شناسایی و ارزیابی تنوع ژنتیکی ارقام سیب زمینی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره‌ای

مسعود بهار، حمید رضا محمدی و سیروس قبادی[۱]

چکیده

به دلیل افزایش تعداد ارقام سیب زمینی و اهمیت تولید غده‌های بذری با خلوص ژنتیکی بالا، شناسایی دقیق و نیز ارزیابی ژنتیکی ارقام از فعالیت‌های مستمر در تحقیقات مربوط به اصلاح سیب زمینی محسوب می‌شود. برای دست‌یابی به یک روش قابل اعتماد جهت شناسایی ۲۸ رقم سیب زمینی، کارایی ۱۰ نشانگر ریزماهواره‌ای که در مطالعات سایر محققین چند شکلی مناسبی نشان داده بودند، بررسی شد. جفت آغازگرهای ریزماهواره مورد استفاده از ۳ تا ۱۰ آلل در بین ۲۸ رقم سیب زمینی و در مجموع ۵۷ آلل تکثیر کردند که متوسط تعداد آلل‌ها به ازای هر جفت آغازگر ۵/۷ بود. تعداد ارقام هتروزیگوت (افرادی که بیش از یک آلل تکثیر کردند) از ۶ تا ۲۸ رقم متغیر بود و تعداد متوسط آنها به ازای هر جفت آغازگر ۱۸ رقم برآورد شد. تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA و با ضریب جاکارد، ۲۸ رقم سیب زمینی را در دو گروه مجزا گروه‌بندی کرد. بر اساس دندروگرام ترسیم شده ارقام آمریکایی کنبک، فلوریدا و آتلانتیک در یک گروه قرار گرفتند و رقم استانبولی که یک رقم ناشناخته در ایران محسوب می‌شود. در گروه ارقام اروپایی دسته بندی شد. احتمال داده می‌شود که این رقم به‌همراه سایر ارقام ناشناخته که در مناطق مختلف کشور کاشته می‌شوند از اروپا به ایران وارد شده می‌باشد. نتایج به‌دست آمده در این تحقیق نشان داد که استفاده از ریزماهواره‌ها برای تعیین رابطه ژنتیکی ارقام سیب زمینی و ارزیابی خلوص بذری مناسب می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: سیب زمینی، تنوع ژنتیکی، نشانگرهای SSR

مقدمه

سیب زمینی (*Solanum tuberosum* L.) از گیاهان زراعی خانواده Solanaceae و به‌عنوان یکی از منابع اصلی غذایی مردم، در محدوده‌های جغرافیایی وسیعی از دنیا که اقلیم معتدلی دارند کشت می‌شود. جنس *Solanum* تقریباً ۲۰۰۰ گونه گیاهی را در بر می‌گیرد که از نظر سطح پلوئیدی متفاوت هستند و در بین آنها گونه‌های دیپلوئید (۲x)، تتراپلوئید (۴x) و هگزاپلوئید (۶x) یافت می‌شود. گونه زراعی سیب زمینی به صورت اوتوتتراپلوئید با فرمول ژنومی ۲n =۴x =۴۸ می‌باشد که منشا اولیه آن ناحیه Andean در مرکز پرو تا مرکز بولیوی بوده و از آنجا به اروپا و مناطق دیگر دنیا منتقل گردیده است (۱۶). سیب زمینی عمدتاً به صورت غیر جنسی و از طریق غده‌ها تکثیر می‌یابد و از جوانه‌های به وجود آمده در محل جوانه‌های چشمی غده، بوته‌های جدید تکثیر می‌شوند.

۱. به ترتیب استادیار، کارشناس و مربی بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1385.10.4.20.1]

یک‌نواختی و خلوص ژنتیکی ارقام سیب زمینی در مراحل مختلف کاشت، داشت و برداشت سیب زمینی و هم‌چنین در صنایع تبدیلی از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است. به‌دلیل عدم توجه به این مهم ممکن است در یک توده از غده‌های سیب زمینی، غده‌هایی با رنگ‌ها و اندازه‌های مختلف وجود داشته باشد که حاکی از خلوص ژنتیکی پایین، به عبارت دیگر وجود بیش از یک رقم سیب زمینی، در این توده می‌باشد. بنابراین در مراحل مختلف تولید بذر سیب زمینی، از مرحله کشت بافت اولیه جهت تولید غده‌های مادری عاری از عوامل بیمارگر تا تولید غده‌های بذری گواهی شده، اطمینان از خلوص ژنتیکی رقم سیب زمینی ضروری می‌باشد. هر گونه اختلاط ژنتیکی در یکی از مراحل تولید بذر گواهی شده، که معمولاً بیش از پنج سال طول می‌کشد، موجب خواهد شد که غده‌های تولید شده گواهی بذری دریافت ننمایند و نتیجه آن تحمیل زیان مالی به تولیدکنندگان بذر سیب زمینی و زارعین می‌باشد. بنابراین وجود روش‌های دقیق و معتبر و در عین حال سریع در امر شناسایی و متمایز ساختن ارقام مختلف سیب زمینی بسیار مهم می‌باشد.

تا پیش از دو دهه گذشته شناسایی ارقام سیب زمینی بر اساس صفات ظاهری رقم مانند شکل برگ، رنگ گل، رنگ و شکل غده و عادت رشد صورت می‌گرفت. در این نوع شناسایی لازم بود که خصوصیات مرفولوژیکی در تمام مراحل رشد گیاه ثبت شود که نیاز به زمانی طولانی داشت. از طرف دیگر چون رابطه متقابل شرایط منطقه‌ای و عوامل محیطی با مراحل رشد گیاه در بروز مشخصات مرفولوژیکی گیاه مؤثر بود و تجربه افراد طبقه بندی کننده نیز تأثیر مستقیمی در تشخیص نهایی داشت، لذا این نوع شناسایی برای تشخیص ارقام سیب زمینی دقیق نبود (۲۵). در سال‌های بعد استفاده از نشانگرهای بیوشیمیایی برای تفکیک ارقام سیب زمینی آمریکای شمالی (۱۱ و۱۸) ونیز ارقام اروپایی(۴)مورد توجه قرار گرفت. اما تعداد نشانگرهای بیوشیمیایی کم بوده و از طرفی این نشانگرها تحت تأثیر نوع بافت و فیزیولوژی گیاه در زمان‌های مختلف رشد قرار می‌گیرند. به دلیل مشکلات عنوان شده امروزه نشانگرهای مختلفی توسعه یافته‌اند که بیشتر آنها به تفاوت افراد در سطح ملکولی DNA تأکید دارند و توانایی این تکنیک‌ها در شناسایی ویژگی‌های ژنومی موجودات مختلف و در تهیه نقشه‌های ژنتیکی اشباع شده به اثبات رسیده است(۲۶). تهیه نقشه‌های ژنتیکی سیب زمینی با استفاده از چند جمعیت دیپلوئید و به‌کارگیری نشانگر RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) شروع شد (۵). پس از آن محققین جهت اشباع نقشه‌های ژنتیکی و با به‌کارگیری نشانگرهای مختلف از جمله ترانسپوزون‌ها (۱۹)، AFLP (Amplified fragment length polymorphism) (۳۷) و نشانگرهای SSR (Simple Sequence Repeats) (۲۴) پروژه‌های اصلاحی متعددی را برنامه ریزی کردند. نشانگرهای DNA در بررسی تنوع ژنتیکی و شناسایی ارقام سیب زمینی نیز به کار رفته اند. استفاده از نشانگرهای RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)، برای شناسایی ارقام سیب زمینی با منشا آمریکایی (۳۳) و ارقام سیب زمینی مورد کاشت در ژاپن (۱۷) و استرالیا (۱۲) با موفقیت همراه بود، هر چند که ممکن است عدم تکرار پذیری نتایج به‌دست آمده کاربرد این روش را دچار تردید نماید (۱۰). در تحقیقات مشابهی نشانگرهای ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) برای تعیین تنوع ژنتیکی ارقام اروپایی و آرژانتینی (۶) و RFLP برای تفکیک ارقام تتراپلوئید سیب زمینی به کار رفتند (۱۴). مقایسه کاربرد تکنیک‌های RAPD، ISSR، AFLP و SSR به منظور انگشت نگاری ژنتیکی ارقام سیب زمینی نشان داد که نشانگرهای SSR در مقایسه با سایر نشانگرها از توانایی بالایی در ردیابی تنوع ژنتیکی و شناسایی ارقام برخوردار می‌باشند(۲۲). علی‌رغم سودمندی روش‌های فوق، به‌دلیل استفاده از مواد رادیواکتیو و پیچیدگی مراحل اجرایی در تکنیک RFLP ، نیاز به استفاده از DNA بسیار خالص در مطالعات مربوط به AFLP و نیز مشکل تکرارپذیری RAPD، استفاده از

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1385.10.4.20.1]

ریزماهواره‌ها برای مطالعه خلوص و تفکیک ارقام سیب زمینی به‌عنوان یک روش برتر مطرح گردیده است(۲).

ریزماهواره‌ها شامل واحدهای تکراری دو، سه، چهار، شش تا ده تایی نوکلئوتیدی می‌باشند که در طول ژنوم بیشتر یوکاریوت‌ها پراکنده‌اند و به‌دلیل داشتن تعداد متفاوت واحدهای تکراری ، چند شکلی زیادی را نشان می‌دهند. از آنجاکه توالی‌های نوکلئوتیدی احاطه کننده ریزماهواره‌ها (Flanking region) حفاظت شده (Conserved) می‌باشند، بنابراین می‌توان با طراحی آغازگر اختصاصی بر اساس این توالی‌ها، نشانگرهای انحصاری مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز(PCR)، برای هر جایگاه به‌دست آورد (۲۶).

از نشانگرهای ریزماهواره در بررسی تعیین تنوع ژنتیکی گلابی (۴۰)، انگور(۹)، سویا (۲۸)، گوجه فرنگی (۳۲)، آفتاب گردان (۸)، و ذرت (۳۱) استفاده شده است. نشانگرهای SSR از حساسیت زیادی برخوردارند و به‌کارگیری آنها نسبت به تکنیک‌های RFLP و AFLP ساده تر است (۳۶) و قادرند سطوح بالایی از چند شکلی را آشکار نمایند (۲۹). چند شکلی بالا در جایگاه‌های ریزماهواره ناشی از شدت بالای جهش در این توالی‌ها نسبت به سایر نواحی ژنومی است ($۱۰^{-۳}$ الی $۱۰^{-۵}$). وقوع کراسینگ‌اور نامتعادل در میوز و لغزش درهنگام همانندسازی از مهم‌ترین مکانیسم‌های ایجاد جهش در این جایگاه‌ها می‌باشند (۲۶). هم‌چنین نشانگرهای SSR به دلیل توارث هم‌بارز و ماهیت چند آللی ، کارایی بالایی در ارزیابی تنوع ژنتیکی،روابط شجره‌ای وتهیه نقشه‌های ژنتیکی دارند(۳۴).

تشخیص گیاهان حاصل از کشت دانه گرده از اولین موارد استفاده از ریزماهواره‌ها در سیب زمینی بود (۳۸). در یک بررسی Kawchuk و همکاران (۲۰) با استفاده از سه آغازگر ریزماهواره‌ای، ۷۵ رقم سیب زمینی را از بین ۹۵ رقم تفکیک کردند، هرچند در یک مطالعه دیگر نشانگرهای ISSR به دلیل عدم وجود چند شکلی نتوانستند کلون‌های سیب زمینی رقم *Russet burbank* را از هم متمایز سازند (۱). گزارش‌های بسیاری وجود دارد که آغازگرهای ریزماهواره‌ای برای تفکیک ارقام سیب زمینی و تعیین رابطه ژنتیکی آنها مناسب هستند (۱، ۱۳، ۲۲، ۲۴ و ۲۶). پلی مورفیسم زیاد،سرعت وآسانی کار و نیز تکرارپذیری بسیار زیاد باعث شده است که ریزماهواره‌ها در تشخیص ارقام سیب زمینی مورد توجه بیشتری قرار گیرند (۲۳).

با توجه به افزایش ارقام سیب زمینی وارداتی مورد کاشت در ایران، وجود روش‌های کارامد برای شناسایی دقیق و سریع ارقام و تأیید خلوص غدد سیب زمینی از اهمیت بالایی برخوردار است. این شناسایی ارقام برای پژوهشگران در جهت انتخاب و تولید ارقام خالص و برای زارعین به خاطر تولید محصول یک‌نواخت و گواهی شده بسیار مفید خواهد بود. لذا در این تحقیق کارایی نشانگرهای SSR برای تشخیص ارقام سیب زمینی مورد توجه قرار گرفت و سعی شد ضمن تعیین چند شکلی ژنتیکی ارقام مختلف سیب زمینی مورد کاشت در ایران، روابط ژنتیکی این ارقام نیز بررسی گردد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد استفاده شامل ۲۸ رقم سیب زمینی وارداتی سال ۱۳۸۳ بود که ارقام فلوریدا، سانتانا، مارادونا، راموس، اگریا، دیامونت، آتلانتیک، دزیره، کوزیما، آئولا، نیکولا، استانبولی، لابیدا، راجا، مارکینز، مارفونا، فرسکو، کایزر و پیکاسو از مؤسسه اصلاح نهال و بذر اصفهان و ارقام سانته، میلوا، کنبک، نوتاشل، ایمپالا، بارن، کارتوفل، موندیال و ایمازکا از طریق اتحادیه تولید کنندگان بذر سیب زمینی (شرکت رویان گستر) تهیه شدند. بر اساس اطلاعات به‌دست آمده از تهیه کنندگان ارقام مورد مطالعه، ارقام فلوریدا، آتلانتیک و کنبک منشأ آمریکایی داشته و بقیه ارقام از کشورهای اروپایی وارد کشور شده‌اند. تمام ارقام مذکور از نظر ویژگی‌های مرفولوژیکی، زراعی و فیزیولوژیکی مانند زمان رسیدگی، اندازه، رنگ و شکل غده، عملکرد، الگوی رشد بوته‌ها و نیز مسأله مقاومت در برابر ویروس‌های مهم سیب

[Downloaded from jstmar.iut.ac.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1385.10.4.20.1]

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده، آلل‌های ردیابی شده، تعداد و درصد هتروزیگوت‌ها در ۲۸ رقم سیب زمینی

جفت آغازگر	تعداد آلل‌های ردیابی شده	دامنه اندازه آللی (جفت باز)	تعداد ارقام هتروزیگوت	درصد هتروزیگوتی
STM 3012 (۱۳*)	۴	۱۶۸–۲۱۳	۹	۳۲
STM 1104(۱۳)	۱۰	۱۵۰–۱۸۰	۲۱	۷۵
STM 0019(۱۳)	۷	۸۰–۲۴۰	۲۷	۹۶
STM 1031(۱۳)	۵	۲۶۰–۳۲۰	۲۰	۷۱
STM 2022(۱۳)	۵	۱۸۰–۲۴۰	۱۰	۳۵
STM 1049(۱۳)	۵	۱۸۰–۲۶۰	۱۷	۶۰
STM 0031(۱۳)	۷	۱۵۰–۲۰۰	۲۸	۱۰۰
POT 47-48 (۲)	۳	۱۵۰–۲۳۰	۶	۲۲
POT 83-84 (۲)	۵	۱۴۰–۱۸۰	۱۷	۶۰
ST 21-22 (۲)	۶	۱۶۰–۲۰۰	۲۸	۱۰۰

*: اعداد داخل پرانتز نشان دهنده شماره منبع علمی است که توالی آغازگر از آن اقتباس شده است.

زمینی متفاوت هستند (http://www.nivaa.nl ; http://www. .hhdra. org. uk/ catalog.htm).

پس از نگه‌داری نمونه‌ها در یخچال تا زمان پایان یافتن دوره خواب و فعال شدن جوانه‌های چشمی، از هر رقم هشت غده به طور جداگانه در مخلوط خاک و ماسه (۱:۱) پاستوریزه شده در گلدان‌های سه کیلویی کاشته شدند. پس از رشد کامل بوته‌ها و در زمان قبل از گل‌دهی، یکی از برگ‌های مرکب جوان میانی از هر بوته انتخاب گردید و پس از انجماد سریع در ازت مایع تا زمان استخراج DNA در فریزر $-80^{o}C$ نگه‌داری شد. برای استخراج DNA ژنومی ، یک گرم از بافت برگی جمع آوری شده از هر بوته در هاون چینی و در حضور ازت مایع پودر شد و استخراج DNA به روش CTAB (۳۰) صورت گرفت. سپس کمّیت و کیفیت DNAهای حاصله با روش اسپکتروفتومتری و نیز مقایسه تراکم باندهای DNA هر نمونه در روی ژل آگارز ۱٪ در بافر TBE (Tris-Borate EDTA) با تراکم باندهای نشانگر III (λ-*Hind* III *Eco*R1) تخمین زده شد. جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) از ۱۰ جفت آغازگر SSR اختصاصی سیب زمینی (جدول۱) استفاده شد که این آغازگرها با کیفیت آللی مناسب، میزان پلی مورفیسم بالایی را بین ارقام سیب زمینی نشان داده بودند (۲ و۲۴).

واکنش‌های PCR با استفاده از مواد شرکت (Roche Co., Germany) و در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ۱/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X حاوی کلرید منیزیوم ۱۵ میلی مولار، یک واحد آنزیم *Taq* DNA Polymerase ، ۰/۳ میکرومولار از هر آغازگر، ۰/۲ میلی مولار مخلوط نوکلئوتیدی (dNTPs) و۵۰ نانوگرم DNA ژنومی انجام شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر اپندورف (Mastercycler gradient) با برنامه حرارتی یک چرخه سه دقیقه‌ای در $94^{o}C$ و ۳۰ چرخه با یک دقیقه در $94^{o}C$ ، ۳۰ ثانیه در $58^{o}C$ ، یک دقیقه در $72^{o}C$ و مرحله تکثیر نهایی با ۵ دقیقه در $72^{o}C$ انجام شد. محصول واکنش PCR با استفاده از ژل پلی اکریل آمید شش درصد

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1385.10.4.20.1]

واسرشت با هفت مولار اوره، تفکیک شد و در نهایت رنگ آمیزی ژل با روش نیترات نقره انجام گرفت (۳). در این آزمایش‌ها اندازه تقریبی باندهای تکثیر شده به کمک نشانگر ۵۰ جفت بازی تخمین زده شد.

گر چه با توجه به تکثیر غیرجنسی سیب زمینی، تغییرات ژنتیکی داخل جمعیتی در این گیاه محدود می‌باشد، ولی برای اطمینان از خلوص ژنتیکی ارقام مورد بررسی، در یک آزمایش مقدماتی تمام هشت نمونه مربوط به یک رقم از ارقام استانبولی، اگریا، مارادونا و آتلانتیک با آغازگرهای STM0031 و POT83-84 به طور مستقل تحت واکنش زنجیره‌ای پلیمراز قرار گرفتند. چون در بررسی نتایج، تفاوتی از نظر آللی در بین افراد داخل هر رقم مشاهده نشد، در آزمایش‌های اصلی، مخلوط DNA (Bulk) به‌دست آمده از تمام افراد داخل جمعیت برای واکنش‌های PCR با آغازگرهای مختلف استفاده گردید.

الگوهای نواری حاصل به صورت وجود و یا عدم وجود نوارها (Band) در محصول PCR با اعداد یک و صفر امتیازدهی شدند. ماتریس تشابه با سه ضریب تطابق ساده (SM)، جاکارد و دایس محاسبه شد. تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA انجام شد و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار NT SYS-pc Ver 2.02 انجام گرفت.

نتایج و بحث

هر ۱۰ جفت آغازگر SSR الگوی نواری قابل امتیاز دهی را برای ۲۸ رقم سیب زمینی مورد مطالعه تولید کردند. در شکل ۱ الگوی نواری مربوط به نشانگر STM0031 دیده می‌شود.در جدول ۱ تعداد آلل ، دامنه اندازه آللی و تعداد ژنوتیپ هتروزیگوت در هر مکان ژنی آورده شده است. به طوری‌که مشاهده می‌شود تمامی مکان‌ها دارای آلل‌های چندگانه بودند که دلیل بر هتروزیگوت بودن ارقام سیب زمینی مورد مطالعه می‌باشد. تعداد آلل‌های مشاهده شده از سه آلل (POT 47-48 تا ۱۰ آلل (STM 1104) متغیر بود و در کل تعداد ۵۷ آلل تولید شد که متوسط تعداد آلل‌ها به ازای هر مکان ۵/۷ آلل برآورد گردید. این نتایج با یافته‌های سایر پژوهشگران در بررسی روابط ژنتیکی ارقام سیب زمینی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره‌ای که میانگین تعداد آللی ۵/۸ (۲۳)، ۶ (۲۰) و ۶/۸ (۲۷) را گزارش کرده‌اند مطابقت دارد. بنابراین نشانگرهای SSR مورد استفاده از ثبات خوبی برخوردار بوده و نتایج به دست آمده از این آزمایش‌ها در تحقیقات و آزمایشگاه‌های مختلف قابل استناد می‌باشد. چند آللی طبیعت نشانگرهای SSR است، به‌طوری‌که قادرند در یک مکان چندین آلل را تکثیر کنند (۲۱) که تعداد آلل‌ها در هر مکان بر اساس ویژگی‌های توالی‌های تکراری متفاوت است و تأثیر مستقیمی بر بازدهی آن مکان در تظاهر هتروزیگوسیتی دارد (۷).

یکی از مهم‌ترین مزایای نشانگرهای همبارز مانند SSR، برتری آنها در تمایز افراد هموزیگوت از هتروزیگوت می‌باشد. بنابراین تعداد آلل‌های مجزا در هر مکان می‌تواند بیانگر سطح پلوئیدی و در نهایت هتروزیگوسیتی باشد. از آنجا که سیب زمینی‌های زراعی تتراپلوئید (۴x) هستند، افراد هتروزیگوت می‌توانند دو، سه یا چهار آلل در هر جایگاه داشته باشد اما در مورد افراد هموزیگوت تنها یک آلل در هر جایگاه تکثیر می‌شود(۲). در این تحقیق تعداد ارقام هتروزیگوت از ۶ رقم (۲۲ درصد) در جایگاه POT 47-48 تا ۲۸ رقم هتروزیگوت (۱۰۰درصد) مربوط به جایگاه‌های ST 21-22 و STM0031 متغیر بود. تعداد متوسط ارقام هتروزیگوت هم ۱۸ رقم (۶۵ درصد) برآورد شد. در تحقیق دیگری Provan و همکاران(۲۷) میانگین ارقام هتروزیگوت را ۷۹ درصد اعلام کردند. آنها از ۱۶ جفت آغازگر SSR و ۱۸ رقم سیب زمینی استفاده کردند. هم‌چنین Ashkenazi وهمکاران با استفاده از هشت جفت آغازگر SSR، ۱۲ رقم سیب زمینی را از هم متمایز کردند که میانگین هتروزیگوتی ۶۶ درصد بود و مشخص شد که حداقل تعداد آغازگرهای لازم که قادرند به خوبی کار تمایز ارقام را انجام دهند دو جفت آغازگر بود که البته توانایی بسیار بالایی در ردیابی چند شکلی داشتند (۲).

ضریب کوفنتیک (Cophenetic coefficient) برای تجزیه

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1385.10.4.20.1]

خوشه‌ای به روش UPGMA با سه ضریب تطابق ساده (SM)، جاکارد و دایس نشان داد که گروه بندی بر اساس ضریب جاکارد با ضریب کوفنتیک (۰/۹۹۴) بهترین روش گروه بندی است. در گروه بندی به‌دست آمده بیشترین تشابه بین ارقام آئولا و نیکولا با ضریب تشابه ۰/۸۶ و کمترین تشابه بین ارقام نوتاشل و سانتانا با ضریب ۰/۳۲مشاهده شد. در دندروگرام ترسیم شده (شکل۲) ارقام سیب زمینی مورد مطالعه در ضریب تشابه ۰/۳۲ در دو گروه مجزا قرار گرفتند.گروه A به دلیل داشتن ضریب ۰/۴۷ از گروه B با ضریب ۰/۳۴ متمایز شد. گروه A را می‌توان به ۲ زیر گروه A۱ و A۲ تقسیم کرد. زیر گروه A۱ شامل ارقام مارادونا، سانته، فلوریدا،آتلانتیک، کنبک و دیامونت با ضریب تشابه ۰/۵۲ می‌باشد و در زیر گروه A۲ ارقام راموس، دزیره، میلوا، اگریا، کزیما، ایمپالا و نوتاشل با ضریب ۰/۵۴ قرار دارند. همین طور گروه B را می‌توان به ۲ زیر گروه B۱ و B۲ تقسیم کرد. ارقام سانتانا، بارن، آئولا، نیکولا، استامبولی، ایمازکا، کارتوفل، لابیدا، موندیال، راجا و مارکینز با ضریب تشابه ۰/۴۱ در زیر گروه B۱ و ارقام مارفونا، فرسکو، کایزر و پیکاسو با ضریب ۰/۴۵ در زیر گروه B۲ قرار گرفتند. با توجه به ضرایب تشابه زیرگروه‌های A و B مشاهده می‌شود که ضرایب تشابه در زیر گروه‌ها در مقایسه با خود گروه‌ها بالاتر است که این نشانگر شباهت زیاد در هر زیر گروه می‌باشد.

دندروگرام ترسیم شده از یک‌نواختی کمی برخوردار است که به‌دلیل سطوح پایین تشابه در بین ارقام سیب زمینی تجاری می‌باشد. پایین بودن تشابه ژنتیکی و نیز اختلاف در انشعاب‌های دندروگرام، گوناگونی ژنتیکی بالا در این ارقام را نشان می‌دهد. قابل ذکر است که در این دندروگرام، ارقام سیب زمینی آمریکایی فلوریدا، آتلانتیک و کنبک در زیر گروه A1 قرار گرفتند. در حالی‌که بیشتر ارقام اروپایی متعلق به گروه B بودند.

چون تعداد ارقام سیب زمینی آمریکایی مورد بررسی در مقایسه با ارقام اروپایی محدود بود، بنابراین پیشنهاد می‌شود که در آینده با استفاده از تعداد زیادی از ارقام سیب زمینی جمع آوری شده از اقلیم‌های مختلف، نسبت به سنجش قدرت این آغازگرها برای تفکیک ارقام، براساس منشا جغرافیایی آنها اقدام کرد. چنین ایده‌ای در تحقیق دیگری (۶) با هدف بررسی تنوع ژنتیکی ارقام سیب زمینی زراعی اروپایی و آرژانتینی و با استفاده از نشانگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت که در نتیجه چهار رقم آرژانتینی مورد آزمایش در دو گروه جداگانه و به‌صورت کاملاً مجزا از ارقام اروپایی گروه بندی شدند.

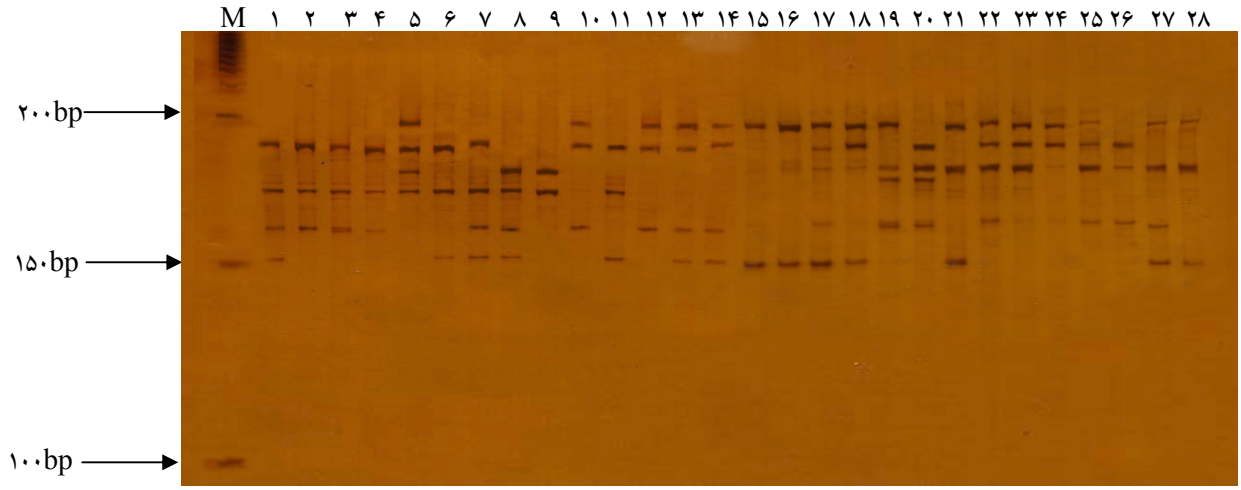
بر اساس دندروگرام رسم شده، سیب زمینی رقم استانبولی که منشا آن مشخص نیست در گروه ارقام اروپایی قرار گرفت. به دلیل سابقه کوتاه کشت سیب زمینی در ایران که عمدتا از طریق کشورهای همسایه مانند روسیه و ترکیه معرفی شده و با توجه به توانایی نشانگرهای ملکولی در تمایز ارقام انگور (۳۹)، پسته (۱۵) و سیب زمینی(۶) بر اساس خاستگاه جغرافیایی آنها می‌توان احتمال داد که سیب زمینی استانبولی منشا اروپایی دارد، هر چند برای تأیید مطلب نیاز به بررسی‌های بیشتری می‌باشد.

در مقایسه مجموعه‌ای از صفات مرفولوژیکی، فیزیولوژیکی و زراعی ارقام با گروه بندی مندرج در دندروگرام به‌دست آمده (شکل ۲)، در برخی از زیرگروه‌ها مطابقت هایی دیده شد. اگر چه در برخی موارد نیز دلایل کافی از نظر خصوصیات ظاهری برای قرار گرفتن ارقام در یک زیر گروه پیدا نشد. این نتایج چندان دور از انتظار نیست چرا که صفات فنوتیپی از توارث‌پذیری بسیار پایینی برخوردار هستند و هیچ مدرکی در دست نیست که همبستگی صفات ژنتیکی و فنوتیپی را نشان دهد. Toress و همکاران (۳۵) تنوع مشاهده شده در صفات باغبانی در بین ژنوتیپ‌های رز را به تغییر بیان ژن‌ها در واکنش به تغییرات شرایط محیطی و مسایل مربوط به رشد نسبت دادند. به عبارت دیگر تعداد زیادی از این نشانگرها ارتباطی با ژن ندارند و این درست بر خلاف صفات مرفولوژیکی است که احتمالاً محصول بیان ژن‌های مختلف هستند.

آنالیز SSR در ژنوم موجودات یوکاریوت، آنها را به منابع نامحدود پلی‌مورفیسم تبدیل کرده است. امروزه در تحقیقات زیادی از نشانگرهای SSR به عنوان نشانگرهای ژنتیکی، برای

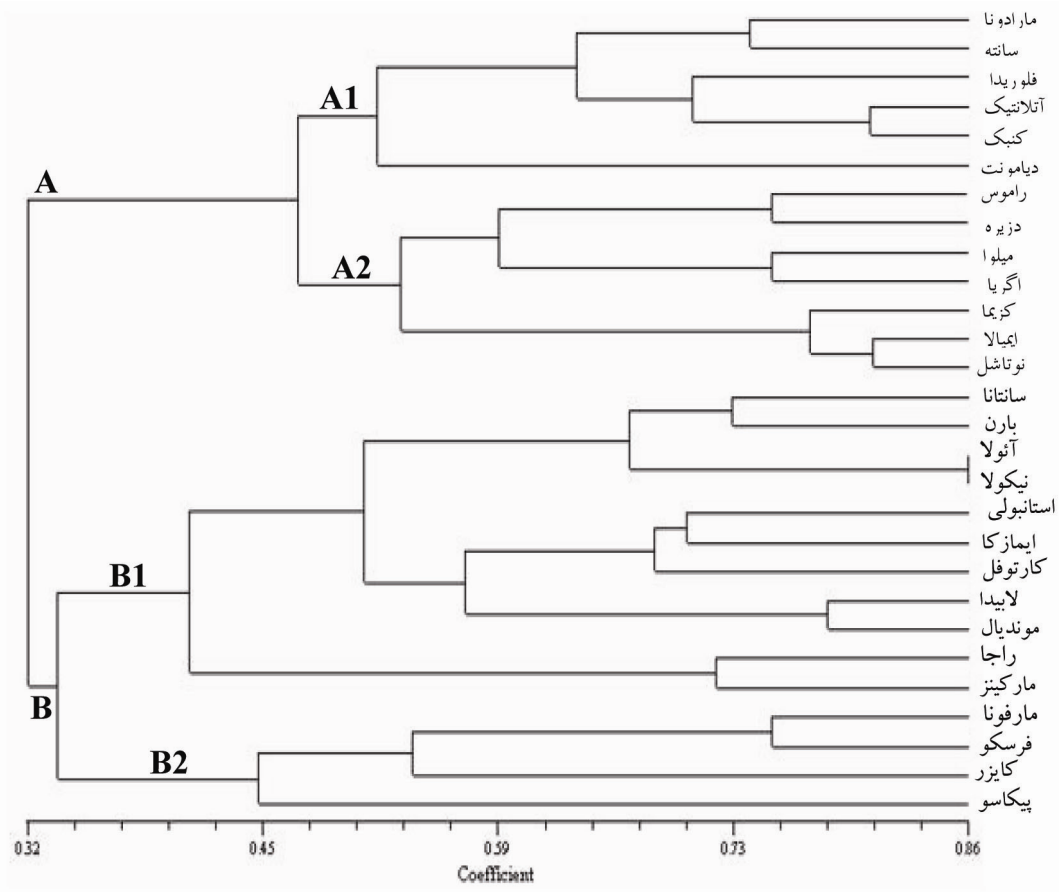
[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1385.10.4.20.1]



شکل ۱. محصولات تکثیری ۲۸ رقم زراعی سیب زمینی با جفت آغازگر STM 0031 در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

M- 50 bp Ladder ۱- فلوریدا ۲- آتلانتیک ۳- سانتانا ۴- سانته ۵- مارادونا ۶- مارفونا ۷- راموس ۸- فرسکو ۹- پیکاسو ۱۰- دیامونت ۱۱- اگریا ۱۲- دزیره ۱۳- آئولا ۱۴- نیکولا ۱۵- استانبولی ۱۶- راجا ۱۷- کزیما ۱۸- مارکینز ۱۹- کایزر ۲۰- ایمازکا ۲۱- نوتاشل ۲۲- بارن ۲۳- میلوا ۲۴- لابیدا ۲۵- ایمپالا ۲۶- موندیال ۲۷- کارتوفل ۲۸- کنبک



شکل ۲. گروه بندی ۲۸ رقم سیب زمینی بر اساس نشانگرهای SSR و ضریب تشابه جاکارد

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1385.10.4.20.1]

مطالعات مربوط به شناسایی ارقام، انطباق اسامی مشابه واریته‌ها و نیز بررسی تنوع ژنتیکی و نقشه‌یابی ژنتیکی استفاده می‌شود. جفت آغازگرهای SSR مورد استفاده در این تحقیق که جهت انگشت نگاری ارقام سیب زمینی توسعه یافته‌اند(۲و۲۴)، قادر به متمایز کردن ۲۸ رقم سیب زمینی از یکدیگر بودند. به‌طوری‌که با در نظر گرفتن وضعیت ارقام در مکان‌های ژنی مختلف، مشاهده شد که ارقام در چند مکان دارای الگوی آللی متفاوت هستند که می‌توان از این اطلاعات آللی به‌عنوان نشانگر در شناسایی ارقام استفاده نمود. به‌عنوان مثال رقم استانبولی دارای الگوی آللی مشخصی است که از طریق آن می‌توان به راحتی این رقم را از سایر ارقام شناسایی کرد. این تمایز الگوی آللی به‌ویژه در تعیین خلوص ارقام سیب زمینی بذری از اهمیت زیادی برخوردار است. با تعیین دقیق اندازه آللی برای هر رقم از اطلاعات به‌دست آمده می‌توان به‌عنوان یک شناسنامه معتبر در کار شناسایی ارقام مشابه ظاهری، کلون‌های یک رقم و ارقام با پیشینه نامشخص طی مدت کوتاه در هر موقعیت زمانی استفاده کرد. بنابراین به کارگیری تعداد مناسبی از نشانگرهای SSR با قدرت اطلاع‌رسانی بالا، در مدیریت کلکسیون‌های ژرم‌پلاسم سیب زمینی بسیار مفید است.

سپاسگزاری

هزینه طرح پژوهشی فوق توسط دانشگاه صنعتی اصفهان پرداخت شده است که بدین وسیله سپاسگزاری می‌شود.

منابع مورد استفاده

1. Albani, M. C. and M. J. Wikinson. 1998. Inter simple sequence repeats polymerase chain reaction for defection of somaclonal variation. Plant Breed. 17:573-575.
2. Ashkenazi, V., E. Chani and U. Lavi. 2001. Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analysis. Genome 44:50-62.
3. Bassam, B. J., G. Caetano-Anolles and P. M. Greesshoff. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 19: 680-683.
4. Barta, J., V. Curn and V. Davis. 2003. Study of biochemical variability of potato cultivars by soluble protein, isoesterase and isoperoxidase electrophoretic patterns. Plant Soil. Environ. 49:230-236.
5. Bonierbale, M. W., R. L. Plaisted and S. D. Tanksley. 1988. RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. Genetics. 120: 1095-1103.
6. Bornet, B., F. Goraguer, G. Joly and M. Branchard. 2002. Genetic diversity in European and Argentinian cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs). Genome 45: 481-484.
7. Bowers, G. E., G. S. Dangel and R. Vignani. 1996. Isolation and characterization of new polymorphism simple sequence loci in grapevine (*Vitis vinifera* L.). Genome 39: 628-633.
8. Brunel, D. 1994.A microsatellite marker in *Helianthus annus* L. Plant. Mol. Biol. 24: 397-400.
9. Dangle, G. S., M. L. Mendum and B. H. Prins. 2001. Simple sequence repeat analysis of a clonally propagated species: A tool for managing a grape germplasm collection.Genome 44:432-438.
10. Demeke, T., L. M. Kawchuk and D. R. Lynch. 1993. Identification of potato cultivars and clonal variants by random amplified polymorphic DNA analysis. Amer. Potato. J. 70: 561-570.
11. Douches, D. S. and K. Ludlamel. 1991. Electrophoresis characterization of North American potato cultivars. Amer. Potato. J. 68:767-780.
12. Ford, R. D. and P. W. J. Taylor. 1997. The application of RAPD marker for potato cultivars identification. Aust. J. Agric. Res. 48:1213-1217.
13. Ghislain, M., F. Rodriguez and F. Villamon. 2000. Establishment of microsatellite assays for potato genetic identification.CIP Program Report, International potato center. Lima, Peru.
14. Gorg, R., U. Schachtschauel, E. Ritter, F. Salamini and C. Gebhardt. 1992. Discrimination among 136 tetraploid potato varieties by fingerprints using highly polymorphic DNA markers. Crop. Sci. 32:815-819.
15. Hormaza, J. I., L. Dollo and V. S. Polito. 1994. Determination of relatedness and geographical movements of P*istacia vera* (pistachio; Anacardiaceae) germplasm by RAPD analysis. Econ. Bot. 48: 349-358.
16. Hosaka, K. 2004. Evolutionary pathway of T-type chloroplast DNA in potato. Amer. J. Potato Res. 81: 155–160.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1385.10.4.20.1]

17. Hoska, K., M. Mori and K. Ogava. 1994. Genetic relationships of Japanese potato cultivars assesed by RAPD analysis. Amer. Potato. J. 71:535-546.
18. Human, Z. and R. Ortiz. 2000. Isozyme analysis of entire and core collection of *Solanum tuberosum* subsp. *Andigena* potato cultivars. Crop Sci. 40:273-276.
19. Jacobs, J. M. E., H. G. Van Eck, P. Arens, B. Verkerk Bakker and W. Stiekema. 1995. A genetic map of potato (*Solanum tuberosum*) integrating molecular markers, including transposons and classical markers. Theor. Appl. Genet. 91: 289-300.
20. Kawchuk, L. M., D. R. Lynch, J. Thomas, B. Penner, D. Sillito and F. Kulesar. 1996. Characterization of *Solanum tuberosum* simple sequence repeats and application to potato cultivar identification. Amer. Potato. J. 73: 325-335.
21. Lefort F. and K. A. Roubelakis-Angelakis. 2001. Genetic comparison of Greek cultivars of *Vitis vinifera* L. by nuclear microsatellite profiling. Amer. J. Enol. Vitic. 52.
22. McGregor, C. E., C. A. Lambert and M. M. Greyling. 2000. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato germplasm. Euphytica 113: 135-144.
23. Milbourne, D., R. C. Meyer, J. E. Bradshaw and R. Waugh. 1997. Comparison of PCR- based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato. Mol. Breed. 3: 127-136.
24. Milbourne, D., R. C. Meyer and A. J. Collins. 1998. Isolation, characterization and mapping of simple sequence repeat loci in potato. Mol. Gen. Genet. 259:233-245.
25. Moisan-Thiery, M., Y. Le Hingrat and M. C. Kerlan. 2001. Potato cultivars identification using molecular markers. Acta. Hort. 546:471-477.
26. Powell, W., G. C. Machray and G. Proven. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Trends Trends. Plant Sci. 1: 215-222.
27. Provan, J., W. Powell and R. Waugh. 1996. Microsatellite analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*). Theor. Appl. Genet. 92: 1078-1084.
28. Rongwen, J., M. S. Akkaya, A. A. Bhagwat, U. Lavi and P. B. Cregan. 1995. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. Theor. Appl. Genet. 90: 43-48.
29. Russell, J. R., J. D. Fuller and M. Macauley.1997. Direct comparison of level of genetic variation among barley accession detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. Theor. Appl. Genet. 95: 714-722.
30. Saghai-Maroof, M. A., R. A. Jorgensen and R. W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. Proc. Natl. Acad. USA 81:8014-8018.
31. Senior, M. L. and M. Henu. 1993. Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the repeats using a CT primer. Genome 36: 884-889.
32. Smulders, M. J. M., G. Bredemeijer, W. Rus-Kortekaas, P. Arens and B. Vosman. 1997. Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. Theor. Appl. Genet. 97: 264-272.
33. Sosinski, B. and D. S. Douches. 1996. Using polymerase chain reaction-based DNA amplification to fingerprint North American potato cultivars. Hortscience 31: 130-133.
34. Thomas, M. R. and N. S. Scott. 1993. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphism when analysed as sequence-tagged sites (STSs). Theor. Appl. Genet. 86: 985- 990.
35. Torres A. M., T. Millan and J. I. Cubero. 1993. Identifying rose cultivars using random amplified polymorphic DNA markers. Hortscience 24: 333-334.
36. Ulanovsky, S., Y. Gogorcena and F. Martinez de toda. 2002. Use of molecular markers in detection of synonymies and homonymies in grapevines (*Vitis vinifera* L.). Sci. Hort. 92: 241-254.
37. Van Eck, H., J. Rouppe van der Voort, J. Draaistra and J. Bakker. 1995. The inheritance and chromosomal localization of AFLP markers in a non-inbred potato offspring. Mol. Breed. 1:397-410.
38. Villeux, R. E., L. Y. Shen and M. M. Paz. 1995. Analysis of the genetic composition of anther-derived potato by randomly amplified polymorphic DNA and simple sequence repeats. Genome 38: 1153-1162.
39. Wang, Y., J. chen and J. Lu. 1999. Random amplified polymorphic DNA analysis of *vitis* species and Florida bunch grapes. Sci. Hort. 82: 85-94.
40. Yamamoto, T., T. Kimur, Y. Sawamura, K. Kotobuki, Y. Ban, T. Hayashi and N. Matsuta. 2001. SSRs isolated from apple can identify polymorphism and genetic diversity in pear. Theor. Appl. Genet. 102: 865-870.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1385.10.4.20.1]