Nova Biologica Reperta 5 (1): 72-81 (2018)
یافته‌های نوین در علوم زیستی، جلد ۵، شمارهٔ ۱: ۸۱-۷۲

بررسی تنوع سوماکلونال گیاهان باززایی‌شده از کشت بافت آلوئه‌ورا

زهرا نورمحمدی[۱*]، بهار قاسم‌پور[۱] و فرح فراهانی[۲]

دریافت: ۱۳۹۵/۴/۲ / پذیرش: ۱۳۹۶/۹/۱۳ / چاپ: ۱۳۹۷/۳/۲۰

[۱]گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[۲]گروه میکروبیولوژی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران
*مسئول مکاتبات: z-nouri@srbiau.ac.ir

چکیده. گیاه *Aloe barbadensis* Mill. گیاهی چندساله، تک‌لپه، گوشت‌دار از تیرهٔ Aloaceae است. در این مطالعه، تنوع سوماکلونال گیاهان باززایی‌شدهٔ *A. barbadensis* بعد از چهار واکشت و انتقال به گلدان تحت بررسی قرار گرفت. ژنوم ۴۰ گیاه باززایی‌شده استخراج و تنوع ژنتیکی با استفاده از ۲۰ نشانگر SPAR شامل پرایمرهای RAPD و ISSR بررسی شد. همچنین، میزان ژل حاصل از گیاهان باززادهٔ آلوئه‌ورا محاسبه گردید. میانگین درصد پلی‌مورفیسم، اندیس-شانون، تنوع ژنتیکی Nei's و تعداد الل‌های مؤثر براساس داده‌های RAPD، بالاتر از پارامترهای ژنتیکی به‌دست‌آمده از داده‌های ISSR بود. خوشه‌بندی NJ و ساختار ژنتیکی براساس نمودار STRUCTURE بر پایهٔ نشانگرهای تحت مطالعه توانستند افراد را به خوشه‌های جداگانه تقسیم کنند. تحلیل AMOVA نیز نشان-دهندهٔ تمایز ژنتیکی بین گروه‌ها در سطح معنی‌داری (P=0.01) بوده است و تأییدکنندهٔ تفرق گروه‌های حاصل از تجزیهٔ خوشه‌ای داده‌های مولکولی است. میزان تولید ژل در گروه‌های ایجادشده براساس تحلیل تجزیهٔ خوشه‌ای با استفاده از آزمون تحلیل واریانس (ANOVA) بررسی شد که تفاوت معناداری (P=0.746) بین مقدار ژل در چهارگروه مشاهده نشد. نتایج این مطالعه توانست تغییرات سوموکلونال در سطح ژنوم با استفاده از نشانگرهای مولکولی را در میان گیاهان باززایی‌شده آلوئه نشان دهد، درحالی‌که میزان ژل تولیدی در میان این گیاهان تغییر معناداری نشان داد.

واژه‌های کلیدی. خوشه‌بندی، ، ژل آلوئه ساختار ژنتیکی ، SPAR, AMOVA

Somaclonal variation of tissue culture regenerated plants of *Aloe barbadensis* Mill.

Zahra Noormohammadi[1*], Bahar Ghasempour[1] & Farah Farahani[2]

Received 22.06.2016 / Accepted 04.12.2017/ Published 10.06.2018

[1]Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[2]Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran
*Correspondent author: z-nouri@srbiau.ac.ir

Abstract. *Aloe barbadensis* is a perennial, monocotyledonous, fleshy plant belonging to Aloaceae family. In this study, somoclonal variations of regenerated *A. barbadensis* plants were investigated. The plantlets of the forth subculture were transferred to soil for further study. The genomic DNAs of 40 regenerated plantlets were extracted and genetic variations were studied using SPAR markers including RAPD and ISSR primers. The amount of Aloe gel extracted from regenerated *A. vera* plants was also determined. The average percentage of polymorphism, Shannon index, Nei's genetic diversity and the number of effective alleles based on RAPD data were higher than genetic parameters obtained from ISSR data. NJ cluster and STRUCTURE plot based on molecular markers grouped regenerated plants into distinct clusters. AMOVA analysis also showed a significant (P = 0.01) genetic distinction between the studied groups. This result also confirmed differentiation of regenerated plants. The amount of Aloe gel in the four groups (based on clustering method) was compared by using analysis of variance (ANOVA). The results showed no significant (P = 0.746) differences among the amounts of gel in four groups. In total, our findings showed somaclonal variations on genomic level while no significant differences were observed in the amount of gel among regenerated Aloe plantlets.
Keywords. aloe gel, AMOVA, clustering, genetic structure, SPAR

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.1.3.1]
[DOI: 10.29252/nbr.5.1.72]

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.1.3.1]
[DOI: 10.29252/nbr.5.1.72]

مقدمه

آلوئه‌ورا، صبر زرد یا شاخ بزی با نام علمی *Aloe barbadensis* Mill. مترادف با *A. vera* L. گیاهی گوشت‌دار از راستهٔ مارچوبه‌سانان، تیرهٔ سریشیان و سرده *Aloe* است. *A. vera* L. (*Aloe barbadensis* Mill.) مهم‌ترین گونه سرده *Aloe* است. گیاهان جنس آلوئه دارای 2n= 14 کروموزوم هستند. بعضی کلون‌ها دیپلوئید و برخی تتراپلوئید هستند و ایجاد سطح بالای پلوئیدی در آنها امکان‌پذیر است (Bayani *et al.*, 2013). بیش از ۴۰۰ گونه از آلوئه‌ورا در تمام نقاط جهان می‌رویند (Mohammad, 2003) با وجود این امروزه تنها دو گونه به نام‌های *Aloe barbadensis* Mill. و *Aloe littoralis* Mill. به‌صورت تجاری رشد می‌کنند. ارزش تجارت جهانی محصول خام این گونهٔ گیاهی حدود ۱۲۵ میلیون دلار و ارزش محصولات نهایی تولیدشدهٔ آن بالغ بر ۱۱۰ میلیارد دلار است. در حال حاضر، محصولات مختلف آلوئه‌ورا در صنایع مختلف غذایی (انواع نوشابه‌ها، کمپوت، دوغ و غیره)، صنایع آرایشی و بهداشتی (انواع کرم‌ها، لوسیون، شامپوها، صابون‌ها، شوینده‌ها) صنایع دارویی (کپسول، قرص جوشان) استفاده می‌شود (Mendonça *et al.*, 2009; Bhaludra *et al.*, 2013). ازآنجاکه تکثیر آلوئه از روش‌های مرتبط با بذر، به واسطهٔ وجود نر عقیمی، راندمان پایینی دارد، یگانه راه کشت سنتی آلوئه‌ورا تکثیر از طریق پاجوش است، اما سرعت تکثیر آن پایین است، به‌نحوی که هر گیاه بالغ در سال قادر به تولید تنها ۳ تا ۸ پا جوش است که این تعداد جهت تولید تجاری این گیاه کافی نیست. به‌دلیل تقاضای فراوانی که برای صبر زرد در بازار داخلی و خارجی وجود دارد، این گیاه مورد توجه بسیاری از مراکز تحقیقاتی قرار گرفته است تا روش مناسبی جهت تکثیر آنها یافت شود.

ریزازدیادی گیاه از طریق کشت بافت یکی از روش‌های رایج در تولید این نوع گیاهان است که به‌طور گسترده‌ایی درکانون توجه محققان قرار گرفته است. تحقیقات مختلفی در خصوص ریزازدیادی گیاه آلوئه تاکنون گزارش شده است. انتخاب نوع جدا کشت شامل جوانه جانبی یا راسی در ریزازدیادی آلوئه یکی از نکات مهم بوده است (Supe, 2007; Hashemabadi & Kaviani, 2008; Nayanakantha *et al.*, 2011). مورد دیگر، استفاده از فیتوهورمون‌ها در کشت بافت گونه‌های مختلف آلوئه است که تأثیرات متفاوتی در ریزازدیادی آنها داشته است. برای مثال Soup (2007) از ۴ میلی‌گرم در لیتر بنزیل آمینوپورین (BA) و ۱ میلی‌گرم در لیتراندول استیک اسید (IAA) استفاده کرد، در حالی‌که تحقیقی دیگر استفاده از $4mg^{-L}$ BAP + $0.2mg^{-L}$ NAA + $1g^{-L}$ PVP را برای تکثیر بهتر آلوئه پیشنهاد داده است (Nayanakantha *et al.*, 2011).

به‌هرحال، کشت بافت محصولات کشاورزی باعث ایجاد تنوع سوماکلونال گیاهان باززایی می‌شود. عوامل مختلف همچون نوع ژنوتیپ، نوع کشت بافت و زمان کشت می‌تواند باعث تغییرات ژنتیکی در گیاهان باززایی‌شده از کشت بافت شود که در برخی موارد می‌تواند فنوتیپ متفاوتی نسبت به گیاه مادری ایجاد کند. Haque و Ghosh (2013) طی مطالعات کاریوتیپی و مولکولی دربارهٔ گیاهان باززایی‌شدهٔ *A. vera* تا سه واکشت و دو سال رویش در مزرعه تفاوتی در اندازه و تعداد کروموزوم‌ها در تقسیم میتوز و رفتار کروموزومی در تقسیم میوز مشاهده نکردند. همچنین، نشانگرهای مولکولی RAPD هم تنوع سوموکلونال در گیاهان باززایی شده نشان ندادند. در تحقیق دیگری به بررسی تنوع سوماکلونال گیاهان باززایی‌شده از گونهٔ *A. barbadensis* با استفاده از نشانگرهای ISSR و RAPD پرداخته شده است. نتایج دال بر چندشکلی‌نبودن در لوکوس‌های تحت مطالعه در گیاهان باززایی‌شدهٔ آلوئه بوده است (Sahoo & Rout, 2014). این درحالی است که در تحقیق دیگری درصد زیادی از چندشکلی ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR در آلوئه‌وراهای باززایی شده از جوانه انتهایی مشاهده شده است (Rathore *et al.*, 2011). Bayani و همکاران (2013) سطح پلوئیدی و اندازهٔ ژنوم گیاهان باززایی‌شده را با استفاده از روش فلوسایتومتری در چهار تیمار محیط کشت پایهٔ MS حاوی هورمون BAP با مقادیر ۰/۵ و ۱/۲ میلی‌گرم بر لیتر و هورمون IAA با مقادیر ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر لیتر و دو گونهٔ *A. littoralis* و *A. barbadensis* مقایسه کرد و تنوع سطح پلوئیدی و اندازه ژنوم در گیاهان باززایی‌شده را در تیمارهای مختلف هورمونی نشان داد. این نتایج برتری تیماری در ایجادتغییرات ژنومی یا ثبات ژنومی را نشان نداد. تولید تجاری گیاه *A. vera* با حفظ صفات مورفولوژیکی از اهمیت شایانی برخوردار است. بر این اساس، طبق مطالعات گذشته، در تحقیق حاضر تنوع سوماکلونال گیاهان

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.1.3.1]
[DOI: 10.29252/nbr.5.1.72]

باززایی‌شده *A. barbadensis* و ساختار ژنتیکی آنها بعد از چهار واکشت و انتقال آنها به خاک تحت بررسی قرار گرفت. از نشانگرهای تک‌پرایمری RAPD و ISSR به‌علت پراکندگی گستردهٔ آنها در کل ژنوم برای بررسی تنوع ژنتیکی در این گیاهان استفاده شد. همچنین، ارتباط بین تغییرات ژنتیکی گیاهان باززایی-شده و مقدار ژل حاصل از برگ‌های گیاهان باززایی‌شده بررسی شد.

مواد و روش‌ها

کشت بافت

گیاه آلوئه‌ورا از شرکت سبزگستر تهیه و با حذف برگ‌ها، ساقه به اندازه‌های ۱/۵-۱ سانتی متر در محلول ضدعفونی‌کننده به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت و سپس ساقه‌ها در آب مقطر استریل به‌مدت یک ساعت نگهداری شد. محیط کشت MS (Murashige – Skoog) حاوی هورمون‌های گیاهی BAP (1mg/l) و IBA (0.5mg/l) تهیه شد و ریزنمونه‌های استریل روی محیط کشت فوق منتقل شد و در اتاق رشد با دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و فتوپریود ۱۶/۸ قرار گرفت. گیاهان باززایی‌شده تا چهار واکشت کشت داده شدند و سپس به گلدان با خاک پیت و پرلیت به نسبت ۱:۱ منتقل شدند (شکل ۱).

استخراج DNA و ارزیابی چندشکلی‌های نشانگرهای RAPD وISSR

۴۰ نمونهٔ گیاه باززایی‌شده در واکشت چهارم و منتقل‌شده در خاک برای ۱۰ لوکوس نشانگر RAPD و ۱۰ لوکوس نشانگر ISSR تحت بررسی قرار گرفت. بدین‌منظور برای نمونه‌های تحت مطالعه از برگ‌های تازه، DNA با استفاده از روش تغییریافته CTAB توسط Križman و همکاران (2006) استخراج شد. کیفیت DNA ژنومی روی ژل آگاروز ۰/۸ درصد سنجیده شد. در این تحقیق از ۱۰ پرایمر نشانگر ISSR که دانشگاه بریتیش‌کلمبیای کانادا معرفی کرده است استفاده شد. این پرایمرها شامل: UBC823، $(GA)_9C$، $(GA)_9T$، $(CA)_7AT$، UBC 811، UBC 807، UBC 810، UBC849، UBC834 و $(GA)_9A$ هستند. پرایمرهای نشانگرهای RAPD شامل ۱۰ پرایمر سری A که توالی‌های آن‌را شرکت اپرون تکنولوژی آمریکا ارائه داده است (OPA02, OPA03, OPA04, OPA05, OPA09, OPA10, OPA11, OPA12, OPA13, OPA18) مورد استفاده قرار گرفت. واکنش ISSR-PCR و RAPD-PCR در حجم ۲۵ میکرو لیتر شامل بافر 1X، کلرید منیزیم (۱/۵ میلی‌مول)، مخلوط dNTP (۰/۲ میلی‌مول)، نشانگرها با غلظت نهایی ۰/۲ میکرومول، ۳ واحد آنزیم *Taq* DNA پلی‌مراز و ۲۰ نانوگرم از DNA ژنومی انجام گرفت. تمامی مواد PCR از شرکت بایورون آلمان تهیه شد. واکنش تکثیر در دستگاه ترموسیکلر (Techne، آلمان) با برنامهٔ دمایی ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد و به-دنبال آن ۴۰ سیکل در سه مرحله شامل ۴۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در دمای ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد و ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد صورت گرفت. درنهایت، به‌منظور توسعهٔ کامل زنجیره‌های تکثیرشده، مخلوط PCR ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد گرمادهی شدند. برنامه دمایی واکنش RAPD-PCR مشابه برنامه ISSR-PCR بود، با این تفاوت که دمای اتصال پرایمرها ۴۰ درجهٔ سانتی‌گراد و تعداد سیکل‌ها ۴۵ بود. به‌منظور نمایان‌سازی و تفکیک باندها، محصول واکنش تکثیر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز و سپس با استفاده از رنگ فلئورسنت gel red رنگ‌آمیزی شدند و اندازهٔ باندها روی ژل با استفاده از اندازهٔ مارکر ۱۰۰ جفت بازی تخمین زده شدند. به-منظور بررسی تکرارپذیری نشانگرهای تحت مطالعه، هر واکنش سه بار تکرار و روی ژل آگارز الکتروفورز شد. باندهای ISSR و RAPD به‌دست‌آمده به‌صورت دوحالتی کدگذاری شدند. بدین صورت که حضور باندها با کد یک و غیبت باندها با کد صفر مشخص می‌شود. پارامترهای تنوع ژنتیکی شامل درصد چندشکلی اللی، تنوع اللی (Weising *et al*., 2005)، تنوع ژنتیکی نای، شاخص اطلاعات شانون، تعداد الل‌های مؤثر و درصد پلی-مورفیسم است (Freeland *et al*., 2011; Weising *et al*., 2005).

گروه‌بندی گیاهان باززایی‌شده و مادری از بوت استرپ کردن انجام گرفت. همچنین، رسته‌بندی براساس مؤلفه‌های اصلی (PCoA) توسط نرم‌افزار DARwin نسخه 5 انجام گرفت (http://darwin.cirad.fr/). به‌منظور بررسی تفاوت‌های ژنتیکی گروه‌های حاصل از تجزیهٔ خوشه‌ای از آزمون تحلیل واریانس مولکولی و اندیس فاصلهٔ ژنتیکی نای توسط نرم‌افزار GenAlex نسخه 6.5 انجام گرفت (Peakall & Smouse, 2006). تحلیل



شکل ۱- گیاهان باززایی‌شده واکشت چهارم در خاک پیت و پرلیت.

Fig. 1. Fourth sub-cultured regenerated plants transferred into pitte and perlite soil.

STRUCTURE روی نمونه‌های تحت مطالعه با کمک نرم‌افزار STRUCTURE نسخه 2.2 انجام شد (Falush *et al.* 2007). در این روش، ابتدا K خوشه در نظر گرفته می‌شود که هرکدام از آن خوشه‌ها به‌وسیلهٔ فرکانس الل های هر لوکوس از یکدیگر متمایز می‌شوند (Pritchard *et al.*, 2000).

استخراج ژل گیاه آلوئه‌ورا

برگ‌های گیاهان باززایی‌شده برای استخراج ژل جمع‌آوری و مراحل استخراج به‌روش Shafi و همکاران (2000) انجام شد. بدین‌ترتیب که ۴ گرم ژل از برگ‌ها جدا شد و با ۴۵ میلی‌لیتر آب مخلوط شد و به آن مقدار ۱۱/۱میلی‌گرم اسیدتانیک اضافه شد. مخلوط در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت حرارت داده شد. سپس، مخلوط سانتریفوژ و فیلتر شد. محلول رویی در دمای ۵۵-۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد تا حذف حلال از محلول رویی نگهداری شد. مادهٔ خشک حاصل با ۲۰۰ میلی‌لیتر الکل اتانول حل شد و محلول صاف تا شفاف شود و سپس آنرا در دمای ۵۵-۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد حرارت داده شد تا کاملاً خشک شود. مادهٔ خشک‌شده در ۳۵ میلی‌لیتر متانول حل شد تا کریستال تشکیل شود. کریستال‌ها را در حرارت ۷۰-۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد خشک کرده و به‌صورت پودر نگهداری شدند. مقدار پودر حاصل از هر نمونه اندازه‌گیری و با استفاده از آزمون تحلیل واریانس (ANOVA) تفاوت میانگین بین گروه‌های تحت مطالعه در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ تحت مطالعه قرار گرفت.

نتایج

ارزیابی تنوع ژنتیکی

الگوی نواربندی پرایمرهای یکی از نشانگرهای ISSR و RAPD در شکل ۲ آمده است. براساس داده‌های حاصل از امتیازدهی باندهای ۱۰ لوکوس نشانگر RAPD میانگین درصد پلی‌مورفیسم برای تمامی لوکوس‌ها برابر با ۱۰۰ درصد بود. از بین ۱۰ پرایمر تحت مطالعه، کوچک‌ترین قطعهٔ تکثیرشده مربوط به OPA 13 با اندازهٔ ۱۸۰ جفت‌باز و بزرگ‌ترین قطعهٔ تکثیری با اندازهٔ ۲۳۵۰ جفت‌باز به پرایمر OPA04 مربوط است درحالی‌که بیشترین تعداد الل‌های مؤثر Ne برای پرایمر OPA 03 (۱/۲۲۹) به‌دست آمد و کمترین آن به پرایمر OPA 02)158/1) تعلق دارد. میانگین اندیس شانون به‌منزلهٔ یک مقیاس تنوع ژنتیکی ۰/۲۷۶ برای هر پرایمر بود که در این میان بیشترین ارزش اندیس شانون به پرایمر OPA 03 (۰/۳۱۵) و کمترین آن به پرایمر OPA 02 (۰/۲۴۳) تعلق داشت. بیشترین تنوع ژنتیکی نای (Nei's) یا هترو زیگوسیتی پیش‌بینی‌شده در لوکوس RAPD برای پرایمر OPA 03 (۰/۱۷۸) و کمترین آن برای پرایمر OPA 02 (۰/۱۲۹) به‌دست آمد. پارامترهای ژنتیکی برای ۱۰ لوکوس ISSR نیز محاسبه شد و میانگین درصد پلی‌مورفیسم برای تمامی لوکوس‌ها برابر با ٪۱۰۰ بود. کوچک‌ترین و بزرگ‌ترین قطعهٔ تکثیری به‌ترتیب مربوط به UBC-849با اندازهٔ ۱۰۰ جفت‌باز و پرایمر $(GA)_9A$ با اندازه ۱۶۰۰ جفت‌باز بود، درحالی‌که بیشترین تعداد الل‌های مؤثر (Ne) اندیس شانون و تنوع ژنتیکی نای برای پرایمر UBC-834 (به‌ترتیب ۱/۲۰۶، ۰/۲۸۷ و ۰/۱۶۰) به‌دست آمد و کمترین آنها به پرایمر $(CA)_7AT$ (به‌ترتیب ۱/۰۵۹، ۰/۱۲۴ و ۰/۰۵۴) تعلق داشت.

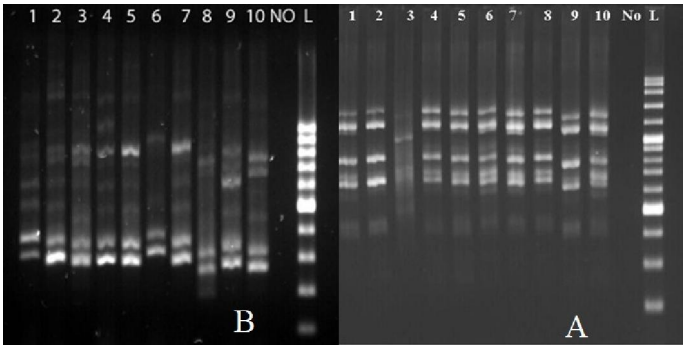
نشانگرهای RAPD توانستند تعداد الل‌های مؤثر(۱/۲۲۹)، تنوع

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.1.3.1]
[DOI: 10.29252/nbr.5.1.72]

جدول ۱- پارامترهای ژنتیکی نشانگرهای مولکولی تحت مطالعه در گیاهان باززایی‌شده آلوئه‌ورا.

Table 1. Genetic parameters of used molecular markers in regenerated *Aleo vera* plants.

نشانگر مولکولی	تعداد الل‌های مؤثر (Ne)	تنوع ژنتیکی نای (He)	اندیس شانون (I)	درصد پلی‌مورفیسم	باندهای اختصاصی
RAPD	۱/۲۲۹	۰/۱۷۸	۰/۲۷۶	۱۰۰	۷
ISSR	۱/۲۰۶	۰/۱۶۰	۰/۱۱۲	۱۰۰	۶



شکل ۲- الگوی باندینگ ۱۰ نمونه از گیاهان باززایی‌شده آلوئه‌ورا، No = نمونه کنترل بدون DNA و L= سایز مارک ۱۰۰ جفت بازی. **A:** الگوی باندینگ پرایمر $(GA)_9A$ و **B:** پرایمر OPA18.

Fig. 2. Banding profile of 10 regenerated *Aloe vera* plants. No= no DNA, L= 100 bp ladder. **A:** $(GA)_9A$ banding profile, **B:** OPA18 banding profile.

ژنتیکی نای (۰/۱۷۸) و اندیس شانون(۰/۲۷۶) بالاتری نسبت به نشانگر دیگر ISSR نشان دهند (جدول ۱).

آزمون مانتل برمبنای رگرسیون برای مقایسهٔ دو نشانگر مولکولی تحت مطالعه به‌کار گرفته شد. بر این اساس، در گیاهان باززایی-شده آلوئه تحت مطالعه، ماتریس ژنتیکی داده‌های RAPD وISSR همبستگی در سطح معنی‌داری را $R^2=0.420$ $P=0.01$ نشان دادند. به این معنی که احتمال داشتن هم‌پوشانی بین دو نشانگر RAPD و ISSR بسیار زیاد است.

تجزیهٔ خوشه‌ای گیاهان باززایی‌شده از کشت بافت آلوئه

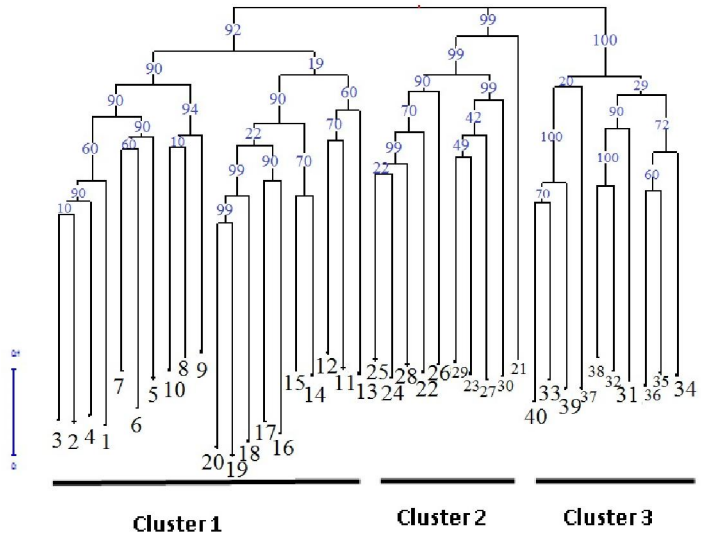
برمبنای داده‌های دو نشانگر تحت مطالعه دندروگرام با روش Neighbor Joining با بوت استرپ ۱۰۰۰ جایگشت رسم شد (شکل ۳). در این خوشه‌بندی گیاهان باززایی‌شده به‌صورت ۳ خوشهٔ اصلی قرار گرفته‌اند و نشان‌دهندهٔ تفرق گروه‌های حاصل از تجزیهٔ خوشه‌ایی داده‌های مولکولی هستند. به‌طوری‌که در دندروگرام اختصاصی هر کدام از نشانگرهای تحت مطالعه نیز گیاهان باززایی‌شده آلوئه به همین صورت قرار گرفته‌اند (داده‌ها ارائه نشده است).آزمون مانتل حاصل از داده‌های دو نشانگر $R^2=0.420$ $P=0.01$ هم‌بستگی در سطح معنی‌داری را نشان داد که نمایانگر هم‌پوشانی بین دو ماتریس تشابه نشانگرهای RAPD و ISSR بوده است. تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) به-منظور بررسی تمایز ژنتیکی بین گروه‌های حاصل از تجزیهٔ خوشه-ای براساس داده‌های RAPD و ISSR نشان داد که۲۶ درصد از کل تنوع مربوط به بین گروه‌های (براساس گروه‌های متشکله در دندروگرام) تحت مطالعه و ۷۴ درصد از تنوع مربوط به گیاهان درون یک گروه بوده است (جدول ۲). درکل این آزمون نشانگر تمایز ژنتیکی بین گروه‌ها در سطح معنی‌داری ($P=0.01$) بوده است و تأییدکنندهٔ تفرق گروه‌های حاصل از تجزیهٔ خوشه‌ای داده‌های مولکولی است.

تحلیل ساختار ژنتیکی با استفاده از روش STRUCTURE

باتوجه به تنوع ژنتیکی گیاهان باززایی‌شده، گروه‌بندی افراد مطالعه‌شده را با تحلیل STRUCTURE با پیروی از آزمون Evanno بررسی شد ($K=2$-5) (شکل ۴). آزمون Evanno دو نوع گروه‌بندی یعنی $K=2$ و $K=4$ را تأیید کرد و براساس این دو گروه‌بندی تحلیل ساختار ژنتیکی صورت گرفت (شکل ۵).

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.1.3.1]
[DOI: 10.29252/nbr.5.1.72]

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.1.3.1]
[DOI: 10.29252/nbr.5.1.72]



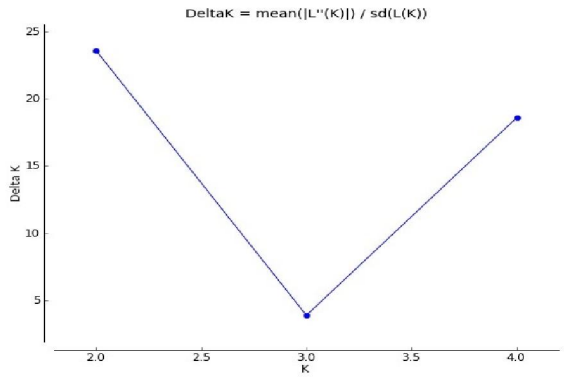
شکل ۳- دندروگرام NJ ترکیبی دو نشانگر ISSR و RAPD.

Fig. 3. NJ dendrogram based on combined RAPD and ISSR data.

جدول ۲- تحلیل واریانس مولکولی براساس داده‌های RAPD و ISSR براساس سه گروه حاصل از تجزیهٔ خوشه‌ای.

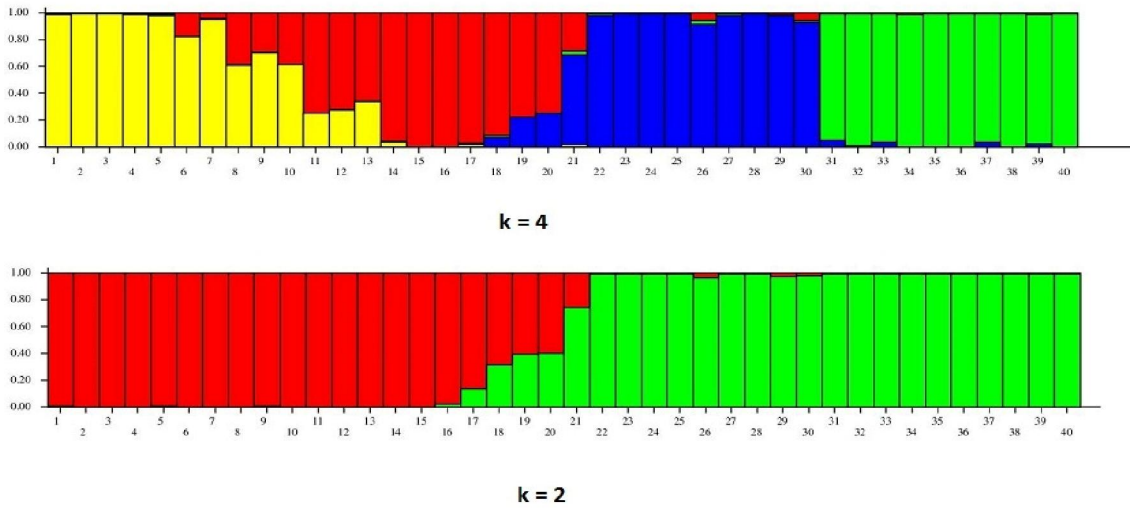
Table 2. Analysis of molecular variance based on RAPD and ISSR data on three groups formed by cluster analysis.

	درجهٔ آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	واریانس تخمینی	درصد تنوع
بین گروهی	۳	۲۱۲,۳۰	۷۰,۷۶	۵,۵۰	۲۶
درون‌گروهی	۳۶	۵۶۷,۰۰	۱۵,۷۵	۱۵,۷۵	۷۴
مجموع	۳۹	۷۷۹,۳۰	؟؟؟	۲۱,۲۵	۱۰۰



شکل ٤- نمودار Evanno test براساس داده‌های ISSR و RAPD.

Fig. 4. Evanno test plot based on ISSR and RAPD data.



شکل ۵- ساختار ژنتیکی گروه‌های تحت مطالعه براساس داده‌های ISSR و SSRبا استفاده از تحلیل STRUCTURE.

Fig. 5. Genetic structure of studied groups based on ISSR and RAPD dada using STRUCTURE analysis.

جزئیات نقشهٔ STRUCTURE درجاتی از مبادلهٔ ژنی بین گروه-ها را نشان می‌دهد. ترکیب اللی گروه اول (۱ الی ۱۰) (قطعات زرد)، اختصاصی و با بقیه متفاوت است. با این حال، بخش‌های کوچکی از ژنوم گیاهان این گروه وجود الل‌هایی را که به رنگ دیگری (رنگ قرمز) هستند را نشان می‌دهد که این الل فرکانس بالایی را در گروه دوم (۱۱ الی ۲۰) نشان می‌دهد. در همین گروه فرکانس پایینی از الل عمده موجود در گروه دیگر (رنگ آبی) را در برخی از گیاهان خود نشان می‌دهد که حاکی‌از نوارآرایی اللی در این گروه‌هاست. نکتهٔ جالب توجه این است که افراد ۳۱ تا ۴۰ فرکانس اللی غالب (رنگ سبز) را در تمامی افراد نشان می‌دهد و الل نوترکیب (رنگ آبی) با فرکانس الل خیلی کم در برخی افراد این گروه مشاهده می‌شود. این گروه اخیر در تجزیهٔ خوشه‌ای نیز با بوت استرپ ۱۰۰ درصد (شکل ۳) از بقیهٔ گروه‌ها تفکیک شده است که این موضوع تأییدکنندهٔ ترکیب اللی اختصاصی این افراد است.

استخراج ژل از گیاهان باززایی‌شدهٔ آلوئه‌ورا

به‌منظور مقایسهٔ میزان تولید ژل در گیاهان باززایی‌شدهٔ آلوئه گیاهان را براساس گروه‌بندی حاصل از تجزیهٔ خوشه‌ای NJ براساس داده‌های دو نشانگر مولکولی، به چهار گروه تقسیم و میزان تولید ژل در این چهار گروه با استفاده از آزمون تحلیل واریانس (ANOVA) و مقایسهٔ میانگین‌ها بررسی شد. براساس تحلیل واریانس، تفاوت معناداری بین مقدار ژل در چهارگروه مشاهده نشد (P=0.746). تحلیل مقایسهٔ میانگین‌ها به‌منظور مقایسهٔ دو به دو گروه‌ها نیز تفاوتی را نشان نداد.

بحث

تولید گیاهان حاصل از کشت بافت یکی از راه‌های مدرن در تولید انبوه در کشاورزی جدید است. بررسی تغییرات ژنتیکی سوماکلونال یکی از دغدغه‌های محققان در این صنعت است. تحقیق حاضر به بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان باززایی‌شده در واکشت چهارم با استفاده از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA پرداخته است. نتایج حاضر نشان‌دهندهٔ تنوع بالا در میان گیاهان باززایی‌شده آلوئه‌ورا در هر دو نوع نشانگر است. گفتنی است دو نشانگر تحت مطالعه به‌طور گسترده در ژنوم پراکنده هستند و می-توانند تصویر واضح‌تری از تغییرات ژنتیکی حاصل از کشت بافت را ارائه دهند. ازطرف دیگر، در این میان نشانگرهای RAPD تنوع ژنتیکی بیشتری را نسبت به نشانگرهای ISSR در این گیاهان ارائه داده است. به‌نظر می‌رسد می‌توان نشانگرهای RAPD تحت مطالعه را به‌مثابهٔ نشانگر برتر در بررسی تنوع سوماکلونال گیاه آلوئه‌ورا پیشنهاد کرد. مطالعات متعددی در خصوص تنوع ژنتیکی در گیاهان باززایی‌شده آلوئه در محیط‌های مختلف کشت و نیز انواع جداکشت‌های این گیاه در واکشت‌های مختلف صورت

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.1.3.1]
[DOI: 10.29252/nbr.5.1.72]

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.1.3.1]
[DOI: 10.29252/nbr.5.1.72]

گرفته است. برخی از این گزارش‌ها عدم تنوع ژنتیکی را با استفاده از نشانگرهای مولکولی نشان دادند برای مثال، Haque و Ghosh (2013) طی مطالعات مولکولی گیاهان باززایی‌شده از ساقهٔ آلوئه-ورا تا سه واکشت و دو سال رویش در مزرعه تنوع سوماکلونال را در گیاهان باززایی‌شده مشاهده نکردند. گیاهان باززایی‌شده از جوانهٔ جانبی و جداکشت از برگ‌ها در تحقیقات دیگر چندشکلی ژنتیکی با نشانگرهای RAPD و ISSR در گیاهان باززایی‌شده نشان داده نشده است (Hashemabadi & Kaviani 2008; Gantait *et al*., 2010; Rathore *et al*., 2011; Sahoo & Rout 2014). این درحالی است که گیاهان باززایی‌شده از محور گل‌آذین از کالوس تا حدود ۸۰ درصد پلی‌مورفیسم را نشان دادند (Rathore *et al*., 2011). Bayani و همکاران (2013) با بررسی واکشت‌های مختلف حاصل از کشت بافت جوانه انتهایی تنوع در اندازهٔ ژنوم را با روش فلوروسایتومتری مشاهده کرد. تفاوت در نتایج مطالعات ممکن است به نوع بافت برداشت‌شده و کشت مورد استفاده مرتبط باشد. همان‌گونه که ذکر شد، در تحقیق حاضر از کشت قسمت انتهایی ساقهٔ آلوئه استفاده شد و پلی‌مورفیسم بالایی (۱۰۰ درصد) در هر دو نوع نشانگر مشاهده شد. به‌منظور بررسی ساختار ژنتیکی جداکشت‌های باززایی‌شده در این تحقیق، از تحلیل Structure استفاده شد. در این روش با استفاده از تکرار تصادفی داده‌ها و محاسبهٔ Likelihood می‌توان به اطلاعات دقیق‌تری دربارهٔ میزان تنوع نمونه‌های تحت مطالعه و قرابت میان نمونه‌ها دست یافت. این روش یک روش مدل‌دار گروه‌بندی نمونه‌ها است که براساس مدل MCMC یا روش زنجیره‌ای مارکوف–مونتکارلو انجام می‌گیرد. امروزه از نرم افزار STRUCTURE می‌توان در شناسایی ساختار ژنتیکی، شناسایی منطقه هیبریدها، افراد هیبرید و نیز تعلق افراد به جمعیت‌ها استفاده کرد.

در تحقیقات به‌عمل‌آمده دربارهٔ گیاهان باززایی‌شدهٔ آلوئه‌ورا تحلیل‌های تجزیهٔ خوشه و ساختار ژنتیکی صورت نگرفته است. درحالی‌که این نوع تحلیل‌ها دربارهٔ گونه‌های مختلف آلوئه در موقعیت‌های جغرافیایی متفاوت صورت پذیرفته است که نشان-دهندهٔ تنوع ژنتیکی در میان ژرم پلاسم و نیز گونه‌های مختلف است. همان‌طور که قبلاً ذکر شد، یکی از فاکتورهای ایجاد تنوع سوماکلونال نوع ژنوتیپ است. بدین ترتیب که تنوع ژنتیکی در میان ژرم پلاسم می‌تواند منبع تنوع ژنتیکی در کشت بافت باشد (Bhaludra *et al.,* 2013; Lal *et al.,* 2002; Nejatzadeh-Barandozi *et al.,* 2012). میزان تولید ژل در گیاهان باززایی-شده در این تحقیق اندازه‌گیری شد. تحقیقات نشان داده است ترکیب شیمیایی ژل در میان گونه‌های مختلف آلوئه متفاوت است. برای مثال *A. barbadensis* ممکن است ۲/۵ برابر ماده aloe emodin بیشتر از *A. ferox* داشته باشد، که به‌دنبال آن، زمان برداشت هر گونه نیز متفاوت است و به ترکیب عوامل آن بستگی دارد. تنوع سوماکلونال که در گیاهان باززایی‌شده بسیار شایع است و ویژگی‌ها و صفات جدیدی به گیاه می‌دهد. گیاه آلوئه نیز از این قاعده مستثنی نیست و طی تحقیقی که Ferro و همکارانش (2003) انجام داده‌اند مقایسه‌ای بین آلوئه با تغییرات سوماکلونال و کلون والدین انجام شده است، که نتایج آن نشان‌دهندهٔ تفاوت ترکیبات موجود در ژل و مقدار آن است.

در تحقیق دیگری Saggoo و Kaur (2010) از جداکشت ساقهٔ آلوئه ورا دو رقم HPM1 و PBL3 هند در محیط کشت MS حاوی D-۲،۴ و کینتین افزایش میزان ژل در گیاهان باززایی‌شده و کاهش آلوئین مشاهده شده است. استفاده از نانوذرهٔ جیوه و Nano-Tio2 وNH4NO3 در سوسپانسون سلول‌های آلوئه‌ورا توانایی افزایش ماده آلوئن را تا ۴۸ ساعت بعد در کالوس‌های ایجادشده نشان داده است (Raei *et al.,* 2014).

در تحقیق حاضر، میزان ژل تفاوت معنی‌داری در بین گیاهان باززایی‌شده نشان نداد که مبین عدم تأثیر کشت بافت و تغییرات ژنتیکی حاصل در ژن‌های دخیل در تولید ژل در این گیاهان است. این تفاوت را می‌توان به نوع ژنوتیپ، نوع جداکشت و میزان و نوع فیتوهورمون‌های به‌کاررفته در کشت بافت نسبت داد. درواقع، می‌توان گفت احتمالاً تغییر در سطح ژنوم گیاهان باززایی (تنوع ژنتیکی در بخش‌هایی که نشانگرهای RAPD و ISSR تکثیر کرده‌اند) روی ژن‌های تولیدکنندهٔ ژل نبوده است یا این تغییرات در حدی نبوده است که میزان بیان ژن‌های مربوط را تغییر دهد. به-هرحال تحقیقات بیشتر و بررسی ژن‌های دخیل در مسیر تولید ژل به‌منظور وضوح بیشتر بایستی صورت پذیرد. به‌طورکلی تحقیق حاضر توانست درصد پلی‌مورفیسم بالا در لوکوس‌های انتخابی نشانگرهای مولکولی ISSR و RAPD را نشان دهد. وجود تمایز ژنتیکی بین گیاهان باززایی‌شده حاکی‌از ایجاد تنوع سوماکلونال

در گیاهان باززایی‌شده واکشت چهارم و منتقل‌شده به خاک است. بر این اساس، به نظر می‌رسد این گیاهان برای تولید انبوه ژنوتیپ خاص برای دستیابی گیاهان مشابه با گیاه مادری مناسب نیست، درحالی‌که این روش در بهنژادی گیاهان به منظور رسیدن به صفات مطلوب در برنامه‌های زادآوری کاربرد خواهد داشت.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی به دلیل در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی قدردانی می نمایند.

REFERENCES

Bayani, A., Noormohammadi, Z., Farahani, F. and Nejadsatari, S. 2013. The study of morphological and cytogenetical variations in *Aloe littoralis* and *Aloe barbadensis* regenerated plants. M.Sc. Thesis, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Bhaludra, C.S.S., Bethapudi, R. R., Murugulla, A.C., Pullagummi, C., Latha, T., Venkatesh, K., Bheemagani, A.J., Pudutha, A., and Rani, A.R. 2013. Cultivation, phytochemical studies, biological activeities and medicinal uses of *Aloe ferox*, grandfather of Aloes an important amazing medi-cinal plant. – Int. J. Pharmacol. 9: 405-415.

Ferro, C.P.V.A., Bradbury, F., Shakir, E., Rahman, S.R. and Stimon, W.H. 2003. In vitro susceptibilities of *Shigella flexneri* and *Streptococcus pyogenes* to inner gel of *Aloe barbadensis* Miller. antimicrob. – Agents Chemotherap. 47: 1137-1139.

Freeland, J.R., Kirk, H. and Peterson, S.D. 2011. Molecular ecology (2nd ed). UK: Wiley-Blackwell, pp: 449.

Gantait, S., Mandal, N., Bhattacharyya, S. and Das P.K. 2010. A novel strategy for in vitro conservation of *Aloe vera* L. through long term shoot culture. – Biotechnol. 9: 326-331.

Haque, M.S. and Ghosh, B. 2013. High frequency microcloning of *Aloe vera* and their true-to-type conformity by molecular cytogenetic assessment of two years old field growing regenerated plants. – Bot. Studies 54: 1-10. doi: 10.1186/1999-3110-54-46.

Hashemabadi, D. and Kaviani, B. 2008. Rapid micropropagtion of *Aloe vera* shoot multiplication. – Afr. J. Biotechnol. 72: 64-78.

Krizman, M., Jakse, J., Baricevic, D., Javornik, B. and Mirko, P. 2006. Robust CTAB-activated charcoal protocol for plant DNA extraction. – Actaagri Slov. 87: 427 - 433.

Lal, R.K., Sharma, J.R., Patra, D.D., Farooqui, A.H.A. Kalra, A., Baba, J.R., Singh, A.K. and Khanuja, S.P.S. 2002. *Aloe vera* and its cultivation in India. – Farm bulletin, central institute of medicinal and aromatic Plants, Lucknow, India. 54: 124-134.

Mendonça, F.A., Passarini Junior, J.R., Esquisatto, M.A., Mendonça, J.S., Franchini, C.C. and Santos, G.M. 2009. Effects of the application of *Aloe vera* L. and micro current on the healing of wounds surgically induced in wistar rats. – Acta Cir. Bras. 24: 150-155.

Mohammad, A. 2003. *Aloe vera*. – Textbook of pharmacognosy pp: 111-115.

Nayanakantha, N., Singh, B. and Kumar, A. 2011. Improved culture medium for micropropagation of *Aloe vera* L. – Trop. Agri. Res. Exten. 13: 87-93.

Nejatzadeh-Barandozi, F., Naghavi, M.R., Hassani, M.E., Mostofi, Y., Mousavi A. and Tahmasebi Enferadi S. 2012. Diversity of Iranian Aloe (*Aloe vera* L.) genotypes based on aloenin contents and some morphological traits. – J. Hortic. Sci. Biotechnol. 87: 673-677.

Peakall, R. and Smouse, P.E. 2006. GENALEX 6: genet-

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.1.3.1]
[DOI: 10.29252/nbr.5.1.72]

-ic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research. – Mol. Ecol. Not. 6: 288-295.

Pritchard, J.K., Stephens, M. and Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype Data. – Genetics 155: 945-959.

Raei, M., Angaji, S.A., Omidi, M., and Khodayari, M. 2014. Effect of abiotic elicitors on tissue culture of *Aloe vera*. – Intl. J. Biosci. 5: 74-81.

Rathore, M.S., Chikara J, Mastan, S.G., Rahman, H., Anand, K.G. and Shekhawat N.S. 2011. Assessment of genetic stability and instability of tissue culture propagated plantlets of *Aloe vera* L. by RAPD and ISSR markers. – Appl. Biochem. Biotechnol. 165: 1356-65.

Saggoo, M.I.S. and Kaur, R. 2010. Somaclonal variation in plants regenerated from cultures of two morphologically distinct accessions of *Aloe vera* L. – Annals Biol. Res. 1: 172-177

Sahoo, S. and Rout, G.R. 2014. Plant regeneration from leaf explants of *Aloe barbadensis* Mill. and genetic fidelity assessment through DNA markers. – Physiol. Mol. Biol. Plants 20: 235–240

Shafi, K., Khan, L. and Khan, A. 2000. Commercial extraction of gel from *Aloe vera* L. leaves. – J. Chem. Sci. Pak. 22: 47-49.

Supe, U.J. 2007. In vitro regeneration of *Aloe barb-adensis*. – Biotech. 6: 601-603

Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. and Kahl, G. 2005. DNA fingerprinting in plants. principles, methods, and applications. (2nd ed.), Boca Rayton, Fl., USA: CRC Press, pp: 472.

*****

How to cite this article:

Noormohammadi, Z., Ghasempour, B. and Farahani, F. 2018. Somaclonal variation of tissue culture regenerated plants of *Aloe barbadensis* Mill. – Nova Biologica Rep. 5: 72-81.

نورمحمدی، ز.، قاسم‌پور، ب. و فراهانی، ف. ۱۳۹۷. بررسی تنوع سوماکلونال گیاهان باززایی‌شده از کشت بافت آلوئه‌ورا. – یافته‌های نوین در علوم زیستی ۵: ۸۱-۷۲.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.24236330.1397.5.1.3.1]
[DOI: 10.29252/nbr.5.1.72]