ژنتیک نوین
دوره شانزدهم، شماره ٤، زمستان ١٤٠٠
صفحه ٣٧٢ - ٣٦٣

بررسی پایداری ژنتیکی گیاهچه‌های حاصل از ریزازدیادی *Rosa damascena* با استفاده از نشانگرهای ISSR و SCoT

Evaluation of the genetic fidelity of in vitro propagated Damask Rose (*Rosa damascena* Mill.) plants using SCoT and ISSR markers

نسرین نامداری[۱]، لیا شوشتری*[۲]، علی مهراس مهرابی[۲]، علیرضا اطمینان[۳]

۱- دانشجوی دکترا، گروه بیوتکنولوژی و بهنژادی گیاهی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران
۲- استادیار، گروه بیوتکنولوژی و بهنژادی گیاهی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران
۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی و بهنژادی گیاهی، واحد کرمانشاه، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمانشاه، ایران

Namdari N[1], Shooshtari L[*2], Mehras Mehrabi A[2], Etminan A[3]

1- PhD Student, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran
2- Assistant Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran
3- Associate Professor, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Kermanshah Branch, Islamic Azad University, Kermanshah, Iran

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

(تاریخ دریافت: ١٤٠٠/٠٥/٠٣ - تاریخ پذیرش: ١٤٠٠/٠٨/٠٦)

چکیده

حفظ خلوص ژنتیکی و همسانی گیاهچه‌های حاصل از تکثیر درون شیشه‌ای با گیاه مادری یکی از مهمترین پیش نیازهای اساسی در ریز ازدیادی گونه‌های گیاهی به‌شمار می‌رود. در مطالعه حاضر پایداری ژنتیکی در ۲۸ گیاهچه گل محمدی حاصل از ریزازدیادی که از ۳ محیط مختلف با غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد به‌دست آمده بودند به‌وسیله نشانگرهای SCoT و ISSR مورد بررسی قرار گرفت. پس از تهیه ریزنمونه‌های لازم از یک پایه مادری مشخص، از محیط MS جامد برای مرحله استقرار ریزنمونه‌ها استفاده شد و سپس ریز نمونه‌های استقرار یافته به محیط پرآوری با سه غلظت مختلف تنظیم کننده‌های رشد منتقل شدند. برای ریشه‌دار کردن گیاهچه‌ها، نمونه‌های حاصل از محیط پرآوری بر روی محیط MS جامد حاوی IAA و IBA واکشت شدند و سپس گیاهچه‌های ریشه‌دار شده برای مرحله سازگاری به محیط گلخانه انتقال یافتند. استخراج DNA ژنومی از برگ‌های جوان گیاهچه‌های حاصل انجام شد. تعداد ۲۰ آغازگر SCoT و ۲۰ آغازگر ISSR برای ارزیابی پایداری ژنتیکی گیاهچه‌های حاصل از ریزازدیادی مورد استفاده قرار گرفت که از بین این ٤٠ آغازگر تنها ١٤ آغازگر SCoT و ١١ آغازگر ISSR باندهای مشخص و قابل امتیازدهی تکثیر کردند. با استفاده از مجموع ۲۵ آغازگر SCoT و ISSR تعداد ۱۳۹ مکان تکثیر شد که از این بین، تنها ۳۵ مکان چندشکلی نشان دادند. متوسط تعداد مکان چندشکل به ازای هر آغازگر برای نشانگرهای SCoT و ISSR به‌ترتیب برابر ۱/۵ و ۱/۳ به‌دست آمد. بر اساس پارامترهای ژنتیکی برآورد شده (حداکثر مقدار شاخص شانون، هتروزیگوسی و تعداد آلل موثر به‌ترتیب ۰/٤۲ ، ۰/۲۸ و ۱/۵ به‌دست آمد) و نتایج تجزیه‌های آماری داده‌ها در مجموع، سطح پایینی از تنوع دربین گیاهچه‌های حاصل از ریزازدیادی شناسایی شد. به‌خصوص گیاهچه‌های حاصل از محیط‌های شماره II و III تنوع بسیار کمتری در مقایسه با گیاهچه‌های حاصل از محیط I نشان دادند. بدین ترتیب این نتایج نشان داد که محیط‌های پرآوری شماره II و III می‌توانند با موفقیت برای تولید تجاری گیاهچه‌های کشت بافتی گل محمدی با حداقل احتمال ایجاد ناپایداری ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی

پایداری ژنتیکی
ریزازدیادی
گل محمدی
نشانگرهای DNA

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.4.8.2]

مقدمه

در طی دو دهه اخیر استفاده از تکنیک ریزازدیادی از طریق قطعات مختلف ریز نمونه در گونه‌های مختلفی نظیر *Prunus avium* (Dukovic 2006)، *Cedrus atlantica* (Renau-Murataet et al. 2005)، *Acacia mangium* (Monteuuis 2004) و بسیاری گونه‌های دیگر گزارش شده است و گیاه باارزش گل محمدی (damask rose) با نام علمی *Rosa damascena* نیز ازجمله گونه‌های گیاهی به‌شمار می‌رود که گزارشات زیادی در خصوص ریزازدیادی آن وجود دارد و در این رابطه انواع محیط‌های کشت و ترکیبات تنظیم کننده‌های رشد برای مراحل مختلف ریزازدیادی آن در مقالات مختلف ارائه شده است. به‌عنوان نمونه در یک بررسی، استفاده از ترکیب 0.1mg/L NAA+ 0.1 mg/L GA3+ 1.5mg/L BAP در مقایسه با سایر ترکیبات بهترین ترکیب تنظیم کننده‌های رشد در محیط پرآوری به لحاظ تعداد ساقه‌های جانبی، سرعت رشد و میزان سبزینگی گزارش شده است (Asadi and Shooshtari 2021). در نتایج حاصل از پژوهش دیگری که به‌منظور بهینه‌سازی ریزازدیادی *Rosa damascena* انجام گرفته استفاده از تنظیم کننده‌های رشد BA و NAA به‌ترتیب به میزان 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 damascena*، استفاده از GA3 در ترکیب با BA و NAA ضروری می‌باشد (Kumar et al. 2000; Nikbakht et al. 2005). ارزش بالای این گونه گیاهی و کاربردهای فراوان و گسترده آن در صنایع مختلف از جمله داروسازی، صنایع غذایی، تولیدات آرایشی و بهداشتی (Tabaei-Aghdaei et al. 2007) یکی از دلایل افزایش تقاضا برای این محصول ارزشمند است. علاوه بر این، سازگاری این گیاه به دامنه وسیعی از شرایط اقلیمی باعث شده تا روند کشت و کار این گونه گیاهی به‌طور پیوسته در حال افزایش باشد و به‌همین دلیل، تقاضا برای نهال‌های این گونه گیاهی به‌منظور توسعه کشت و کار آن بالاست. تولید نهال از طریق ریزازدیادی به‌دلیل کوتاه شدن زمان فرایند تکثیر و درنتیجه افزایش سرعت تولید یکی از راه‌های پاسخ به این افزایش تقاضای بازار است. از سوی دیگر تکثیر گیاهان یکنواخت و عاری از پاتوژن در یک زمان کوتاه و در مقیاس بسیار وسیع از جمله مزیت‌های مهم دیگر این تکنیک به‌شمار می‌رود (Shabbir et al. 2009). لیکن نباید از این نکته مهم غافل بود که ریزازدیادی در کنار مزایای خود می تواند مشکلاتی را نیز به‌همراه داشته باشد که وقوع تغییرات ناخواسته ژنتیکی در طی فرایند تکثیر و از دست رفتن اصالت ژنتیکی گیاه مادری یکی از این مشکلات است. در نتایج تحقیقات مختلف نشان داده شده است که موفقیت در ریزازدیادی گیاهان از جمله *Rosa damascena* به عوامل متفاوتی مانند محیط کشت پایه مورد استفاده، نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد، نوع و سن ریزنمونه، ژنوتیپ پایه مادری، تعداد واکشت‌ها و موارد دیگر وابسته است (Jabbarzadeh and Khosh-Khui 2005; Mahmoudi Noodezh et al. 2012). از سوی دیگر مطالعات مختلفی وجود دارند که نتایج آن‌ها نشان می‌دهد عواملی مانند نوع و غلظت اکسین‌ها و سیتو کینین‌های مورد استفاده در ترکیب محیط‌های کشت، منبع تهیه ریزنمونه و همچنین تعداد و طول دوره واکشت‌ها بر پاره‌ای از تغییرات ژنتیکی ناخواسته در شرایط کشت بافت انواع گونه‌های گیاهی مؤثرند (Etienne et al. 2003; Larkin et al. 1984; Noormohammadi et al. 2018; Pourjabar et al. 2009; Shooshtari et al. 2014). به‌طورکلی برنامه‌ریزی برای ایجاد یک گیاه کامل از یک ریزنمونه در شرایط کشت بافت مستلزم مجموعه‌ای از فرایندهای پیچیده و فعالیت‌های بیولوژیکی است که این فرایندها و فعالیت‌ها می‌تواند منجر به پاره‌ای از تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی در گیاهان حاصل شود (Bednarek and Orłowska 2020).

گزارش‌هایی وجود دارند که نشان می‌دهند ترکیب محیط‌های کشت با ایجاد انواع موتاسیون‌های نقطه‌ای و کروموزومی و همچنین تغییر در فعالیت ترانسپوزون‌ها می‌تواند باعث پدید آمدن ویژگی‌های جدیدی در گیاهان حاصل از کشت بافت شود (Jiang et al. 2011; DogramaciAltuntepe et al. 2001; Bednarek and Orłowska 2020). تغییرات اپی‌ژنتیکی نظیر متیلاسیون و دمتیلاسیون هیستون‌ها (Grafi et al. 2007)، تغییر در بیان ژن‌ها (Kabita et al. 2019) و نیز تغییر در عملکرد micro RNAs از جمله مواردی هستند که با شرایط کشت بافت مرتبط می‌باشند (Li et al. 2012).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.4.8.2]

در روش ریزازدیادی ضروری است گیاهان حاصل از تکثیر کاملاً شبیه به پایه مادری که به‌عنوان ژنوتیپ ایده آل بر اساس اهداف تجاری انتخاب شده باشند. لذا با توجه به احتمال وقوع تغییرات ژنتیکی تحت تاثیر شرایط محیط کشت و تاثیر تنظیم کننده‌های رشد مورد استفاده در فرایند ریزازدیادی، همواره این نگرانی در خصوص حفظ اصالت ژنتیکی نمونه‌های تکثیر یافته و شباهت کامل آن به پایه مادری وجود دارد. اگرچه کم کردن مدت زمان و دوره واکشت‌ها و پرهیز از کاربرد غلظت‌های بالای برخی مواد مانند 2,4-D در محیط کشت تا حدودی به کاهش این تغییرات ناخواسته کمک می‌کند لیکن تضمین ثبات ژنتیکی نمونه‌های تکثیر یافته از جمله دغدغه‌های همیشگی در این زمینه می‌باشد. لذا در کنار توجه به کارآمدی پروتکل‌های پیشنهادی برای ریزازدیادی از لحاظ سرعت تکثیر و تلفات اندک، این نکته نیز همواره مورد توجه است که تنظیم کننده‌های رشد و یا هرگونه افزودنی دیگری مانند انواع stimulant یا elicitor به‌کار رفته در ترکیب محیط‌های بهینه شده، دارای حداقل تاثیر بر تغییرات احتمالی ژنتیکی و ازدست رفتن اصالت پایه مادری باشند.

استفاده از نشانگرهای ملکولی یکی از روش‌های بررسی پایداری ژنتیکی گیاهان کشت بافتی است که می‌تواند برای شناسایی تغییرات ژنتیکی احتمالی که در شرایط کشت بافت رخ داده بسیار کارآمد باشد. طیف متنوعی از نشانگرهای DNA برای این منظور در مطالعات مختلف بر روی گونه‌های گیاهی متفاوتی مورد استفاده قرارگرفته که از آن جمله می‌توان به استفاده از نشانگر AFLP در ارزیابی ژنتیکی نمونه‌های حاصل از کشت بافت *Foeniculum vulgar* در غلظت‌های مختلف هورمونی (Shooshtari et al. 2014)، 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)، استفاده از نشانگرهای SCoT، CBDP و ISSR در بررسی تغییرات ژنتیکی در نمونه‌های کشت بافتی گیاه دارویی *Ferulago angulata* (Shooshtari et al. 2018)، استفاده از نشانگرهای SCoT و CBDP در بررسی تغییرات ژنتیکی در ریزازدیادی *Rosa damascena* (Asadi and Shooshtari 2021)، و استفاده از نشانگر RAPD در بررسی تنوع سوماکلونال در کشت درون شیشه‌ای *Silybum marianum* (Pourjabar et al. 2009) اشاره نمود.

در این مطالعه که با هدف بررسی تأثیر ترکیب محیط کشت بر ایجاد تغییرات ژنتیکی در نمونه‌های گیاهی رشد یافته در شرایط کشت بافت و ارزیابی کارایی نشانگرهای مورد استفاده در بررسی این تنوع انجام شد، پایداری ژنتیکی گیاهان به‌دست آمده در ریزازدیادی گل محمدی (*Rosa damascena* Mill.) در سه محیط مختلف پرآوری که بر اساس مطالعات قبلی (Mahmoudi Noodezh et al. 2012; Nikbakht et al. 2005; Asadi and Shooshtari 2021) بهینه‌سازی شده‌اند، توسط دو نوع از نشانگرهای DNA مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

به‌منظور تولید گیاهچه‌های لازم برای استخراج DNA ژنومی، ابتدا ریزنمونه‌های مورد نیاز به طول تقریبی ۳ سانتی‌متر از ساقه‌های جوان یک پایه مادری واحد جدا شدند به‌طوری که هر قطعه واجد یک گره بود. ریزنمونه‌های تهیه شده پس از شستشوی سطحی و قرارگیری در معرض آب جاری به مدت ۳۰ دقیقه، در زیر هود لامینار توسط کلرید جیوه ۰/۱درصد و زمان اثر ۷ دقیقه ضدعفونی و سپس طی سه نوبت آب‌کشی شدند.

برای مرحله استقرار از محیط MS جامد (Murashige and Skoog 1962) فاقد هرگونه تنظیم کننده رشد استفاده شد و پس از حدود یک ماه که برگچه‌ها بر روی ریزنمونه به‌خوبی ظاهر شدند، انتقال نمونه‌ها به محیط پرآوری در شرایط استریل و در زیر هود لامینار صورت گرفت. برای این مرحله از محیط VS مایع (Van der Salm et al. 1994) استفاده شد و سه ترکیب مختلف از تنظیم کننده‌های رشد که بر اساس مطالعات پیشین در تحقیقات مختلف بر روی بهینه‌سازی ریزازدیادی گیاه مورد بررسی به‌عنوان بهترین ترکیب محیط پرآوری گزارش شده بود در این محیط پایه مورد استفاده قرار گرفت (جدول۱). پس از پنج مرحله انجام واکشت به فاصله هر ۲۰ روز یکبار، نمونه‌های رشد یافته در هریک از سه محیط پرآوری به محیط ریشه‌زایی واجد ترکیبات محیط پایه MS جامد به‌همراه ۲ میلی‌گرم بر لیتر IAA و ۲ میلی‌گرم بر لیتر IBA انتقال داده شدند. پس از ریشه‌دار شدن

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.4.8.2]

نمونه‌ها در شرایط درون شیشه‌ای، گیاهچه‌های ریشه‌دار شده به آرامی به سینی‌های مخصوص نشا حاوی پیت ماس، کوکوپیت و پرلیت منتقل و برای حدود ۱۵ روز در داخل سبدهایی با ارتفاع حدود ۳۰ سانتی‌متر و دارای پوشش نایلونی برای حفظ حداکثر رطوبت در فضای اطراف نمونه‌ها در شرایط کاملاً کنترل شده نگهداری و در نهایت در گلدان‌های حاوی نسبت برابر ترکیبات مورد اشاره کشت شدند. با توجه به استفاده از سه محیط مختلف در مرحله پرآوری، از نمونه‌های ریشه‌دار شده و سازگار شده حاصل از هر محیط تعداد ۱۰ گیاهچه به‌عنوان تکرارهای آزمایش انتخاب شد (البته با توجه به از دست رفتن تعداد نمونه‌های بیشتر مربوط به محیط پرآوری شماره II، تنها ۸ گیاهچه ریشه‌دار شده و سازگار یافته از این محیط باقی ماند که به‌همین دلیل تعداد کل گیاهچه‌های مورد استفاده برای استخراج DNA برابر با ۲۸ گیاهچه (۱۰ نمونه از محیط I، ۸ نمونه از محیط II و ۱۰ نمونه از محیط III) بود.

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

محیط کشت	ترکیب و غلظت (mg/L) تنظیم کننده‌های رشد					
I	GA3 (0.2)	+	BAP (4.0)	+	IAA (0.25)	Mahmoudi Noodezh et al. (2012)
II	GA3 (0.1)	+	BA (1.0)	+	NAA (0.1)	Nikbakht et al.(2005)
III	GA3 (0.1)	+	BAP (1.5)	+	NAA (0.1)	Asadi et al. 2021

IAA (indole-3-acetic acid)
NAA (Naphthalene Acetic Acid)
GA3 (Gibberellic Acid)
BAP (6-Benzylaminopurine)
BA (Benzyl Adenine)

استخراج DNA ژنومی از برگ‌های جوان تعداد ۲۸ گیاهچه مورد اشاره بر اساس دستورالعمل CTAB[1] انجام و کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد بررسی شد.

ارزیابی ملکولی نمونه‌های DNA استخراج شده با استفاده از۴۰ آغازگر شامل ۲۰ آغازگر SCoT و ۲۰ آغازگر ISSR انجام شد، لیکن از بین الگوهای باندی حاصل این ۴۰ آغازگر تنها در ۲۵ مورد باندهای واضح و دارای چندشکلی مشاهده شد که حاصل از ۱۴ آغازگر SCoT و ۱۱ آغازگرISSR بودند؛ بنابراین تجزیه و تحلیل داده‌ها بر اساس این ۲۵ الگوی باندی انجام شد. واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل دو میکرولیتر DNA ژنومی، دو میکرولیتر آغازگر با غلظت 10ng/uL، شش میکرولیتر آب دیونیزه و ۱۰ میکرولیتر مستر میکس (2X) شرکت سیناکلون انجام شد. واکنش‌های تکثیر با استفاده از ترموسایکلر Biorad (مدل T-100) با برنامه دمایی شامل یک مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه و ۳۵ چرخه حرارتی شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر در دمای بهینه برای آغازگر به مدت یک دقیقه و پلیمریزاسیون در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱/۵ دقیقه انجام شد. در انتها، یک مرحله توسعه نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه نیز درنظر گرفته شد. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با استفاده از بافر TBE تفکیک و رنگ‌آمیزی ژل‌ها با استفاده از Safeview انجام شد. الگوهای باندی به‌دست آمده بر اساس وجود یا عدم وجود باند به‌صورت یک و صفر امتیاز دهی شدند و پس از برآورد فواصل ژنتیکی بر اساس ضریب فاصله جاکارد، تجزیه‌های آماری و محاسبات مربوطه صورت گرفت. برای تجزیه و تحلیل داده‌های به‌دست

[1] Cethyl Trimenthyl Ammonium Bromide

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.4.8.2]

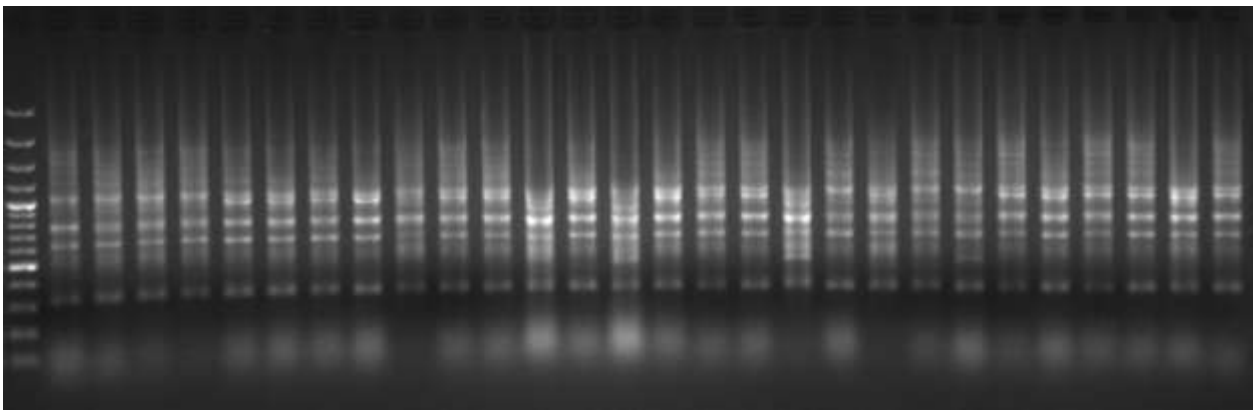
آمده شامل برآورد مقدار فاصله ژنتیکی، برآورد شاخص‌های تنوع مانند میزان هتروزیگوسی، شاخص شانون، تعداد الل مؤثر، تجزیه به مختصات اصلی و تجزیه کلاستر از نرم‌افزارهای DARwin (Perrier et al. 2003) و GenAlEx (Peakall and Smouse 2006) استفاده شد.

نتایج و بحث

الگوهای باندی به‌دست آمده از الکتروفورز محصولات PCR با استفاده از هردو سری آغازگرهای ISSR و SCoT بیانگر تشابه بسیار زیاد پروفایل DNA نمونه‌های مختلف بود و تنها تعداد اندکی باندهای متفاوت در هریک از ژل‌های الکتروفورزی قابل تشخیص بودند. (لازم به ذکر است از بین ٤٠ آغازگر مورد استفاده ٣٧ آغازگر در تکثیر قطعات ژنوم موفق عمل نمودند لیکن در ١٢ مورد باندهای به‌دست آمده در طول ٢٨ نمونه کاملاً یکسان و فاقد چندشکلی بودند وتنها در ٢٥ مورد از الگوهای باندی چندشکلی‌های جزیی مشاهده شد). توسط ٢٥ آغازگر مورد استفاده در این مطالعه در مجموع ١٣٩ باند قابل امتیازدهی تکثیر شد که از این تعداد تنها ٣٥ باند چندشکلی نشان دادند و سهم آغازگرهای SCoT و ISSR از باندهای چندشکل ایجاد شده به‌ترتیب برابر با ٢١ و ١٤ باند بود. با توجه به اطلاعات جدول ٢ ملاحظه می‌شود متوسط تعداد باند چندشکل به‌ازای هر آغازگر برای آغازگرهای SCoT برابر ١/٥ در مقابل ١/٣ برای آغازگرهای ISSR و میانگین درصد چندشکلی آغازگرها برای دو نشانگر SCoT و ISSR به‌ترتیب ٢٦ و ٢٥ درصد به‌دست آمد.

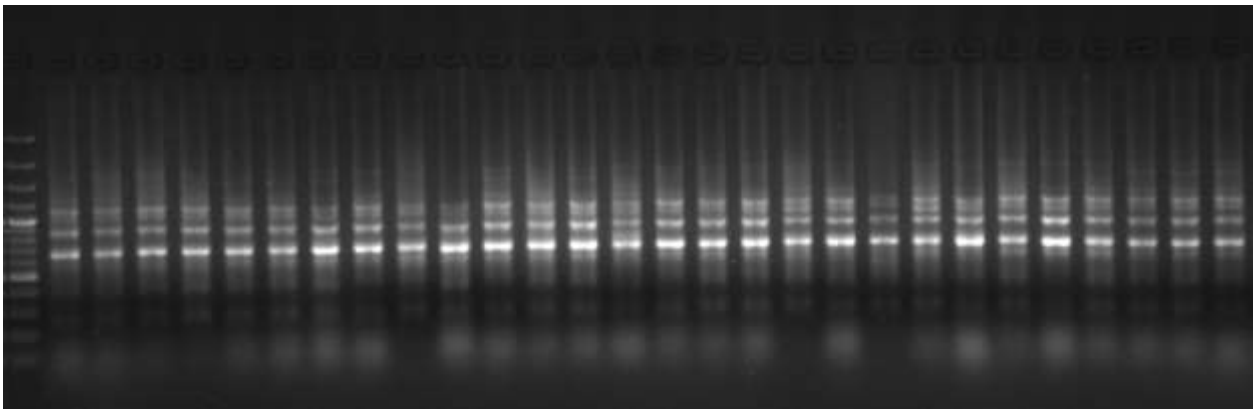
باتوجه به اهمیت و کاربرد شاخص محتوای اطلاعات چند شکل (PIC[1]) و همچنین شاخص نشانگر (MI[2]) در تعیین کارایی یک سیستم نشانگری، مقادیر این دوشاخص برای نشانگرهای مورد استفاده برآورد شد که نتایج نشان داد مقدار شاخص PIC برای نشانگرهای SCoT و ISSR به‌ترتیب برابر ٠/١٨ و ٠/١٦ می‌باشد که با توجه به دامنه تغییرات PIC برای نشانگرهای غالب در فاصله صفر تا ٠/٥٠، این مقادیر اعداد چندان زیادی نیستند اگرچه نشانگرهای مورد استفاده در گزارشات قبلی معمولاً جزو نشانگرهای آگاهی بخش با کارایی خوب تا بسیار خوب معرفی شده‌اند. یکی از دلایل اصلی کم بودن مقادیر PIC را ماهیت مواد ژنتیکی مورد استفاده در این بررسی می‌توان ذکر نمود چرا که اصولا مواد ژنتیکی همگی دارای ژنوتیپ واحدی بودند و با توجه به محیط‌های مورد استفاده که جزو محیط‌های توصیه شده بر اساس مطالعات قبلی (Mahmoudi Noodezh et al. 2012; Nikbakht et al. 2005; Asadi and Shooshtari 2021) می‌باشند، حداقل تغییرات ناشی از اثر تنظیم کننده‌های رشد مورد انتظار بود. از سوی دیگر با توجه به تعداد اندک باندهای چندشکل به‌دست آمده مقدار شاخص MI نیز برای هردو سیستم نشانگری اندک بود به‌طوری که متوسط MI برای آغازگرهای SCoT و ISSR به‌ترتیب ٠/٣٠ و ٠/٢٠ برآورد شد.

[1] Polymorphism information content
[2] Marker index



شکل ١- الگوی باندی حاصل از الکتروفورز قطعات تکثیر شده با استفاده از آغازگر SCoT-1 در بررسی تنوع نمونه‌های حاصل از ریزازدیادی گل‌محمدی

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.4.8.2]



شکل ۲- الگوی باندی حاصل از الکتروفورز قطعات تکثیر شده با استفاده از آغازگر ISSR-4

جدول ۲- توالی آغازگرهای SCoT و ISSR مورد استفاده در بررسی پایداری ژنتیکی نمونه‌های حاصل از ریزازدیادی *Rosa damascena* و شاخص‌های کارایی آن‌ها

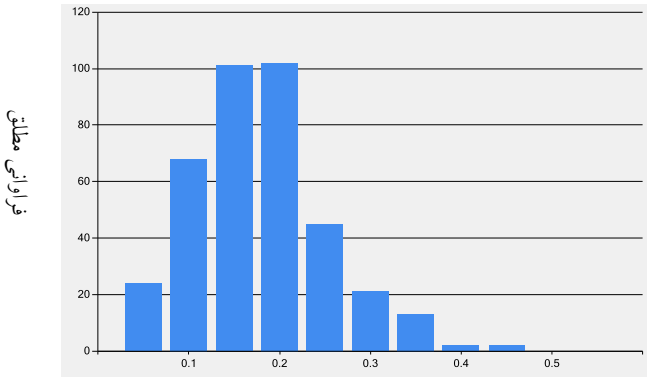
Marker	Sequence.(5-3)	TB	PB	%P	PIC	MI
SCoT	SCoT-1 : CAACAATGGCTACCACCA	۸	۳	۳۸	۰/۳۵	۱/۰۵
	SCoT-2 : CAACAATGGCTACCACCC	۷	۲	۲۹	۰/۱۳	۰/۲۶
	SCoT-3 : CAACAATGGCTACCACCG	۸	۲	۲۵	۰/۱۹	۰/۳۸
	SCoT-4 : CAACAATGGCTACCACCT	۵	۱	۲۰	۰/۲۴	۰/۲۴
	SCoT-5 : CCATGGCTACCACCGCCA	۴	۱	۲۵	۰/۱۹	۰/۱۹
	SCoT-6 : CAACAATGGCTACCACGC	۵	۱	۲۰	۰/۰۷	۰/۰۷
	SCoT-7 : CAACAATGGCTACCACGG	۷	۱	۱۴	۰/۱۳	۰/۱۳
	SCoT-8 : CAACAATGGCTACCACGT	۵	۱	۲۰	۰/۱۳	۰/۱۳
	SCoT-9 : CAACAATGGCTACCAGCA	۸	۲	۲۵	۰/۲۹	۰/۵۸
	SCoT-10 : CAACAATGGCTACCAGCC	۵	۱	۲۰	۰/۰۷	۰/۰۷
	SCoT-11 : ACGACATGGCGACCACGC	۶	۲	۳۳	۰/۱۶	۰/۳۲
	SCoT-12 : ACGACATGGCGACCGCGA	۴	۱	۲۵	۰/۱۳	۰/۱۳
	SCoT-13 : ACCATGGCTACCACCGGC	۵	۲	۴۰	۰/۲۴	۰/۴۸
	SCoT-14 : ACGACATGGCGACCCACA	۴	۱	۲۵	۰/۱۹	۰/۱۹
	میانگین	۵/۸	۱/۵	۲۶	۰/۱۸	۰/۳۰
ISSR	ISSR-1 : GGATGGATGGATGGAT	۷	۱	۱۴	۰/۱۳	۰/۱۳
	ISSR-2 : GACAGACAGACAGACA	۵	۱	۲۰	۰/۱۳	۰/۱۳
	ISSR-3: AGAGAGAGAGAGAGAGYT	۵	۲	۴۰	۰/۳۰	۰/۶۰
	ISSR-4 : ACACACACACACACACC	۵	۱	۲۰	۰/۱۳	۰/۱۳
	ISSR-5 : GAGAGAGAGAGAGAGARC	۷	۲	۲۹	۰/۱۶	۰/۳۲
	ISSR-6 : CTCTCTCTCTCTCTCTG	۳	۱	۳۳	۰/۲۴	۰/۲۴
	ISSR-7 : GTGTGTGTGTGTGTGTC	۵	۱	۲۰	۰/۰۷	۰/۰۷
	ISSR-8 : CACACACACACACACAG	۵	۱	۲۰	۰/۱۹	۰/۱۹
	ISSR-9 : AGAGAGAGAGAGAGAGC	۴	۱	۲۵	۰/۱۳	۰/۱۳
	ISSR-10 : ACACACACACACACACYA	۷	۱	۱۴	۰/۱۹	۰/۱۹
	ISSR-11 : GTGTGTGTGTGTGTGTYG	۵	۲	۴۰	۰/۰۷	۰/۱۴
	میانگین	۵/۳	۱/۳	۲۵	۰/۱۶	۰/۲۰

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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.4.8.2]

درخصوص برآورد فواصل ژنتیکی بین نمونه‌ها نیز با توجه به درجه تشابه بالا میانگین فاصله ژنتیکی همان‌گونه که انتظار می‌رفت اندک بود. فواصل ژنتیکی بین نمونه‌ها بر اساس مجموع ۳۵ باند چند شکل حاصل از هردو سیستم نشانگری در دامنه صفر تا ۰/٤۱ متغیر بود و میانگین فاصله ژنتیکی برابر ۰/۱۵برآورد شد. منحنی توزیع فراوانی فواصل ژنتیکی دارای چولگی به چپ بود (شکل۳) که این حالت نمودار نیز بیانگر فراوانی بالای تعداد فواصل ژنتیکی با مقادیر اندک در بین جفت نمونه‌ها می‌باشد. با توجه به بررسی به‌ترتیب ۱۰، ۸ و ۱۰ نمونه حاصل از هریک از سه محیط پرآوری با ترکیبات مختلف هورمونی، شاخص‌های تنوع برآورد شده برای این سه گروه حاکی از وجود تنوع بیشتر در نمونه‌های حاصل از محیط I (0.2mg/L GA3 + 4mg/L BAP + 0.25mg/L IAA) بود. به‌طور مثال مقدار شاخص شانون (I) در این جمعیت برابر با ۰/٤۲ برآورد شد که تقریباً یک و نیم برابر مقدار این شاخص در دو جمعیت دیگر بود. سایر شاخص‌های برآورد شده در جدول ۳ ارائه شده است. بررسی الگوهای باندی به تفکیک هریک از این سه جمعیت نیز حاکی از وجود تعداد چهار باند اختصاصی برای نمونه‌های حاصل از محیط I و تنها یک باند اختصاصی برای جمعیت حاصل از محیط III بود و جمعیت حاصل از محیط II فاقد باند اختصاصی بود (شکل٤).

سایر اطلاعات مربوط به باندهای مشاهده شده در این سه گروه در شکل ٤ قابل مشاهده است. نتایج حاصل از تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) بر اساس تجمیع داده‌های SCoT و ISSR نیز نشان‌دهنده یکنواختی نمونه‌های مورد بررسی بود لیکن با توجه به وضعیت قرارگرفتن برخی از نمونه‌های مربوط به محیط I وجود تنوع (ناپایداری) در نمونه‌های این محیط را نشان داد (شکل ۵).



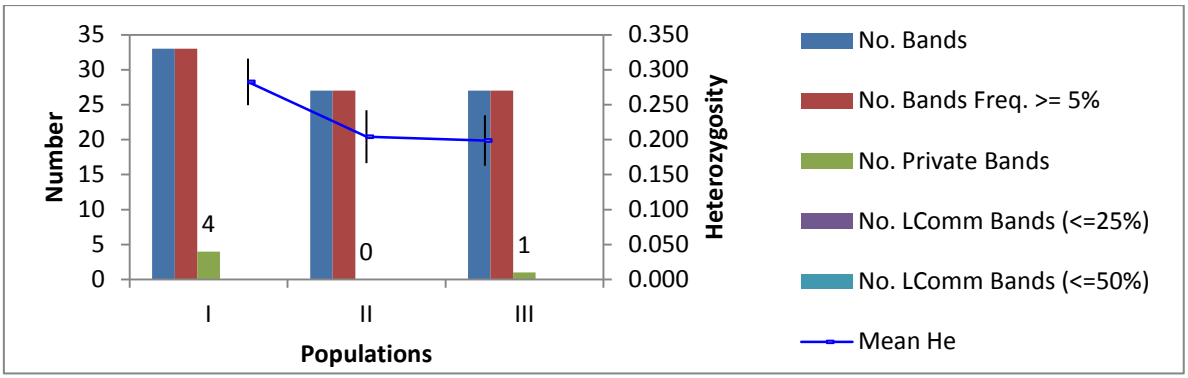
شکل ۳- توزیع فراوانی فواصل ژنتیکی برآورد شده بین جفت نمونه‌های مورد بررسی

جدول ۳- شاخص‌های تنوع محاسبه شده در جمعیت‌های مورد مطالعه

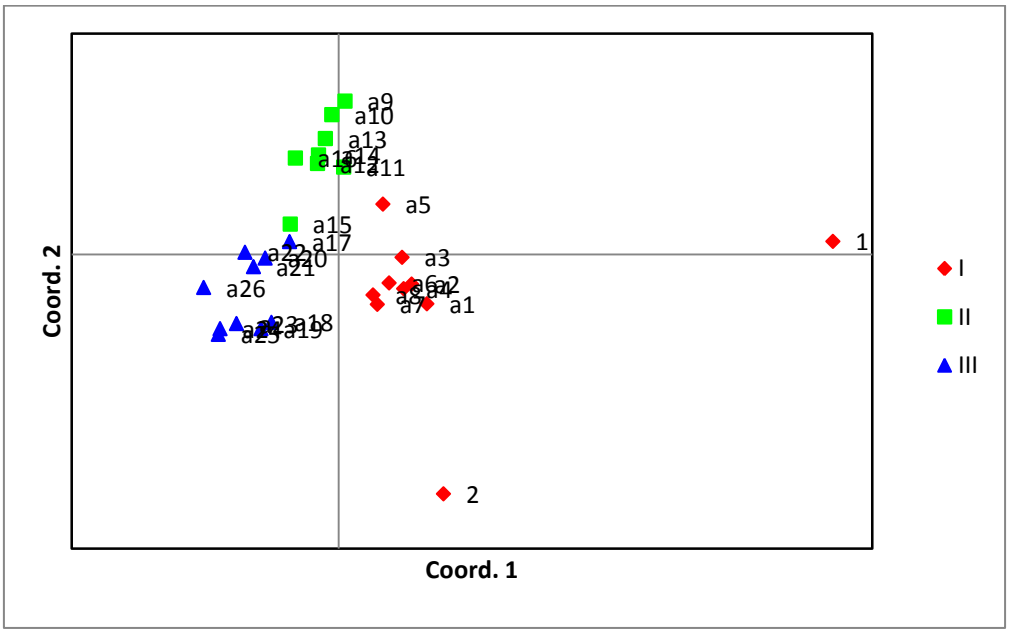
محیط پرآوری	شاخص آماری	شاخص تنوع جمعیت				
		N	Na	Ne	I	He
I	میانگین	۱۰	۱/۷۰	۱/۵	۰/٤۲	۰/۲۸
	خطای استاندارد		۰/۰۹	۰/۰٦	۰/۰٤	۰/۰۳
II	میانگین	۸	۱/۲۵	۱/۳	۰/۲۹	۰/۲۰
	خطای استاندارد		۰/۱۳	۰/۰۷	۰/۰۵	۰/۰۳
III	میانگین	۱۰	۱/۳۱	۱/۳	۰/۲۹	۰/۱۹
	خطای استاندارد		۰/۱٤	۰/۰٦	۰/۰۵	۰/۰۳

N: اندازه جمعیت، Na: تعداد الل، Ne: تعداد الل مؤثر، I: شاخص شانون، He: هتروزیگوسیتی

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.4.8.2]



شکل ٤- فراوانی الگوهای باندی تکثیر شده به تفکیک گروه‌های مورد بررسی در بررسی تنوع گیاهچه‌های حاصل از ریزازدیادی گل‌محمدی



شکل ٥- نمودار بای پلات حاصل از تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) برای نمونه‌های حاصل از ریزازدیادی *Rosa damascena* در سه محیط پرآوری مختلف بر اساس داده‌های SCoT+ISSR

با بررسی وضعیت ترکیب این محیط که دارای غلظت‌های بالاتری از تنظیم کننده‌های رشد در مقایسه با دو محیط دیگر می‌باشد، ملاحظه می‌شود اگرچه بر اساس برآورد فواصل ژنتیکی بین نمونه‌ها و سایر شاخص‌های برآورد شده، در مجموع بیانگر یکنواختی نمونه‌های مورد مطالعه و در نتیجه ثبات ژنتیکی و حفظ اصالت پایه مادری در طی فرایند ریزازدیادی است لیکن به‌نظر می‌رسد نمونه‌های رشد یافته در غلظت‌های بیشتر تنظیم کننده‌های رشد به لحاظ ژنتیکی تغییرات بیشتری را نسبت به سایرین نشان داده‌اند هرچند تاثیر تعداد نسبتاً بالای واکشت‌های انجام گرفته را نیز نباید نادیده گرفت که طبیعتاً می‌تواند بر شدت تاثیر بیافزاید. تأثیر عوامل مختلف بر ناپایداری ژنتیکی و وقوع تنوع سوماکلونال در ریزازدیادی گونه‌های مختلف گیاهی در مطالعات مختلف گزارش شده است. به‌عنوان مثال استفاده از نشانگرهای ISSR در بررسی پایداری ژنتیکی گیاهچه‌های ژربرا (*Gerbera jamesonii*) تکثیر یافته از سه نوع ریزنمونه مختلف به روش ریزازدیادی نشان داد که نوع ریزنمونه عاملی مؤثر در ثبات ژنتیکی گیاهچه‌های حاصل می‌باشد. نتایج تحقیق مورد اشاره نشان داد که گیاهچه‌هایی که از ریزنمونه برگ به‌دست آمده بودند در مقایسه با دو نوع ریزنمونه دیگر سطوحی از تنوع سوماکلونال را نشان دادند (Bhatia et al. 2009). در تحقیقی دیگر، به‌منظور بررسی وقوع تغییرات ژنتیکی در کشت درون شیشه‌ای (کشت سوسپانسیون) گیاه *Silybum marianum* با

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.4.8.2]

استفاده از نشانگر مولکولی ISSR گزارش شد که گیاهچه‌های حاصل از ریزنمونه‌های مختلف دارای الگوی باندی متفاوتی بوده و این اختلافات حتی تکرارهای مختلف یک واکشت قابل مشاهده است (Firouzi et al. 2009). همچنین در تحقیق دیگری که به‌منظور بررسی پایداری ژنتیکی نمونه‌های کشت بافتی گیاه دارویی *Ferulago angulata* با استفاده از نشانگرهای DNA از جمله دو نشانگر SCoT و ISSR صورت گرفت تأثیر غلظت‌های مختلف تنظیم کننده‌های رشد گیاهی به‌خصوص غلظت‌های بالای 2,4-D بر وقوع تغییرات ژنتیکی در شرایط کشت درون شیشه‌ای گزارش شده است (Shooshtari et al. 2018). تأثیر مستقیم هورمون 2,4-D بر وقوع تغییرات ژنتیکی در شرایط کشت درون شیشه‌ای گونه‌های گیاهی مختلف از جمله گندم هگزاپلوئید (Mendoza and Kaeppler 2002) و نیشکر (Solangi et al. 2015) نیز گزارش شده است. همچنین در نتایج پژوهش دیگری که با هدف بررسی تنوع سوماکلونال در فرایند ریزازدیادی *Rosa damascena* با استفاده از نشانگرهای SCoT و CBDP انجام شد گزارش شد که استفاده ازهورمون 2,4-D به‌خصوص در غلظت‌های بیشتر و همچنین افزایش تعداد واکشت‌ها و فاصله آن‌ها می‌تواند نرخ تغییرات ژنتیکی را افزایش دهد (Asadi and Shooshtari 2021).

علاوه بر شناسایی تغییرات ژنتیکی و مقایسه الگوهای باندی نمونه‌های مختلف، دستاوردهای خاصی نیز در این‌گونه مطالعات به‌دست آمده است. به‌عنوان نمونه در کاربرد نشانگرهای ISSR جهت بررسی پایداری ژنتیکی در گیاهچه‌های حاصل از ریزازدیادی ژربرا (*Gerbera jamesonii*) گزارش شده است که استفاده از آغازگرهای ISSR مبتنی بر موتیف AG از قابلیت بهتری در ایجاد باندهای پلی‌مورف در بین نمونه‌های مورد بررسی برخوردار می‌باشند (Bhatia et al. 2009). همچنین در بررسی تنوع سوماکلونال در گیاهان باززا شده از کشت کالوس *Ducrosia anethifolia* (Shooshtari et al. 2013) نشان داده شده است که با به‌کارگیری دو سیستم هضم آنزیمی با استفاده از دو نوع اندونوکلئاز اختصاصی حساس و غیر حساس به متیلاسون، نشانگرهای AFLP، نشانگرهایی کارآمد و قابل اعتماد در شناسایی تغییرات ژنتیکی ناشی از متیلاسیون ژنوم (Grafi et al. 2007) می‌باشند.

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق حاکی از یکنواختی نسبی گیاهچه‌های حاصل از ریزازدیادی و تغییرات ژنتیکی اندک در بین نمونه‌های تکثیر شده از طریق روش ریزازدیادی با استفاده از جوانه‌های جانبی بود. در مقایسه گیاهچه‌های رشد یافته در سه محیط مختلف پرآوری مورد استفاده در این بررسی، نمونه‌هایی که در غلظت‌های به مراتب بالاتری از تنظیم کننده‌های رشد قرار گرفته و به مدت طولانی واکشت شده بودند درجه بیشتری از غیر یکنواختی را نشان دادند که نتیجه می‌تواند بیانگر احتمال وقوع تغییرات ژنتیکی بیشتر در این نمونه‌ها باشد. لیکن درمجموع و با درنظر گرفتن خطاهای احتمالی و احتمال وجود باندهای کاذب در نتایج، بر اساس پارامترهای ژنتیکی برآورد شده و نتایج تجزیه‌های آماری داده‌ها سطح پایینی از تنوع دربین گیاهچه‌های حاصل به‌خصوص گیاهچه‌های به‌دست آمده از محیط‌های شماره II و III مشاهده شد. بدین ترتیب این نتایج نشان داد که محیط‌های پرآوری شماره II و III می‌توانند با موفقیت برای تولید تجاری گیاهچه‌های کشت بافتی گل محمدی با حداقل ریسک ایجاد ناپایداری ژنتیکی مورد استفاده قرار گیرند. این نتایج همچنین نشان داد که نشانگرهای SCoT و ISSR می‌توانند با موفقیت در بررسی تنوعات سوماکلونال مورد استفاده قرار گیرند همچنان که مطالعات قبلی با استفاده از این نشانگرها نیز این موضوع را تایید می‌نماید. برای اطمینان بیشتر از صحت یافته‌های این تحقیق و تاثیر شرایط محیط کشت بر تغییرات ژنومی می‌توان از روش‌های دقیق‌تری مانند تکنیک‌های مبتنی بر توالی‌یابی استفاده نمود.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.4.8.2]

منابع

Asadi A, Shooshtari L (2021) Assessment of somaclonal variation in micropropagation of Damask Rose *(Rosa damascena* Mill.) using molecular markers. Modern Genetics Journal 15:327-335 (In Farsi).

Bhatia R, Singh K.P, Jhang T, Sharma T.R (2009) Assessment of clonal fidelity of micropropagated gerbera plants by ISSR markers. Scientia Horticulturae 119:208-211.

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.

Durkovic J. J (2006) Rapid micropropagation of mature wild cherry. Biologia Plantarum 50:733-736.

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.

Jabbarzadeh Z, Khosh-Khui M (2005) Factors affecting tissue culture of Damask rose (*Rosa damascena* Mill.). Scientia Horticulturae 105:475–482.

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.

Mahmoudi Noodezh H, Moieni A, Baghizadeh A (2012) In vitro propagation of the Damask rose (*Rosa damascena* Mill.) In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 48:530–538

Mendoza MG, Kaeppler HF(2002) Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryo of wheat (*Triticum aestivum* L.) In Vitro Cellular & Developmental Biology 38:39–45.

Monteuuis O (2004) In vitro micropropagation and rooting of *Acacia mangium* microshoots from juvenile and mature origins. In vitro cellular and developmental Biology-Plant 40:102-107.

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.

Renau-Morata B, Ollero J, Arrillaga I, Segura J (2005) Factors influencing auxillary shoot proliferation and adventitious budding in cedar. Tree Physiology 25:477-486.

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

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.4.8.2]

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

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.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.4.8.2]