بررسی تنوع سوماکلونال گیاهان درون شیشه‌ای چای با استفاده از مارکر مولکولی ISSR

رضا آزادی گنبد *، شاهین جهانگیرزاده خیاوی و صنم صفائی چایکار
پژوهشکده چای، موسسه تحقیقات علوم باغبانی؛ سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، لاهیجان، ایران.

* azadi_g@yahoo.com

چکیده

چای (*Camellia sinensis* L. Kuntze) یکی از متداول‌ترین نوشیدنی‌های غیرالکلی جهان از محصولات باغبانی نیمه گرمسیری است که در شرایط آب و هوایی گرم و مرطوب رشد بهتری دارد. مناطق شمالی کشورمان (گیلان و مازندران) تنها مناطقی هستند که شرایط مناسب برای کشت و پرورش این محصول که در اقتصاد این منطقه نقش مهمی را ایفا می‌کند دارا می‌باشند.(مظفریان، ۱۳۸۳؛ وکیلی، ۱۳۸۳). به علت وجود دگرگشنی و خود ناسازگاری شدید در بوته‌های چای، تفرق صفات در گیاهان حاصل از بذر مشاهده می‌شود و هرکدام از بوته‌ها دارای ژنوتیپ‌های متفاوتی از دیگری هستند که سبب می‌شود عملکرد و کیفیت این بوته‌ها با یکدیگر یکسان نباشد. با توجه به کمبود بسیار شدید باغ‌های بوته مادری و مشکلات مربوط به تکثیر چای از طریق روش‌های سنتی، تکثیر چای از طریق کشت درون شیشه‌ای غیرقابل‌اجتناب است. پایداری ژنتیکی زیر کشت‌ها در نمونه‌های بدست آمده از ریزازدیادی گونه‌ها، به دلیل ایجاد تنوع سوماکلونالی در اثر استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد، حائز اهمیت می‌باشد. در بخش اول این تحقیق اقدام به استقرار و پرآوری جوانه‌های چای (کلون ۱۰۰) در شرایط درون شیشه‌ای در محیط کشت MS همراه با تنظیم‌کننده‌های رشد متنوع با غلظت‌های متفاوت گردید. در بخش دوم پژوهش برای بررسی میزان پایداری ژنتیکی زیرکشت‌ها از ۲۱ پرایمر مارکر ISSR استفاده شد و نمونه‌های زیرکشت پنجم حاصل از پرآوری با گیاه مادری مقایسه شد و متوسط میزان تشابه نیز ۰/۹۶۱ درصد به دست آمد که نشان از تشابه بالای نمونه‌های موردبررسی پس از پنج زیر کشت داشت. بنابراین، با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش می‌توان بیان کرد که استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد با غلظت‌های مناسب، در زیرکشت‌های متوالی، می‌تواند روش امنی برای حفظ پایداری ژنتیکی گیاهان پرآوری شده باشد.

واژه‌های کلیدی: چای، کشت بافت، مارکرهای مولکولی، یکنواختی، رابطه ژنتیکی

مقدمه

چای یکی از مهم‌ترین نوشیدنی‌های غیرالکلی در جهان می‌باشد و این سبب افزایش محبوبیت آن به‌عنوان یک نوشیدنی سالم شده است. چای با نام *Camilla sinensis* متعلق به خانواده (Teaceae) است. در این خانواده تاکنون ۱۸ جنس و ۲۵۰ گونه شناخته‌شده است که بعضی از آن‌ها ارزش غذایی دارند و بعضی دیگر زینتی هستند. چای از محصولات باغبانی نیمه گرمسیری و به‌صورت درخت یا درختچه همیشه‌سبز است که در شرایط آب‌وهوای گرم و مرطوب رشد مناسبی دارد. مناطق شمالی کشور (گیلان و مازندران) مناطقی هستند که شرایط مناسب برای کشت و پرورش این محصول را دارند. این محصول در اقتصاد منطقه نقش مهمی را ایفاء می‌کند. بررسی وضعیت مدیریت باغ‌های چای در منطقه برای فراهم آوردن امکانات اشتغال، بهره‌برداری بهینه از منابع، جلوگیری از مهاجرت بی‌رویه، تضمین ارزش‌های اجتماعی، افزایش تولید و بهره‌وری و درنهایت توسعه پایدار ضروری است. به‌منظور تأمین نیاز داخلی و رسیدن به خودکفائی بایستی به دو موضوع افزایش کیفیت چای داخلی، به جهت ترغیب مصرف‌کنندگان و همچنین افزایش میزان تولید از طریق افزایش عملکرد در واحد سطح و احیاء و واکاری باغ‌های قدیمی توجه خاصی شود. چای با روش‌های کشت بذر، قلمه‌زنی، پیوند و خوابانیدن شاخه تکثیر می‌شود. چای گیاهی خود لقاح است، بنابراین تفرق صفات در گیاهان حاصل از بذر مشاهده می‌شود، در نتیجه هرکدام از درختچه‌ها دارای ژنو تیپ متفاوتی از دیگری هستند که سبب می‌شود عملکرد و کیفیت این درختچه‌ها با یکدیگر یکسان نباشد. باتوجه به محدودیت شدید زمین‌های کشاورزی و تراکم جمعیت در استان‌های گیلان و مازندران، امکان افزایش سطح زیر

کشت کم است. لذا با اعمال مدیریت مناسب در بخش‌های مختلف کاشت، داشت و برداشت می‌توان عملکرد را در واحد سطح افزایش داد. در حال حاضر اکثر باغ‌های چای ایران بذری با متوسط سن بوته بیش از ۵۰ سال است که نتیجه آن باعث کاهش عملکرد و کیفیت چای تولیدی ایران شده است. طی این سال‌ها کشاورزان به‌جای کشت نهال‌های جدید و برتر چاره‌ای جز جوان‌سازی بوته با هرس نداشته‌اند. استفاده از این روش‌ها هیچ‌گاه نمی‌تواند گزینه مناسب و مطمئنی برای جایگزینی و کشت نهال‌های جدید به‌جای بوته‌های پیر و بدون کیفیت باشد. لذا ضروری است که بوته‌های قدیمی ریشه‌کن شده و نهال‌های جوان بجای آن کشت گردند. این موضوع یکی از دغدغه‌های دولت و از اهداف اصلی اصلاح ساختار در چای کشور در آینده نه‌چندان دور خواهد بود. با توجه به سطح زیرکشت چندین هزار هکتاری اراضی چایکاری ایران برای انجام اصلاح و نوسازی باغ‌های چای کشور به تولید تعداد زیادی نهال برای جایگزینی و کاشت نیاز می‌باشد. با توجه به کمبود بسیار شدید باغ‌های بوته مادری و مشکلات مربوط به تکثیر چای از طریق روش‌های سنتی، تکثیر چای از طریق کشت درون‌شیشه‌ای غیرقابل‌اجتناب می‌باشد. امروزه تکنیک‌های کشت بافت به خاطر مزایایی همچون تولید انبوه نهال‌های قوی، سالم (عاری از بیماری)، یکنواخت، انتخاب ژنوتیپ‌های برتر و کاربرد در بیوتکنولوژی در اغلب کشورهای پیشرو در حوزه چای استفاده می‌گردد. با بهره‌گیری از این روش می‌توان در مدت‌زمان کوتاه به تعداد زیادی گیاه چای سالم با ساختار ژنتیکی یکسان دست‌یافت که به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم بر کمیت و کیفیت برگ سبز و چای خشک استحصالی تأثیر گذارد. پایداری ژنتیکی زیر کشت‌ها در نمونه‌های بدست آمده از ریزازدیادی گونه‌ها، به دلیل ایجاد تنوع سوماکلونالی در اثر استفاده از تنظیم‌کننده‌های رشد، حائز اهمیت می‌باشد. بنابراین بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از مارکرهای مولکولی در نسل‌های متوالی حاصل از ریزازدیادی درون شیشه‌ای چای، ضروری می‌باشد.

تنوع سوماکلونال

تنوع سوماکلونال به‌عنوان تنوع ایجادشده در کشت بافت یا سلول تعریف‌شده است (Larkin and Scowcroft, 1981). اخیراً، اصطلاح تنوع سوماکلونالی به‌طورکلی، برای همه‌ی اشکال تنوع ایجادشده از کشت بافت استفاده می‌شود (Bajaj, 1990). اگرچه مکانیزم تنوع سوماکلونالی هنوز به‌طور کامل درک نشده است اما می‌تواند به‌عنوان یک ابزار کارآمد برای القای تنوع، بهبود و اصلاح میوه‌ها به کار گرفته شود(Predieri, 2001). دو نوع تنوع سوماکلونال وجود دارد: وراثتی (ژنتیکی) و اپی ژنتیکی. تنوع وراثتی هم از طریق سیکل جنسی و هم سیکل غیرجنسی پایدار است اما تنوع اپی ژنتیکی ممکن است حتی وقتی‌که تکثیر به‌صورت غیرجنسی صورت می‌گیرد، ناپایدار باشد، بهترین مثال شناخته‌شده از تنوع اپی ژنتیکی از دست رفتن نیاز به اکسین، سیتوکینین یا ویتامین‌ها توسط کالوس است(Nwauzoma and Jaja, 2013).

باززایی از سلول‌های بدنی به دلیل مسئله‌ی توانمندی سلول‌های گیاهی است. طی باززایی سلول‌های تمایزیافته واتمایزیابی می‌شوند و متعاقباً دوباره طی یک مسیر تکاملی بازتمایزیابی می‌شوند (Pasqual et al. 2014). این تغییرات طی کشت پروتوپلاست ها طولانی‌تر است علل و ریشه‌های تنوع سوماکلونال اغلب مرتبط با مسائل درونی و بیرونی در کشت بافت است (Pasqual et al. 2014). در طول کشت درون شیشه‌ای، روش‌های پرآوری، ژنوتیپ، نوع بافت استفاده‌شده به‌عنوان ماده‌ی آغازی، نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد، تعداد و مدت‌زمان زیر کشت‌ها، برخی از فاکتورهایی هستند که فرکانس تنوع را تعیین می‌کنند(Pierik, 1987). بعد از مرحله‌ی رشد نامنظم و بی‌سازمان کالوس احتمال بالایی برای وقوع تنوع سوماکلونال فراهم می‌شود. در یک مطالعه توسط لوپز و همکاران(۲۰۱۰) بر روی گیاهان باززایی شده از کشت کالوس Theobroma cacao نشان داده شد که افزایش قابل‌ملاحظه‌ای از تنوع هم در ژنتیک و هم در اپی ژنتیک در مقایسه با گیاهان حاصل از اندام‌زایی مشاهده شد(Pasqual et al. 2014).

تنوع در منشأ بافت

تنوع ژنتیکی شامل اندوپلی پلوئیدی و پلیتن (Polytene) و افزایش و کاهش توالی DNA است که می توانند در طول تمایز سوماتیکی در رشد و نمو گیاهان رخ دهند(Pasqual et al. 2014). بنابراین هیچ جای تعجب نیست که تفاوت در فراوانی و ماهیت تنوع سوماکلونال می تواند رخ دهد افزون بر این روند تمایز و واتمایزیابی نیز ممکن است هم در کیفیت و هم در کمیت تنوع ژنوم ها و توالی های مختلف DNA که در طول تغییرات سلولی هم

می توانند گسترش یابند و هم می توانند حذف شوند، دخالت نماید این تغییرات مرتبط با منشاء بافت ها و سیستم باززایی هستند و ممکن است توضیح دهند که چرا کشت های خاصی در ارتباط با انواع خاصی از تغییرات هستند برای مثال فراوانی بالای زالی (Albino) در غلات وگسترش توالی های DNA در تنباکو(Pasqual et al. 2014). آزمایش ها روی تنوع سوماکلونال که در آن هر سوماکلون و گیاه منشا آن مشخص هستند و با مقایسه گیاهان باززایی شده خاص از همان کشت به وضوح نشان می دهد که اگر چه بسیاری از تنوعات ریشه در فاز کشت دارند شماری از این تنوعات در بافت دهنده پدیدار می شوند این نشان می دهد که تنوع سوماکلونال ممکن است ریشه در موتاسیون بدنی داشته باشد که قبلا در گیاه دهنده وجود داشته است(Sato et al. 2011).

ناهنجاری ها در تقسیم سلولی درون شیشه ای

وقتی که سلول ها یا بافت های تمایز یافته جدا شده و در شرایط درون شیشه ای کشت شوند در حضور تنظیم کننده‌های رشد میتوز انگیخته می شود. مطالعات بافت شناسی نشان داده اند که ناهنجاری هایی ممکن است طی تقسیم سلولی رخ دهد که در نتیجه آن، ناهنجاری هایی در تعداد و ساختار کروموزوم در گیاهان باززایی شده به وجود می آید پیشنهاد می شود که کنترل ناکافی چرخه سلولی در محیط آزمایشگاهی یکی از دلایل رخ دادن تنوع سوماکلونال است وقتی که دیواره سلولی در کشت پروتوپلاست حذف می شود و دیواره جدید تشکیل می شود و تقسیم در سلول های مشتق شده از پروتوپلاست ها رخ می دهد بیشترین خطاهایی که طی آن اتفاق افتاده است در طی سنتز میکروتوبول ها، تشکیل و سمتگیری دوک و تفکیک کروماتیدها رخ می دهد و در نتیجه تغییرات گسترده ای در ساختار و تعداد کروموزوم ها روی می دهد. افزایش سن کالوس و طولانی شدن چرخه رشد درون شیشه ای سبب افزایش زمان رشد بی سازمان کالوس و کشت های سلولی شده و در نتیجه این ناهنجاری ها افزایش می یابند(Pasqual et al. 2014).

نوع و غلظت تنظیم کننده‌های رشد گیاهی در ایجاد تنوع سوماکلونال

تنظیم کننده‌های رشد گیاهی بر چرخه سلولی و متعاقبا در تنوع سوماکلونال دخیل هستند غلظت بالای 2,4-D در افزایش بی ثباتی کروموزومی دخیل شناخته شده است(Pasqual et al. 2014). غلظت‌های زیاد اکسین و یا سیتوکینین در محیط کشت می توانند در گیاهان باززایی شده انحراف مورفولوژیکی از حالت نرمال ایجاد کنند. پدیدار شدن تنوع سوماکلونال در گیاهان باززایی شده درون شیشه ای به میزان زیادی با کاهش سطوح تنظیم کننده‌های رشد در محیط کشت ریزازدیادی ریزنمونه‌ها کاهش می یابد(Debnath, 2003). نوع و غلظت تنظیم کننده ها ی رشد بر تنوعات مشاهده شده در گیاهان باززایی شده از تحریک گزینشی سلول های در معرض سطوح پلوئیدی خاص اثرگذار بوده است. تنظیم کننده‌های رشد همچنین می توانند باعث تغییرات گذرا در فنوتیپ شوند هرچند این تغییرات میتوزی در طول رشد گیاه به ارث برده نمی شوند در نتیجه اپی ژنتیک هستند. تبادل ناکافی گازها در فلاسک های دربسته ی کشت ممکن است باعث تجمع اتیلن شود و متعاقب اتیلن بر تغییرات اپی ژنتیکی تاثیرگذار باشد(Pasqual et al. 2014).

نشانگرها

نشانگر ژنتیکی معادل هر صفت (ویژگی) است که تفاوت ژنتیکی را بین افراد و یا گونه ها، مشخص کند. اساسا این نشانگرها به ژن خاصی اشاره نمی کنند و تنها به عنوان نشانه هایی ژنتیکی عمل می کنند. نشانگرهای مولکولی که بسیار نزدیک به ژن هستند به نحوی که به ژن متصل شده باشند ، با عنوان برچسب و یا ضمیمه خوانده می شوند. چنین نشانگرهایی به خودی خود بر فنوتیپ صفت مورد نظر تاثیری نمی گذارند، چرا که آن ها تنها در نزدیکی و یا در اتصال با ژن های کنترل کننده ی صفت هستند. تمام نشانگرهای مولکولی موقعیت ژنومی ویژه ای را درون کروموزوم اشغال کرده اند. به طور کلی نشانگرهای ژنتیکی به سه گروه عمده تقسیم می شوند:

- نشانگرهای مورفولوژیکی (یا کلاسیک و یا قابل مشاهده) که خودشان صفت یا ویژگی فنوتیپی هستند.
- نشانگرهای بیوشیمیایی که شامل تنوع های آنزیمی با نام ایزوزیم ها هستند.
- نشانگرهای مولکولی که تفاوت های مکانی در DNA را مشخص می کنند.

نشانگرهای مورفولوژیکی

نشانگرهای مورفولوژیکی غالبا قابل مشاهده هستند و

شامل ویژگی های از قبیل رنگ گل، شکل دانه و ویژگی های رشدی می شوند. تعداد محدودی از ویژگی های مورفولوژیکی مندلی در گیاهان وجود دارند که قابل تعمیم به عنوان نشانگر ژنتیکی باشند. بسیاری از نشانگرهای مورفولوژیکی، جهش هایی هستند که در دانه رست ها مشاهده می شوند. جهش هایی مانند عدم رنگدانه و کوتاهی گیاه که عمدتا در مخروطیان قابل تشخیص و مشاهده هستند. چنین نشانگرهایی کاربردهای محدودی دارند چراکه این جهش ها بسیار نادر هستند و در صورت بروز هم بسیار مخرب و حتی کشنده هستند. متاسفانه، نشانگرهای مورفولوژیکی اندکی تا به امروز شناسایی شده اند. عمده ی آن ها محدود به گونه های گیاهی خاص می شوند و یا جهش هایی هستند که بسیار آسیب رسان و مخرب می باشند. در چنین نشانگرهایی مکان ژنی غالب بین افراد هتروزیگوت و هوموزیگوت قابل تمییز از یکدیگر نیست. از سویی دیگر ناکارآمدی این گروه از نشانگرها این است که آنها محدود به صفات تک ژنی می شوند و بسیاری از صفات چندژنی مهم را نمی توانند پوشش دهند(Angaji, 2011).

نشانگرهای بیوشیمیایی

نشانگرهای بیوشیمیایی شامل هر هورمون، آنتی بادی و یا سوبسترای دیگری می شوند که در مایعات و یا بافت ها قابل شناسایی باشند. در بین تمام آنها آلوزیم ها و ایزوزیم ها شاخص تر از بقیه هستند. آن ها مهم ترین نوعِ نشانگرهای ژنتیکی هستند و در بسیاری گونه ها کاربردی می باشند. انواعی از آنزیم ها با یک عملکرد ولی با ۱، ۲، ۳ و یا ۴ تفاوت ساختاری وجود دارند.

ایزوزیم ها اولین سیستم نشانگرهای مولکولی-پروتئینی را برای نقشه یابی ژنی فراهم کردند. واژه ی ایزوزیم در سال ۱۹۵۹ ابداع شد. ایزوزیم ها در واقع اشکال متنوع یک آنزیم هستند که یک فعالیت کاتالیکی توسط Moller و Market را انجام می دهند و از بافتی ویژه در یک موجود منشاء می شوند و یا در یک توضیح گسترده تراین واژه به آنزیم های متفاوتی اطلاق می شود که فعالیت یکسانی را انجام می دهند.

واژه ی آلوزیم نیز به حالتی اشاره دارد که آنزیم ها ی متفاوت ناشی از چندشکلی (پلی مورفیسم) در یک آلل باشند. تفاوت در تحرک آنزیم ها نیز در نتیجه ی تغییر آمینواسیدی ایجاد می شود که آن نیز به نوبه ی خود در نتیجه ی جهش نقطه ای به وجود آمده است.

ایزوزیم ها بار الکتریکی متفاوتی دارند که به آن ها قابلیت جداسازی بر روی ژل الکتروفورز (برمبنای اندازه ی مولکولی، شکل و بار الکتریکی) را می دهد و لذا آنزیم های یکسان باندهای متفاوتی را بر روی ژل ایجاد خواهند کرد .براساس عملکرد اختصاصی آنزیم ها، می توان طی واکنشی رنگی، آنزیم ها را با سوبستراهاشان و یا کوفاکتورهایی بر روی ژل به هم متصل کرد و با تولید رنگ به راحتی آن ها رو روی ژل مشاهده کرد و تشخیص داد. در پروتوکل های بسیار ساده تر از ژل نشاسته استفاده می شود. در تکنولوژی های پیچیده تر از ژل پلی اکریل آماید و یا ژل ایزوالکتریک استفاده می شود که نتایج بهتری را به دست می دهند اما پرهزینه تر هستند .دو الل در یک مکان آلوزیمی، در یک فرد هتروزیگوت قابل تشخیص هستند. لذا آلوزیم ها نشانگرهای co-dominant هستند.

نشانگرهای مولکولی

نشانگرهای مولکولی یا نشانگرهای بر مبنای DNA دارای چندین ویژگی سودمندی نسبت به نشانگرهای قدیمی و کلاسیک فنوتیپی و بیوشیمیایی هستند. این گروه از نشانگرها کمتر توسط سن، شرایط فیزیولوژیکی نمونه‌ها و فاکتورهای محیطی تغییر می کنند. مختص بافتی نیستند و لذا در هر مرحله ی تکوینی از فرد مورد مطالعه، قابل شناسایی و کاربرد هستند. تنها مقادیر کمی از نمونه برای مطالعه و پردازش کافی است و شکل فیزیکی نمونه عامل محدودکننده ای برای شناسایی و مطالعه نیست. تعداد نامحدودی از نشانگرهای مولکولی در دسترس هستند. بیش از هر نشانگر دیگری پلی مورفیک هستند و قدرت جداسازی و تمییز آن ها بسیار بالاست که حتی واریته های بسیار نزدیک به هم نیز قابل جداسازی از یکدیگر هستند. نشانگرهای مولکولی بر مبنای DNA جایگاه مستحکمی را در زمینه های مختلف از جمله تاکسونومی، فیزیولوژی، جنین شناسی، مهندسی ژنتیک و غیره پیدا کرده اند. آن ها دیگر به عنوان ابزار ساده ای برای انگشت نگاری DNA یا اهداف جنایی به کار نمی روند.

در این پژوهش از نشانگرهای برمبنای PCR استفاده شد، تا میزان پایداری ژنتیکی در زیر کشت های حاصل از

پرآوری جوانه های جانبی چای (کلون ۱۰۰) بعد از پنج زیرکشت بررسی شود.

نشانگرهای ISSR

روش های بر پایه ی زنجیره ای پلیمراز PCR(Polymerase chain reaction) به دلیل سهولت، هزینه ی پایین، سرعت و عدم نیاز به کاوشگرهای رادیواکتیو، امروزه به طور گسترده ای در بررسی تنوع ژنتیکی ارقام مختلف گیاهی مورد استفاده قرار می گیرند. در بین نشانگرهای مبتنی بر PCR، نشانگرهای ISSR (Interv simple sequence repeat نواحی بین توالی های تکراری ساده) به طور وسیعی توسط محققان برای تجزیه وتحلیل تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفته اند و کارآمد گزارش شده اند. نشانگر ISSR مبتنی بر واکنش زنجیره ای پلیمراز و جزء انواع تغییر یافته ی نشانگرهای ریزماهواره می باشد. نشانگرهای ISSR، توسط PCR و با استفاده از توالی های مرکزی ریزماهواره به عنوان آغازگر، همراه با چند نوکلئوتید انتخابی در انتهای ۳ / یا ۵/ به عنوان لنگرهایی داخل مناطق غیر تکراری مجاور تکثیر می شوند(Li et al. 2008). نشانگر ISSR یک تکنیک ساده، سریع و موثر و بسیار تکرارپذیر است و دارای ویژگی های بسیار مطلوبی مانند تجزیه و تحلیل همزمان تعداد زیادی جایگاه ژنی، دقت بالا، تنوع بسیار بالا، هزینه ی پایین، سرعت و سهولت اجرا به طور گسترده ای در گیاهان به کار گرفته شده است. نشانگر ISSR نیمه تصادفی بوده و از تکرارپذیری و چند شکلی بالایی برخوردار است و در دامنه ی وسیعی از گیاهان کاربرد دارد. همچنین به علت قالبیت، سادگی، سرعت عمل و قدرت تفکیک بالا، قدرت بیشتری در آشکار سازی تنوع ژنتیکی دارد. مزایای استفاده از نشانگر ISSR این است که اختصاصی بودن نشانگرهای ریزماهواره را به نمایش می گذارد، اما با بهره گیری از مزیت های نشانگرهای تصادفی، نیاز به هیچ گونه اطلاعات توالی برای سنتز آغازگر ندارد. از جمله مزایای دیگر آن می‌توان به داشتن چندین مقر ژنی چند شکل، قابل کاربرد با تعدا زیادی نمونه و هزینه ی پایین اشاره کرد. تجزیه و تحلیل ISSR می تواند در مطالعات مربوط به هویت ژنتیک، نسبت، کلون، شناسایی سویه و مطالعات تاکسونومیک گونه های بسیار نزدیک و همچنین در مطالعات نقشه برداری ژن مورد استفاده قرار گیرد.

این طرح باهدف ارزیابی ریزازدیادی چای ایرانی با استفاده از تکنیک کشت بافت و بررسی ژنتیکی زیرکشت ها با استفاده از مارکر ISSR برای اثبات پایداری ژنتیکی زیرکشت ها انجام خواهد گرفت. در این روش برای دستیابی به روش تکثیر مطلوب چای، عواملی همچون جداکشت مناسب، روش مناسب استریل، نحوه استقرار جداکشت در محیط کشت، ترکیبات محیط کشت و نوع و غلظت تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی کنترل‌کننده شاخه زایی و ریشه‌زایی و ثبات ژنتیکی گیاهان حاصله باید مورد بررسی قرار گیرد. با توجه به سطح زیر کشت بیش از ۳۲ هزار هکتاری اراضی چای‌کاری ایران و نیاز به ۱۵ هزار اصله نهال چای برای جایگزینی و کاشت در هر هکتار باغ، برای انجام اصلاح و نوسازی باغ‌های چای کشور به تعداد زیادی نهال چای نیاز خواهیم داشت. با توجه به کمبود بسیار شدید باغ‌های بوته مادری و مشکلات مربوط به تکثیر چای از طریق روش‌های سنتی، تکثیر چای از طریق کشت درون شیشه‌ای غیرقابل‌اجتناب است. با بهره‌گیری از این روش می‌توان در مدت‌زمان کوتاه به تعداد زیادی گیاه چای سالم با ساختار ژنتیکی یکسان دست پیدا نمود که به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم بر کمیت و کیفیت برگ سبز و چای خشک استحصالی تأثیر می‌گذارد. پایداری ژنتیکی زیر کشت ها در نمونه‌های بدست آمده از ریزازدیادی گونه ها، به دلیل ایجاد تنوع سوماکلونالی در اثر استفاده از تنظیم کننده‌های رشد، حائز اهمیت می باشد. بنابراین بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از مارکرهای مولکولی در نسل های متوالی حاصل از ریزازدیادی درون شیشه ای چای، ضروری می باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های گیاهی چای کلون ۱۰۰ از ایستگاه تحقیقاتی شهید اسلامی شهر لاهیجان تهیه شد. جوانه‌های جانبی از شاخساره ها جداشده و در شرایط ضدعفونی شده، ریز نمونه‌ها با استفاده از الکل اتیلیک و وایتکس سترون شد. ریزنمونه‌های سترون‌شده زیر هود کشت بافت در اندازه‌های ۲- ۵ میلی‌متر برش زده شده و جهت پرآوری شاخساره در محیط کشت پایه موراشیگی و اسگوگ با ۱/۵ گرم بر لیتر آگار و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز با استفاده از ترکیب تنظیم‌کننده رشد بنزیل آمینوپیورین در غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر و غلظت ثابت ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر ژیبرلین پرآوری و سپس شاخساره ها (طول ۲ – ۵ سانتی متر) در محیط کشت ریشه زایی شامل محیط موراشیگی و اسگوگ با ۱/۵ گرم بر لیتر آگار و ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و استفاده از ایندول بوتیریک اسید در غلظت ۶۰۰۰ میلی گرم در لیتر قرار داده شد.نمونه‌های کشت داده شده در فیتوترون با دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و فتوپریود ۱۸ ساعت روشنایی نگهداری شدند.

مطالعات مولکولی

نمونه برداری گیاهی

نمونه‌ها را از برگ های جوان و بالغ گیاه مادری کلون ۱۰۰ موجود در پژوهشکده ی چای جمع آوری شد. نمونه‌های مربوط کشت بافت نیز از برگ های گیاهچه های حاصل از کشت درون شیشه ی کلون ۱۰۰ در پنج زیر کشت انتخاب گردید. برگ های جوان پس از چیدن از هر بوته در محفظه های یخ یا تانک ازت مایع نگهداری و به آزمایشگاه منتقل و بلافاصله در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد جهت جلوگیری از فعالیت اندونوکلئازی قرار داده شدند.

استخراج DNA

در این تحقیق استخراج DNA ژنومی از نمونه‌های برگی به روش کیت (Gene JET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit) در آزمایشگاه بیوتکنولوژی پژوهشکده ی چای واقع در لاهیجان صورت گرفت.

مراحل استخراج DNA

۱. ابتدا نمونه‌های برگی جهت حذف عوامل آلاینده مانند گرد و غبار و یا تخم حشرات توسط آب مقطر استریل شسته و سپس با اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی شدند. بعد از خشک شدن برگ ها ادامه ی مسیر استخراج بر اساس دستورالعمل ذیل صورت پذیرفت.

۲. برگ ها با نیتروژن مایع در هاون چینی به طور کامل پودر شدند. سپس مقدار مورد نیاز (حدود ۰/۲ گرم) از این پودر به تیوپ های اپندرف دو میلی متری شماره گذاری شده که توسط نیتروژن مایع خنک شده بودند، منتقل گشت (دلیل خنک کردن تیوپ ها جلوگیری از آب انداختن پودر برگ در زمان انتقال به تیوپ ها بود).

۳. ۳۰ میکرو لیتر از Lysis Buffer A به تیوپ حاوی نمونه‌ها اضافه شد.

۴. ورتکس کردن مخلوط به مدت ۱۰ تا ۱۵ ثانیه

۵۰ میکرولیتر از Lysis Buffer B و ۲۰ میکرولیتر ماده ی RNaseA به تیوپ ها افزوده شد.

۵. ورتکس کردن مخلوط به مدت ۱۰ تا ۱۵ ثانیه

۶. تیوپ ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد در بن ماری قرار داده شد.

۱۳۰ میکرولیتر محلول Pricipitation به تیوپ ها اضافه و تیوپ ها ۳-۵ بار سر و ته گردید.

۷. تیوپ ها به مدت ۵ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت.

سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی گراد با نیرو rpm ۱۴۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه صورت گرفت.

۸. فاز بالایی (حدود ۳۰۰ تا ۴۰۰ میکرولیتر) با سمپلر و با دقت برداشته شد و به تیوپ های جدید شماره گذاری شده منتقل شد.

۴۰۰ میکرو لیتر محلول Plant gDNA Binding و ۴۰۰ میکرولیتر اتانول ٪۹۶ به تیوپ ها اضافه شد و سر و ته شد تا به خوبی مخلوط شوند.

۹. نصف مخلوط حاصل (حدود ۶۵۰ میکرولیتر) به ستون های جداسازی منتقل گردید.

به مدت ۱ دقیقه تیوپ ها در rpm ۸۰۰۰ سانتریفیوژ شدند.

۱۰. مایع جمع شده در پایین تیوپ ها دور ریخته شد.

۱۱. مراحل ۱۳ تا ۱۵ برای باقی مانده ی مخلوط حاصل از مرحه ی ۱۲ تکرار شد.

۱۲. ۵۰۰ میکرولیتر از بافر شستشو۱ به مخلوط اضافه شد.

سانتریفیوژ به مدت ۱ دقیقه در rpm ۱۰۰۰۰ انجام گرفت و مایع جمع شده در پایین دور ریخته شد.

۵۰۰ میکرولیتر از بافر شستشو ۲ به مخلوط اضافه شد و

به مدت ۳ دقیقه در rpm ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ انجام گرفت.

۱۳. ستون های جداسازی به تیوپ های جدید شماره گذاری شده منتقل شد.

۱۰۰ میکرولیتر Elution Buffer به تیوپ ها اضافه شد و ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت.

سانتریفیوژ به مدت ۱ دقیقه در rpm ۱۰۰۰۰

افزودن ۱۰۰ میکرولیتر Elution Buffer (مجددا) به ستون جداسازی و سانتریفیوژ به مدت ۱ دقیقه در rpm ۱۰۰۰۰

مرحله ی تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده

غلظت DNA بدست آمده با اسپکتروفتومتر (نانودراپ) در جذب ۲۶۰ نانومتر اندازه گیری شد. همچنین برای تصدیق آن از روش الکتروفورز بر روی ژل آگارز که یکی از روش هایی است که برای این منظور به کار می رود، استفاده شد. معمولا DNA با وزن مولکولی زیاد بر روی آگارز به صورت یک باند مشاهده می شود. در حالی که نمونه‌های تخریب شده به صورت هاله ای در سرتاسر ژل دیده می شود.

با استفاده از الکتروفورز DNA روی ژل آگارز ۰/۸٪ کیفیت باند هر نمونه مشخص شد. برای هر نمونه ۳ میکرولیتر DNA استخراج شده با ۱ میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط گردیده و در چاهک های ژل آگارز ۰/۸٪ در شرایط بافری TBE (Tris-borate-EDTA) بارگذاری شد. ژل آگارز به مدت یک ساعت با ولتاژ ثابت ۶۵ الکتروفورز گردید. ژل تهیه شده پس از تهیه و قبل از جامد شدن به نسبت ۱ میکرولیتر در ۱۵۰ میلی لیتر با ماده ی Safe staibn ترکیب شده بود تا رشته های DNA در زیر نور (UV) قابل مشاهده گردند. ژل بدست آمده پس از الکتروفورز در دستگاه Geldoc جهت کنترل DNA های استخراجی مشاهده و عکس برداری شد. پس از تفسیر ژل، نمونه‌های مناسب از نظر کیفی و کمی جهت انجام PCR به عنوان DNA الگو انتخاب گردیدند.

انجام واکنش های PCR

آغازگرهای مورد مطالعه:

برای بررسی چند شکلی قطعات DNA با استفاده از نشانگر ISSR از ۲۱ آغازگر استفاده شد. مشخصات آغازگرها در جدول ۱ ارائه شده است .

از مقدارهای ذکر شده در جدول ۲ برای تنظیم مواد مورد استفاده در انجام واکنشPCR برای نشانگر ISSR استفاده شد.

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای ISSR بکار رفته در واکنش PCR

Primer	Sequence (5'-3')
IS1	ACACACACACACACACC
IS2	AGAGAGAGAGAGAGAGYA
IS3	AGAGAGAGAGAGAGAGYC
IS4	CTCTCTCTCTCTCTCTRG
IS5	CAGCAGCAGCAGCAGCAGT
IS6	GGAGAGGAGAGGAGAGGAGA
IS7	CTTCACTTCACTTCA
IS8	TGTGTGTGTGTGTGTGG
IS9	CAACAACAACAACAACAAG
IS10	GAGAGAGAGAGAGAGAC

IS11	CTCTCTCTCTCTCTCTRA
IS12	GATAGATAGATAGATA
IS13	TCTCTCTCTCTCTCTCC
IS14	AGAGAGAGAGAGAGAGYT
IS15	ACACACACACACACACYC
IS16	ACACACACACACACACYG
IS17	GACAGACAGACAGACAT
IS18	ACACACACACACACACCG
IS19	TATATATATATATATAT
IS20	CACACACACACACACARC
IS21	CACACACACACACACAG

جدول ۲- نوع مواد تشکیل دهنده اجزای PCR و مقدار پیشنهادی برای نشانگرهای ISSR در حجم نهایی ۱۲/۵ میکرولیتر

مواد واکنش	غلظت نهایی	یک واکنش ۱۲/۵ میکرولیتری
DNA الگو (25ng/µl)	50	2µl
بافر PCR*(10X)	1x	1.25
مخلوط نوکلوئیدی (10 mM)	0.2	0.25µl
آغازگر (10 µM)	0.8	1µl
Taqپلیمراز (5U/µl)	1	0.2 µl
آب		7.8 µl

* بافر PCR حاوی یون Mg^{+}

چرخه حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

شرایط ازدیاد DNA در ابتدا برای هر آغازگر به صورت واسرشسته سازی اولیه (Initial Denaturation) در ۹۴ سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشسته سازی در ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال (Annealing) برای آغازگر ۵۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و توسعه (Extension) در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه (که این سه مرحله بصورت چرخه‌ای ۲۵ بار تکرار گشتند) و در نهایت در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه توسعه نهایی (Final Extension) انجام شد.

تهیه ژل آگارز ۲ درصد و الکتروفورز محصولات PCR و رنگ‌آمیزی:

به منظور بررسی قطعات تکثیر شده، از ژل آگارز با غلظت ۲ درصد استفاده شد. برای تهیه ژل از تانک الکتروفورز با ظرفیت ۱۲۰ میلی‌لیتر استفاده شد. برای تهیه

آگارز ۱/۵ درصد مقدار ۲/۴ گرم آگارز درون یک ارلن ریخته و به آن ۱۲۵ میلی‌لیتر از بافر TBE یک برابر غلظت اضافه شد (پنج میلی‌لیتر برای بخار شدن بافر). محلول تهیه شده را ۱/۵ دقیقه درون مایکروویو با قدرت ۱۰۰۰ وات قرار داده، سپس در دمای محیط تا حدود ۴۰ درجه سانتی‌گراد سرد شد. سپس ۱ میکرولیتر ماده Safe stain داخل ژل ریخته شد. مخزن ژل روی یک سطح تراز قرار داده شد تا ضخامت ژل در همه قسمت‌ها یکنواخت باشد در غیر این صورت در هنگام برقرار کردن جریان و شروع به کار دستگاه باعث انحراف DNA از مسیر اصلی خواهد شد. قبل از ریختن ژل داخل مخزن، شانه‌های ایجاد کننده چاهک درون مخزن قرار گرفتند. پس از ۲۰ دقیقه که ژل به حالت جامد درآمد شانه‌ها خارج شدند و تانک الکتروفورز از بافر TBE یک برابر غلظت پر شد.

جهت الکتروفورز به هر واکنش PCR، دو میکرولیتر بافر بارگذاری افزوده شد و مقدار ۱۰ میکرولیتر از مخلوط محصول PCR و بافر بارگذاری در هر یک از چاهک‌های ایجاد گردیده بر روی ژل بارگذاری شدند. شرایط الکتروفورز با ولتاژ ۹۰ برای ۲ ساعت تنظیم شده و پس از اتمام عمل الکتروفورز و رنگ آمیزی، قطعات تکثیر شده DNA در زیر نور ماورا بنفش در دستگاه ژل داک مشاهده و عکس برداری گشتند.

تجزیه ی آماری داده ها

بعد از عکس برداری ژل ها با دستگاه ژل داک، با استفاده از نرم افزار فتوشاپ (Photoshope) در روی هر ژل برای حضور باند امتیاز یک و عدم حضور باند امتیاز صفر لحاظ شد (بر روی تصویر ژل با استفاده از خط کش، در هر ردیف برای کلیه ی نمونه‌ها اسکوردهی انجام شد، حضور باند عدد یک و عدم حضور باند عدد صفر). بعد از کد بندی، داده ها به صورت ماتریس صفر و یک، وارد نرم افزار Excel گشتند. درجه ی چند شکلی نشانگرها توسط نرم افزار Excel صورت پذیرفت و با نتایج آنها بهترین تجزیه ی خوشه ای با استفاده از ضرایب والگوریتم های مختلف توسط نرم افزار NTSYS-pc 2.02 مشخص گردید.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از سنجش مولکولی

در این مطالعه گیاهان، در حالت درون شیشه ای در پنج زیر کشت، پرآوری شد. با توجه به اطلاعات ما، این اولین گزارش از تنوع توالی DNA در گیاهان پرآوری شده از *C.sinensis* می باشد. در این تحقیق از کلون ۱۰۰ متعلق به این گونه استفاده شد. در پروتوکل پرآوری درون شیشه ای از طریق جوانه ی جانبی گیاهان کلون ۱۰۰ که به طور استاندارد تکثیر شده بودند، جوانه های جانبی در محیط کشت MS همراه با تنظیم کننده‌های رشد مناسب قرار گرفتند و هر ۴۵ روز به محیط جدید منتقل شدند و در دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس تحت دوره ی نوری ۱۶ ساعته انکوبه شدند. گروهی از گیاهان پرآوری شده به طور تصادفی انتخاب و ۲۷ نمونه ی برگی از شاخه های متفاوت پرآوری شده درون شیشه جمع آوری شدند و تحت تجزیه و تحلیل ISSR قرار گرفتند. علاوه بر این یک گروه شاهد از گیاه مادری که در شرایط گلخانه تکثیر شده بودند نیز تجزیه و تحلیل و با یکدیگر مقایسه شدند. کل DNA از برگ های تازه از زیرکشت های پرآوری شده ی درون شیشه ای با روش کیت استخراج شد. برای این بررسی تعداد ۳۰ پرایمر ISSR بررسی شده روی گیاه چای مورد استفاده قرار گرفت که این پرایمرها بر روی چهار نمونه DNA به صورت تصادفی انتخابی تست شده و ۲۱ عدد از بهترین آنها برای بررسی در این پروژه انتخاب شدند. این ۲۱ پرایمر باندهای قابل تکثیر و قابل شناسایی مشخصی را ارائه دادند و این‌ها در ادامه ی تجزیه و تحلیل های PCR استفاده شدند. از این ۲۱ پرایمر تعداد ۱۱۵ نوار تکثیر شد که از این تعداد ۱۰۲ نوار حالت یک شکلی (۸۸/۶۹ درصد) و ۱۳ نوار حالت چند شکلی (۱۱/۳۰ درصد) داشتند. بیشترین تعداد باند تولیدی مختص به پرایمر ISSR1 (AGAGAGAGAGAGAGAGYT) با تعداد ۱۰ باند و کمترین متعلق به پرایمرهای ISSR8 (TGTGTGTGTGTGTGTGG) و ISSR12 (GATAGATAGATAGATA) با تعداد ۲ باند بود. بیشترین تعداد باند یک شکل در پرایمر ISSR19 (TATATATATATATATAT) با تعداد ۹ نوار و کمترین در چهار پرایمر ISSR2 (AGAGAGAGAGAGAGAGYA)، ISSR8 (TGTGTGTGTGTGTGTGG)، ISSR12 (GATAGATAGATAGATA) و ISSR16 (ACACACACACACACACYG) با تعداد ۲ نوار مشاهده شد. با توجه به آنکه در رابطه با بررسی حاضر مهم

یکنواخت بودن نمونه‌های مورد بررسی است بنابراین بر خلاف سایر مطالعات به بررسی نوارهای یک شکل اولویت داده می‌شود. درصد یکنواختی و چند شکلی باندها نیز بر اساس تعداد باندهای مشاهده شده محاسبه شد که میزان درصد یکنواختی باندهای بدست آمده ۸۸/۶۹ درصد و درصد نوارهای چند شکل ۱۱/۳۰ درصد برای کل باندها محاسبه شد. از ۲۱ پرایمر بکار برده نه پرایمر ISSR2، ISSR4، ISSR5، ISSR9، ISSR10، ISSR11، ISSR12، ISSR14 و ISSR16 تولید باند چند شکل نمودند و باقی ۱۲ پرایمر دیگر تماما باندهای یک شکل ایجاد کردند. احتمالا این درصد چند شکلی به دلیل نیمه تخصصی بودن مارکرهای ISSR می باشد.

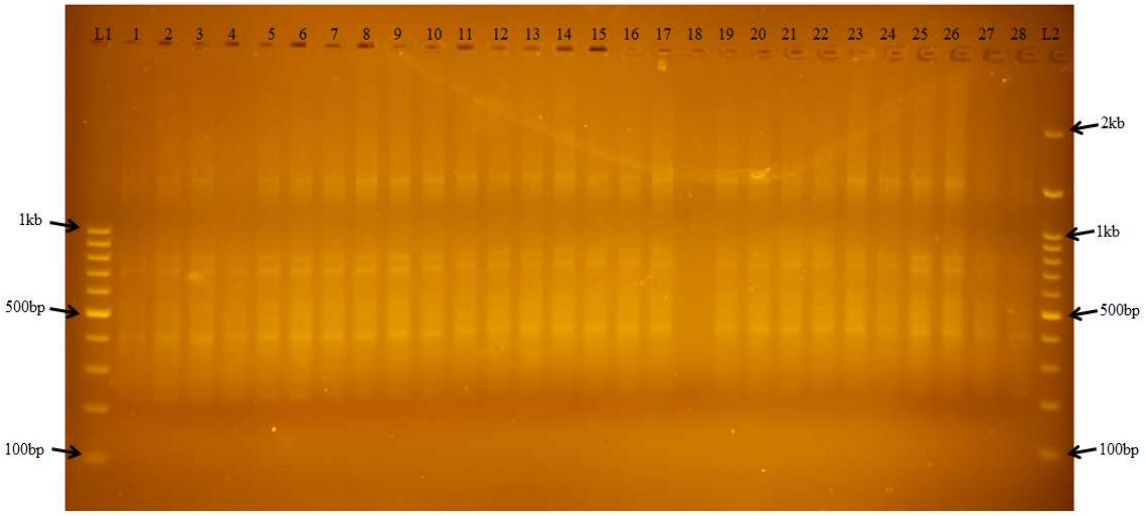
بعد از کدبندی، داده ها به صورت ماتریس صفر و یک (وجود باند عدد یک و عدم وجود باند عدد صفر)، وارد نرم افزار Excel شدند. پس از این مرحله، ماتریس تشابه و تجزیه ی خوشه ای با استفاده از نرم افزار NTSYSpc 2.02 محاسبه شد و دندروگرام بر اساس الگوریتم های UPGMA، اتصال ساده و اتصال کامل و ضرایب تشابه دایس، جاکارد و تطابق ساده طراحی شد. برای آنکه مشخص شود کدام الگوریتم بهتر میزان تشابه بدست آمده در ماتریس تشابه را در دندروگرام طراحی شده نشان می دهد ضریب کوفنتیک محاسبه شد که بر اساس آن ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA میزان ۰/۸۲۵ را نشان دادند که نسبت به سایر ضرایب کوفنتیک بدست آمده بالاتر بود. بنابراین برای طراحی کلاستر از ضریب کوفنتیک جاکارد و الگوریتم UPGMA استفاده شد. در تجزیه خوشه‌ای توسط داده‌های مولکولی به طور کلی ضریب کوفنتیک بالا دلیل کارایی نمودار در بیان شباهت‌های محاسبه شده می‌باشد. ضریب کوفنتیک می‌تواند از دامنه صفر تا یک متغیر باشد. اگر ضریب بالای ۰/۹ باشد، بیان اطلاعات خیلی خوب صورت گرفته است، اگر دامنه ضریب مابین ۰/۹ و ۰/۷ باشد، بیان اطلاعات خوب بوده و اگر ضریب کمتر از ۰/۷ باشد، ویژگی‌های محاسبه شده در ماتریس تشابه ضعیفی در خوشه‌بندی را نشان می‌دهد. رینکون و همکاران (۱۹۹۶) در تجزیه خوشه‌ای با کاربرد داده‌های مولکولی نشان داده‌اند که ضریب کوفنتیک پایین به دلیل عدم کارایی نمودار نمی‌باشد، بلکه ضریب کوفنتیک پایین می‌تواند به دلیل شرایط غیرعادی در داده‌ها باشد. شکل های (۱ و ۲) نوارهای ایجاد شده بر روی ژل داک درنتیجه ی الکتروفورز نمونه‌ها با پرایمرهای ISSR3 و ISSR6 را به ترتیب نشان می دهد.

دامنه تشابه بدست آمده در ماتریس تشابه محاسبه شده از ۰/۹۱۲ تا ۰/۹۹۱ واحد متفاوت بود. متوسط میزان تشابه نیز ۰/۹۶۱ محاسبه شد که نشان از تشابه بالای نمونه‌های مورد بررسی پس از پنج زیر کشت دارد، که در مقایسه با پژوهش Fusheng و همکاران در سال ۲۰۰۹ روی یک گیاه دارویی *Anoectochilus formosanus* پایداری ژنتیکی بیشتر از ۹۴ درصد و میزان پلی مورفیسم ۲/۷۶ درصد را گزارش شد که تقریبا با نتایج پژوهش ما همسو است.

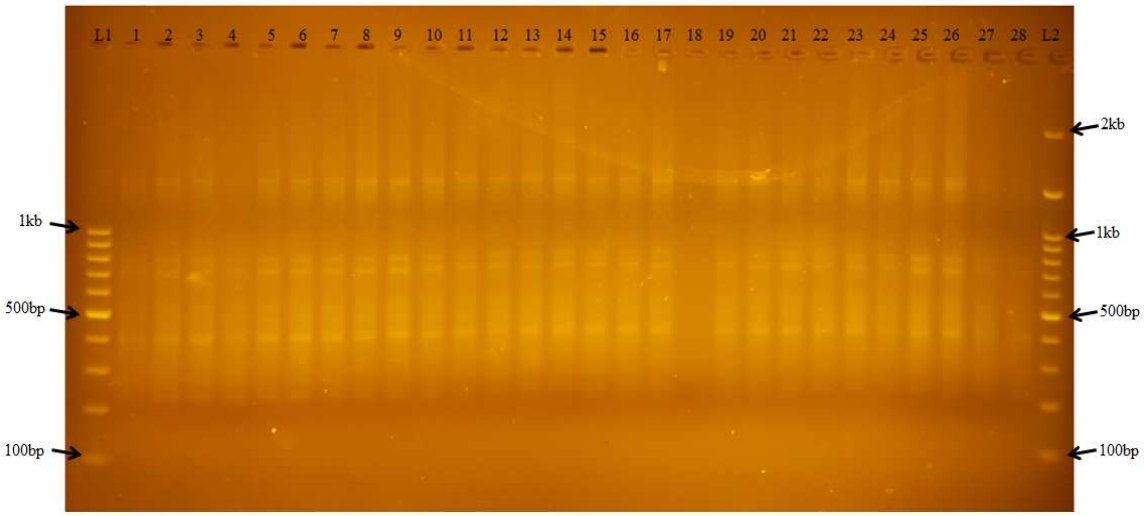
در بررسی کلاستر زیر کشت های حاصل از کشت بافت کلون ۱۰۰ چای، همانطور که از شکل ۳ مشخص است در ابتدا نمونه کد G17 با میزان تشابه ۰/۹۷ از سایر نمونه‌ها جدا شد. با رجوع به جدول ماتریس تشابه میزان متوسط تشابه این نمونه با سایر نمونه‌ها ۰/۹۴۴ بود که نسبت به سایر نمونه‌ها کمتر است. باقی نمونه‌ها (از نمونه کد G13 تا نمونه کدG19) نیز در سطح تشابه حدود ۰/۹۷۶ از سایر نمونه‌های جدا شدند. از آنجایی که این نمونه‌ها با بایکدیگر در دسته دوم تیمار هورمونی قرار داشتند و این احتمال وجود دارد که تماما از یک زیر نمونه این تیمار حاصل شده باشند، تایید کننده یکنواختی در تکثیر کشت بافت است. دو نمونه G11 و G12 که متعلق به تیمار هورمونی دوم بودند با سایر نمونه‌ها در یک کلاستر قرار دارند که نشان می دهد آنها از ریز نمونه ای دیگر در این تیمار هورمونی تکثیر شده اند که در آن جهش هایی که باعث تفکیک شدن نمونه‌های G13 الی G19 شده است را ندارند. دسته دیگر نمونه‌ها (تمام نمونه‌های انتخابی از تیمار سوم هورمونی) (نمونه‌های کد G20 الی G28) تماما در یک گروه در سطح حدود ۰/۹۸۷ تشابه از سایر نمونه‌ها جدا شدند. بنابراین می‌توانبیان کرد که این نمونه‌ها با توجه به تیمار یکسان، تایید کننده تشابه و یکنواختی در گیاهچه های بدست آامده می باشند. در انتها نیز گروه آخر نمونه‌ها شامل نمونه مادری کلون ۱۰۰ (G1) و نمونه‌های تیمار وال هورمونی (G2 الی G10) به همراه دو نمونه تیمار هورمونی دوم (G11 و G12) در حدود ۰/۹۸۷ از سایر نمونه‌های جدا شدند. قرار گیری دو نمونه تیمار هورمونی دوم (G11 و G12) در کنار نمونه مادری و نمونه‌های تیمار اول هورمونی مجددا دلالت بر یکنواختی بالای گیاهان بدست آمده از کشت بافت دارد.

بطور کلی با توجه به نتایج بدست آمده از تحلیل ماتریس تشابه تجزیه کلاستر مشخص می شود که روش تکثیر ریز ازدیادی گیاه چای می تواند به عنوان یک روش مناسب برای تکثیر انبوه این گیاه با حفظ میزان یکنواختی و تولید گیاهان مشابه گیاه مادری مدنظر قرار گیرد.

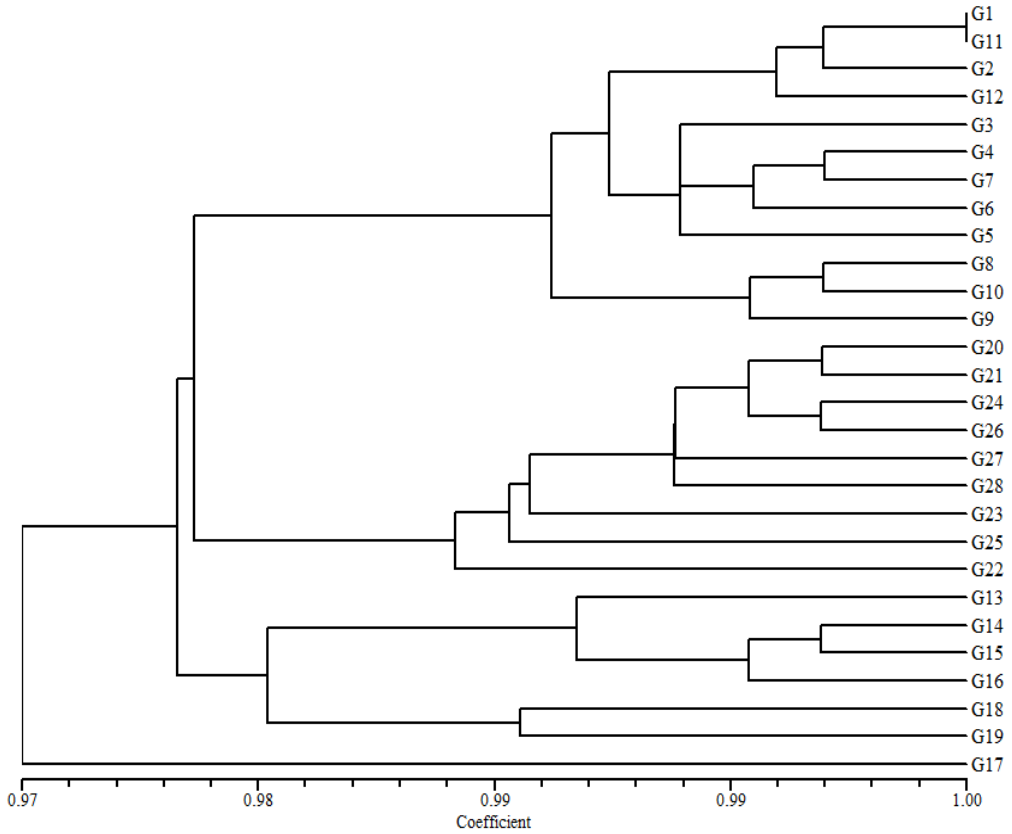
G1: Mother plant
G2-G10: A (BA 3mg l^{-1})
G11-G19: B (BA 6mg l^{-1})
G20-G28: C (BA 9mg l^{-1})



شکل ۱. الکتروفورز پرایمر ISSR3



شکل ۲. الکتروفورز پرایمر ISSR6



شکل ۳. دندروگرام بدست امده از داده های نشانگر ISSR بر اساس ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA)

برخی محققان گزارش کرده اند که زمان در کشت درون شیشه ای می تواند تنوع سوماکلونال را ترفیع دهد (Orton 1985, Hartmann *et al.* 1989, Nayak and Sen 1991). از طرف دیگر Venddrame و همکاران (۱۹۹۹) نتیجه گیری کردند که در یک خط کشت تنوع ژنتیکی می تواند توسط ژنوتیپ بیشتر از مدت زمان کشت تحت تاثیر قرار گیرد. نتایج ما نشان داد که در کلون ۱۰۰ چای، مدت زمان کشت با زیر کشت های مرتب تاثیری در پایداری ژنتیکی آن ها نشان نداد. نتایج مشابه همچنین توسط Martins و همکاران در سال ۲۰۰۴ گزارش شده بود.

Hammerschlag و همکاران (۱۹۸۷) در مطالعه ای که روی زیرکشت های پرآوری شده ی هلو انجام دادند، نشان دادند که ژنوتیپ و طبیعت جداکشت ها می تواند پایداری ژنتیکی گیاه به دست آمده از کشت درون شیشه ای را تحت تاثیر قرار دهد. به نظر نمی‌رسد که مدت زمان کشت تنها پارامتر موثر در پایداری ژنتیکی باشد(Glould, 1986). با توجه به نتایج به دست آمده به نظر می رسد که استفاده از جوانه های جانبی برای تکثیر درون شیشه ای شاخه های چای، روشی مناسب، حفاظت شده با ریسک پایینی از تنوع ژنتیکی است.

همچنین طبق گزارشاتی، استفاده از غلظت‌های بالای تنظیم کننده‌های رشد (۱۵ میلی گرم بر لیتر از BA) نرخ تنوع سوماکلونال را افزایش داد(Gime´nez *et al.*, 2001). همچنین استفاده از تنظیم کننده‌هایی مثل 2,4-D یا 2,4,5-T نسبت به دیگر تنظیم کننده‌های رشد مثل IBA و NAA به نسبت بیشتری احتمال ایجاد تنوع سوماکلونال را دارد(Ahmed et *al.* 2004). پس طبق نتایج ما استفاده از غلظت‌های مناسب از تنظیم کننده ها ی رشد می تواند روش امنی برای حفظ پایداری ژنتیکی گیاهان پرآوری شده باشد.

مقایسه بین گیاهان درون شیشه ای در پنجمین زیرکشت و گیاهان والد به طور متوسط ۹۸/۹۱ درصد تشابه را نشان داد.

پیشنهادات

- ✓ بهینه سازی کشت درون شیشه ای رقم های برتر چای مانند ارقام مقاوم به خشکی و یا شوری
- ✓ مطالعه ی تاثیر تنظیم کننده های رشد دیگر بر روی استقرار و پرآوری چای
- ✓ بررسی تنوع ژنتیکی زیر کشت ها با استفاده از نشانگرهای دیگر و مقایسه با نتایج بدست آمده از این مطالعه
- ✓ استفاده از کشت بافت برای استخراج آنتی اکسیدان های موجود در چای

فهرست منابع منتخب

احمدپور دهکردی، ۱.، دانش شهرکی، ع.، خسروی لمجیری، پ. ۱۳۹۷. اثر پرایمینگ بذر با اسید سالیسیلیک بر شاخص های جوانه زنی و رشد گیاهچه چای ترش (*Hibiscus sabdariffa*) توده بومی سیستان تحت تنش خشکی. علوم و تحقیقات بذر ایران. ۵: (۱-۱۱).

ترنگ, علیرضا؛ شادی کیابی؛ الهام یوسف پور لزرجانی و علی رمضانی صیاد، ۱۳۹۱، بررسی ابعاد ریزازدیادی و کشت بافت گیاه چای (Camellia sinensis)، اولین همایش ملی دانشجویی بیوتکنولوژی، گرگان، دانشگاه گلستان.

غلامی، م.، (۱۳۸۳)، کاربرد فناوری زیستی در اصلاح ژنتیکی چای، مجله علمی فنی چای، ص. 15-24

مظفریان، و.، (۱۳۸۳)، رده‌بندی گیاهی جلد دوم (کتاب دوم) دولپه‌ای‌ها، انتشارات امیرکبیر.

وکیلی، د.، (۱۳۸۳)، چای (با نگرش علمی تحلیلی)، انتشارات موثقی.