

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، ۴ 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، ۴، 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 ۴ 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 ارگانسیم‌ها 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 پلاسما 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 واکنش 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 (-196°C) 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، بی‌ثباتی ژنتیکی کمتری گزارش شده است ولی امکان بازیابی و رشد مجدد نمونه‌ها نیز کمتر است (Sarkar & Naik, 1998). در مورد نگهداری نوساقه‌های سیب‌زمینی در محیط 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 واکنش‌های 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 زمانهای ۲، 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 20°C نگهداری شده بودند به روش Jobs و همکاران (۱۹۹۵) استخراج شد. به طور خلاصه در هر استخراج ۰/۱ گرم از بافت گیاهی با ۰/۱ گرم پودر شیشه در ۱ ml بافر استخراج گرم (دمای 55°C) به مدت ۱۰ دقیقه کاملاً ورتکس شد. ترکیب بافر استخراج به ترتیب زیر است:

CoONaCH₃ (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 میکروسانتریفیوژ eppendorf مدل 5415D به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ 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 ۳۰۰ μl آب مقطر دو بار تقطیر استریل توسط اتانول استخراج شد. در پایان DNA در بافر TE مولار، pH 8 حل شد و در 20°C نگهداری شد. در واکنش‌های PCR، ۴-۲ میکرولیتر از DNA مورد استفاده قرار گرفت.

RAPD-PCR

واکنش RAPD-PCR در حجم نهایی ۲۵ μ l شامل PCR Buffer (۱۰ X) ۲/۵ μ l، Taq DNA Polymerase ۰/۲ μ l، dNTP (۱۰ mM) ۱/۵ μ l، MgCl₂ (۵۰ mM) ۱/۵ μ l، Primer (۱۰ pmol) ۱/۵ μ l از پرایمرهای OPJ-01، FPK1-016، FPK2-06، OPA-01 و OPAA-20 و DNA ژنومی انجام شد. توالی پرایمرها و شرایط PCR در جدول ۱ قید شده است. شرایط جدول ۱ برای همه پرایمرها به کار برده شد. واکنش PCR در دستگاه Master Cyclor ساخت ایندرف انجام شد. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ با اختلاف پتانسیل ۸۵-۱۰۰ v الکتروفورز و به وسیله اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شد. مشاهده باندها در دستگاه Gel Documentation مدل Biometra انجام گرفت.

جدول ۱- شرایط انجام RAPD-PCR و توالی پرایمرها

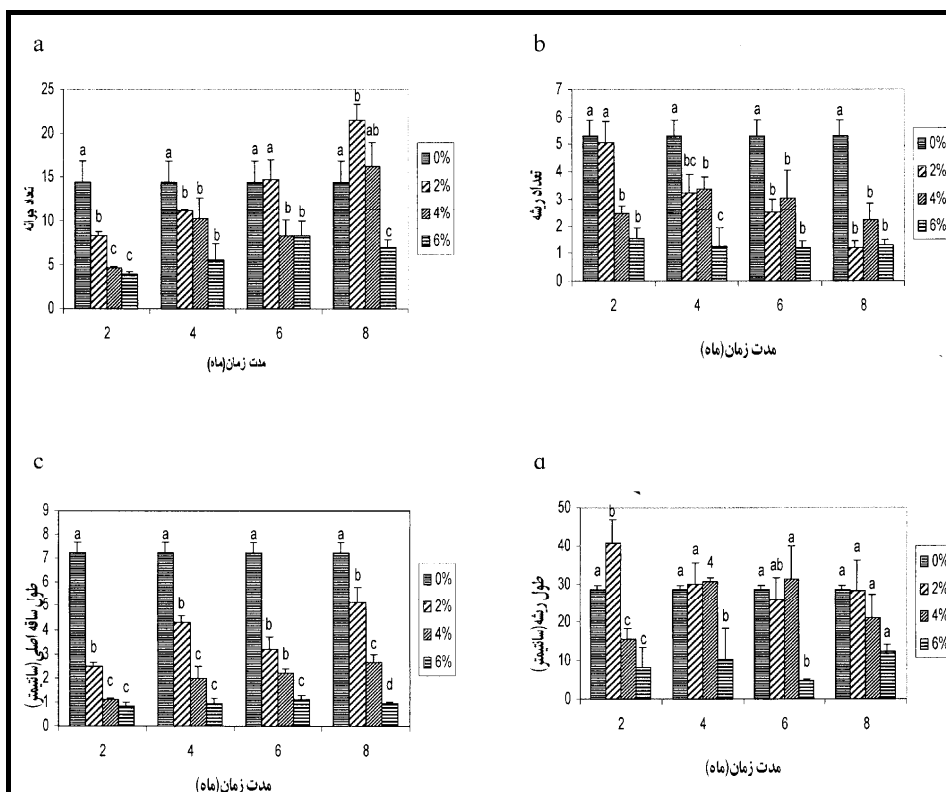
شرایط RAPD-PCR			توالی	نام پرایمر		
مدت زمان	دما	تعداد سیکل	5'-CAC TGC GCT GAA-3'	FPK 1-016		
۵'	۹۴°C	40 Cycle			5'-TTG CCT TCG G-3'	OPAA-20
۳۰''	۹۴°C					
۳۰''	۴۰°C					
۱'	۷۲°C					
۵'	۹۴°C	40 Cycle	5'-TTG CCT TCG G-3'	OPAA-20		
۱'	۹۴°C					
۱'	۲۶°C					
۱'	۷۲°C					

نتایج

مانیتول به طور متداول جهت کاهش رشد در کشت *in vitro* استفاده می‌شود. در این مطالعه رشد نوساقه‌های سیب‌زمینی در محیط کشت حاوی غلظت‌های ۲، ۴ و ۶ درصد مانیتول مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دهنده کاهش رشد در تمامی غلظت‌های مورد آزمایش در هر دو رقم کوزیما و وایت دزیره بود (شکل ۱ و ۲). در غلظت‌های ۰/۶٪ و ۰/۲٪ به ترتیب بیشترین و کمترین کاهش رشد مشاهده گردید. تعداد ریشه در نوساقه‌های سیب‌زمینی رقم وایت دزیره نگهداری شده در غلظت ۰/۶٪ مانیتول به مدت ۸ ماه، با میانگین ۷/۵ عدد نسبت به نمونه‌های

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 ($P \leq 0/05$) نشان داد. طول ریشه نیز در رقم دزیره در غلظت ۲ درصد مانیتول با میانگین ۳۸/۸۶ سانتی متر نسبت به نمونه‌های شاهد با میانگین ۴۲ سانتی‌متر اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0/05$) نداشت. در غلظت‌های ۰.۴٪ و ۰.۶٪ اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0/05$) بود. در رقم کوزیما بین غلظت‌های تیمار و شاهد از نظر این پارامتر اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0/05$) وجود نداشت. در غلظت‌های مورد آزمایش در هر دو رقم کوزیما و وایت دزیره طول ساقه نسبت به نمونه‌های شاهد اختلاف معنی‌دار ($P \leq 0/05$) داشت. تعداد جوانه‌های ساقه اصلی در رقم دزیره در غلظت ۰.۲٪، ۰.۴٪ و ۰.۶٪ به ترتیب با میانگین ۱۱/۸، ۱۲/۳ و ۹/۲ عدد نسبت به نمونه‌های شاهد با میانگین ۱۷/۸۶ عدد اختلاف معنی‌داری ($P \leq 0/05$) را نشان داد. در رقم کوزیما این اختلاف در غلظت ۰.۴٪ مانیتول معنی‌دار نیست. در غلظت‌های ۰.۴ و ۰.۶ 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 ۰.۲٪ 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 ۰.۲٪ مانیتول ۱۰۰ درصد بعد از انتقال به محیط کشت MS بازیابی شده و رشد طبیعی نشان دادند، درحالی‌که در غلظت‌های ۰.۴ و ۰.۶ درصد مانیتول بازیابی و رشد مجدد نمونه‌ها حدود ۹۰ درصد بود.

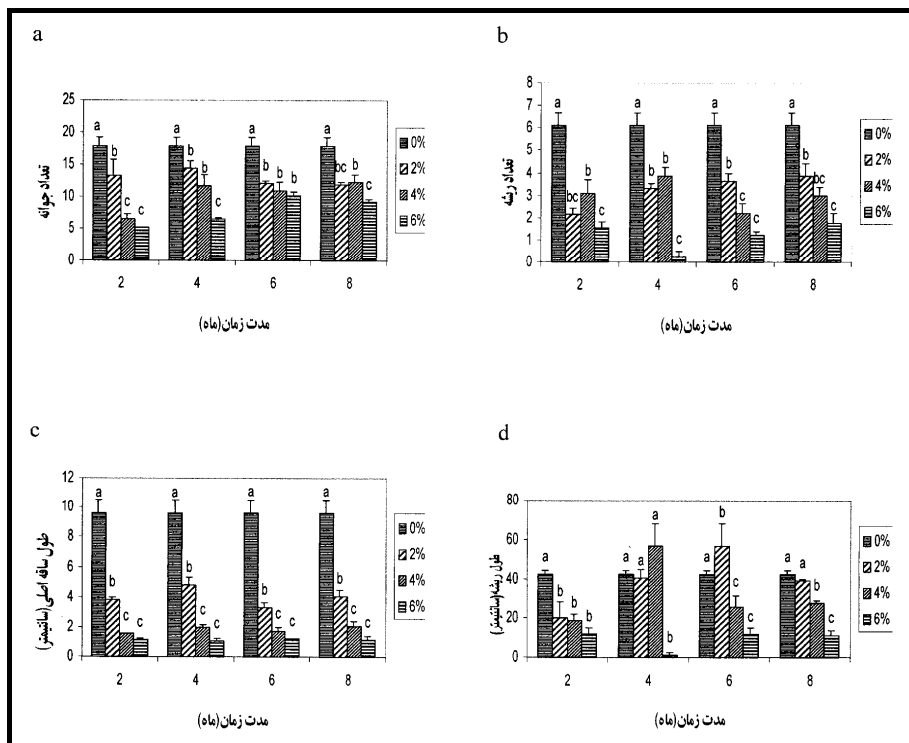
به منظور بررسی تنوعات سوماتیک احتمالی در نوساقه‌های نگهداری شده در مانیتول دو رقم کوزیما و وایت دزیره RAPD-PCR بر روی این گیاهان انجام شد. تنها در پرایمرهای FPK1-016 و OPAA-20 نتایج ثابت و قابل تکرار ایجاد شد. در هر دو رقم و در تمامی غلظت‌ها با پرایمر FPK1-016 باندهایی در محدوده ۴۰۰bp - ۱۵۰۰ و با پرایمر OPAA-20 در محدوده ۴۰۰-۷۰۰bp مشاهده شد. با مقایسه این باندها بین گیاهان شاهد و گیاهان تیمار شده با مانیتول، هیچ تغییری (اضافه یا کم شدن باندها) مشاهده نشد (شکل ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷).



شکل ۱- اثر غلظت های مختلف مانیتول (۰، ۲، ۴ و ۶ درصد) بر روی تعداد جوانه (a)، تعداد ریشه (b)، طول ساقه اصلی (c) و طول ریشه (d) در سیب زمینی رقم کوزیما. حروف غیر مشابه نشان دهنده معنی دار بودن داده ها ($P \leq 0.05$) می باشد.

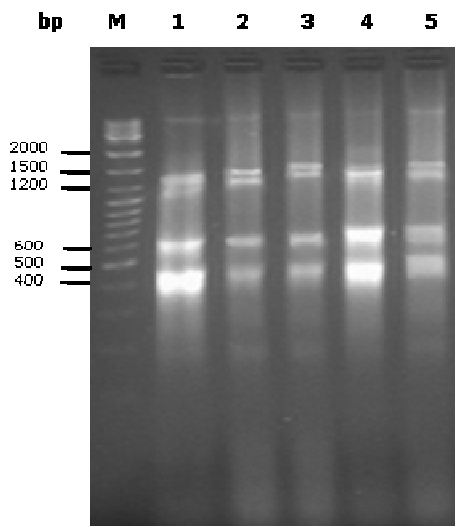
بحث

مانیتول یک قند ۶ کربنه است که به طور طبیعی در بسیاری از گیاهان ساخته می شود. و در آنها به عنوان آنتی اکسیدان و تعدیل کننده تنش خشکی و شوری عمل می کند. از آنجایی که این قند الکلی به وسیله گیاهان متابولیزه نمی شود، به عنوان یک ماده اسموتیکوم در کشت بافت گیاهی، استفاده می گردد (Williamson *et al.*, 2002). علاوه بر مانیتول، برای کاهش پتانسیل اسمزی محیط کشت از مواد دیگری مانند سوربیتول، انسی میدول و استیل سالیسیلیک اسید نیز استفاده می شود (Golmirzaie & Toledo, 1997; Lopez-Delgado *et al.*, 1998; Sarkar *et al.*, 2001).

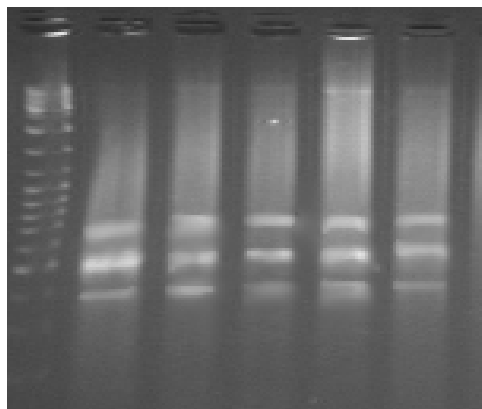


شکل ۲- اثر غلظت های مختلف مانیتول (۰، ۲، ۴ و ۶ درصد) بر روی تعداد جوانه (a)، تعداد ریشه (b)، طول ساقه اصلی (c) و طول ریشه (d) در سیب زمینی رقم وایت دزیره. حروف غیر مشابه نشان دهنده معنی دار بودن داده ها ($P < 0.05$) می باشد.

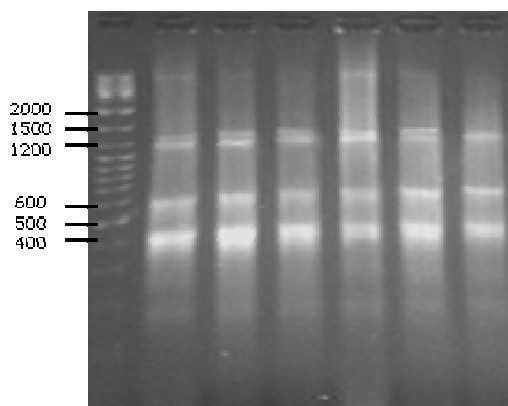
مواد اسموتیکوم با کاهش پتانسیل اسمزی محیط کشت جذب آب و املاح توسط گیاه را کاهش داده، در کل باعث کاهش متابولیسم گیاه می شوند و از این طریق رشد نمونه‌ها را در محیط کشت کم کرده و در نتیجه می توان فاصله واکشت نمونه‌ها را افزایش داد. بر اساس برخی گزارشها تغییرات مورفولوژیک که در صورت استفاده از مانیتول به عنوان ماده اسموتیکوم در گیاهان دیده می شود، 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.



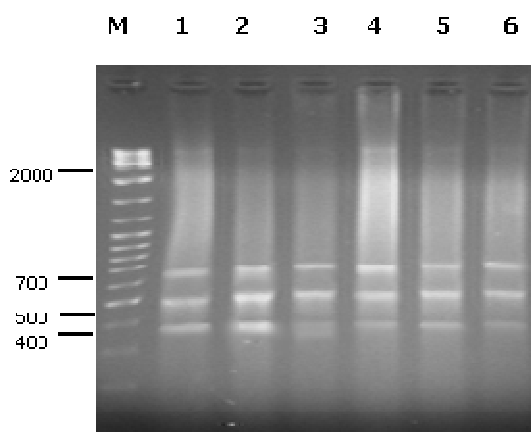
شکل ۳. الگوی باندهای حاصل از RAPD-PCR نوساقه های سیب زمینی رقم دزیره (۸ ماه). نمونه ها پس از PCR با پرایمر FPK1-016 بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ تفکیک شدند. M: مارکر، ۱: شاهد، ۲: مانیتول ۲ درصد، ۳: مانیتول ۴ درصد، ۴: شاهد، ۵: مانیتول ۶ درصد. نشانه های سیاه معرف باندهای اصلی است.



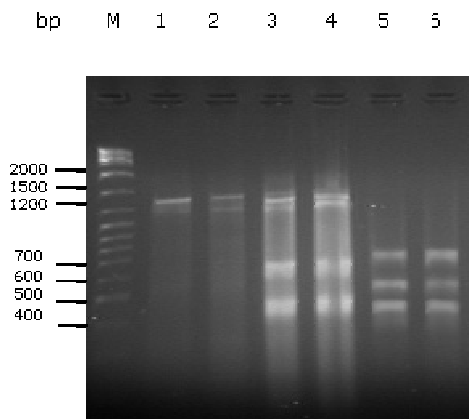
شکل ۴- الگوی باندهای حاصل از RAPD-PCR نوساقه های سیب زمینی رقم دزیره (۸ ماه). نمونه ها پس از PCR با پرایمر OPAA-20 بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ تفکیک شدند. از چپ به راست M: مارکر، ۱: شاهد، ۲: مانیتول ۲ درصد، ۳: مانیتول ۴ درصد، ۴: شاهد، ۵: مانیتول ۶ درصد. نشانه های سیاه معرف باندهای اصلی است.



شکل ۵- الگوی باندهای حاصل از RAPD-PCR نوساقه‌های سیب‌زمینی رقم کوزیما. نمونه‌ها پس از PCR با پرایمر FPK1-016 بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ تفکیک شدند. از چپ به راست M: مارکر، ۱: شاهد، ۲: مانیتول ۲ درصد (۸ ماه)، ۳: مانیتول ۴ درصد (۸ ماه)، ۴: مانیتول ۶ درصد (۸ ماه)، ۵: مانیتول ۲ درصد (۲ ماه)، ۶: شاهد. نشانه‌های سیاه معرف باندهای اصلی است.



شکل ۶- الگوی باندهای حاصل از RAPD-PCR نوساقه‌های سیب‌زمینی رقم کوزیما. نمونه‌ها پس از PCR با پرایمر OPAA-20 بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ تفکیک شدند. M: مارکر، ۱: شاهد، ۲: مانیتول ۲ درصد (۸ ماه)، ۳: مانیتول ۴ درصد (۸ ماه)، ۴: مانیتول ۶ درصد (۸ ماه)، ۵: مانیتول ۲ درصد (۲ ماه)، ۶: شاهد. نشانه‌های سیاه معرف باندهای اصلی است



شکل ۷- الگوی باندهای حاصل از RAPD-PCR نوساقه‌های سیب‌زمینی رقم دزیره (۲ ماه). نمونه‌ها پس از PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ تفکیک شدند. M: مارکر، ۳: شاهد، ۴: مانیتول ۲ درصد، ۳، ۴: پرایمر FPK1-016، ۵: شاهد، ۶: مانیتول ۲ درصد، ۶، ۵: پرایمر OPAA-20. نشانه‌های سیاه معرف باندهای اصلی است.

با افزایش غلظت مانیتول در محیط کشت پارامترهای رشد از قبیل طول ساقه، طول و تعداد ریشه و تعداد جوانه‌ها کاهش یافت. در غلظت ۲٪ مانیتول به دلیل تنش ملایم خشکی کاهش تعداد و طول ریشه نسبت به گیاهان شاهد کمتر بود. در غلظت ۶ درصد مانیتول به علت کاهش شدید پتانسیل اسمزی محیط کشت و کاهش جذب مواد غذایی، متابولیسم گیاه کاهش چشمگیری نشان داد و در مجموع پارامترهای رشد در این غلظت کاهش بیشتری نشان دادند. در غلظت ۲٪ مانیتول، به دلیل افزایش سطح جذب آب تعداد ریشه‌های فرعی افزایش قابل توجه نشان داد. ولی به دلیل تجمع گاز اتیلن در ظروف کشت طی ۸ ماه نگهداری گیاهان تعداد بسیار زیادی ریشه‌های نابجا تولید گردید، این پدیده توسط Sarkar و همکاران (۱۹۹۹) نیز گزارش شده است. در غلظت ۴ و ۶ درصد مانیتول به علت کاهش شدید فشار تورگر و در نتیجه کاهش گسترش سلولی، کاهش سطح برگ گیاهان دو رقم کوزیما و وایت دزیره مشاهده شد. از آنجایی که در تنش خشکی مقدار ABA درون سلولی افزایش می‌یابد، رشد ساقه، ریشه و جوانه‌ها در غلظت‌های ۴ و ۶ درصد مانیتول احتمالاً تحت تأثیر این تنظیم کننده رشد گیاهی، کاهش یافته است (Leon *et al.*, 1994).

بعد از انتقال نمونه‌های تیمار شده با مانیتول به محیط کشت پایه MS، به علت برطرف شدن تنش خشکی و برگشت شرایط عادی فیزیولوژیکی، نمونه‌ها رشد طبیعی خود را نشان

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 تنظیم‌کننده‌های 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 موثرین 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 بخش‌های 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 پلاسما 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). در آزمایشهای 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 نوساقه‌های 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.

References

- Abkenar, A.A. and Isshiki, S., (2003) *Molecular characterization and genetic diversity among japaneses acid citrus (Citrus spp.) based on RAPD markers*, J. of Hort. Sci. and Biot., **78(1)**, 108-112.
- Bajaj, Y.P.S., (1986) *Biotechnology in agriculture and forestry*, Springer-Verlag, **3**, Berlin.
- Bonnier, F.J.M. and Van Tuyl, J.M., (1997) *Long-term in vitro storage of lily: effects of temperature and consentration of nutrients and sucrose*, Plant cell, Tiss. and org. Cult., **49**, 81-87.
- Golmirzaie, A.M. and Toledo, J., (1997) *In vitro conservation of potato and sweet potato germplasm*, CIP Program Reports 1997-98, CIP, Lima, Peru, 351-355.
- Jobes, D.V., Hurley, D.L. and Thien, L.B., (1995) *Plant DNA isolation: method to efficiently remove polyphenolics, polysaccharides and RNA*, Taxon, **44**, 379-389.
- Keskitalo, M., Linden, A. and Valkanes, J.P.T., (1998) *Genetic and morphological diversity of Finnish tansy (Tanacetum vulgare L., Asteraceae)*, Theor. Appl. Genet., **96**, 1141-1150.
- Leon, A., Costa, A., Tucci, M. and Grillo, S., (1994) *Comprative analysis of short- and long-term changes in gene expression caused by low water potential in potato (Solanum tuberosum L.) cell suspension cultures*. Plant Physiol., **106**, 703-712.
- Lopez-Delgado, H., Jimenez-Casas, M. and Scott, I.M., (1998) *Storage of potato microplants in vitro in the presence of acetylsalicylic acid*, Plant cell, Tiss. and org. Cult., **54(3)**, 145-152.
- Nagash, A., Krens, F., Schaart, J. and Visser, B., (2001) *In vitro conservation of enset under slow-growth conditions*, Plant cell, Tiss. and org. Cult., **66**, 107-111.
- Perazzo, G., Panta, A., Rodriguez, F., Gomez, R., Toledo, J., Huaman, Z., Chislaib, M., Golmirzaie, A.M. and Roca, M., (1999) *Clonal true-to-type verification of potato accessions retrieved from in vitro conservation and cryopreservation*, CIP Program Reports 1999-2000, CIP, Lima, Peru, 175-183.
- Sarkar, D., and Naik, P.S., (1998) *Cryopreservation of shoot tips of tetraploid potato (Solanum tuberosum L.) clones by vitrification*, Ann. of Bot., **82(4)**, 455-461.
- Sarkar, D., Kaushik, S.K.C., and Naik, P.S., (1999) *Minimal growth conservation of potato microplants: silverthiosulfate reduces ethylene-induced growth abnormalities during prolonged storage in vitro*, Plant Cell, Rep., **18**, 897-903.
- Sarkar, D., Chakrabarti, S.K. and Naik, P.S., (2001) *Slow growth conservation of potato microplants: efficacy of ancymidol for long-term storage in vitro*, Euphytica, **117**, 133-142.
- Sarkar, D., Sud, K.C., Chakrabarti, S.K., and Naik, P.S., (2002) *Growing of potato microplants in the presence of alginate-silverthiosulfate capsules reduces ethylene-induced culture abnormalities during minimal growth conservation in vitro*, Plant Cell Tiss. Org. Cult., **68**, 79-89.
- Tang, W., (2001) *In vitro regeneration of loblolly pine and random amplified polymorphic DNA analyses of regenerated plantlets*, Plant Cell Rep., **20**, 163-168.
- Williamson, J.D., Jemings, D.B., Guo, W.W., Pharr, D.M. and Ehrenshaft, M., (2002) *Suger alchols, salt stress and fungal resistance: polyols-multifunctional plant proteins?*, J. Amer. Soc. Hort. Sci., **127(4)**, 467-473