ژنتیک نوین
دوره پانزدهم ، شماره ٤، زمستان ۱۳۹۹
صفحه ۳۳۵ - ۳۲۷

# بررسی تنوع سوماکلونال در ریزازدیادی گل محمدی (*Rosa damascena* Mill.) با استفاده از نشانگرهای مولکولی

# Assessment of somaclonal variation in micropropagation of Damask Rose (*Rosa damascena* Mill.) using molecular markers

آزاده اسدی[۱]، لیا شوشتری[*۱]

۱- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد،استادیار، گروه بیوتکنولوژی و بهنژادی گیاهی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران

**Asadi A[1], Shooshtari L[*1]**

1- MSc Student, Assistant Professor, Department of plant breeding and Biotechnology, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی:l_shooshtary@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۹/۰٦/۱٤ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۹/۱۸)

## چکیده

**این تحقیق به‌منظور بررسی تغییرات ژنتیکی احتمالی در فرایند ریزازدیادی گل محمدی (*Rosa damascena* Mill.) با استفاده از نشانگرهای Start Codon Targetted (SCoT) و CAAT- Box Derived Polymorphism (CBDP) انجام شد. قطعات ریزنمونه پس از ضدعفونی، برای مرحله استقرار در محیط MS جامد کشت شدند و پس از چهار هفته، ساقه‌های جانبی ایجاد شده بر روی ریزنمونه‌ها به‌منظور پرآوری، محیط وندرسالم (VS) مایع با ترکیبات متفاوت از غلظت‌های مختلف اکسین و سیتوکینین واکشت شدند. جهت القای ریشه در شرایط درون شیشه‌ای، گیاهچه‌های حاصل از مرحله پرآوری به محیط ریشه زایی شامل محیط MS جامد حاوی دو میلی‌گرم بر لیتر IAA و ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA منتقل شدند و در حدود ۸ هفته بعد، گیاهچه‌های ریشه دار شده جهت سازگاری به محیط گلخانه انتقال داده شدند. به‌منظور بررسی تنوع احتمالی ایجاد شده در نمونه‌های رشد یافته در محیط‌های کشت مختلف، از دو نشانگر SCoT و CBDP استفاده شد. تعداد ۳۰ آغازگر مورد استفاده شامل ۱۵ آغازگر SCoT و ۱۵ آغازگرCBDP، در مجموع ۱۷۳ باند تکثیر نمودند که تنها ۷٤ باند دارای چندشکلی بود. میانگین شاخص محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) برای آغازگرهای SCoT و CBDP به‌ترتیب ۰/۳۲ و ۰/۳۵ به‌دست آمدکه بیانگر کارایی قابل قبول این نشانگرها در تفکیک نمونه‌های مورد بررسی بود. دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر بر اساس داده‌های هر دو نشانگر نمونه‌های مورد بررسی را در دو گروه دسته‌بندی نمود. اگرچه یافته‌های این پژوهش بیانگر تنوع ژنتیکی نسبتا اندکی در بین نمونه‌های مورد بررسی بود، لیکن بر اساس نتایج تجزیه کلاستر و فاصله ژنتیکی بیشتر نمونه‌های رشد یافته در محیط حاوی غلظت‌های بیشتر 2,4-D با سایر نمونه‌ها نشان داد که استفاده از 2,4-D به‌خصوص در غلظت‌های بیشتر و به‌ویژه زمانی‌که تعداد واکشت‌ها و فاصله آن‌ها افزایش می‌یابد، می‌تواند نرخ تغییرات را افزایش دهد. نتایج این تحقیق همچنین نشان داد که نشانگرهای SCoT و CBDP نشانگرهایی مناسب برای بررسی تغییرات ژنتیکی در شرایط کشت بافت می‌باشند.**

## واژه‌های کلیدی

تنوع ژنتیکی
کشت بافت
گل محمدی
نشانگر مولکولی

[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.4.11.8 ]

## مقدمه

گل محمدی (*Rosa damascena* Mill.) به‌واسطه دارا بودن گلبرگ‌های خوشبو از شهرت بالایی برخوردار می‌باشد و برخی از ارقام آن برای تولید اسانس پرورش داده می‌شوند که این اسانس در زمینه‌های گوناگون از جمله صنایع غذایی، داروسازی، صنایع آرایشی بهداشتی، عطرسازی و همچنین طب سنتی مورد استفاده قرار می‌گیرد. در طب سنتی ایران، گلاب که محصول این گیاه است به‌عنوان آرام‌بخش و تسکین دهنده دستگاه عصبی مورد استفاده دارد. همچنین، فعالیت ضد ویروسی، ضدباکتریایی و خواص آنتی اکسیدانتی اسانس گل محمدی نیز گزارش شده است (Tabaei-Aghdaei et al. 2007).

بر اساس گزارشات موجود، گل محمدی از منطقه خاورمیانه به اروپای غربی معرفی شده است (Beales et al. 1998) و به‌طور عمده ناحیه اسپارتای ترکیه و کازانلوک بلغارستان به‌همراه ایران، هندوستان مناطق اصلی پرورش گل محمدی و تولید گلاب و استخراج اسانس آن به‌شمار می‌روند (Rusanov et al. 2005). کاربردهای فراوان اسانس با ارزش این گونه گیاهی از یک سو و سازگاری آن به دامنه وسیعی از شرایط اقلیمی از سوی دیگر، باعث شده تا روند کشت و کار این گونه گیاهی ارزشمند در جهان به‌طور پیوسته در حال افزایش باشد و به‌همین واسطه، منجر به رشد تقاضا برای نهال های این گیاه دارویی و صنعتی به‌منظور توسعه کشت و کار آن شود. بسیاری از ارقام رز از جمله گل محمدی از طریق روش‌های غیرجنسی هم‌چون قلمه، پیوند و پاجوش تکثیر می‌شوند اما این روش‌ها علاوه بر زمان‌بر بودن با مشکلاتی همچون کاهش تشکیل ریشه‌های نابه‌جا در قلمه‌ها همراه است. علاوه بر روش‌های متداول تکثیر گیاهان، روش‌های تکثیر درون شیشه‌ای نیز وجود دارد که در حال حاضر تقریباً در همه گونه های گیاهی قابل استفاده می‌باشد. تکنیک کشت بافت و تکثیر درون شیشه‌ای مزایا و پتانسیل‌های زیادی نسبت به روش‌های کلاسیک تکثیر رویشی گیاهان دارا ست که مهم‌ترین آن‌ها، تکثیر گیاهان یکنواخت و عاری از پاتوژن در یک زمان کوتاه و در مقیاس بسیار وسیع است (Shabbir et al. 2009). لیکن، استفاده از روش‌های مبتنی بر کشت بافت و سلول در کنار مزایای خود می‌تواند مشکلاتی را نیز به‌همراه داشته باشد. اساس تکنیک کشت بافت پرورش ریزنمونه‌های گیاهی بر روی محیط‌های متنوع کشت است که حاوی عناصر ضروری برای بافت‌های زنده گیاه هستند. یکی از اجزای ضروری محیط‌های کشت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی می‌باشند که اکسین‌ها و سیتو کینین‌ها از پرکاربردترین آن‌ها در تهیه محیط‌های کشت به حساب می‌آیند. نتایج بسیار از تحقیقات نشان داده است که استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد و همچنین تعداد و طول دوره واکشت‌ها گاهی می‌تواند با برخی اثرات منفی همراه باشد. با وجود گذشت حدود نیم قرن از انجام تحقیقات مختلف در زمینه کشت بافت گیاهی، هنوز جنبه‌های ناشناخته زیادی در این حوزه وجود دارند. مسیر برنامه‌ریزی مجدد ریزنمونه‌ها برای انجام فعالیت‌های زیستی در گیاهان کامل باززا شده با مجموعه‌ای از فرایندهای پیچیده مرتبط است که می‌تواند منجر به پاره‌ای از تغییرات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی، ژنتیکی و اپی ژنتیکی در آن‌ها شود (Bednarek and Orłowska 2020).

بر اساس تحقیقات صورت گرفته در دهه‌های گذشته، کاربرد تنظیم کننده‌های رشد به‌ویژه اکسین‌ها، از علل و عوامل تنوع سوماکلونال به‌خصوص در کشت کالوس، کشت تعلیقی، کشت سلول و پرتوپلاست عنوان شده است (Etienne et al. 2003; Larkin et al. 1984). از سوی دیگر ترکیب محیط‌های کشت و شرایط نگه‌داری آن‌ها، میتواند با ایجاد تغییرات ژنتیکی نظیر جهش‌های نقطه‌ای، شکستگی‌های کروموزومی و تغییر در فعالیت ترانسپوزون‌ها منجر به بازآفرینی خصوصیات جدید در گیاهان حاصل از کشت بافت شود (Jiang et al. 2011; DogramaciAltuntepe et al. 2001; Bednarek and Orłowska 2020). با توجه به پیشرفت‌های به‌دست آمده در زمینه تکنیک‌های نوین و روش‌های مولکولی نیز ثابت شده است که کشت بافت گیاهی می‌تواند متاثر از تغییرات اپی ژنتیکی نظیر متیلاسیون و دمتیلاسیون هیستون‌ها (Grafi et al. 2007)، سطوح متیلاسیون DNA ژنومی (Han et al. 2018)، تغییر در بیان ژن‌ها (Kabita et al. 2019) بوده و هم‌چنین با عملکرد طیف وسیعی RNAهای کوچک مرتبط باشد (Li et al. 2012).

از آنجاکه در ریزازدیادی هدف، تکثیر یک ژنوتیپ ایده آل بر اساس اهداف تجاری در مقیاس بزرگ می‌باشد، باید سعی شود



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.4.11.8 ]

که گیاهان حاصله کاملا شبیه به پایه مادری منتخب باشند. به‌همین دلیل یکی از دغدغه‌های محققان در این زمینه آن است که با بهینه‌سازی ترکیب محیط‌های کشت و تنظیم غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد و هم‌چنین شرایط کشت بافت و تعداد واکشت‌ها از بروز تغییرات ژنتیکی احتمالی جلوگیری شود. از این‌رو بررسی یکنواختی ژنتیکی گیاهان حاصل از کشت بافت دارای اهمیت می‌باشد. استفاده از روش‌های مولکولی در شناسایی تغییرات ژنتیکی روی داده در شرایط کشت بافت می‌تواند بسیار کارآمد و مفید باشد.

به‌کمک نشانگر مولکولی AFLP و استفاده از دو نوع اندونوکلئاز اختصاصی حساس و غیرحساس به متیلاسون در مرحله هضم آنزیمی، وقوع تغییرات سوماکلونال در گیاهان باززا شده از کشت کالوس *Ducrosia anethifolia* گزارش شده و نشانگر AFLP به‌عنوان نشانگری قابل اعتماد در بررسی تنوع سوماکلونال معرفی شده است (Shooshtari et al. 2013). در تحقیقی دیگر، در بررسی تنوع سو ماکلونال در کشت‌های سوسپانسیون گیاه دارویی ماریتیغال با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR نشان داده شد که الگوی باندی حاصله از ریزنمونه‌های مختلف و حتی تکرارهای یک واکشت متفاوت بودند (Firouzi et al. 2009). گزارشات دیگری نیز مبنی بر شناسایی تنوع سوماکلونال در گیاهان حاصل از کشت بافت با استفاده از نشانگرهای مولکولی دیگر وجود دارد که استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR در بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان حاصل از کشت بافت *Aloe barbadensis* Mill. (Sahoo and Rout 2014; Noormohammadi et al. 2018)، بررسی تنوع سوماکلونال در نمونه‌های کشت بافتی گیاه دارویی *Ferulago angulata* با استفاده از نشانگرهای SCoT، CBDP و ISSR (Shooshtari et al. 2018)، بررسی تنوع سوماکلونال حاصل از کشت درون شیشه‌ای گیاه دارویی ماریتیغال (*Silybum marianum*) با استفاده از نشانگرهای RAPD (Pourjabar et al. 2009) و ارزیابی ژنتیکی نمونه‌های حاصل از کشت بافت گیاه دارویی *Foeniculum vulgar* در غلظت‌های مختلف هورمونی با استفاده از نشانگر AFLP (Shooshtari et al. 2014) از آن جمله می‌باشند. هدف از این مطالعه، ارزیابی پایداری ژنتیکی گیاهان حاصل از ریزازدیادی گل محمدی (*Rosa damascena* Mill.) تحت ترکیبات مختلف محیط‌های استقرار و پرآوری و بررسی کارایی نشانگرهای هدفمند ژنی در این خصوص می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

در این تحقیق برای تهیه ریزنمونه‌های لازم، از اکوتیپ گره‌بان استفاده شد و تمامی ریزنمونه‌ها از یک پایه مادری جدا شدند. ریزنمونه‌ها به طول ۲ الی ۳ سانتی‌متر، با حداقل یک گره، از ساقه‌های جوان تهیه شدند. قطعات ریزنمونه پس از شستشوی سطحی توسط مایع شوینده رقیق، به مدت سی دقیقه در معرض آب جاری قرار داده شد و به‌دنبال آن در زیر هود لامینار توسط کلرید جیوه ۰/۱ درصد به مدت ۷ دقیقه ضدعفونی و آب‌کشی شدند. جهت استقرار ریز نمونه‌ها از محیط MS جامد (Murashige and Skoog 1962) استفاده شد. پس از گذشت یک ماه، نمونه‌ها جهت ساقه زایی، در شرایط استریل و در زیر هود لامینار از محیط استقرار به محیط VSمایع (Van der Salm et al. 1994) انتقال داده شدند. در مرحله پرآوری از ۱۵ محیط کشت مختلف حاصل ترکیب و نسبت‌های مختلف از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی شامل NAA، 2,4-D، BAP، GA3 و Kin استفاده شد که رشد گیاهچه‌ها تنها در ۸ مورد از این محیط‌ها موفقیت‌آمیز بود و در نهایت نمونه‌های رشد یافته در ۸ محیط (جدول۱) برای ریشه دارشدن نمونه‌ها به محیط ریشه‌زایی انتقال داده شدند.

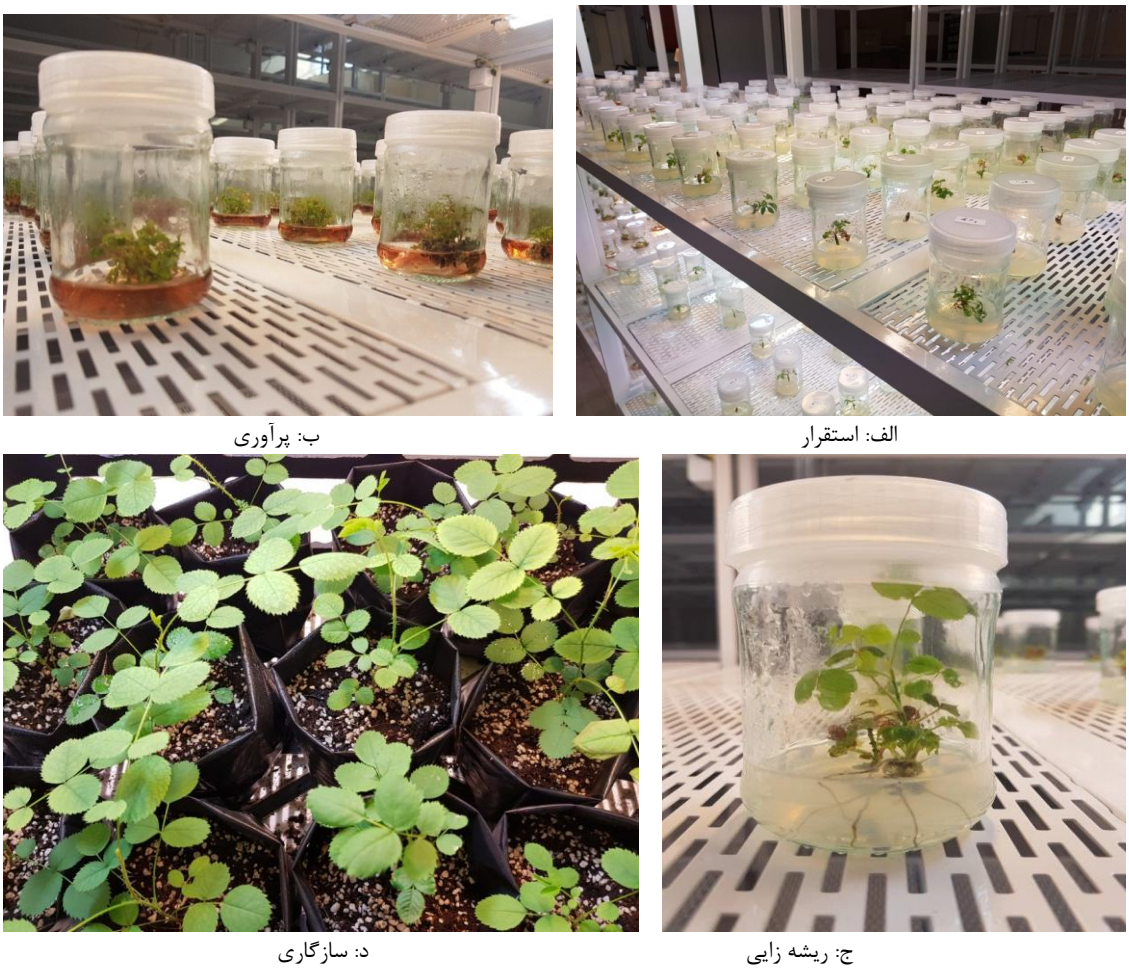
جدول ۱- ترکیب و نسبت تنظیم کننده‌های رشد در محیط‌های مختلف مورد استفاده در مرحله پرآوری در ریزازدیادی گل محمدی (*Rosa damascena* Mill.)

| محیط کشت | ترکیب هورمونی | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 2,4-D (mg/L) | NAA (mg/L) | GA3 (mg/L) | BAP (mg/L) | Kin (mg/L) |
| ۱ | ۰/۵ | - | ۰/۱ | ۲/۵ | - |
| ۲ | ۰/۵ | ۰/۱ | - | ۲ | - |
| ۳ | ۰/۱ | - | ۰/۱ | - | ۱ |
| ٤ | ۰/۱ | - | ۰/۱ | ۱/۵ | |
| ٥ | - | ۰/۱ | ۰/۱ | | ۱ |
| ٦ | - | ۰/۱ | ۰/۱ | ۲ | |
| ۷ | - | ۰/۱ | ۰/۱ | ۱/۵ | |
| ۸ | - | ۰/۱ | - | ۱/۵ | |

2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)
Acetic Acid) NAA (Naphthalene
GA3 (Gibberellic Acid)
BAP (6-Benzylaminopurine)
Kin (Kinetin )



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.4.11.8 ]



الف: استقرار ب: پرآوری

ج: ریشه زایی د: سازگاری

شکل ۱- وضعیت گیاهچه در مراحل استقرار (الف)، پرآوری (ب)، ریشه‌زایی (ج) و سازگاری (د) در فرایند ریزازدیادی گل محمدی (*Rosa damascena* Mill.)

بعد از گذشت دو ماه از رشد نمونه‌ها در محیط ریشه‌زایی و القای ریشه، مراحل سازگاری گیاهچه‌های تولید شده با انتقال به سینی‌های مخصوص نشا حاوی پیت ماس، کوکوپیت و پرلیت و سپس در گلدان‌های حاوی نسبت برابر ترکیبات مورد اشاره انجام شد. وضعیت گیاهان در مراحل مختلف چهارگانه فوق در شکل ۱ نشان داده شده است. ارزیابی مولکولی بر روی تعداد ۸ نمونه گیاهچه حاصل از محیط‌های مختلف مورد استفاده (جدول۱) انجام شد. برای این منظور استخراج DNA ژنومی از برگ‌های جوان نمونه‌های گیاهی مورد اشاره بر اساس دستورالعمل CTAB[1] و با استفاده از روش Doyle and Doyle (1987) انجام شد. به‌منظور بررسی و تایید کیفیت DNA استخراج شده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد استفاده شد.

واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل دو میکرولیتر DNA ژنومی، دو میکرولیتر آغازگر (10ng/uL) شش میکرولیتر آب دیونیزه استریل و ۱۰ میکرولیتر مستر میکس 2x (Ampliqon, ID: 5200300-1250) انجام شد. واکنش‌های تکثیر با استفاده از ترموسایکلر Biorad (مدل T100) با برنامه دمایی یک مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه و ۳۵ چرخه حرارتی شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر در دمای بهینه‌سازی شده به مدت یک دقیقه، و پلیمریزاسیون در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱/۵ دقیقه انجام شد. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با استفاده از بافر TBE تفکیک و برای رنگ‌آمیزی ژل‌ها از Safeview استفاده شد. پس از امتیازدهی الگوهای باندی حاصل به‌صورت یک (وجود باند) و صفر (عدم وجود باند)، شاخص‌های تعیین

[1] Cethyl Trimenthyl Ammonium Bromide



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.4.11.8 ]

کننده کارایی نشانگر شامل تعداد کل قطعات تکثیر شده (NTB[1])، تعداد قطعات چندشکل (NPB[2])، محتوای چندشکلی (PIC[3]) و شاخص نشانگری (MI[4]) محاسبه شد. مقادیر فواصل ژنتیکی بین جفت نمونه‌ها بر اساس ضریب فاصله دایس محاسبه و به‌منظور گروه‌بندی نمونه‌ها، آنالیزهای مربوطه شامل تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) و تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA با استفاده از نرم‌افزار DARwin (Perrier et al. 2003) انجام شد.

## نتایج و بحث

در بین ۱۵ محیط مایع حاصل از نسبت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد مورد استفاده، رشد گیاهچه‌ها تنها در ۸ محیط (جدول۱) موفقیت‌آمیز بود. اگرچه بررسی وضعیت گیاهچه‌ها در این ۸ محیط نیز حاکی از تفاوت در میزان رشد آن‌ها در ترکیبات مختلف بود لیکن در همه محیط‌ها نمونه‌ها تا پنج مرحله واکشت به رشد خود ادامه داده و به مرحله ریشه‌زایی رسیدند. لازم به ذکر است در بین ۸ محیط مذکور، گیاهچه‌های رشد یافته در محیط شماره ۷ ( 0.1 mg/L NAA + 1.5 mg/L BAP + 0.1 mg/L GA3) در مقایسه با سایر نمونه‌ها به لحاظ تعداد ساقه‌های جانبی، سرعت رشد و میزان سبزینگی به مراتب از وضعیت مناسب‌تری برخوردار بودند که این نتیجه با نتایج Nikbakht et al.(2005) مطابقت داشت. در نتایج حاصل از پژوهش دیگری که به‌منظور بهینه‌سازی ریزازدیادی *Rosa damascene* انجام گرفته استفاده از تنظیم کننده‌های رشد BA و NAA به‌ترتیب به‌میزان ۲ و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر به‌عنوان بهترین ترکیب گزارش شده است (Khosh-Khui and Sink 1982). همچنین گزارشات دیگری وجود دارد که نشان می‌دهد برای دستیابی به بهترین نتایج در ریزازدیادی گیاه *Rosa damascene*، استفاده از GA3 در ترکیب با BA و NAA ضروری می‌باشد (Kumar et al. 2000; Nikbakht et al. 2005).

تعداد ۳۰ آغازگر مورد استفاده در این تحقیق در مجموع ۱۷۳ باند واضح و قابل امتیازدهی ایجاد نمودند که از این تعداد ۷٤ باند چندشکلی نشان دادند. همان‌طورکه در جدول۲ مشاهده می‌شود آغازگرهای SCoT سهم بیشتری از تعداد باندهای چند شکل را در مقابل آغازگرهایCBDP به‌خود اختصاص دادند به‌طوری‌که ۱۵ آغازگر SCoT در مجموع ٤۰ و ۱۵ آغازگرCBDP در مجموع ۳٤ باند چندشکل تکثیر نمودند. دامنه شاخص محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) برای نشانگرهایSCoT بین ۰/۲۲ (برای آغازگر SC-12) تا ۰/٤۱ (برای آغازگر SC-15) و برای نشانگرهای CBDP بین ۰/۲۷ (برای آغازگر CB-10) تا ۰/٤۵(برای آغازگر CB-01) بود. در مورد شاخص نشانگر (MI) نیز دامنه تغییرات برای نشانگرهای SCoT و CBDP به‌ترتیب ۰/٤٤ تا ۱/۲۳ و ۰/٦۰ تا ۱/۳۵ بود. لیکن، متوسط شاخص PIC و MI برای دو گروه آغازگرهای مورد استفاده بیانگر تفاوت اندک کارایی این دو نشانگر در تفکیک نمونه‌ها بود (جدول۲). با توجه به اینکه حداکثر مقدار شاخص PIC در نشانگرهای غالب مانند SCoT و CBDP برابر با ۰/۵ می‌باشد بنابراین بر اساس متوسط مقدار شاخص PIC به‌دست آمده برای آغازگرها، می‌توان گفت این میزان PIC نشان‌دهندهٔ کارآیی مناسب آن‌ها در تمایز نمونه‌های مورد استفاده در این تحقیق بوده و بنابراین می‌توان آن‌ها را جهت مطالعات مشابه پیشنهاد نمود. مقادیر نسبتاً پایین شاخص نشانگر را می‌توان به تعداد کم باندهای چندشکل با توجه به ماهیت کار نسبت داد. بدیهی است با افزایش تعداد باندهای چندشکل مقدار این شاخص با توجه به همبستگی مثبت آن با شاخص محتوای اطلاعات چندشکل افزایش خواهد داشت.

متوسط فواصل ژنتیکی برآورد شده بین نمونه‌ها نیز حاکی از تنوع اندک بین نمونه‌ها بود به‌طوری‌که این مقدار بر اساس داده‌های SCoT برابر با ۰/٤۲ و بر اساس داده‌های CBDP برابر با ۰/٤٤ به‌دست آمد. چولگی به چپ نمودار توزیع فراوانی فواصل ژنتیکی (شکل۲) نیز نشان‌دهنده غالب بودن تعداد فواصل ژنتیکی کم در بین جفت نمونه‌ها می‌باشد.

[1] Total amplified bands
[2] Number of polymorphic bands
[4] Polymorphism information content
[4] Marker index

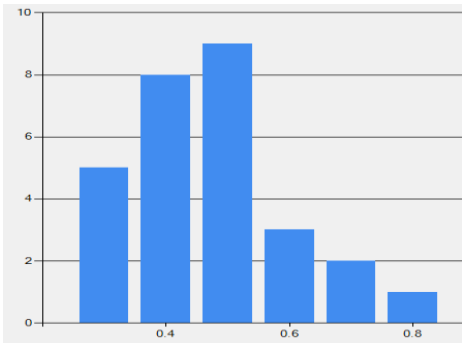


[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.4.11.8 ]

جدول ۲- توالی آغازگرهای CBDP و SCoT به‌همراه نتایج حاصل از تکثیر PCR در نمونه‌های گل محمدی (*Rosa damascena* Mill.) مورد مطالعه

| Marker | Sequence.(5-3) | TB | PB | %P | PIC | MI |
|---|---|---|---|---|---|---|
| CBDP | TGAGCACGATCCAAT AGC | ۷ | ۳ | ٤۳ | ۰/٤٥ | ۱/۳٥ |
| | TGAGCACGATCCAATAAT | ٥ | ۲ | ٤۰ | ۰/۳۸ | ۰/۷٦ |
| | TGAGCACGATCCAAT ACC | ٥ | ۲ | ٤۰ | ۰/۳۰ | ۰/٦۰ |
| | TGAGCACGATCCAAT AAG | ۸ | ۲ | ۲٥ | ۰/۳۰ | ۰/٦۰ |
| | TGAGCACGATCCAAT CTA | ٤ | ۲ | ٥۰ | ۰/۳۰ | ۰/٦۰ |
| | TGAGCACGATCCAAT CAG | ۸ | ۳ | ۳۸ | ۰/۳۲ | ۰/۹٦ |
| | TGAGCACGATCCAAT CGA | ٥ | ۲ | ٤۰ | ۰/۳ | /٦۰ |
| | TGAGCACGATCCAAT CGG | ٤ | ۱ | ۲٥ | ۰/۳۸ | ۰/۳۸ |
| | TGAGCACGATCCAAT GAT | ۷ | ۳ | ٤۳ | ۰/٤۱ | ۱/۲۳ |
| | TGAGCACGATCCAAT GTT | ٥ | ۳ | ٦۰ | ۰/۲۷ | ۰/۸۱ |
| | TGAGCACGATCCAATTGA | ٥ | ۲ | ٤۰ | ۰/۳۰ | ۰/٦۰ |
| | TGAGCACGATCCAATTCA | ۷ | ۲ | ۲۹ | ۰/۳۸ | ۰/۷٦ |
| | TGAGCACGATCCAATTTG | ٤ | ۲ | ٥۰ | ۰/۳٤ | ۰/٦۸ |
| | CTGAGCACGATCCAATAG | ٥ | ۲ | ٤۰ | ۰/۳۸ | ۰/۷٦ |
| | CTGAGCACGATCCAATAC | ۷ | ۳ | ٤۳ | ۰/٤۱ | ۱/۲۳ |
| | میانگین | ٥/۷ | ۲/۳ | ٤۰ | ۰/۳٥ | ۰/۷۹ |
| SCoT | CAACAATGGCTACCACCA | ٥ | ۲ | ٤۰ | ۰/۳۸ | ۰/۷٦ |
| | CAACAATGGCTACCACCC | ۷ | ۳ | ٤۳ | ۰/۳۲ | ۰/۹٦ |
| | CAACAATGGCTACCACCG | ٤ | ۲ | ٥۰ | ۰/۳۰ | ۰/٦۰ |
| | CAACAATGGCTACCACCT | ٥ | ۳ | ٦۰ | ۰/۲۷ | ۰/۸۱ |
| | CAACAATGGCTACCACGA | ٤ | ۳ | ۷٥ | ۰/۳۲ | ۰/۹٦ |
| | CAACAATGGCTACCACGC | ٥ | ۲ | ٤۰ | ۰/۳۸ | ۰/۷٦ |
| | CAACAATGGCTACCACGG | ٥ | ۳ | ٦۰ | ۰/۳۲ | ۰/۹٦ |
| | CAACAATGGCTACCACGT | ٤ | ۱ | ۲٥ | ۰/۳۸ | ۰/۳۸ |
| | CAACAATGGCTACCAGCA | ۷ | ۳ | ٤۳ | ۰/۳۲ | ۰/۹٦ |
| | CAACAATGGCTACCAGCC | ۸ | ٤ | ٥۰ | ۰/۲۸ | ۱/۱۲ |
| | ACGACATGGCGACCACGC | ۸ | ۳ | ۳۸ | ۰/۲۷ | ۰/۸۱ |
| | ACGACATGGCGACCGCGA | ٥ | ۲ | ٤۰ | ۰/۲۲ | ۰/٤٤ |
| | CCATGGCTACCACCGGCC | ۹ | ٤ | ٤٤ | ۰/۳۰ | ۱/۲ |
| | CATGGCTACCACCGGCCC | ٥ | ۲ | ٤۰ | ۰/۳۸ | ۰/۷٦ |
| | ACCATGGCTACCACCGCG | ۷ | ۳ | ٤۳ | ۰/٤۱ | ۱/۲۳ |
| | میانگین | ٥/۸ | ۲/۷ | ٤٦ | ۰/۳۲ | ۰/۸٥ |

TB: تعداد کل باند PB: تعداد باند چندشکل %P: درصد چندشکلی PIC: محتوای اطلاعات چندشکل MI: شاخص نشانگر



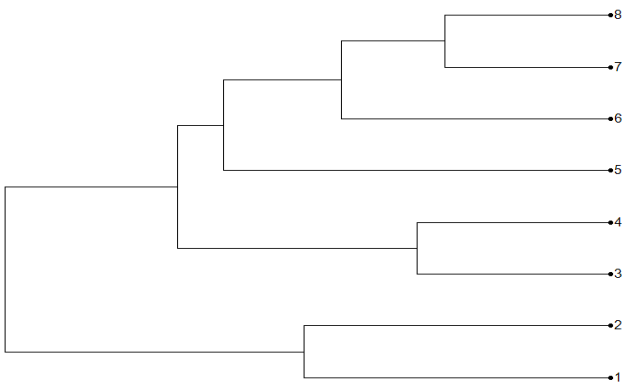

شکل ۲- توزیع فراوانی فواصل ژنتیکی برآورد شده بین جفت نمونه‌های مورد بررسی



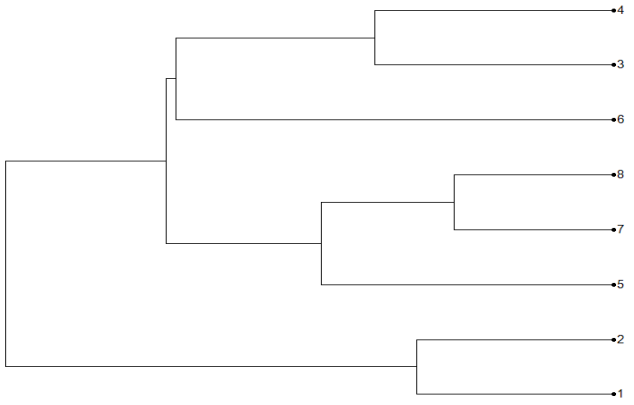
[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.4.11.8 ]

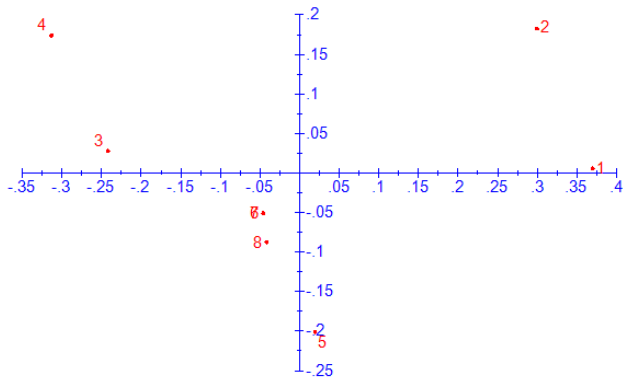
تجزیه کلاستر بر اساس داده‌های SCoT هشت نمونه مورد بررسی را در دو گروه کلی دسته‌بندی نمود. گروه اول شامل نمونه‌های رشدیافته در محیط‌های ۱ و ۲ و سایر نمونه‌ها در گروه دوم قرار گرفتند (شکل۳). نکته قابل توجه اینکه این دسته‌بندی در نتیجه تجزیه کلاستر داده‌های CBDP نیز تکرار شد (شکل٤). با بررسی وضعیت ترکیب محیط‌های مورد آزمایش، ملاحظه می‌شود اگرچه بر اساس برآورد فواصل ژنتیکی بین نمونه‌ها و سایر شاخص‌های برآورد شده، در مجموع بین نمونه‌های مورد مطالعه تنوع اندکی قابل مشاهده است لیکن به‌نظر می‌رسد نمونه‌های رشدیافته در غلظت‌های بیشتر 2,4-D (0.5 mg/L) به لحاظ ژنتیکی تغییرات بیشتری را نسبت به سایرین نشان داده‌اند. که البته تعداد بالای واکشت‌های انجام گرفته نیز قاعدتاً بر شدت تاثیر آن افزوده است. در نتایج تحقیق دیگری که به‌منظور بررسی اثر غلظت‌های مختلف تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی بر وقوع تغییرات ژنتیکی در کشت درون شیشه‌ای *Ferulago angulata* صورت گرفت نیز مشخص شد که نمونه‌هایی که در محیط‌های حاوی مقادیر بالای 2,4-D رشدیافته بودند، بر اساس داده‌های حاصل از سه نشانگر SCoT، CBDP و ISSR از فاصله ژنتیکی بیشتری نسبت به نمونه رشد یافته درمحیط شاهد برخوردار بودند (Shooshtari et al. 2018). مطالعه Mendoza and Kaeppler (2002) نیز بیانگر تاثیر مستقیم هورمون 2,4-D بر وقوع تنوع سوماکلونال می‌باشد. تاثیر کاربرد 2,4-D در وقوع تغییرات ژنتیکی طی فرایند ریزازدیادی در بررسی عوامل مؤثر بر وقوع تنوع سوماکلونال در کشت بافت نیشکر نیز تاکید شده است (Solangi et al. 2015). نتایج تجزیه به مختصات اصلی بر اساس نشانگرهای استفاده شده به تفکیک در شکل‌های ۵ و ٦ نیز ارایه شده است که با نتایج تجزیه کلاستر هم‌خوانی داشته و دندروگرام‌های حاصل را تایید می‌نماید.




شکل ۳- دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر نمونه‌های مورد بررسی گل محمدی بر اساس داده‌های SCoT با استفاده از ضریب فاصله دایس و روش UPGMA



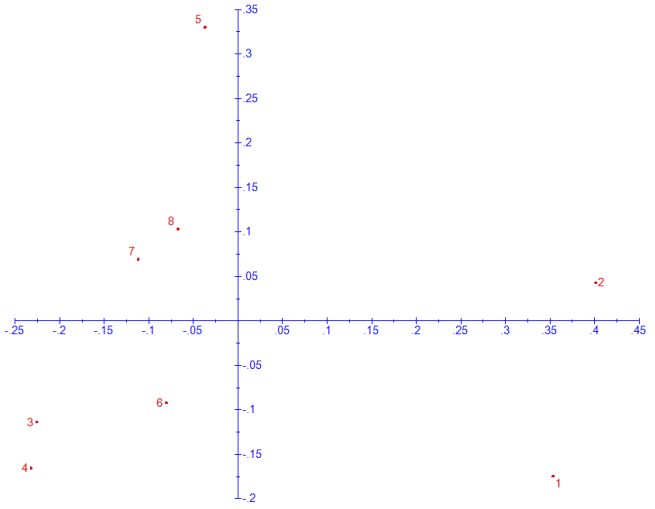

شکل ٤- دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر نمونه‌های مورد بررسی گل محمدی بر اساس داده‌های CBDP با استفاده از ضریب فاصله دایس و روش UPGMA




شکل ۵- نمودار بای پلات حاصل از تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) برای ۸ نمونه گل محمدی بر اساس داده‌های SCoT



[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.4.11.8 ]



شکل ٦- نمودار بای پلات حاصل از تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) برای ۸ نمونه گل‌محمدی بر اساس داده‌های CBDP

## نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق نشان‌دهنده تغییرات ژنتیکی کمتری در فرایند ریزازدیادی با استفاده از جوانه‌های جانبی در مقایسه با گزارش‌های ارایه شده در خصوص میزان تنوع سوماکلونال در باززایی نمونه‌ها از کشت کالوس می‌باشد که بر این اساس می‌توان نتیجه‌گیری نمود که انتظار می‌رود نگرانی از عدم یکنواختی ژنتیکی و تفاوت نمونه‌های تکثیر شده از پایه مادری، در فرایند ریزازدیادی گل محمدی کمتر باشد. لیکن از سوی دیگر، این نتایج نشان‌دهنده اختلاف بیشتر نمونه‌های رشد یافته در غلظت‌های بیشتر 2,4-D در مقایسه با نمونه‌های حاصل از محیط‌های دیگر است که می‌تواند بیانگر احتمال وقوع تغییرات ژنتیکی بیشتر در این نمونه‌ها باشد. ضمن اینکه استفاده از 2,4-D تاثیر چندانی در کیفیت و کمیت ریزازدیادی نداشت. با توجه به این موارد استفاده از 2,4-D به‌خصوص زمانی‌که احتمال می‌رود تعداد و فاصله واکشت‌ها افزایش یابد توصیه نمی‌شود. این نتایج هم‌چنین نشان داد که نشانگرهای SCoT و CBDP نشانگرهای مناسبی در بررسی تنوعات سوماکلونال می‌باشند.

## منابع


Beales P, Cairns T, Duncan W, Fagan G, Grant W, Grapes K, Harkness P, Hughes K, Mattock J, Ruston D, Sutherland P, Williams T (1998) Botanica’ s roses. The encyclopedia of roses. Random House, Australia

Bednarek PT, Orłowska R (2020) Plant tissue culture environment as a switch-key of (epi)genetic changes. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 140: 245-257

Dogramaci-Altuntepe M, Peterson TS, Jauhar PP (2001) Anther culture-derived regenerants of durum wheat and their cytological characterization. American Genetic Association 92: 56-64

Doyle JJ, Doyle KJ (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19: 11-15.

Etienne H, Bertrand B (2003) Somaclonal variation in Coffea arabica: effects of genotype and embryogenic cell suspension age on frequency and phenotype of variants. Tree Physiology 23: 419-426.

Firouzi A, Mohammadi SA, Khosroshahli M, Movafeghi A, Hasanloo T , Khoramdel S (2009) Applying elicitors and feeding with precursor in suspension cell cultures of milk thistle Silybum marianum and their effect on silymarin production. 6th National Biotechnology Congress of Iran, 13-15 Aug, Tehran-Iran.

Grafi G, Ben-Meir H, Avivi Y, Moshe M, Dahan Y, Zemach A (2007) Histone methylation controls telomerase-independent telomere lengthening in cells undergoing dedifferentiation. Developmental Biology 306: 838-846.

Han Z, Crisp PA, Stelpflug S, Kaeppler SM, Li Q, Springer NM (2018) Heritable epigenomic changes to the maize methylome resulting from tissue culture. Genetics 209: 983-995.

Jiang C, Mithani A, Gan X, Belfield EJ, Klingler JP, Zhu JK, Ragoussis J, Mott R, Harberd NP (2011) Regenerant Arabidopsis lineages display a distinct genome-wide spectrum of mutations conferring variant phenotypes. Current Biology 21: 1385-1390

Kabita KC, Sharma SK, Sanatombi K (2019) Analysis of capsaicinoid biosynthesis pathway genes expression in callus cultures of Capsicum chinense Jacq. cv. ‘Umorok’. Plant Cell Tissue and Organ Culture https ://doi.org/10.1007/s1124 0-019-01591

Kosh–Khui M , Sink KC (1982) Rooting enhancement of Rosa hybrida for tissue culture propagation. Scientia Horticulturae 17: 371-376.

Kumar A, Sood A, Palni LMS, Palni UT, Gupta AK (2000) In vitro propagation of Bulgarian rose from selected mature bushes. Journal of Medicinal and Aromatic Plant Science 22: 593-602.

Larkin PJ, Ryan SA, Brettle RIS, Scowcroft WR (1984) Heritable somaclonal variation in wheat. Theoretical and Applied Genetics 76: 443-455.

Li H, Zhao X, Dai H, Wu W, Mao W, Zhang Z (2012) Tissue culture responsive microRNAs in strawberry. The Plant Molecular Biology Reporter 30: 1047-1054.

Mendoza MG, Kaeppler HF (2002) Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryo of wheat (Triticum




[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]

[ DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.4.11.8 ]

aestivum L.) In Vitro Cellular and Developmental Biology. 38: 39-45.
Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.
Nikbakht A, Kafi M, Mirmasoumi M Babalar M (2005) Micropropagation of Damask Rose (Rosa damascena Mill.) cvs Azaran and Ghamsar. International Journal of Agriculture and Biology 7: 535-538.
Noormohammadi Z, Ghasem pour B, Farahani F (2018) Somaclonal variation of tissue culture regenerated plants of Aloe barbadensis Mill. Nova Biologica Reperta 5: 72-81.
Perrier X, Flori A, Bonnot F (2003) Data Analysis Methods. In:Hamon P, Seguin M, Perrier X, Glaszmann JC, editors.Genetic diversity of cultivated tropical plants. Boca Raton,FL (USA): CRC Press
Pourjabar A, Mohammadi SA, Khosroshahli M, Motalebi AR and Ziai SA (2009) Optimization of in vitro culture of Milk Thistle (*Silybum marianum*) and analysis of somaclonal variation by RAPD markers. Journal of Plant Physiology and Breeding 19: 95 - 106.
Rusanov K, Kovacheva N, Vosman B, Zhang L, Rajapakse S, Atanassov A, Atanassov I (2005) Microsatellite analysis of Rosa damascena Mill. accessions reveals genetic similarity between genotypes used for rose oil production and old Damask rose varieties Theoretical and Applied Genetics 111: 804-809.
Sahoo S, Rout GR (2014) Plant regeneration from leaf explants of Aloe barbadensis Mill. and genetic fidelity assessment through DNA markers. Physiology and Molecular Biology of Plants 20: 235-240.
Shabbir A, Hameed N, Ali A, Bajwa R (2009) Effect of different cultural conditions on microprapagation of Rose (Rosa indica L.) Pakistan Journal of Botany 41: 2877-2882.
Shooshtari L, Omidi M, Majidi E, Naghavi M, Ghorbanpour M, Etminan A (2013) Assessment of somaclonal variation of regenerated Ducrosia anethifolia plants using AFLP markers. Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology 17: 99-106.
Shooshtari L, Etminan A, Mehrafarin A, Qaderi A (2014) Genetic and Phytochemical Evaluation of Tissue Culture-derived Plants in Fennel (Foeniculum vulgar) under Different Concentrations of Growth Regulators . Journal of Medicinal Plants 52: 154-162
Shooshtari L, Omidi M, Qaderi A, Zare Karizi AR, Mehrafarin A (2018) Genomic and Phytochemical Assessment of Chavir (Ferulago angulate) under Different in vitro Conditions. Journal of Medicinal Plants 66: 176-189.
Solangi S, Qureshi ST, Nizamani GS, Burio A, Noman A (2015) Exploration of somaclonal variations in elite three sugarcane genotypes Pakistan Journal of Biotechnology 12: 161- 168.
Tabaei-Aghdaei SR, Babaei A, Khosh-Khui M, Jaimand K, Rezaee MB, Assareh MH, Naghavi MR (2007) Morphological and oil content variations amongst Damask rose (Rosa damascena Mill.) landraces from different regions of Iran. Scientia Horticulturae 113: 44-48.
Van der Salm TPM, Van der Toorn CJG, Hänisch ten Cate CH, Dubois LAM, De Vries DP, Dons HJM (1994) Importance of the iron chelate formula for micropropagation of Rosa hybrida L. 'Moneyway'. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 37: 73-77

[ Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19 ]
[ DOR: 20.1001.1.20084439.1399.15.4.11.8 ]