مجله علوم دانشگاه تهران
جلد سی‌ام (۱۳۸۳) شماره ۳ (۵۰۶-۴۹۵)

مطالعه تغییرات حاصل از کشت طولانی مدت نوساقه‌های سیب زمینی در مانیتول با استفاده از RAPD-PCR

شهرزاد مدنی، علی اکبر احسانپور*، صادق ولیان بروجنی
گروه زیست‌شناسی، دانشگاه اصفهان، اصفهان
(دریافت: ۸۲/۹/۱۹ ؛ پذیرش:۸۳/۵/۱۸)

چکیده

نگهداری ژرم پلاسم گیاه سیب زمینی با توجه به ارزش غذایی این محصول، اهمیت زیادی دارد. انواع روشهای نگهداری ژرم پلاسم گیاهان شامل روش رشد آهسته و نگهداری در انجماد است. در این تحقیق نوساقه‌های سیب زمینی به روش رشد آهسته به مدت ۸ ماه نگهداری شدند. بدین منظور غلظت‌های ۲، ٤ و ۶ درصد مانیتول به محیط کشت MS اضافه گردید و قطعات تک جوانه از دو رقم کوزیما و وایت دزیره در این محیط‌ها کشت شد. بعد از مدت زمانهای ۲، ٤، ۶ و ۸ ماه پارامترهای رشد در گیاهان اندازه‌گیری شد. با افزایش غلظت مانیتول تعداد و طول ریشه، تعداد جوانه و طول ساقه کاهش یافت. بیشترین کاهش در غلظت ۶٪ مانیتول مشاهده شد. تغییرات رشدی از قبیل نازک شدن ساقه، کوچک شدن برگها و شیشه‌ای شدن به دفعات در غلظت‌های ٤ و ۶ درصد مانیتول مشاهده شد. بعد از انتقال نمونه‌ها به محیط کشت پایه MS، به منظور بررسی تنوع سوماتیک نمونه‌ها، روش RAPD با استفاده از پرایمرهای FPK1-016 و OPAA-20 اجرا شد. مقایسه باندهای نمونه‌های شاهد و تیمار در مدت زمان نگهداری ۲ و ۸ ماه در دو رقم کوزیما و وایت دزیره به کمک روش RAPD نشان داد که مانیتول هیچ تغییر ژنتیکی قابل تشخیصی را در این گیاهان القا نکرده است..

واژه‌های کلیدی: *مانیتول، نگهداری ژرم پلاسم، رشد آهسته، تنوع سوماتیک، سیب زمینی، RAPD-PCR .*

مقدمه

سیب زمینی(*Solanum tuberosum* L.) چهارمین منبع غذایی مهم جهان پس از گندم، برنج و ذرت است. این گیاه به طریق رویشی تکثیر می‌شود و یکی از روشهای معمول نگهداری آن، از طریق نگهداری غده در انبار می‌باشد. این روش علاوه بر پرهزینه بودن و خطر آلودگی توسط میکرو ارگانیسم‌ها و حشرات، دارای دو مشکل اصلی در اثر نگهداری طولانی مدت غده در انبار است: تشکیل جوانه در غده‌ها و از بین رفتن مقداری از کربوهیدراتها و مقدار قابل توجهی از ویتامین C در غده. استفاده از روشهای نگهداری *in vitro* برای ذخیره ژرم پلاسم سیب زمینی روش مناسبی است که نقاط ضعف انبارداری غده سیب زمینی را ندارد (Bajaj, 1986).

روشهای نگهداری مواد گیاهی در *in vitro* شامل دو روش رشد آهسته و نگهداری در انجماد می‌باشد.

در روش رشد آهسته (Slow growth) با کم کردن مواد غذایی محیط کشت مانند ساکارز، کم کردن شدت نور و یا استفاده از مواد کاهش دهنده رشد مانند مانیتول، سوربیتول، استیل سالیسیلیک اسید و انسی میدول (ancymidol) می‌توان رشد نمونه‌ها را در محیط کشت کاهش داد و واکشت نمونه‌ها را از ۱۲-۶ ماه به تعویق انداخت. در این روش احتمال بازیابی و رشد مجدد نمونه‌ها بیشتر است (Bonnier & Tuyl, 1997; Nagash *et al.,* 2001). در روش نگهداری در انجماد (Cryopreservation) مواد گیاهی در نیتروژن مایع (۱۹۶ºC-) نگهداری می‌شوند، با این روش می‌توان گیاهان را به چندین سال نگهداری نمود. از آنجایی که در این روش رشد گیاهان در نیتروژن مایع کاملاً متوقف می‌شود، بی ثباتی ژنتیکی کمتری گزارش شده است ولی امکان بازیابی و رشد مجدد نمونه‌ها نیز کمتر است (Sarkar & Naik, 1998). در مورد نگهداری نوساقه‌های سیب‌زمینی درمحیط کشت حاوی مانیتول تغییرات رشدی از قبیل باریک شدن ساقه، کوچک شدن برگها، شیشه‌ای شدن و شل شدن بافت گزارش شده است(Sarkar *et al*., 1999; Sarkar *et al*., 2001; Sarkar *et al*., 2002).

یکی از اصول بانک ژنی حفظ ثبات ژنتیکی گیاهان است. بنابراین لازم است که تنوع سوماتیک احتمالی در گیاهان نگهداری شده در مانیتول بررسی شود. روش‌هایی که «برپایه‌ی استفاده از مارکرهای ژنتیکی» بنا نهاده شده است در شناسایی تنوع سوماتیک گیاهان کاربرد فراوانی دارد. انواع این روشها شامل واکنش های زنجیره‌ای پلیمرازی (PCR)، پلی‌مورفیسم قطعات حاصل از برش‌گیری (RFLP)، (AFLP) و (RAPD-PCR) امروزه به وفور در گیاهان استفاده می‌شود. از میان این تکنیک‌ها، روش RAPD-PCR از اهمیت خاصی برخوردار می‌باشد (Abkenar & Isshiki, 2003; Perazzo *et al*., 1999; Sarkar *et al*., 2001).

در این مطالعه به منظور بررسی تنوع سوماتیک نوساقه‌های سیب‌زمینی نگهداری شده در مانیتول، از روش RAPD-PCR استفاده شد.

مواد و روشها

مواد گیاهی

قطعات ساقه گیاه سیب زمینی از دو رقم کوزیما و وایت دزیره که قبلاً از طریق کاشت غده در گلخانه تولید شده بودند، پس از ضدعفونی سطحی با محلول وایتکس تجاری ۲۰٪ به مدت ۱۵ دقیقه و شستشو با آب مقطر استریل در محیط کشت پایه MS کشت شدند. بعد از تکثیر، نوساقه‌های سترون به محیط کشت حاوی مانیتول با غلظت‌های ۲، ۴ و ۶ درصد منتقل شدند. برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد و در هر تکرار ۳ قطعه تک جوانه کشت گردید. بعد از مدت زمانهای۲، ۴، ۶ و ۸ ماه پارامترهای رشد در نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. همچنین رشد مجدد گیاهان نگهداری شده در مانیتول، پس از این مدت در محیط کشت MS بررسی گردید.

استخراج DNA ژنومی

DNA ژنومی از برگها و ساقه‌های جوان گیاهان تحت تیمار مانیتول بعد از گذشت زمانهای ۲، ۴، ۶ و ۸ ماه که در ۲۰°C- نگهداری شده بودند به روش Jobes و همکاران (۱۹۹۵) استخراج شد. به طور خلاصه در هر استخراج ۰/۱گرم از بافت گیاهی با ۰/۱ گرم پودر شیشه در 1ml بافر استخراج گرم (دمای ۵۵°C) به مدت۱۰ دقیقه کاملاً ورتکس شد. ترکیب بافر استخراج به ترتیب زیر است:

$CoONaCH_3$ (100 mM), pH 4.8
EDTA (100 mM), pH 8
NaCl (500 mM)
PVP (2%W/V),
DTT (100 mM)

۱۵۰ µl از محلول SDS ۱۰٪ به آن اضافه شد و خوب مخلوط گردید. محلول حاصل در rpm ۱۰۰۰۰ با دستگاه میکروسانتریفوژ eppendorf مدل 5415D به مدت۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. DNA موجود در محلول رویی با فنل/کلروفرم استخراج گردید و نهایتاً با ایزوپروپانول سرد رسوب داده شد. به منظور افزایش خلوص DNA، بعد از حل کردن آن در ۳۰۰µl آب مقطر دو بار تقطیر استریل توسط اتانول استخراج شد. درپایان DNA در بافر TE مولار، pH 8 حل شد و در ۲۰°C- نگهداری شد. در واکنش‌های PCR ، ۴-۲ میکرولیتر از DNA مورد استفاده قرار گرفت.

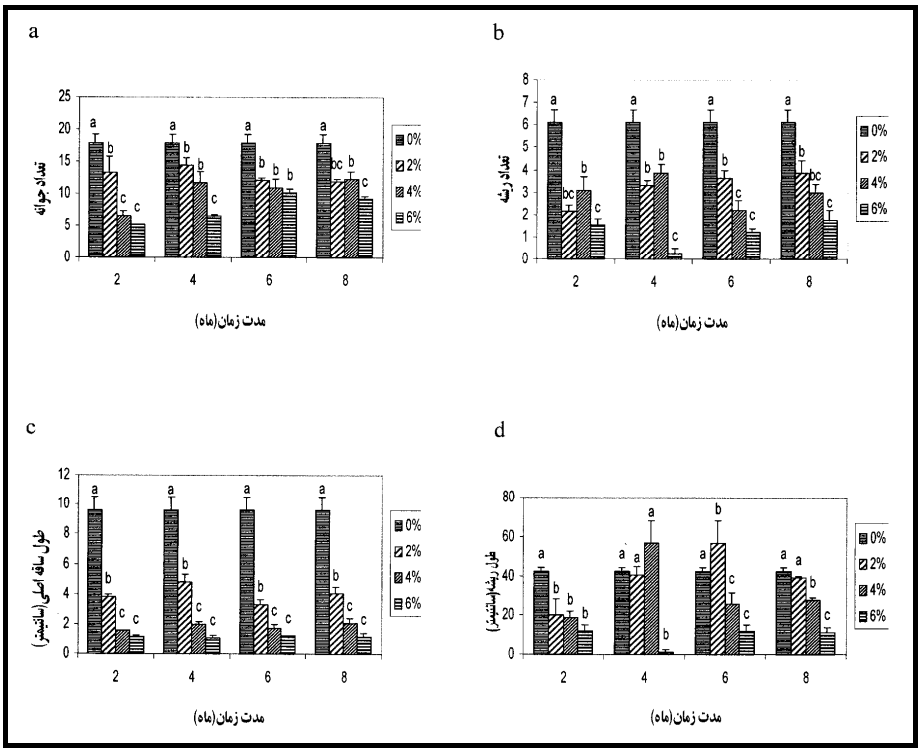
۴۹۸ ـــــــ

شاهد با میانگین ۶/۱ عدد کاهش داشته است. میانگین تعداد ریشه در غلظت ۲ و ۴ درصد مانیتول بعد از ۸ ماه نگهداری نوساقه‌ها به ترتیب ۳/۸۶ و ۲/۹۹ عدد است. در مجموع تعداد ریشه رقم وایت دزیره و کوزیما در تمامی غلظت‌ها، با تعداد ریشه در نمونه‌های شاهد اختلاف معنی‌دار (P≤۰/۰۵) نشان داد. طول ریشه نیز در رقم دزیره در غلظت۲ درصد مانیتول با میانگین ۳۸/۸۶ سانتی مترنسبت به نمونه‌های شاهد با میانگین ۴۲ سانتیمتر اختلاف معنی‌دار (P≤۰/۰۵) نداشت. در غلظت‌های ۴٪ و۶٪ اختلاف معنی‌دار(P≤۰/۰۵) بود. در رقم کوزیما بین غلظت‌های تیمار و شاهد از نظر این پارامتر اختلاف معنی‌دار(P≤۰/۰۵) وجود نداشت. در غلظت‌های مورد آزمایش در هر دو رقم کوزیما و وایت دزیره طول ساقه نسبت به نمونه‌های شاهد اختلاف معنی‌دار(P≤۰/۰۵) داشت. تعداد جوانه‌های ساقه اصلی در رقم دزیره در غلظت ۲٪ ، ۴٪ و ۶٪ به ترتیب با میانگین ۱۱/۸، ۱۲/۳ و۹/۲ عدد نسبت به نمونه‌های شاهد با میانگین ۱۷/۸۶ عدد اختلاف معنی‌داری(P≤۰/۰۵) را نشان داد. در رقم کوزیما این اختلاف در غلظت ۴٪ مانیتول معنی‌دار نیست. در غلظت‌های۴ و ۶ درصد مانیتول در هر دو رقم کوزیما و وایت دزیره تغییرات مورفولوژیکی نوساقه‌ها از قبیل شل شدن بافت، خمیده شدن و متورم شدن ساقه، شیشه‌ای شدن و از همه مهمتر کوچک شدن برگها دیده شد. در غلظت ۲٪ مانیتول بعد از ۸ ماه نگهداری در این محیط کشت، تعداد زیادی ریشه نابجا دیده شد.

ساقه‌های نگهداری شده دو رقم کوزیما و وایت دزیره در غلظت ۲٪ مانیتول ۱۰۰ درصد بعد از انتقال به محیط کشت MS بازیابی شده و رشد طبیعی نشان دادند، درحالیکه در غلظت‌های ۴ و ۶ درصد مانیتول بازیابی و رشد مجدد نمونه‌ها حدود۹۰ درصد بود.

به منظور بررسی تنوعات سوماتیک احتمالی در نوساقه‌های نگهداری شده در مانیتول دو رقم کوزیما و وایت دزیره RAPD-PCR برروی این گیاهان انجام شد. تنها در پرایمرهای FPK1-016 و OPAA-20 نتایج ثابت وقابل تکرار ایجاد شد. در هر دو رقم و در تمامی غلظت‌ها با پرایمر FPK1-016 باندهایی در محدوده ۴۰۰bp – ۱۵۰۰ و با پرایمر OPAA-20 در محدوده ۷۰۰-۴۰۰bp مشاهده شد. با مقایسه این باندها بین گیاهان شاهد و گیاهان تیمار شده با مانیتول، هیچ تغییری (اضافه یا کم شدن باندها) مشاهده نشد (شکل۳، ۴، ۵، ۶ و ۷).

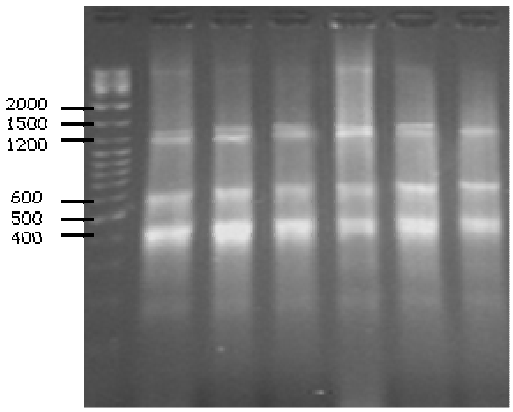
۵۰۰ ـــــــ



شکل۲- اثر غلظت های مختلف مانیتول (۰، ۲، ۴و ۶ درصد) بر روی تعدادجوانه (a)، تعداد ریشــه(b)، طول ساقه اصلی(c)و طول ریشه(d)درسیب زمینی رقم وایت دزیره. حروف غیر مشابه نشان دهنــده معنی‌دار بودن داده ها (P<۰/۰۵) می‌باشد.

مواد اسموتیکوم با کاهش پتانسیل اسمزی محیط کشت جذب آب و املاح توسط گیاه را کاهش داده، در کل باعث کاهش متابولیسم گیاه می‌شوند و از این طریق رشد نمونه‌ها را در محیط کشت کم‌کرده و درنتیجه می‌توان فاصله واکشت نمونه‌ها را افزایش داد. بر اساس برخی گزارشها تغییرات مورفولوژیک که درصورت استفاده از مانیتول به عنوان ماده اسموتیکوم در گیاهان دیده می‌شود، نسبت به مواد انسی میدول و استیل سالیسیک اسید بیشتر است (Lopez-Delgado *et al*., 1998; Sarkar *et al*., 2001). نظیر چنین تغییراتی در نمونه‌های مورد آزمایش ما نیز مشاهده گردید.

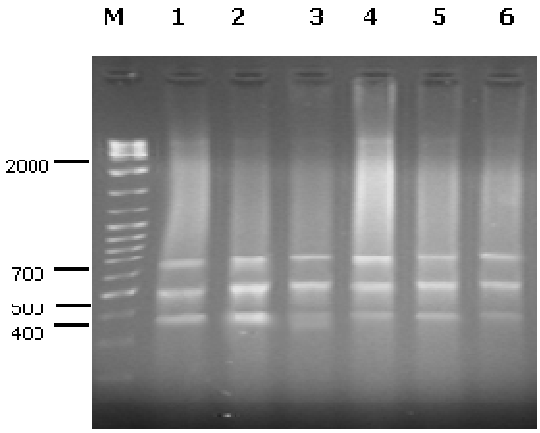
۵۰۲ ـــــــ



شکل۵- الگوی باندهای حاصل از RAPD-PCR نوساقه‌های سیب‌زمینی رقم کوزیما. نمونه‌ها پس از PCR با پرایمر FPK1-016 بر روی ژل‌آگارز ۱/۵٪ تفکیک شدند.

از چپ به راست M: مارکر، ۱: شاهد، ۲: مانیتول۲درصد(۸ ماه)، ۳: مانیتول۴درصد (۸ ماه)، ۴: مانیتول۶ درصد (۸ ماه)، ۵: مانیتول ۲درصد (۲ ماه)، ۶: شاهد.

نشانه‌های‌سیاه معرف باندهای‌اصلی است.



شکل۶- الگوی باندهای حاصل از RAPD-PCR نوساقه‌های سیب‌زمینی رقم کوزیما. نمونه‌ها پس از PCR با پرایمر20 -OPAA بررروی ژل‌آگارز ۱/۵٪ تفکیک شدند.

M: مارکر، ۱: شاهد، ۲: مانیتول۲ درصد(۸ ماه)، ۳: مانیتول ۴ درصد(۸ ماه)، ۴: مانیتول۶ درصد (۸ماه)، ۵: مانیتول۲ درصد(۲ ماه)، ۶: شاهد.

نشانه‌های سیاه معرف باندهای اصلی است

۵۰۴ ـــــــ

دادند. در غلظت‌های ۴ و ۶ درصد مانیتول به علت وقوع تغییرات مورفولوژیک شدیدتر، درصد بازیابی و رشد مجدد گیاهان تحت تیمار نسبت به غلظت ۲ درصد مانیتول کمتر بود.

عوامل مختلفی در وقوع تنوع سوماتیکی در کشت *in vitro* دخالت دارند که از آن جمله می‌توان به اثر ترکیبات محیط کشت و تنظیم کننده‌های رشد گیاهی، تغییر در ساختمان کروموزوم‌ها شامل حذف و جابجایی، وجود عناصر قابل انتقال یا ترانس پوزونها و موتاسیونهای نقطه‌ای اشاره کرد. دلایل زیادی وجود دارد که وقوع تنوعات سوماتیک با نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مرتبط است. این تنظیم‌کننده‌ها می‌توانند به عنوان موتاژن در طی کشت طولانی مدت مواد گیاهی در *in vitro* عمل کنند. در بررسی‌های جدید مشخص شده که شرایط رشد آهسته نیز می‌تواند آنزیم‌های DNA متیلاز خاصی را در سطح سلول فعال کند و باعث ایجاد بخش های غنی از متیل در ژنوم گیاه شود که این نواحی می‌توانند بیان ژن را در نسل‌های بعدی تحت تأثیر قرار دهند(Sarkar *et al*., 2001).

از آنجایی که نگهداری ژرم پلاسم گیاهان در صورت حفظ ثبات ژنتیکی اهمیت زراعی و اقتصادی فراوانی دارد، بنابراین ثبات ژنتیکی نوساقه‌های سیب زمینی نگهداری شده در مانیتول مورد بررسی قرار گرفت. از بین روشهای مولکولی مبتنی بر PCR می‌توان روش RAPD-PCR را نام برد. در این روش نیازی به دانستن توالی نوکلئوتیدی ژنوم گیاه نبوده و مقدار DNA اندکی مورد نیاز است(Keskitalo *et al*., 1998; Tang, 2001). درآزمایشهای انجام شده الگوی باندهای حاصل از پرایمرهای OPAA-20 و FPK1-016 بررسی گردید. با مقایسه الگوی باندهای حاصل از تکثیر قطعات DNA در نمونه‌های شاهد و نمونه‌های نگهداری شده در غلظت‌های ۲، ۴ و ۶ درصد مانیتول به مدت ۸ ماه تغییری در الگوی باندها (کم شدن یا اضافه شدن باند) که نشان دهنده وقوع تنوع سوماتیکی در اثر نگهداری گیاه در محیط کشت حاوی مانیتول باشد، مشاهده نشد.

در مجموع می‌توان گفت الگوی RAPD-PCR دو رقم وایت دزیره و کوزیما نگهداری شده در غلظت‌های مورد آزمایش مانیتول به مدت ۸ ماه با الگوی نمونه‌های شاهد(نگهداری شده در محیط کشت MS) مشابه بود و پرایمرهای استفاده شده تغییری را در توالی DNA ژنومی این گیاهان نشان ندادند. این نتایج بیانگر این است که نوساقه های سیب‌زمینی را می‌توان به منظور نگهداری طولانی مدت در محیط کشت حاوی ۴ یا ۶ درصد مانیتول بدون وقوع هرگونه تغییرات ژنتیکی حداقل برای مدت ۸ ماه نگهداری کرد. این نتایج مشابه گزارشهای Sarkar و همکاران (۱۹۹۹) در نگهداری نوساقه‌های سیب زمینی به روش نگهداری در انجماد و Sarkar و همکاران (۲۰۰۱) در نگهداری نوساقه‌های سیب زمینی به روش رشد آهسته می‌باشد.

۵۰۶ ـــــــ