

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

Asadi A¹, 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_shooshtari@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۶/۱۴ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۹/۱۸)

چکیده

این تحقیق به منظور بررسی تغییرات ژنتیکی احتمالی در فرایند ریزازدیادی گل محمدی (*Rosa damascena* Mill.) با استفاده از نشانگرهای Start Codon Targetted (SCoT) و CAAT-Box (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 به منظور پرآوری، محیط وندرسالیم (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 میلی گرم بر لیتر IAA و ۲ میلی گرم بر لیتر IBA منتقل شدند و در حدود ۸ هفته بعد، گیاهچه‌های ریشه دار شده جهت سازگاری به محیط گلخانه انتقال داده شدند. به منظور 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 آغازگر CBDP، در مجموع ۱۷۳ باند تکثیر نمودند که تنها ۷۴ باند دارای چندشکلی بود. میانگین شاخص محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) برای آغازگرهای SCoT و CBDP به ترتیب ۰/۳۲ و ۰/۳۵ به دست آمد که 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 نسبتاً 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 به خصوص در غلظت‌های بیشتر و به‌ویژه زمانی که 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

گل محمدی (*Rosa damascena* Mill.) به واسطه 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 به عنوان 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 به طور عمده ناحیه اسپارتای ترکیه و کازانلوک بلغارستان به همراه ایران، هندوستان مناطق اصلی پرورش گل محمدی و تولید گلاب و استخراج اسانس آن به شمار 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 به طور پیوسته در حال افزایش باشد و به همین واسطه، منجر به رشد تقاضا برای نهال‌های این گیاه دارویی و صنعتی به منظور 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 گونه‌های گیاهی قابل استفاده می‌باشد. تکنیک کشت بافت و تکثیر درون شیشه‌ای مزایا و پتانسیل‌های زیادی نسبت به روش‌های کلاسیک تکثیر رویشی گیاهان دارا است 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 به همراه 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 تنظیم‌کننده‌های 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

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 به دنبال 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 VS مایع (Van der Salm et al. 1994) انتقال داده شدند. در مرحله پرآوری از ۱۵ محیط کشت مختلف حاصل ترکیب و نسبت‌های مختلف از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی شامل GA3، BAP، 2,4-D، NAA 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 (جدول ۱) برای ریشه دارشدن نمونه‌ها به محیط ریشه‌زایی انتقال داده شدند.

جدول ۱- ترکیب و نسبت تنظیم‌کننده‌های 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
۴	۰/۱	-	۰/۱	۱/۵	-
۵	-	۰/۱	۰/۱	-	۱
۶	-	۰/۱	۰/۱	۲	-
۷	-	۰/۱	۰/۱	۱/۵	-
۸	-	۰/۱	-	۱/۵	-

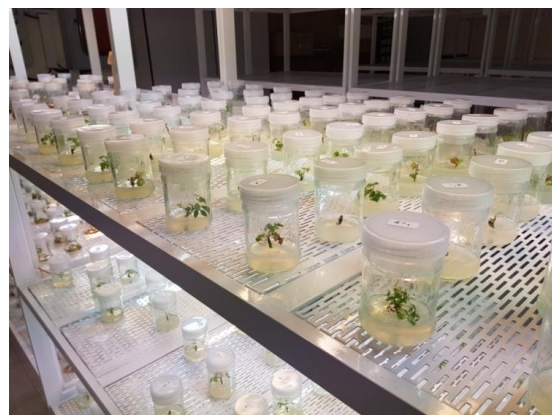
2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)
 Acetic Acid NAA (Naphthalene)
 GA3 (Gibberellic Acid)
 BAP (6-Benzylaminopurine)
 Kin (Kinetin)

که گیاهان حاصله کاملاً شبیه به پایه مادری منتخب باشند. به همین 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.

به کمک نشانگر مولکولی AFLP و استفاده از دو نوع اندونوکلاز 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 به عنوان نشانگری قابل اعتماد در بررسی تنوع سوماکلونال معرفی شده است (Shooshtari et al. 2013). در تحقیقی دیگر، در بررسی تنوع سوماکلونال در کشت‌های سوسپانسیون گیاه دارویی ماریتیغال با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR نشان داده شد که الگوی بانندی 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، CDBP 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.)



ب: پرآوری



الف: استقرار



د: سازگاری



ج: ریشه زایی

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

واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز (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 ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱/۵ دقیقه، پلیمریزاسیون در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، و انجام PCR محصول 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 باندهای حاصل به صورت یک (وجود باند) و صفر (عدم وجود باند)، شاخص‌های تعیین

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 (جدول ۱) انجام شد. برای این منظور استخراج DNA ژنومی از برگ‌های جوان نمونه‌های گیاهی مورد اشاره بر اساس دستورالعمل^۱ CTAB و با استفاده از روش Doyle and Doyle (1987) انجام شد. به منظور بررسی و تایید کیفیت DNA استخراج شده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد استفاده شد.

^۱ Cethyl Trimethyl Ammonium Bromide

کننده کارایی نشانگر شامل تعداد کل قطعات تکثیر شده (^{1}NTB)، تعداد قطعات چندشکل (^{2}NPB)، محتوای چندشکلی (^{3}PIC) و شاخص نشانگری (^{4}MI) محاسبه شد. مقادیر فواصل ژنتیکی بین جفت نمونه‌ها بر اساس ضریب فاصله دایس محاسبه و به منظور 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 (جدول ۱) 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 واکنش 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 ($0.1 \text{ mg/L NAA} + 1.5 \text{ mg/L GA}_3$) 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 $Nikbakht \text{ et al. (2005)}$ مطابقت داشت. در نتایج حاصل از پژوهش دیگری که به منظور بهینه‌سازی ریزازدیادی *Rosa damascene* انجام گرفته استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد BA و NAA به ترتیب به میزان ۲ و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر به عنوان بهترین ترکیب گزارش شده است ($Khosh-Khui \text{ and Sink } 1982$). همچنین گزارشات دیگری وجود دارد که نشان می‌دهد برای دستیابی به بهترین نتایج در ریزازدیادی گیاه *Rosa damascene* استفاده از GA_3 در ترکیب با BA و NAA ضروری می‌باشد ($Kumar \text{ et al. } 2000$; $Nikbakht \text{ et al. } 2005$).

تعداد ۳۰ آغازگر مورد استفاده در این تحقیق در مجموع ۱۷۳ باند واضح و قابل امتیازدهی ایجاد نمودند که از این تعداد ۷۴ باند چندشکلی نشان دادند. همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود آغازگرهای $SCoT$ سهم بیشتری از تعداد باندهای چند شکل را در مقابل آغازگرهای $CBDP$ به خود اختصاص دادند به طوری که ۱۵ آغازگر $SCoT$ در مجموع ۴۰ و ۱۵ آغازگر $CBDP$ در مجموع ۳۴ باند چندشکل تکثیر نمودند. دامنه شاخص محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) برای نشانگرهای $SCoT$ بین ۰/۲۲ (برای آغازگر $SC-12$) تا ۰/۴۱ (برای آغازگر $SC-15$) و برای نشانگرهای $CBDP$ بین ۰/۲۷ (برای آغازگر $CB-10$) تا ۰/۴۵ (برای آغازگر $CB-01$) بود. در مورد شاخص نشانگر (MI) نیز دامنه تغییرات برای نشانگرهای $SCoT$ و $CBDP$ به ترتیب ۰/۴۴ تا ۱/۲۳ و ۰/۶۰ 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 (جدول ۲). 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 به دست آمده برای آغازگرها، می‌توان گفت این میزان PIC نشان‌دهنده کارایی 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 به طوری که این مقدار بر اساس داده‌های $SCoT$ برابر با ۰/۴۲ و بر اساس داده‌های $CBDP$ برابر با ۰/۴۴ به دست آمد. چولگی به چپ نمودار توزیع فراوانی فواصل ژنتیکی (شکل ۲) نیز نشان‌دهنده غالب بودن تعداد فواصل ژنتیکی کم در بین جفت نمونه‌ها می‌باشد.

¹ Total amplified bands

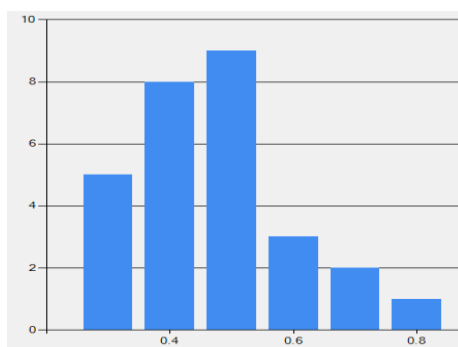
² Number of polymorphic bands

⁴ Polymorphism information content

⁴ Marker index

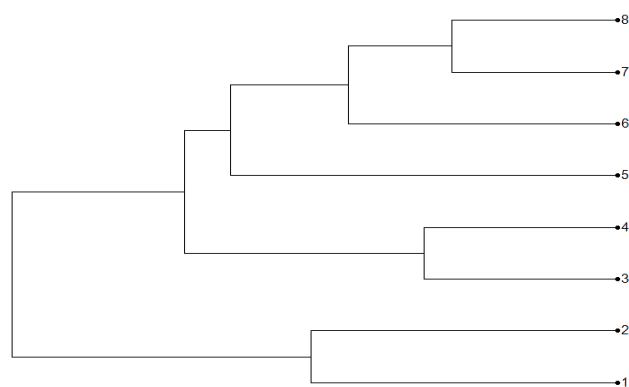
جدول ۲- توالی آغازگرهای CBDP و SCoT به همراه نتایج حاصل از تکثیر PCR در نمونه‌های گل محمدی (*Rosa damascena* Mill.) مورد مطالعه

Marker	Sequence.(5-3)	TB	PB	%P	PIC	MI
CBDP	TGAGCACGATCCAAT AGC	۷	۳	۴۳	۰/۴۵	۱/۳۵
	TGAGCACGATCCAATAAT	۵	۲	۴۰	۰/۳۸	۰/۷۶
	TGAGCACGATCCAAT ACC	۵	۲	۴۰	۰/۳۰	۰/۶۰
	TGAGCACGATCCAAT AAG	۸	۲	۲۵	۰/۳۰	۰/۶۰
	TGAGCACGATCCAAT CTA	۴	۲	۵۰	۰/۳۰	۰/۶۰
	TGAGCACGATCCAAT CAG	۸	۳	۳۸	۰/۳۲	۰/۹۶
	TGAGCACGATCCAAT CGA	۵	۲	۴۰	۰/۳	۰/۶۰
	TGAGCACGATCCAAT CGG	۴	۱	۲۵	۰/۳۸	۰/۳۸
	TGAGCACGATCCAAT GAT	۷	۳	۴۳	۰/۴۱	۱/۲۳
	TGAGCACGATCCAAT GTT	۵	۳	۶۰	۰/۲۷	۰/۸۱
	TGAGCACGATCCAATTGA	۵	۲	۴۰	۰/۳۰	۰/۶۰
	TGAGCACGATCCAATTCA	۷	۲	۲۹	۰/۳۸	۰/۷۶
	TGAGCACGATCCAATTG	۴	۲	۵۰	۰/۳۴	۰/۶۸
	CTGAGCACGATCCAATAG	۵	۲	۴۰	۰/۳۸	۰/۷۶
	CTGAGCACGATCCAATAC	۷	۳	۴۳	۰/۴۱	۱/۲۳
میانگین		۵/۷	۲/۳	۴۰	۰/۳۵	۰/۷۹
SCoT	CAACAATGGCTACCACCA	۵	۲	۴۰	۰/۳۸	۰/۷۶
	CAACAATGGCTACCACCC	۷	۳	۴۳	۰/۳۲	۰/۹۶
	CAACAATGGCTACCACCG	۴	۲	۵۰	۰/۳۰	۰/۶۰
	CAACAATGGCTACCACCT	۵	۳	۶۰	۰/۲۷	۰/۸۱
	CAACAATGGCTACCACGA	۴	۳	۷۵	۰/۳۲	۰/۹۶
	CAACAATGGCTACCACGC	۵	۲	۴۰	۰/۳۸	۰/۷۶
	CAACAATGGCTACCACGG	۵	۳	۶۰	۰/۳۲	۰/۹۶
	CAACAATGGCTACCACGT	۴	۱	۲۵	۰/۳۸	۰/۳۸
	CAACAATGGCTACCAGCA	۷	۳	۴۳	۰/۳۲	۰/۹۶
	CAACAATGGCTACCAGCC	۸	۴	۵۰	۰/۲۸	۱/۱۲
	ACGACATGGCGACCACGC	۸	۳	۳۸	۰/۲۷	۰/۸۱
	ACGACATGGCGACCGCGA	۵	۲	۴۰	۰/۲۲	۰/۴۴
	CCATGGCTACCACCGGCC	۹	۴	۴۴	۰/۳۰	۱/۲
	CATGGCTACCACCGGCC	۵	۲	۴۰	۰/۳۸	۰/۷۶
	ACCATGGCTACCACCGCG	۷	۳	۴۳	۰/۴۱	۱/۲۳
میانگین		۵/۸	۲/۷	۴۶	۰/۳۲	۰/۸۵
TB: تعداد کل باند PB: تعداد باند چندشکل %P: درصد چندشکلی PIC: محتوای اطلاعات چندشکل MI: شاخص نشانگر						

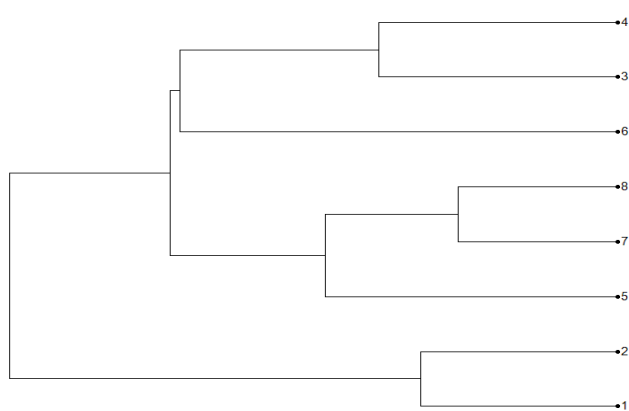


مقدار فاصله ژنتیکی

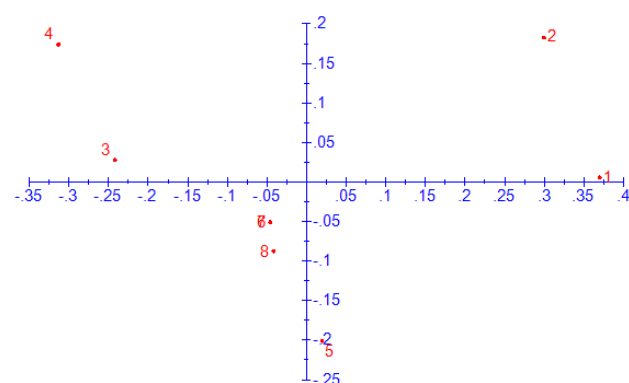
شکل ۲- توزیع فراوانی فواصل ژنتیکی برآورد شده بین جفت نمونه‌های مورد بررسی



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



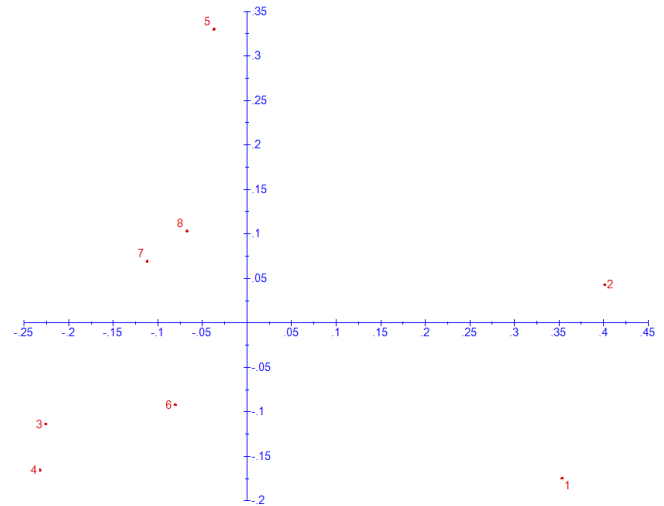
شکل ۴- دندروگرام حاصل از تجزیه کلاستر نمونه‌های مورد بررسی گل محمدی بر اساس داده‌های CDBP با استفاده از ضریب فاصله دایس و روش UPGMA



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

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 (شکل ۳). نکته قابل توجه اینکه این دسته‌بندی در نتیجه تجزیه کلاستر داده‌های CDBP نیز تکرار شد (شکل ۴). 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 به نظر 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 واکنش‌های انجام گرفته نیز قاعدتاً بر شدت تاثیر آن افزوده است. در نتایج تحقیق دیگری که به منظور 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، CDBP و ISSR از فاصله ژنتیکی بیشتری نسبت به نمونه رشد یافته در محیط 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 ۶ نیز ارایه شده است که با نتایج تجزیه کلاستر هم‌خوانی داشته و دندروگرام‌های حاصل را تایید می‌نماید.

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 زمانی که 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.



شکل ۶- نمودار بای پلات حاصل از تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) برای ۸ نمونه گل محمدی بر اساس داده‌های CBDP

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق نشان‌دهنده تغییرات ژنتیکی کمتری در فرایند ریزازدیادی با استفاده از جوانه‌های

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/s11224-019-01591>

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, Brettell 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*

- 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 micropropagation of Rose (*Rosa indica* L.) *Pakistan Journal of Botany* 41: 2877-2882.
- Shooshtari L, Omid 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 vulgare*) under Different Concentrations of Growth Regulators. *Journal of Medicinal Plants* 52: 154-162
- Shooshtari L, Omid 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