰ درجه سانتی گراد اتوکلاو گردیدند. پس از ضد عفونی، ریزنمونه ها به طول ۱ تا ۱/۵ سانتی متر 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 چرخه نوری ۱۶ ساعت روشنایی (۲۷ درجه سانتی گراد) و ۸ ساعت تاریکی (۱۹ درجه سانتی گراد) نگهداری شد. پس از این مدت، از برگ های گیاهچه های حاصل از کشت بافت برای مطالعات بعدی نمونه گیری انجام گرفت.

بررسی کیفی پراکسیداز

استخراج عصاره و الکتروفورز ژل پلی آکریلامید به روش PAGE با استفاده از روش Stich و Ebermann (۸) برای ۲۷ گیاهچه حاصل از کشت بافت صورت گرفت. ۰/۱ گرم برگ تازه در ۰/۳ میلی لیتر محلول استخراج (pH=۷/۵) هموژنیزه گردید و به مدت ۴۸ ساعت در ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. محلول رویی برای الکتروفورز استفاده شد. الکتروفورز با استفاده از ژل جدا کننده 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 اسید سیتریک تنظیم شده بود، همراه با ژل جمع کننده ۵ درصد (۵ گرم در لیتر آکریلامید، ۸/۳۳ گرم در لیتر بیس آکریلامید، ۱۵ گرم در لیتر تریس و ۸/۴۱ گرم در لیتر



شکل ۱- تیپ‌های مختلف باززایی در کشت درون شیشه A: *E. microtheca* باززایی مستقیم در تیمار B_۱
B: وجود کالوس‌های جنین‌زا در تیمار B_۲، C: باززایی غیرمستقیم در تیمار B_۳

جنین‌زایی سوماتیکی کاهش یافت. باززایی در ۱۹ B_۴ درصد بود (شکل ۱- C). در تیمار ۵ کالوس‌ها متراکم و سخت شدند که در نتیجه، باززایی غیرمستقیم به ۳ درصد کاهش یافت. پس از تمايززدایی، 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_۱ همه آلل‌ها حضور داشته و آلل‌های PDB3، PDB2 و PTB5 فعالیت بیشتری یافتند (شکل ۲- B). ولی در تیمارهای B_۲ و B_۳ 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_۴ همه آلل‌ها حضور داشتند و فعالیت مکان رُنی تترامر به شدت افزایش یافته بود، در ۵۰ درصد دیگر نیز از فعالیت مکان رُنی دیمر به شدت کاسته شده بود (شکل ۲- D و E). آلل‌های پراکسیداز در گیاهچه‌های حاصل از باززایی توسط تیمار ۵ رفتارهایی به مانند B_۴ از خود نشان دادند (شکل ۲- F و G).

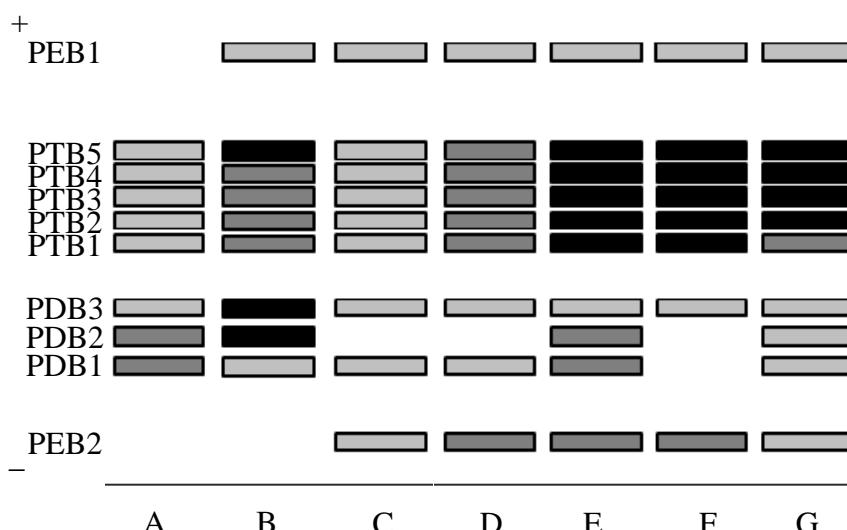
آنالیزهای آماری

داده‌های به دست آمده از باززایی تیمارهای متفاوت با استفاده از فرمول $(Y+0/5)/\sqrt{N}$ 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).

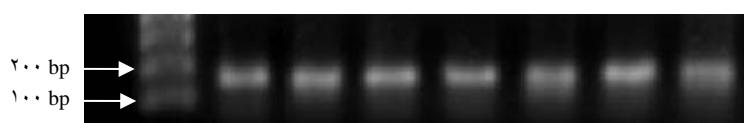
نتایج

کشت بافت

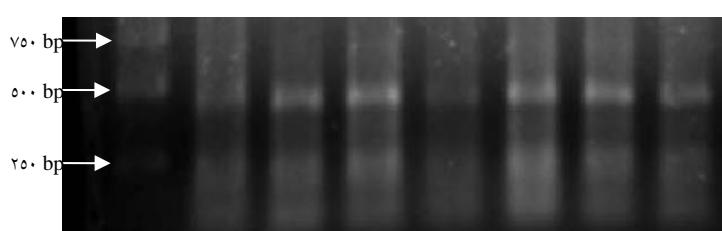
پس از گذشت ۴ هفته، ریزنمونه‌ها در تیمار B_۱ به صورت مستقیم باززایی شدند (شکل ۱- A). با اضافه شدن هورمون TDZ به NAA و Kin، مقدار باززایی از ۶ درصد در B_۱ به ۲۰ درصد در B_۲ رسید. بیشترین باززایی در B_۳ به مقدار ۵۲ درصد مشاهده شد. در این تیمار، باززایی به صورت جنین‌زایی سوماتیکی دیده شد (شکل ۱- B). در B_۴ کالزالی به شدت افزایش یافته و باززایی غیرمستقیم به بیشترین مقدار رسید، در حالی که باززایی به صورت



شکل ۲- زیموگرام باندهای پراکسیداز گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت A: گیاه مادر دارای دو مکان ژنی دیمر و تترامر، B: فعالیت آلل‌ها در تیمار B₁ و ظاهر شدن باند جدید (PEB1) در محدوده مولکول‌های سبک، C: فعالیت آلل‌ها حاصل از تیمارهای B₂ و B₃ 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 B₂ و B₃ بصورت جدا از یکدیگر بارگذاری شدند)، D: نمایان شدن مجدد آلل هتروزیگوت (PDB2) در تیمار B₄، E: کاهش فعالیت مکان ژنی دیمر در B₅، F و G: فعالیت شدید هر دو مکان ژنی در تیمارهای B₄ و B₅ (مقدار فعالیت باندها در ۳ سطح شدید: سیاه، متوسط: خاکستری و کم: خاکستری روشن نشان داده شده است، P: Band، E: Epigenetic، T: Tetramer، D: Dimer، P: Peroxidase، +: به ترتیب محدوده مولکول‌های سبک و سنگین می‌باشند).



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



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

جدول ۲- نتایج حاصل از آزمون χ^2

	EMBRA06		EMCRC09		
	Df	Probability	Df	Probability	
بندهای پراکسیداز	PEB1	۱	.۰/۸۴۴۶n.s	۱	.۰/۸۴۴۶n.s
	PTB5	۱	.۰/۸۴۴۶n.s	۱	.۰/۰۰۰۱**
	PTB4	۱	.۰/۸۴۴۶n.s	۱	.۰/۰۰۰۱**
	PTB3	-	-	-	
	PTB2	۱	.۰/۰۱۲۶*	۱	.۰/۰۱۲۶*
	PTB1	۱	.۰/۰۷۷۸n.s	۱	.۰/۰۷۷۸n.s
	PDB3	۱	.۰/۰۰۳۳**	۱	.۰/۷۲۴۲n.s
	PDB2	۱	.۰/۳۷۷۸n.s	۱	.۰/۳۷۷۸n.s
	PDB1	۱	.۰/۰۷۷۸n.s	۱	.۰/۵۵۶۶n.s
	PEB2	۱	.۰/۰۵۶۶n.s	۱	.۰/۰۵۶۶n.s

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

* معنی دار در سطح ۵ درصد، ** معنی دار در سطح یک درصد و n.s عدم وجود اختلاف معنی دار می باشد.

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 کالزالزی باززا شدند. با اضافه کردن TDZ به مقدار ۰/۰۱ میلی‌گرم در لیتر به تیمار B₂ حجم کاللوس اندکی افزایش یافته و باززایی به صورت جنین‌زایی سوماتیکی بود. به بیانی اثر NAA و Kin در TDZ در مقادیر بسیار کم چیرگی داشت. در تیمار B₃ 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 کاللوس‌ها 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، ستز و تجمع و تعدیل دیگر سیتوکنین‌های درونزاد دارد (۳۴).

نتایج حاصل از مارکر مولکولی SSR EMBRA06 بر روی ژل آگاروز یک باند بسیار شفاف در حدود ۱۵۰ جفت بازی با تکرار پذیری 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 و اسرشته پلی آکریلامید تنها گیاهچه شماره ۲۳ فاقد باند بود. وجود چند شکلی برای گیاهچه‌های ۱۴ و ۲۹ توسط آغازگر EMCRC09 بر روی ژل و اسرشته 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 EMBRA06 و EMCRC09 بر روی دو باند اپیژنیک پراکسیداز (PEB1 و PEB2) و آller (PEB2 و PEB1) 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 Spearman (۲۹) بیشترین مقدار را به آغازگر EMBRA06

جدول ۲. ضرایب همبستگی رتبه‌ای Spearman

آغازگر	باندهای پراکسیداز	ضریب رتبه‌ای Spearman	آغازگر	باندهای پراکسیداز	ضریب رتبه‌ای Spearman
EMBRA06	PEB1	-0/037	EMCRC09	PEB1	-0/037
EMBRA06	PTB5	-0/037	EMCRC09	PTB5	1
EMBRA06	PTB4	-0/037	EMCRC09	PTB4	1
EMBRA06	PTB3	-	EMCRC09	PTB3	-
EMBRA06	PTB2	0/4714	EMCRC09	PTB2	0/4714
EMBRA06	PTB1	0/3333	EMCRC09	PTB1	0/3333
EMBRA06	PDB3	0/5556	EMCRC09	PDB3	-0/0667
EMBRA06	PDB2	0/1667	EMCRC09	PDB2	0/1667
EMBRA06	PDB1	0/3333	EMCRC09	PDB1	-0/1111
EMBRA06	PEB2	-0/1111	EMCRC09	PEB2	-0/1111

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 ثُنی دیمیر به مقدار $r=0.56$ وجود دارد که نشان دهنده تاثیر نسبی توالی تکثیر شده بوسیله این آغازگر بر روی سنتز پراکسیداز می‌باشد. ولی توالی آغازگر PTB4 و EMCRC09 تاثیر معنی‌داری بر روی آلل های PTB5 و PTB4 داشته (جدول ۲) و برای آنها ضریب کامل وجود دارد (جدول ۳). بنابراین TDZ بر روی این توالی تاثیر گذاشته و آلل های یک مکان ثُنی تترامر را متأثر ساخته است.

در تیمارهای B₂ و B₃ از فعالیت همه آلل ها 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 ثُنی دیمیر می‌گردد. این پدیده می‌تواند ناشی از سنتز یک بازدارنده برای پرومودر پراکسیداز (۱۳) و یا جهش باشد (۱۶). وجود همبستگی پایین میان ماتریس ضرائب تشابه ایزوآنژیم پراکسیداز و میکروستلایت‌ها ($r=0.18$) بواسطه استفاده از آزمون Mental (۱۸) تشابه زیادی با نتایج Sun و همکاران (۳۱) دارد. دلیل این

در باززایی مستقیم ریزنمونه‌های کوتیلدونی صنوبر سفید بوسیله هورمون TDZ میزان فعالیت پراکسیداز کاهاش می‌یابد (۳۳). این گزارش کاملاً با یافته‌های این پژوهش مطابقت و همسویی دارد زیرا از فعالیت آلل ها کاسته شده و آلل PDB2 نیز ناپدید شده است. همچنین با ورود به فاز جنین‌زایی سوماتیکی که ارتباط بین جنین‌ها و کالوس به طور کامل از بین می‌رود، میزان پراکسیداز نیز به شدت کاهش یافت. اما اختلاف قابل ملاحظه‌ای بین B₄ و B₅ که باززایی غیرمستقیم در آنها دیده شد وجود نداشت. بنابراین با افزایش مقدار سیتوکین TDZ مقدار فعالیت پراکسیداز افزایش داشته است. این دلیلی آشکار جهت تأیید خصوصیت تعديل 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 و ۳۵). با استفاده از هورمون‌های NAA و Kin یک باند اپی‌ژنتیک (PEB1) در تمامی باززایی‌ها ظاهر می‌گردد. همچنین گیاهچه‌های متأثر از هورمون TDZ باند اپی‌ژنتیک دیگری (PEB2) را به وجود می‌آورند. توالی‌های SSR

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.

عدم وجود همبستگی می‌تواند قرار گرفتن مکان‌های ثابت میکروستلایت در قسمت‌های غیرفعال^۱ توالی‌های DNA باشد (۳).

چند شکلی در توالی‌های ساده تکرار شونده بر روی ایزوآنزیم‌ها موثر است (۱۲). بیان پرومتر پراکسیداز که در نواحی غیرفعال DNA گیاه تباکو 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 مقدار کم) و یا بیان مجدد آلل مذکور (در مقدار بیشتر) می‌توان بیان داشت، نظریه Klotz و Lagrimini (۱۳) مبنی بر اثر فیتوهورمون‌ها در کنترل پرومتر پراکسیداز می‌تواند صحیح باشد.

در مجموع، بدلیل قرار گرفتن توالی‌های پرومترهای 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 مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع ایران انجام گردیده است. نویسنده‌گان به این وسیله از دکتر محسن مردمی و مهندس مصطفی پیرسیدی جهت ارائه تجربیاتشان قادرانی 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.

^۱ Nonfunctional

همستگی آلل های پراکسیداز و توالی های ساده تکرار شونده در ...

- 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-Marof 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 characterisation 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. dunnii*. 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.

