

تأثیر کیفیت ماده اولیه بر قابل اعتماد بودن تحلیل ژنتیکی گیاهچه‌های به‌دست آمده از کالوس سیب‌زمینی

مسیح فروتن^۱، اندرو وتن^۲، مایکل ویلکینسون^۲

چکیده

برای ایجاد ناپایداری کروموزومی مصنوعی در سیب‌زمینی‌های دو رگ، کالوس برگ‌ها در محیط‌هایی با دماهای متفاوت تولید و گیاهچه‌های حاصل از کشت کالوس برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت. DNA با غلظتی پایین استخراج و وجود کروموزوم‌ها با کمک نشانگرهای ریزماهواره اختصاصی هر مکان ژنومی بررسی شد. فراوانی ناپدید شدن نشانگرها بسیار بالا بود، لذا وجود نشانگرها یک بار دیگر در نمونه‌های گلخانه‌ای بررسی شد. مشاهده شد که ناپدید شدن نشانگرها در گیاهچه‌های حاصل از کالوس یک پدیده پایدار نبوده و دلیلی به جز ناپایداری کروموزومی دارد. ناپدید شدن نشانگرها به کمک رقیق‌سازی تدریجی DNA و استفاده از آن برای واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز شبیه‌سازی و نتیجه گرفته شد که دلیل ناپدید شدن نشانگرها در کیفیت DNA نهفته است. سازوکارها و کاربردهای احتمالی این پدیده مورد بحث قرار گرفت.

کلمه‌های کلیدی: ریزماهواره - استخراج DNA - تحلیل ژنومی - ناپایداری کروموزومی.

۱- گروه علوم زیستی، دانشگاه ردینگ، انگلستان. نشانی فعلی: مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، گروه مستقل زیست فناوری منابع

طبیعی، تهران. نشانی الکترونیک forootan@rifr-ac.ir

۲- گروه علوم زیستی، دانشگاه ردینگ، انگلستان

تاریخ دریافت: پاییز ۱۳۸۶ تاریخ پذیرش: بهار ۱۳۸۷

مطالعه‌های ژنتیکی در گیاه سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum*) با محدودیت‌های مهمی مواجه است، که از آن جمله می‌توان از کوچک بودن کروموزوم‌ها و نیز بالا بودن نسبی سطح پلوپیدی در گونه‌های زراعی ($2n=4x=48$) نام برد. برای ردیابی و شناسایی کروموزوم‌ها (و گروه‌های ژنومی) روش‌های بسیاری به کار گرفته شده که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به ایدیوگرام تهیه شده توسط Pijnacker و Ferwerda (1984) اشاره کرد که با استفاده از رنگ‌آمیزی با ژیمسا و تعیین موقعیت سانترومر، توانسته‌اند ۱۲ گروه ژنومی سیب‌زمینی را از هم متمایز کنند. روش پیشنهادی دیگر، استفاده از تکنیک FISH بود که به کمک آن ۱۲ کاوشگر (پروب) فلورسنت روی گروه‌های ژنومی سیب‌زمینی شناسایی شد که می‌توانست کروموزوم متعلق به هر گروه ژنومی را از بقیه متمایز کند (Dong & all, 2000). محدودیتی که بر سر اجرای این روش‌ها وجود دارد، زمان‌بر بودن آن‌ها و در نتیجه پایین بودن تکرارپذیری به دلیل پیچیدگی‌های فنی آن‌ها است. بنابراین راهبرد دیگری که برای مطالعه ژنتیک سیب‌زمینی استفاده می‌شود، مطالعه نحوه توارث نشانگرهای ملکولی در نسل‌های مختلف و تهیه نقشه ژنتیکی این نشانگرها است. اولین نقشه‌های ژنتیکی، بیش‌تر بر اساس چند شکلی (پلی‌مورفیسم) الگوی مکان‌های برشی به‌دست آمده از پروتکل‌های RFLP بود (Bonierbale & all, 1998; Tanksley & all, 1992; Gebhardt & all, 1994; Jacobs & all, 1995). محدودیتی که بر سر راه تهیه این نوع نقشه‌ها وجود دارد هم‌پوشانی نشانگرهای خواهری (همولوگ) به دلیل سطح بالای پلوپیدی سیب‌زمینی است، که محققان را از یک سو به استفاده از گیاه‌ها پلوپوید ترغیب می‌کند، و از سوی دیگر استفاده از نشانگرهایی که تمام یا بخشی از توالی آن مشخص باشد را مطلوب‌تر می‌کند. از متداول‌ترین انواع این نشانگرها می‌توان ریزماهواره‌ها (SSR) را نام برد. این گروه نشانگرها به دلیل پلی‌مورفیسم بالا و نیز قابلیت تمایز افراد هتروزیگوت از هموزیگوت، کاربرد فراوانی دارد. در گیاه سیب‌زمینی تعداد زیادی ریزماهواره شناسایی شده که بسیاری از آن‌ها مختص تنها یک گروه ژنی هستند (Milbourne & all, 1998).

در برنامه‌های به‌نژادی سیب‌زمینی، دو رگ‌گیری گونه‌های زراعی با خویشاوندان وحشی‌شان باعث ورود ناخواسته ژن‌های وحشی به ریخته ارثی گونه زراعی شده و انجام تلاقی‌های برگشتی را اجتناب‌ناپذیر می‌کند. تلاقی‌های برگشتی به نوبه خود تفرق ژنی را افزایش داده و این امر منجر به دشوار شدن گزینش می‌شود. یک راه حل جایگزین برای حذف صفات ناخواسته، بهره‌گیری از ناپایداری کروموزوم‌ها در محیط کشت مصنوعی است. یک روش ساده برای القای ناپایداری کروموزومی، تغییر رژیم دمایی محیط است، چرا که باعث تغییر در سرعت تقسیم

سلولی شده و در نتیجه حرکت طبیعی کروموزومها به قطبهای سلول مختل می شود (Bennet & all, 1976 ; Pickering & all, 1985). هدف اولیه تحقیق حاضر، بررسی کارآمدی ایجاد ناپایداری کروموزومی در دو رگهای F_1 در محیط کشت بوده است.

مواد و روشها

ماده گیاهی آزمایشی، گیاه تریپلوئید ($2n=3x=36$) حاصل از تلاقی *Solanum phureja* ($2n=2x=24$) و *Solanum acaule* ($2n=4x=48$) بود. جوانهها پس از ۳-۵mm رشد از غده جدا شدند در محلول ۰/۰۱٪ هیپوکلریت سدیم به مدت ۱۰ دقیقه تحت فشار ۲۰mbar - ضد عفونی شدند. سپس با آب مقطر استریل شستشو داده شده و در محیط کشت MS (Murashige & Skoog, 1962) و در دمای 24°C ، فتوپریود ۱۶ ساعت با شدت نور $28\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ کشت شدند. برای ازدیاد گیاهچهها نیز از محیط کشت و شرایط محیطی مشابه استفاده شد.

برای باززایی کالوس از پروتکل پیشنهادی Karp & all (1984) استفاده شد. برگها پس از جدا شدن از گیاه به مدت سه هفته در محیط کشت MS جامد همراه با اکسین کشت شدند. برای القای ناپایداری در مرحله کالوس، کشتها در سه محیط با دماهای کنترل شده ۲۲، ۲۴، و ۲۶ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. سه هفته پس از تولید کالوس به MS حاوی اکسین و سیتوکینین منتقل شدند و پس از ۵ هفته دیگر برای ریشه زایی به MS ساده منتقل شدند.

چهار هفته پس از آشکار شدن ساقهها، گیاهچهها از کالوس جدا شده و در دمای 20°C - نگهداری شدند. استخراج DNA با غلظتی به نسبت پایین از مخلوطی از برگ و ساقه گیاهچهها بر اساس پروتکل Tai و Tanksley (1990) انجام شد و برای تنظیمات واکنشهای زنجیره ای پلیمرز از پروتکل Provan (1996) استفاده شد. برای ردیابی کروموزومها، از نشانگرهای ریزماهواره مختص هر گروه ژنومی استفاده شد. انتخاب ریزماهوارهها به گونه ای انجام شد که علاوه بر اختصاصی بودن برای هر مکان ژنومی، محصول تولید شده از هر کروموزوم همولوگ حتی الامکان اندازه متفاوتی داشته باشد تا هر کروموزوم جداگانه قابل ردیابی باشد. پرایمرهای STM2005، STM1064، STM2020، LernalX، STM1100، STM0028، STM1021، STM1106 و STM2005 به ترتیب متعلق به گروههای ژنومی I، II، V، VI، VII، IX، X و XI (Milbourne & all, 1998) برای واکنشهای SSR-PCR استفاده شدند. از DNA استخراج شده از ماده گیاهی اولیه (قبل از تشکیل کالوس) در

هر سری واکنش PCR به عنوان شاهد استفاده شد. الکتروفورز با دستگاه ABI Prism 3100 Genetic Analyzer انجام شد و نتایج با نرم‌افزار ABI Prism Genotyper بررسی شد. تهیه نمونه‌های کروموزومی و شمارش کروموزوم با تغییراتی در روش پیشنهادی Sharma و Sharma (1980) انجام شد.

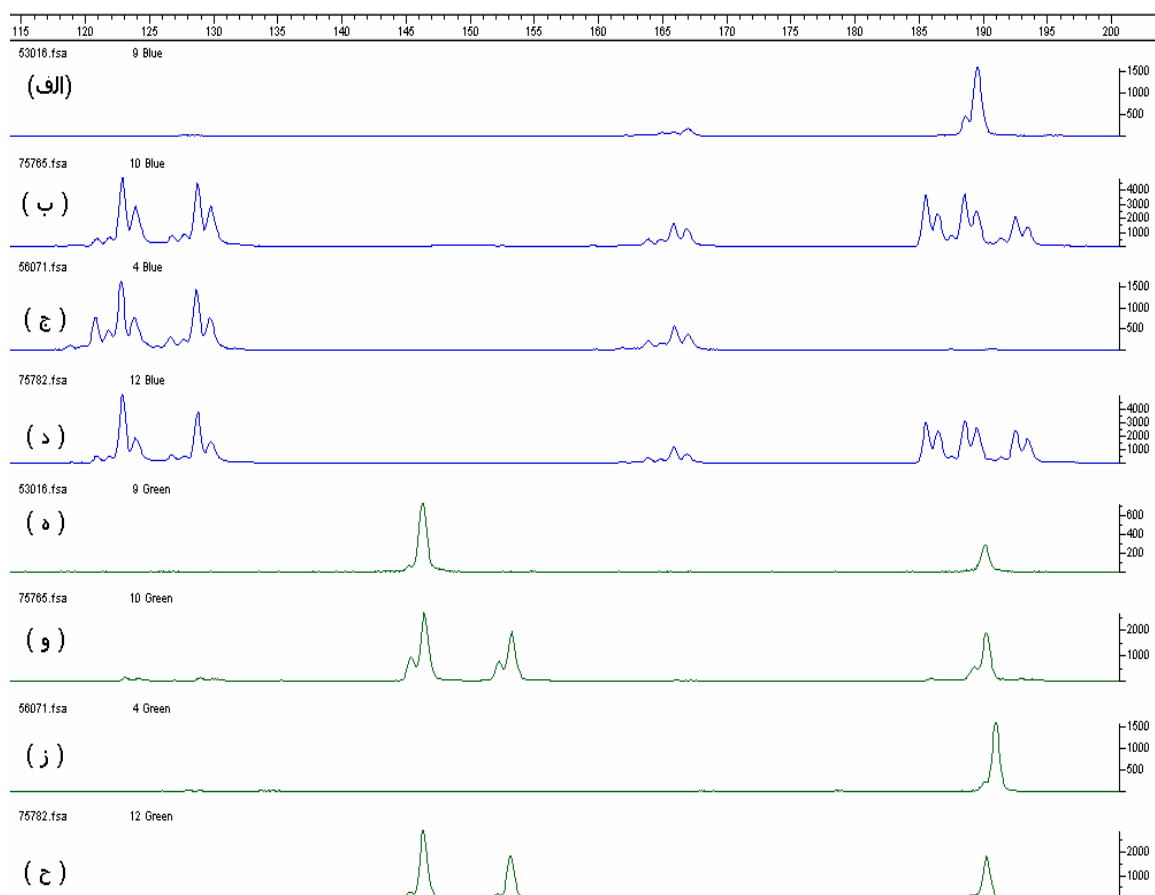
نتایج

تعداد ۴۰۱۰ نشانگر ریزماهواره در ۱۹۸ گیاهچه باززایی شده بررسی شدند. از این تعداد، ۷۰۴ نشانگر در مکان‌های مورد انتظار مشاهده نشدند، و ۱۱۲ گیاهچه از جمعیت مطالعه شده حداقل یکی از نشانگرهای خود را از دست داده بودند. شمارش کروموزوم‌ها در سه عدد از گیاهچه‌های باززایی شده نشان داد که با وجود از دست دادن نشانگرهای ریزماهواره، هیچ یک از کروموزوم‌های خود را از دست نداده‌اند. همچنین وجود نشانگرهای سه گروه ژنی در هشت نمونه دوباره بررسی و مشاهده شد که کلیه نشانگرهایی که در PCR اول ناپدید شده بودند در دوم ظاهر شدند (شکل ۱). بر مبنای این مشاهدات، این احتمال تقویت شد که عامل واقعی نتایج مزبور، خطاهای تکنیکی باشد. با توجه به این که روش‌های اجرا شده (استخراج DNA و واکنش PCR) در مورد نمونه‌های مورد مطالعه، با روشی مشابه روی نمونه‌های شاهد نیز انجام شد و کلیه نشانگرها در نمونه‌های شاهد مشاهده شدند، خطای مشاهده شده را نمی‌توان به تکنیک‌های استخراج DNA و واکنش PCR نسبت داد. از سوی دیگر، مشاهده شد که با طولانی شدن نگهداری نمونه‌ها (بیش‌تر از ۶ ماه) در 20°C ، برخی نشانگرها که قبلاً در واکنش‌های PCR دیده شده بودند، با تکرار واکنش ناپدید شدند. بر این اساس این احتمال تقویت شد که عامل بروز این خطا در شرایط نگهداری نمونه‌ها نهفته باشد. برای بررسی این امر مرحله استخراج DNA برای سه نمونه تکرار شد و DNA جدید به میزان‌های مختلف (۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۵۰ برابر) رقیق و واکنش PCR با دو نشانگر تکرار شد. در سطح ۳۰ برابر و بالاتر، کیفیت محصولات PCR دستخوش تغییر شد و تعدادی از نشانگرها در آستانه محو شدن قرار گرفتند (شکل ۲). آزمون مزبور این فرض را تأیید کرد که دلیل ناپدید شدن نشانگرها در واکنش‌های اولیه، کاهش غلظت DNA هنگام استخراج و نیز حین نگهداری طولانی مدت آن بوده است. این کاهش به حدی بوده که نمونه فاقد ژنوم کامل گیاه اولیه بوده و در نتیجه برخی از نشانگرها هنگام انجام واکنش PCR در نمونه وجود نداشته‌اند.

Sieben & all (2000) هنگام تهیه سوبه‌های خاص سلولی از بافت‌های سرطانی (جایی که به دلیل کم بودن تعداد سلول‌ها، مشکل کم بودن غلظت DNA وجود دارد) با پدیده مشابهی روبه‌رو شده و نگهداری بافت مورد استفاده برای استخراج در دمای 20°C - را برای به‌دست آوردن DNA بیش‌تر ضروری گزارش کرده‌اند، فرایندی که در تحقیق حاضر نیز مورد استفاده قرار گرفته بود. پدیده دیگری که ممکن است به دلیل کم بودن غلظت DNA تشدید شده باشد، تخریب ساختمان شیمیایی DNA است. از مکانیسم‌هایی که می‌تواند منجر به این نوع تغییر شود می‌توان از تنش‌های هیدرولیکی (Hoss & all, 1996) و هم‌چنین اکسید شدن پیریمیدین‌ها و قندها (Lindahl, 1996 ; Paabo, 1989) نام برد.

چنانچه آزمایش‌های بیش‌تر، این فرضیه را تأیید کند، نتیجه‌های این بررسی می‌تواند دقت و اعتبار یافته‌هایی را که از مقدار کم بافت به‌دست آمده (مانند نمونه‌های هرباریومی، نمونه‌های مورد استفاده برای مطالعه‌های باستان‌شناسی و بررسی‌های کشف جرم) را با چالش مواجه کند.

از سوی دیگر، سازوکاری که منجر به بروز این پدیده شده می‌تواند کاربردی جالب توجه در تهیه نقشه‌های ژنتیکی داشته باشد. از آن‌جا که در تهیه نقشه ژنومی، اساس تعیین فاصله ژنومی و پیوستگی ژن‌ها بر فراوانی وقوع کراسینگ اوور (در واقع شکسته شدن پیوستگی بین ژن‌ها) استوار است، فراوانی شکستگی DNA پس از استخراج می‌تواند به عنوان یک راه حل جایگزین مورد توجه قرار گیرد. بر اساس این مدل، DNA پس از استخراج در معرض عوامل ایجاد کننده شکستگی (مانند پرتوهای فرابنفش، گاما و یا امواج فراصوت) قرار می‌گیرد. سپس محلول حاوی DNA شکسته رقیق شده و به نمونه‌هایی با حجم‌های کوچک‌تر تقسیم می‌شود. در اثر این تقسیم شدن، قطعات DNA شکسته شده، به طور تصادفی در حجم‌های کوچک پراکنده می‌شود. این امر موجب می‌شود در واکنش PCR برای هر نمونه، تنها برخی نشانگرها ظاهر شوند. هر چه پیوستگی ژنتیکی بین نشانگرها زیادتر باشد، احتمال جدا شدن آن‌ها در اثر شکستگی DNA کم‌تر می‌شود و در نتیجه نشانگرهای به هم پیوسته در بیش‌تر نمونه‌ها "با هم" دیده خواهند شد. این راهکار می‌تواند در مواردی که با محدودیت تعداد نمونه برای استخراج DNA وجود داشته باشد مورد استفاده قرار گیرد (Dear & Cook, 1993 ; Dear & all, 1998 ; Piper & all, 1998). در عین حال باید توجه داشت که برای کاهش خطاهای ناشی از پایین بودن غلظت DNA لازم است استخراج را به دفعات تکرار کرد و نتایج به‌دست آمده از تکرار استخراج را کنار هم قرار داد تا به تصویر مطمئن‌تری از ژنوم نمونه مورد مطالعه رسید.



شکل ۱-

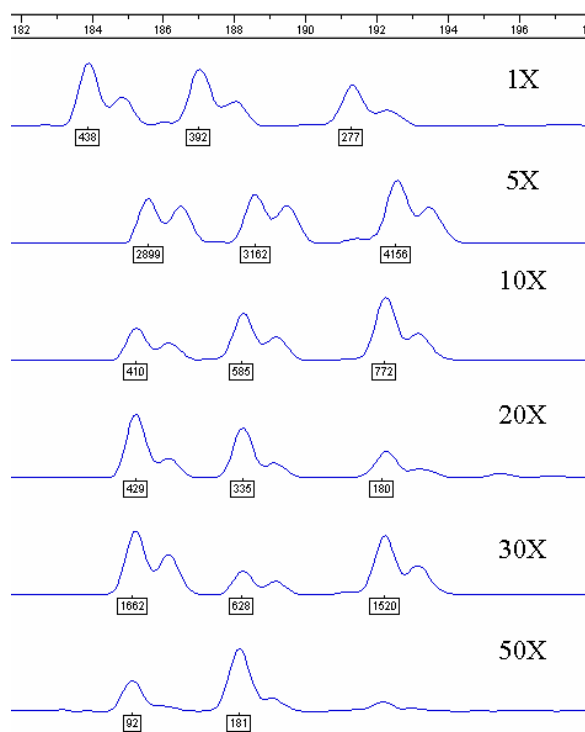
الف- نشانگرهای حاصل از تکثیر ریزماهوره‌های STM0028 (محدوده ۱۲۲bp تا ۱۶۵bp) و STM1064 (محدوده ۱۸۶bp تا ۱۹۳bp) برای نمونه شماره ۱۰۰، در مراحل اولیه جوانه‌زنی از کالوس.

ب- نشانگرهای حاصل از ریزماهوره‌های STM0028 و STM1064 در نمونه شماره ۱۰۰، بعد از رشد گیاه در گلخانه.

ج- نشانگرهای حاصل از تکثیر ریزماهوره‌های STM0028 و STM1064 در نمونه شماره ۱۹۱ در مراحل اولیه جوانه‌زنی از کالوس.

د- نشانگرهای حاصل از ریزماهوره‌های STM0028 و STM1064 در نمونه ۱۹۱، بعد از رشد گیاه در گلخانه.

ه، و، ز، ح- نشانگرهای حاصل از تکثیر ریزماهوره STM2005 به ترتیب برای نمونه‌های الف، ب، ج، د.



شکل ۲ -

نشانه‌های حاصل از تکثیر ریزماهواره STM1064 در نمونه شماره ۱۹۱، پس از رشد در گلخانه. اعداد کنار هر نمونه معرف درجه رقیق شدن DNA قبل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و اعداد داخل مستطیل شاخص ارتفاع منحنی‌ها (میزان تکثیر DNA) می‌باشند.

- Bennett, M D, R A Finch, and I R Barclay**, 1976. The time and rate of chromosome elimination in *Hordeum* hybrids. *Chromosoma*, 54: 175-200.
- Bonierbale, M W, R M Plaisted, and S D Tanksley**, 1988. RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. *Genetics*, 120: 1095-1103.
- Dear, P H and P R Cook**, 1993. Happy Mapping: Linkage mapping using a physical analog of meiosis. *Nucleic Acids Research* 21(1): 13-20.
- Dear, P, A Bankier, and M Piper**, 1998. A high-resolution metric Happy map of human chromosome 14" *Genomics* 48:232-241.
- Dong, F, J Song, S K Naess, J P Helgeson, C Gebhardt, and J Jiang**, 2000. Development and applications of a set of chromosome-specific cytogenetic DNA markers in potato. *Theoretical and Applied Genetics*, 101(7): 1001-1007.
- Gebhardt, C, E Ritter, and F Salamini**, 1994. RFLP Map of Potato. In: *DNA-Based Markers in Plants*. (R L Phillips and I K Vasil) Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 271-285.
- Hoss, M, P Jaruga, T Zastawny, M Dizdaroglu and S Paabo**, 1996. DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Research* 24(7): 1304-1307.
- Jacobs, J M E, H J van Eck, P Arens, B Verkerk Bakker, B Te Lintel Hekkert, H J M Bastiaansen, A El-Kharbotly, A Pereira, E Jacobsen, and W J Steikema**, 1995. A genetic

map of potato, (*Solanum tuberosum*) integrating molecular markers, including transposons and classical markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 91: 289-300.

Karp, A, R Risiott, M G K Jones, and S W J Bright, 1984. Chromosome doubling in monohaploid and dihaploid potatoes by regeneration from cultured leaf explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 3: 363-373.

Lindahl, T, 1993. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362: 709-715.

Milbourne, D, R C Meyer, A J Collins, L D Ramsay, C Gebhardt, and R Waugh, 1998. Isolation, characterisation and mapping of simple sequence repeat loci in potato. *Molecular and General Genetics*, 259: 233-245.

Murashige, T and F Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.

Paabo, S, 1989. Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86(6): 1939-1943.

Pickering, R A, 1985. Partial control of chromosome elimination by temperature in immature embryos of *Hordeum vulgare* L. × *Hordeum bulbosum* L. *Euphytica*, 34(3): 869-874.

Pijnacker, L P and M A Ferwerda, 1984. Giemsa C-banding of potato chromosomes. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 26: 415-419.

Piper, M, A Bankier, and P Dear, 1998. A Happy Map of *Cryptosporidium parvum*. *Genome Research* 8:1299-1307.

Provan, J, W Powell and R Waugh, 1996. Microsatellite analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*). *Theoretical and Applied Genetics* 92: 1078-1084.

Sharma, A K and A Sharma, 1980. *Chromosome Techniques: Theory and Practice*, Butterworth-Heinemann.

Sieben, N, N Ter Haar, C Cornelisse, G Jan Fleuren, and A Cleton-Jansensen, 2000. PCR artifacts in LOH and MSI analysis of microdissected tumor cells. *Human Pathology* 31(11): 1414-1419.

Tai, H T and S D Tanksley, 1990. A rapid and inexpensive method for isolation of total DNA from dehydrated plant tissue. *Plant Molecular Biology Reporter*, 8: 297-303.

Tanksley, S D, M W Ganai, J P Prince, M C de Vicente, M W Bonierbale, P Brown, T M Fulton, J J Giovannoni, S Grantillo, G B Martin, R Messegeur, J C Miller, L Miller, A H Patterson, O Pineda, M S Roder, R A Wing, W Wu, and N D Young, 1992. High-density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics*, 132: 1141-1160.