مقاله پژوهشی

نشریه علمی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۲۸، شماره ۲، صفحه ۲۱۱-۲۰۳ (۱۳۹۹)

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ijrfpbgr.2021.352289.1374
شناسه دیجیتال (DOR): 98.1000/1735-0891.1399.28.203.56.2.1578.82

تأثیر واکشت بر تنوع سوماکلونال کالوس بنگدانه (*Hyoscyamus niger*) با استفاده از نشانگرهای ISSR

سارا طهماسبی گوجگی[۱]، کمال‌الدین حق‌بین[۲]، امیر موسوی[۳*] و خسرو پیری[۴]

۱- دانش‌آموخته دکتری، گروه علوم باغبانی و زراعی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران

۲- استاد، پژوهشگاه ملی ژنتیک و زیست‌فناوری، پژوهشکده بیوتکنولوژی گیاهی، تهران

۳*- نویسنده مسئول مکاتبات، دانشیار، پژوهشگاه ملی ژنتیک و زیست‌فناوری، پژوهشکده بیوتکنولوژی گیاهی، تهران

پست‌الکترونیک: m-amir@nigeb.ac.ir

۴- استاد، دانشگاه بوعلی سینا همدان، دانشکده ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، همدان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۸/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۱۷

چکیده

به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی در کشت درون شیشه‌ای دو نمونه کالوس گیاه دارویی بنگدانه (*Hyoscyamus niger*) شامل کالوس جدید (یک ماهه) و کالوس قدیمی (یکساله) در مقابل برگهای تازه گیاه، از نشانگر تکرار توالی ساده (ISSR) استفاده شد. با استفاده از ده آغازگر ۶/۴۹ درصد چندشکلی در سه نمونه ذکرشده مشاهده شد. تجزیه وتحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) ۶۸ درصد تنوع ژنتیکی را بین نمونه‌ها نشان داد. همچنین از ضرایب (ماتریس تشابه) جاکارد و دایس با روش‌های UPGMA و NJ استفاده شد. بهترین دندروگرام برای نشان دادن تنوع ژنتیکی (دوری یا نزدیکی افراد)، استفاده از ضریب تشابه جاکارد بود. نتایج آنالیز خوشه‌ای نمونه‌ها را در دو گروه متفاوت گروه‌بندی کرد. این دسته‌بندی توسط تجزیه و تحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCoA) نیز تأیید شد. گروه اول شامل کالوس‌های قدیمی و گروه دوم شامل کالوس‌های جدید و برگ‌های گیاه بود. نتایج حکایت از این داشتند که تنوع سوماکلونال در کالوس‌های بنگدانه با افزایش تعداد دفعات واکشت افزایش می‌یابد.

واژه‌های کلیدی: آلکالوئیدهای پیرولیزیدین، ارزیابی ژنتیکی، تنوع سوماکلونال، Jaccard، PCoA، NJ

مقدمه

بنگدانه (خانواده سولاناسه Solanasceae) یک گونه علفی است که به‌صورت خودرو در مناطق مختلف ایران رشد می‌کند و یکی از برجسته‌ترین گیاهان طبیعی ایران است (Li, Shi *et al.* 2011). در فلور خانواده سولاناسه، Khatamsaz و همکاران (۱۹۹۸) ۱۳ گونه از این جنس را از ایران گزارش کردند که ۷ گونه آن به‌طور انحصاری متعلق به ایران است. اهمیت اقتصادی این گیاه به دلیل تروپان آلکالوئیدهای ارزشمندی همانند هیوسیامین و آسکوپولامین است که دارای خواص درمانی فراوان ازجمله ضداسپاسم، تسکین‌دهنده و آرام آرام‌بخش برای دردهای عصبی و کاهش‌دهنده اضطراب می می‌باشند (Sengupta, Vinayagam *et* Li, Shi et al. 2011, *al.* 2011). متأسفانه با وجود اینکه کشور ایران از نظر ژرم پلاسم گیاه بنگدانه بسیار غنی است، هنوز هیچ‌گونه رقم زراعی برای کشت این گیاه با ارزش معرفی نشده است و برداشت آن همچنان از رویشگاه‌های طبیعی انجام می‌شود (Yousefi, *et*

(*al.,* 2009 با شناخت بهتر و اهلی‌سازی این گیاه بومی با بهره‌گیری از روشهایی مانند ریزازدیادی درون شیشه‌ای می‌توان علاوه بر اینکه از خطر انقراض منابع ژنتیکی بنگدانه جلوگیری نمود، آلکالوئیدهای ارزشمند این گیاه را نیز تولید و از نظر اقتصادی به ارزآوری یا جلوگیری از خروج ارز از کشور کمک کرد.

در کشت‌های درون شیشه‌ای سلول و بافت گیاهی عوامل متعددی ازجمله روش تکثیر، ژنوتیپ و نوع ریزنمونه، غلظت تنظیم‌کنندگان رشد، تعداد و فاصله واکشت و غیره می‌تواند باعث تغییرات ژنتیکی در سلول‌ها شود و بعضاً ژنوتیپ و حتی فنوتیپ گیاه مادری را تغییر دهد (Ahmed, *et al*. 2012, Peng, *et al*. 2015). تنوع سوماکلونال در کشت بافت و سلول می‌تواند منبع مناسبی برای تولید کلون‌های جدید یا حتی صفات مطلوب طی برنامه‌های به‌نژادی گردد (Bennici, *et al*. 2004, Bairu, *et al*. 2011).

نشانگرهای مولکولی ابزارهای مناسب و ارزشمندی به به‌منظور تجزیه‌وتحلیل تنوع سوماکلونال در کشت‌های درون شیشه‌ای گیاهان هستند. پیشتر از این نشانگرها برای بررسی تنوع سوماکلونال در گیاهان دارویی استفاده شده است(Shabannejad Mamaghani *et al.,* 2010) در حال حاضر چندین روش سنجش مولکولی برای تشخیص تغییرات توالی ژنتیکی گیاهان و سوماکلون‌ها در دسترس است. در این میان نشانگرهای مولکولی از کارایی بالایی برخوردارند. اغلب برای بررسی تنوع ژنتیکی از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) استفاده می‌شود (Bibak, and Aghaabbasi, 2018). نشانگرهای مولکولی ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) علاوه بر اینکه چندشکلی بالایی ایجاد می‌کنند، در مطالعات ژنتیکی و تنوع سوماکلونال بسیار مفید و رایج هستند. این نشانگرها اولین بار در سال ۱۹۹۴ ارائه شد و در آن قطعه‌ای از DNA که در فاصله بین دو میکروستلایت شبیه به هم و معکوس هم قرار دارند، تکثیر می‌شود (Noormohammadi *et al*. 2011).

این مطالعه با هدف ارزیابی تنوع سوماکلونال بین سه نمونه برگ و کالوس‌های جدید و قدیمی بنگدانه طی واکشت‌های متوالی انجام شده است. ارزیابی پایداری ژنتیکی در کشت‌های درون شیشه‌ای امکان شناسایی گیاهان خارج از تیپ (Off Type) را فراهم می‌کند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و القای کالوس

بذرهای گیاه بنگدانه در اواخر خرداد ماه سال ۱۳۹۶ از کیلومتر ۱۵ جاده اردبیل به سمت اسالم جمع‌آوری شدند. سپس بذرها با روش مرسوم با استفاده از محلول NaOCL و الکل ضدعفونی گردیدند (Shen, *et al*. 2007). بذرهای ضدعفونی شده در محیط کشت MS بدون هورمون و تاریکی نگهداری شدند. جوانه‌زنی پس از هفت روز آغاز شد (میزان جوانه‌زنی ۸۵ درصد) بود. به‌منظور کال‌زایی گیاهچه‌های تشکیل شده از لپه‌ها و ریشه‌چه (به ارتفاع دو سانتی‌متر) به دو قطعه تقسیم شده و محور هیپوکوتیل در محیط کشت MS حاوی $۱۰^{-۵}$ مول در لیتر هورمون کاینتین و $۱۰^{-۶}$ مول در لیتر هورمون 2,4 Dمنتقل شدند. پس از گذشت ۱۴ روز، کال‌زایی آغاز شد و پس از ۲۰ روز کالوس‌ها به اندازه و کیفیت مناسب رسیدند. کالوس‌های به‌دست آمده هر ۱۵ روز یکبار برای مدت یک‌ماه و یکسال در همان محیط کشت واکشت شدند (به‌ترتیب دو و ۲۴ مرتبه برای کالوس‌های جدید و قدیمی).

استخراج DNA و استفاده از نشانگر مولکولی ISSR

کل DNA ژنومی سه نمونه شامل برگ، کالوس جدید و کالوس قدیمی با استفاده از روش CTAB تغییریافته استخراج شد (Murray and Thompson 1980). کیفیت DNA با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد تأیید شد. برای ارزیابی ISSR، ده آغازگر طراحی شده توسط دانشگاه بریتیش کلمبیا و تهیه شده از شرکت Metabion international، براساس قابلیت تولید باندهای تکرارپذیر، وضوح باندها و چندشکلی انتخاب شدند (جدول ۱). واکنش واکنش‌های PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر، حاوی ۱۰ میلی میلی‌مولار بافر تریس با اسیدیته ۸، ۱/۵ میلی‌مولار

MgCl2، ۰/۲ میلی‌مولار از هریک از نوکلئوتیدها، ۰/۲ میکرومولار آغازگر، ۲۰ نانوگرم DNA ژنومی و ۰/۱ واحد از DNA تگ پلیمراز (ساخت شرکت بیورن آلمان) بود. واکنش‌های تکثیر در دستگاه ترموسایکلر T100 ساخت شرکت بیورد امریکا با ۵ دقیقه دناتوراسیون اولیه در ۹۴ درجه سانتیگراد و ۳۵ دوره شامل یک دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد، یک دقیقه در ۵۵ درجه سانتیگراد و دو دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد انجام شد. محصولات واکنش با استفاده از رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد مشاهده شد. برای اندازه‌گیری قطعات حاصل از تکثیر از نردبان مولکولی ۱۰۰ جفت بازی ساخت شرکت فرمنتاس آلمان استفاده شد. کلیه ارزیابی‌ها در سه تکرار انجام گردید.

جدول ۱- آغازگرهای ISSR استفاده شده در ارزیابی ژنتیکی سه نمونه مورد بررسی گیاه بنگدانه

ردیف	نام آغازگر ISSR	توالی
۱	UBC807	(GA)8T
۲	UBC811	(GA)8C
۳	UBC834	(AG)8YT
٤	(AGC)5GG	(AGC)5GG
٥	(AGC)5GC	(AGC)5GC
٦	(AGC)5GT	(AGC)5GT
۷	(AGC)5GA	(AGC)5GA
۸	(GA)9C	(GA)9C
۹	(GA)9T	(GA)9T
۱۰	(GA)9A	(GA)9A

تحلیل آماری

داده‌های ISSR به‌صورت دو وضعیتی می‌باشند، بدین ترتیب حضور باندها با کد یک و عدم حضور باندها با کد صفر مشخص شد. پس از ارزش‌گذاری نشانگرهای ISSR به روش بالا، تحلیل‌های آماری بر روی داده‌ها انجام شد. در ابتدا ماتریس شباهت بین ارقام با استفاده از ضرایب تشابه Jaccard تهیه گردید. سپس به‌منظور گروه‌بندی نمونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار GenAlex 6.4 آنالیزهای تجزیه خوشه‌ای با روشهای UPGMA، تجزیه وتحلیل مؤلفه‌های اصلی (PCOA) و اتصال همسایگی (NJ) بر اساس کلیه باندهای تکثیر شده انجام شد. به منظور محاسبه پارامترهای ژنتیکی همانند تعداد الل‌های متفاوت (Na)، تعداد الل‌های مؤثر (Ne)، اندیس شانون (I)، درصد پلی‌مورفیسم یا چندشکلی و هتروزیگوتی مورد انتظار (He) برای نشانگرهای ISSR از نرم‌افزار POPGENE استفاده گردید. پارامترهای ژنتیکی در سطح نمونه‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفتند. به‌منظور بررسی میزان تنوع ژنتیکی درون و بین نمونه‌های مورد بررسی آنالیز AMOVA با استفاده از نرم‌افزار GenAlex ver 6. انجام شد.

نتایج

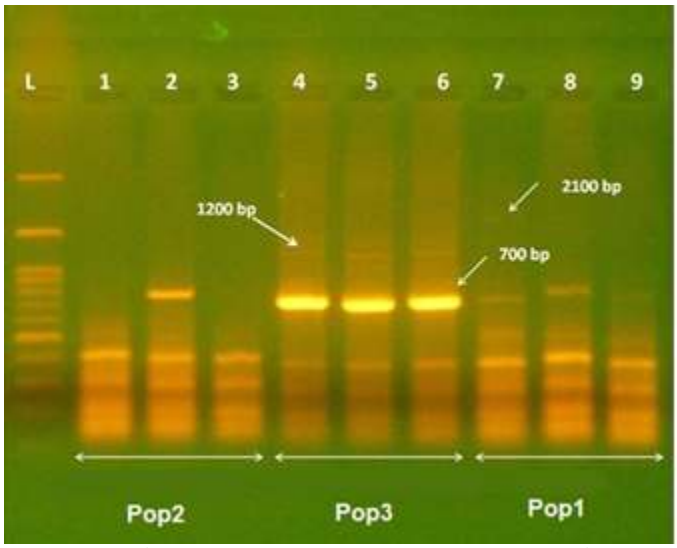
آنالیز ISSR

به‌منظور بررسی تنوع سوماکلونال طی واکشت‌های متوالی، سه نمونه از گیاه بنگدانه انتخاب و با نشانگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت. تعداد کل لوکوس‌های شناسایی شده با استفاده از ده آغازگر مورد استفاده ۷۷ عدد بود. همه قطعات طولی بین ۲۰۰ تا ۲۸۰۰ جفت باز داشتند. آغازگر (GA)9C کمترین تعداد تکثیر باند (پنج عدد) و آغازگر (AGC)5GA بیشترین تعداد تکثیر (۱۳ باند) را نشان دادند

(جدول۱). الگوی قطعات تکثیرشده با استفاده از آغازگر AGC5GG150 در شکل ۱ نمایش داده شده و باندهای اختصاصی در شکل با پیکان سفید مشخص شده است.

جدول ۲- پارامترهای ژنتیکی اندازه‌گیری شده در بررسی تنوع سوماکلونال سه نمونه بنگدانه با استفاده از نشانگرهای ISSR

آغازگر	طول قطعات ایجاد شده (جفت باز)	تعداد قطعات تولید شده	تعداد الل‌های متفاوت	شاخص شانون
(GA)8T (807)	-	۰	۰	۰
(TC)8C (823)	۶۰۰-۳۵۰	۷	۲	۰/۳۱
(AG)8YT (849)	۵۵۰-۲۵۰	۹	۱	۰
(AGC)5GG	۲۳۰۰-۲۰۰	۱۰	۲/۳	۰/۲۲
(AGC)5GC	۶۵۰-۳۰۰	۶	۱	۰
(AGC)5GT	۱۱۰۰-۲۲۰	۹	۲	۰/۲۲
(AGC)5GA	۲۸۰۰-۳۰۰	۱۳	۲/۳	۰/۴۵
(GA)9C	۵۵۰-۲۵۰	۵	۱	۰
(GA)9T	۱۱۰۰-۳۰۰	۹	۳	۱/۴۹
(GA)9A	۸۰۰-۲۵۰	۹	۱	۰
کل		۷۷		



شکل ۱- الگوی قطعات تکثیرشده با آغازگر AGC5GG150 و باندهای اختصاصی آن در سه نمونه مورد بررسی گیاه بنگدانه (نمونه ۱: برگ‌های جوان گیاه، نمونه ۲: کالوس جدید، نمونه ۳: کالوس قدیمی)

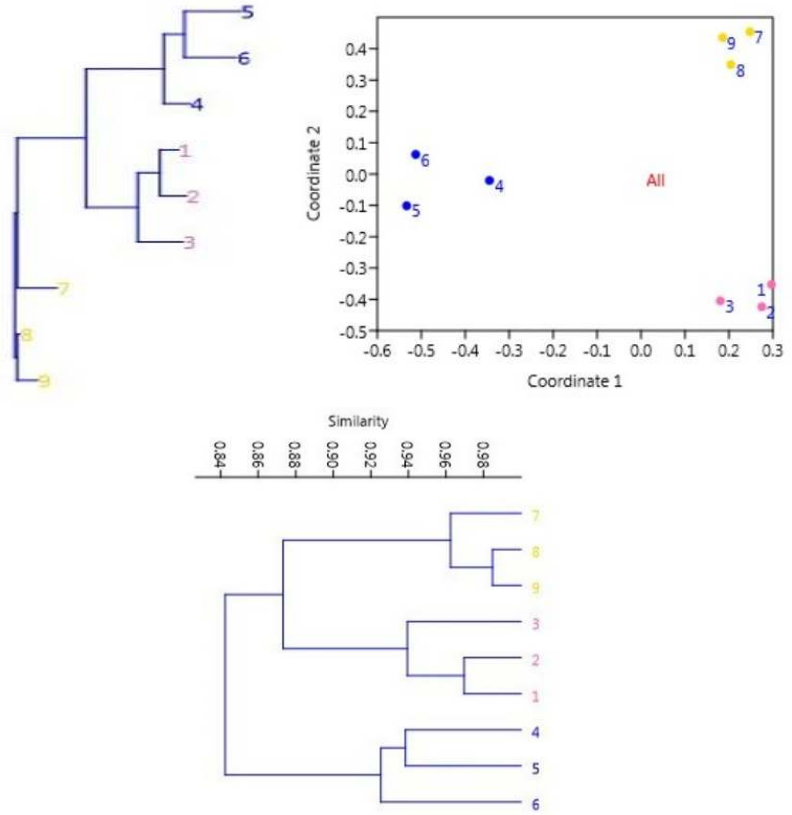
همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، میانگین درصد لوکوس‌های پلی‌مورفیسم در سه نمونه ۶/۴۹ درصد می‌باشد. تعداد الل‌های مشاهده شده و الل‌های مؤثر ۰/۹۳۹ و ۱/۰۳۹ است. متوسط شاخص شانون نیز در سه نمونه ۰/۰۳۵ می‌باشد. تنوع ژنتیکی نمونه ۲ (کالوس‌های جدید) بیشتر از سایرین است.

جدول ۳- خلاصه پارامترهای ژنتیکی بین سه نمونه مورد بررسی گیاه بنگدانه با استفاده از نشانگرهای ISSR

نمونه‌ها	تعداد الل‌های متفاوت	تعداد الل‌های مؤثر	شاخص شانون	هتروزیگوتی مورد انتظار	درصد لوکوس‌های چندشکل
نمونه ۱: برگ گیاه	۰/۹۳۵	۱/۰۴۱	۰/۰۳۶	۰/۰۲۴	۶/۴۹
نمونه ۲: کالوس جدید	۰/۹۷۴	۱/۰۵۳	۰/۰۴۹	۰/۰۳۲	۹/۰۹
نمونه ۳: کالوس قدیمی	۰/۹۰۹	۱/۰۲۳	۰/۰۲۱	۰/۰۱۴	۳/۹۰
میانگین سه نمونه	۰/۹۳۹	۱/۰۳۹	۰/۰۳۵	۰/۰۲۴	۶/۴۹

تجزیه خوشه‌ای

دندروگرام رسم شده از نتایج آماری، سه نمونه گیاه بنگدانه را در دو شاخه نشان داد. شاخه یا گروه اول متعلق به کالوس‌های قدیمی و گروه دوم به دو زیرگروه کالوس‌های جدید و برگ‌های گیاه تقسیم شده است (شکل ۲).



شکل ۲- آنالیزهای تجزیه خوشه‌ای سه نمونه بنگدانه با استفاده از نشانگرهای مولکلولی ISSR: سمت راست UPGMA، سمت چپ NJ و وسط PCOA (۳-۱: کالوس جدید، ۶-۴: کالوس قدیمی و ۹-۷ برگ گیاه بنگدانه)

تجزیه واریانس مولکولی

تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA)، ۶۸ درصد تنوع بین نمونه‌ها و ۳۲ درصد تنوع درون نمونه‌ها را نشان داد (جدول ۴). نمودار PCOA تناسب ژنتیکی گروه اول را ۹۴/۴۱ درصد و گروه دوم را نیز در دو زیرگروه نشان داد.

جدول ۴- آنالیز تنوع ژنتیکی (AMOVA) سه نمونه گیاه بنگدانه با استفاده از نشانگرهای ISSR

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات SS	میانگین مربعات MS	اجزاء واریانس	% واریانس	GD	P value
بین نمونه‌ها	۲	۲۴/۲۲	۱۲/۱۱	۳/۴۸	۶۸*	PhiPT=۰/۶۷۶	۰/۰۰۱
درون نمونه‌ها	۶	۱۰/۰۰	۱/۶۶	۱/۶۶	۳۲		
کل	۸	۳۴/۲۲		۵/۱۴	۱۰۰		

GD: Genetic differentiation or Genetic Distance

بحث

گیاه بنگدانه قابلیت بالایی را در تشکیل کالوس از بخش‌های مختلف گیاه دارد (Ibrahim, *et al*. 2009). این موضوع گیاه بنگدانه را به یک گیاه مدل برای تولید متابولیت‌های ثانویه با ارزش در کشت‌های درون شیشه‌ای و یا اهداف به‌نژادی و مهندسی ژنتیک تبدیل کرده است (Tapingkae, *et al*. 2012). نکته قابل توجه ثبات ژنتیکی گیاه بنگدانه در کشت‌های درون شیشه‌ای است. عدم ثبات ژنتیکی می‌تواند پایداری کشت درون شیشه‌ای و تولید متابولیت‌های ثانویه را در واکشت‌های متوالی تحت تأثیر قرار دهد. در این پژوهش، با افزایش تعداد واکشت تنوع ژنتیکی افزایش می‌یابد اما بیشترین درصد چندشکلی در کالوس‌های جدید مشاهده شد. دلیل این موضوع می‌تواند استفاده از تنظیم‌کنندگان رشد گیاهی برای کالزایی باشد. هورمون‌های گیاهی جهش‌زا بوده و تنوع سوماکلونال بالایی در استفاده از آنها گزارش شده است (Besher *et al*. 2014). نشان داده شده است که ترکیب دو هورمون کاینتین و 2,4D در گیاهان باززا شده پنبه طی جنین‌زایی پیکری، تنوع سوماکلونال بالایی را ایجاد کرده‌اند (Jin *et al*. 2008). در پژوهشی بر روی فلفل (*Capsicum chinense*) تنوع ژنتیکی مشاهده شده در بافت کالوس بیشتر از سایر بافت‌ها بوده است، این موضوع احتمالا به این دلیل است که سلول‌های کالوس بیشتر از سایر سلول‌ها در معرض 2,4 D بوده است (Bello-Bello et al. 2014). به‌طور مشابه، گزارش شده که در کشت‌هایی که بیشتر از سایرین در معرض 2,4 D بوده است، جهش بیشتری اتفاق افتاده است (Jain 2001). انواع مختلفی از تنوع سوماکلونال در کشت‌هایی که برای مدت طولانی در شرایط درون شیشه ای کشت می‌شدند، مشاهده شده است (Halder and Jha 2019). بسیاری از محققان معتقدند که با افزایش تعداد واکشت‌ها تنوع سوماکلونال افزایش می‌یابد (Bairu *et al*. 2011). پنگ و همکاران بیان کردند که در مراحل اولیه کشت درون شیشه ای با افزایش تعداد واکشت، تنوع ژنتیکی افزایش می‌یابد. آنان نشان دادند که برای انتقال نسل، نگهداری ژرم‌پلاسم و سایر انتقالات ژنتیکی، تعداد واکشت‌ها باید تا چهار مرتبه کنترل شود تا گیاهان ثبات ژنتیکی داشته باشند (Peng,*et al*. 2015). پیوندی و همکاران دریافتند که بیشترین تعداد باندهای چندشکل در کشت زیتون (*Olea europea*) باززا شده با استفاده از نشانگر RAPD، بین اولین و هفتمین واکشت ایجاد می‌شود (Peyvandi *et al*. 2010). همچنین گزارش شده است که ریزازدیادی می تواند فیزیولوژی و ژنتیک گیاه را تحت تأثیر قرار دهد (Hosseini-Mazinani and Sheidai 2009).

دو فاکتور افزایش میزان تنوع به‌عنوان تابعی از طول دوره کشت و نیز عدم یکنواختی میزان تنوع ژنتیکی بین

لاین‌های گیاهی مختلف کشت شده در شرایط کاملا یکسان (از نظر طول دوره کشت درون شیشه‌ای) باعث ایجاد پیچیدگی در پیش‌بینی ارتباط بین طول دوره کشت درون شیشه‌ای با میزان تنوع ژنتیکی شده‌اند (Podwyszynska 2005). برای شفاف شدن این مشکل یک مدل آماری برای پیش‌بینی میزان جهش به‌طور تئوری ایجاد شده است. در این مدل از تعداد چرخه‌های تکثیر سلولی به‌عنوان عامل اصلی استفاده شده است. دو برداشت از این مدل منتج می شود، یکی اینکه افزایش میزان تنوع به‌عنوان تابعی از تعداد چرخ‌های تقسیم سلولی است و نتیجه دیگر اینکه به دنبال تعداد مشخصی از چرخه‌های سلولی، درصد متغیری از گیاهان خارج از تیپ (off-type) مورد انتظار می‌باشد (Côte *et al*. 2001).

شاخص شانون می‌تواند بین صفر تا یک متغیر باشد و با میزان تنوع ژنتیکی رابطه عکس دارد. مقدار این شاخص در کالوس‌های قدیمی در این پژوهش کمتر از سایرین بوده است (۰/۰۲۱). همچنین هتروزیگوتی و درصد چندشکلی در کالوس‌های جدید بیشتر از سایرین بوده است که در نتیجه اعمال شرایط کال‌زایی است. سطح هتروزیگوتی مورد انتظار در کالوس‌های جدید بیشتر از سایر نمونه‌ها بوده است. باوجوداین میانگین هتروزیگوتی مورد انتظار در سه نمونه (۰/۰۲۴) در مقایسه با گزارش‌های دیگری که تنوع ژنتیکی و میزان جهش را در واکشت‌های متوالی کشت‌های درون شیشه‌ای مقایسه کرده‌اند، قابل توجه نبوده است (Goodarzi *et al*. 2018).

نتیجه‌گیری

براساس نتایج ارائه شده، تنوع ژنتیکی طی واکشت‌های متوالی کالوس‌های بنگدانه افزایش یافته است. از آنجایی که کشت درون شیشه‌ای معمولا برای مدت طولانی نگهداری شده و تکثیر می‌یابد، بنابراین ارزیابی اختلاف ژنتیکی با سلول یا گیاه والد در فواصل منظم واکشت ضروری به نظر می‌رسد تا بتوان گیاهان خارج از تیپ را شناسایی کرد.

منابع مورد استفاده

- Ahmed, T.A., Alsamaraee, S.A., Zaidan, H.Z., and Elmeer, K., .2012. Inter-simple sequence repeat (ISSR) Analysis of somaclonal variation in date palm plantlets regenerated from callus. Second international conference on environment and industrial innovation, Singapore, IPCBEE 3, 126-130.
- Bairu, M.W., Aremu A. O. and Van Staden, J. 2011. Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. Plant Growth Regulation, 63(2): 147-173.
- Bello-Bello, J.J., Iglesias-Andreu, L.G., Avilés-Vinas, S.A., Gómez-Uc, E., Canto-Flick, A. and Santana-Buzzy, N., 2014. Somaclonal variation in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) as assessed ISSR molecular markers. HortScience 49(4): 481-485.
- Bennici, A., Anzidei, M. and Vendramin, G.G., 2004. Genetic stability and uniformity of *Foeniculum vulgare* Mill. regenerated plants through organogenesis and somatic embryogenesis. Plant science 166(1): 221-227.
- Besher, S., Ammouri, Y., and Murshed, R., 2014. Production of tropan alkaloids in the in vitro and callus cultures of Hyoscyamus aureus and their genetic stability assessment using ISSR markers. Physiology and Molecular Biology of Plants 20(3): 343-349.
- Bibak, H. and Aghaabbasi K. 2018. Assessment of genetic diversity of *Zataria multiflora* ecotypes by RAPD and ISSR. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 26(1): 101-113. (In Persisn).
- Côte, F.X., Teisson, C., Perrier, X., 2001. Somaclonal variation rate evolution in plant tissue culture: Contribution to understanding through a statistical approach *In Vitro* Cellular & Developmental Biology-Plant, 37:539-542.
- Goodarzi, F., Darvishzadeh, R., Hassani, A., 2015. Genetic analysis of castor (*Ricinus communis* L.) using ISSR markers. Journal of Plant Molecular Breeding., 3:18-34.
- Halder, M. and Jha, S. 2019. Morphogenesis, Genetic Stability, and Secondary Metabolite Production in Untransformed and Transformed Cultures. Plant Cell and Tissue Differentiation and Secondary Metabolites: 1-60.
- Hosseini-Mazinani, M. and Sheidai, M., 2009. Molecular analysis of genetic stability in long-term micropropagated shoots of *Olea euroaea* L. (ev. Dezful). Asian J Plant Sci, 8(2): 146-152.
- Ibrahim, A.I., Adeld, A., Abd, M., Nower, A., Abdel, M. and Abd, E. 2009. Alkaloid production and organogenesis from callus of Hyoscyamus muticus L. *in vitro*. Journal of Applied Sciences Research

5(1): 82-92.
– Jain, S.M. 2001. Tissue culture-derived variation in crop improvement. Euphytica 118(2): 153-166.
– Jin, S., Mushke, R., Zhu, H., Tu, L., Lin, Z., Zhang Y., and Zhang, X. 2008. Detection of somaclonal variation of cotton (Gossypium hirsutum) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers. Plant Cell Reports, 27(8): 1303-1316.
– Khatamsaz, M., 1998. Flora of Iran (Solanaceae). Forest and Rangelands Research Institute Publication, Tehran (In Persian)..
– Li, J., Shi, J., Yu, X., and Sun Jk, Q. 2011. Chemical and pharmacological researches *on Hyoscyamus niger*. Chinese Herb Med 3(1): 117-126.
– Murray, M. and Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic acids research, 8(19): 4321-4326.
– Noormohammadi, Z., Baraki, S G. and Sheidai, M. 2011. Preliminarily report on molecular diversity of Sargassum species in Oman Sea by using ISSR and RAPD markers. Acta Biologica Szegediensis, 55(1): 19-26.
– 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 and Organ Culture, 122(1): 67-77.
– Peyvandi, M., Nemat, F.H., Arbabian, S., Nourmohammadi, Z. And Hosseini, M.M. 2010. Somaclonal variation among somatic-embryo derived plants of *Olea europaea L* cv. Kroneiki. Iranian Journal of Sciences, 21(1): 7-14.
– Podwyszynska M., 2005. Somaclonal variation in micropropagated tulips based on phenotype observation. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research, 13:109-122.
– Sengupta, T., Vinayagam, J., Nagashayana, N., Gowda, B., Jaisankar, P., and Mohanakumar, K. 2011. Antiparkinsonian effects of aqueous methanolic extract of *Hyoscyamus niger* seeds result from its monoamine oxidase inhibitory and hydroxyl radical scavenging potency. Neurochemical research 36(1): 177-186.
– Sengupta, T., Vinayagam, J., Nagashayana, N., Gowda, B., Jaisankar P. and Mohanakumar, K. 2011. Antiparkinsonian effects of aqueous methanolic extract of Hyoscyamus niger seeds result from its monoamine oxidase inhibitory and hydroxyl radical scavenging potency. Neurochemical research. 36(1): 177-186.
– Shabannejad Mamaghani, M. M. Assareh, M.H. Omidi, M., Matinizadeh, M ., Foruotan, M ., Ghamari Zare, A. Shahrzad SH. AND Jebelli,M. 2010. Identification of somaclonal variation using peroxidase and microsatellite markers in *Eucalyptus microtheca* F. Muell. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 17(2): 195-208. (In Persisn).
– Shen, X., Chen, J., Kane M.E., and Henny, R.J. 2007. Assessment of somaclonal variation in Dieffenbachia plants regenerated through indirect shoot organogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 91(1): 21-27.
– Tapingkae, T., Zulkarnain, Z., Kawaguchi, M., Ikeda, T. and Taji, A. Published:1 Dec 2012. Somatic (asexual) Procedures (haploids, protoplasts, cell selection) and Their Applications. Plant Biotechnology and agriculture, Elsevier Inc.194P.
– Yousefi, M.J. Hassani, M.E., Arefi, H. M. and Mohammadipour, M. 2009. Evaluation of genetic diversity of several accessions of Iranian *Hyoscyamus niger* L. based on RAPD markers. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research 17(1): 1-14. (In Persisn).

The effect of subculture on somaclonal variation in callus culture of *Hyoscyamus niger* using ISSR markers

S. Tahmasebi Goojgi[1], K. Haghbeen[2], A. Mousavi[3*] and K. piri[4]

1. PhD Graduated, Department of Horticulture Science and Agronomy, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I.R. Iran.
2. Prof. National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Department of Plant Biotechnology, Tehran, I.R. Iran
3*. Corresponding author, Assoc. prof. National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Department of Plant Biotechnology, Tehran, I.R. Iran. Email: m-amir@nigeb.ac.ir.
4. Prof. Bu-Ali Sina University, Department of Genetics and Plant Breeding, Tehran, I.R. Iran

Received: 22.10.2020 Accepted: 07.03.2021

Abstract

To evaluate the genetic variation in an *in vitro* culture of two samples of *Hyoscyamus niger* callus including new (one-month-old) and old (one-year-old) calli versus fresh leaves of the plant, the Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) marker was used. Using 10 primers, 6.49% polymorphism was observed in the three mentioned samples. Analysis of Molecular Variance (AMOVA) revealed 68% genetic variation among samples. Jaccard and Dice coefficients (similarity matrix) were also used by UPGMA and NJ methods. The best dendrogram to show genetic diversity (and distance or proximity of individuals) was known as the Jaccard similarity coefficient. The results of cluster analysis grouped the samples into two different groups. This classification was also confirmed by principal component analysis (PCoA). The first major group consisted of old calli and the second involved new calli and plant leaves. The result showed that the frequency of somaclonal variation in *H. niger* calli tended to increase with increasing the number of subculture times.

Keywords: Pyrrolizidine alkaloids, Genetic assessment, Somaclonal variation, Jaccard, PCoA, NJ.