

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

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 ریزماهورهای که در مطالعات سایر محققین چند شکلی مناسبی نشان داده بودند، بررسی شد. جفت آغازگرهای ریزماهور 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 کنیک، 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 به همراه سایر ارقام ناشناخته که در مناطق مختلف کشور کاشته می‌شوند از اروپا به ایران وارد شده می‌باشد. نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان داد که استفاده از ریزماهورها برای تعیین رابطه ژنتیکی ارقام سیب زمینی و ارزیابی خلوص بذری مناسب می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: سیب زمینی، تنوع ژنتیکی، نشانگرهای SSR

مقدمه

(۶x) یافت می‌شود. گونه زراعی سیب زمینی به صورت اتوتتراپلوئید با فرمول ژنومی $2n=4x=48$ می‌باشد که منشأ 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.

سیب زمینی (*Solanum tuberosum* L.) از گیاهان زراعی خانواده Solanaceae و به عنوان 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

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

یک نواختی و خلوص ژنتیکی ارقام سیب زمینی در مراحل مختلف کاشت، داشت و برداشت سیب زمینی و هم چنین در صنایع تبدیلی از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است. به دلیل عدم توجه به این مهم ممکن است در یک توده از غده های سیب زمینی، غده هایی با رنگ ها و اندازه های مختلف وجود داشته باشد که حاکی از خلوص ژنتیکی پایین، به عبارت دیگر وجود بیش از یک رقم سیب زمینی، در این توده می باشد. بنابراین در مراحل مختلف تولید بذر سیب زمینی، از مرحله کشت بافت اولیه جهت تولید غده های مادری عاری از عوامل بیمارگر تا تولید غده های بذری گواهی شده، اطمینان از خلوص ژنتیکی رقم سیب زمینی ضروری می باشد. هر گونه اختلاط ژنتیکی در یکی از مراحل تولید بذر گواهی شده، که معمولاً بیش از پنج سال طول می کشد، موجب خواهد شد که غده های تولید شده گواهی بذری دریافت نمایند و نتیجه آن تحمیل زیان مالی به تولید کنندگان بذر سیب زمینی و زارعین می باشد. بنابراین وجود روش های دقیق و معتبر و در عین حال سریع در امر شناسایی و متمایز ساختن ارقام مختلف سیب زمینی بسیار مهم می باشد.

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 می گرفت. 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 منطقه ای 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 سال های بعد استفاده از نشانگرهای بیوشیمیایی برای تفکیک ارقام سیب زمینی آمریکای شمالی (۱۱ و ۱۸) و نیز 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 زمان های

مختلف رشد قرار می گیرند. به دلیل مشکلات عنوان شده امروزه نشانگرهای مختلفی توسعه یافته اند که بیشتر آنها به تفاوت افراد در سطح ملکولی DNA تأکید دارند و توانایی این تکنیک ها در شناسایی ویژگی های ژنومی موجودات مختلف و در تهیه نقشه های ژنتیکی اشباع شده به اثبات رسیده است (۲۶). تهیه نقشه های ژنتیکی سیب زمینی با استفاده از چند جمعیت دیپلوئید و به کارگیری نشانگر RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) شروع شد (۵). پس از آن محققین جهت اشباع نقشه های ژنتیکی و با به کارگیری نشانگرهای مختلف از جمله ترانسپوزون ها (۱۹)، AFLP (Amplified fragment length polymorphism) (۳۷) و نشانگرهای SSR (Simple Sequence Repeats) (۲۴) پروژه های 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 منشأ 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 به دست 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 تکنیک های 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 می باشند (۲۲). علی رغم سودمندی روش های فوق، به دلیل 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

ریزماهورها برای مطالعه خلوص و تفکیک ارقام سیب زمینی به عنوان یک روش برتر مطرح گردیده است (۲).

ریزماهورها شامل واحدهای تکراری دو، سه، چهار، شش تا ده تایی نوکلئوتیدی می باشند که در طول ژنوم بیشتر یوکاریوت ها پراکنده اند و به دلیل داشتن تعداد متفاوت واحدهای تکراری، چند شکلی زیادی را نشان می دهند. از آنجاکه توالی های نوکلئوتیدی احاطه کننده ریزماهورها (Flanking region) حفاظت شده (Conserved) می باشند، بنابراین می توان با طراحی آغازگر اختصاصی بر اساس این توالی ها، نشانگرهای انحصاری مبتنی بر واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)، برای هر جایگاه به دست آورد (۲۶).

از نشانگرهای ریزماهور 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 به کارگیری آنها نسبت به تکنیک های AFLP و RFLP ساده تر است (۳۶) و قادرند سطوح بالایی از چند شکلی را آشکار نمایند (۲۹). چند شکلی بالا در جایگاه های ریزماهور ناشی از شدت بالای جهش در این توالی ها نسبت به سایر نواحی ژنومی است (۱۰^{-۵} الی ۱۰^{-۳}). وقوع کراسینگ اور نامتعادل در میوز و لغزش در هنگام همانندسازی از مهم ترین مکانیسم های ایجاد جهش در این جایگاه ها می باشند (۲۶). همچنین نشانگرهای SSR به دلیل توارث هم بارز و ماهیت چند آلی، کارایی بالایی در ارزیابی تنوع ژنتیکی، روابط شجره ای و تهیه نقشه های ژنتیکی دارند (۳۴). تشخیص گیاهان حاصل از کشت دانه گرده از اولین موارد استفاده از ریزماهورها در سیب زمینی بود (۳۸). در یک بررسی Kawchuk و همکاران (۲۰) با استفاده از سه آغازگر ریزماهورهای، 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 کلون های سیب زمینی رقم *Russet burbank* را از هم متمایز سازند (۱). گزارش های بسیاری وجود دارد که آغازگرهای ریزماهورهای برای تفکیک

ارقام سیب زمینی و تعیین رابطه ژنتیکی آنها مناسب هستند (۱، ۱۳، ۲۲، ۲۴ و ۲۶). پلی مورفیسم زیاد، سرعت و آسانی کار و نیز تکرارپذیری بسیار زیاد باعث شده است که ریزماهورها در تشخیص ارقام سیب زمینی مورد توجه بیشتری قرار گیرند (۲۳).

با توجه به افزایش ارقام سیب زمینی وارداتی مورد کاشت در ایران، وجود روش های کارآمد 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 یک نواخت 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 روش ها

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، لایدا، راجا، مارکیز، مارفونا، فرسکو، کایزر و پیکاسو از مؤسسه اصلاح نهال و بذر اصفهان و ارقام سانه، میلوا، کنک، نوتاشل، ایمپالا، بارن، کارتوفل، موندیال و ایمازکا از طریق اتحادیه تولید کنندگان بذر سیب زمینی (شرکت رویان گستر) تهیه شدند. بر اساس اطلاعات به دست آمده از تهیه کنندگان ارقام مورد مطالعه، ارقام فلوریدا، آتلانتیک و کنک منشأ آمریکایی داشته و بقیه ارقام از کشورهای اروپایی وارد کشور شده اند. تمام ارقام مذکور از نظر ویژگی های مرفولوژیکی، زراعی و فیزیولوژیکی مانند زمان رسیدگی، اندازه، رنگ و شکل غده، عملکرد، الگوی رشد بوته ها و نیز مسأله مقاومت در برابر ویروس های مهم سیب

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

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

* : 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 ازلت مایع تا زمان استخراج DNA در فریزر -80°C نگهداری شد. برای استخراج DNA ژنومی، یک گرم از بافت برگی جمع آوری شده از هر بوته در هاون چینی و در حضور ازلت مایع پودر شد و استخراج DNA به روش CTAB (۳۰) صورت گرفت. سپس کمیت 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 EcoR1) تخمین زده شد. جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) از ۱۰ جفت آغازگر SSR اختصاصی سیب زمینی (جدول ۱) استفاده شد که این آغازگرها با کیفیت آللی مناسب، میزان پلی مورفیسم بالایی را بین ارقام سیب زمینی نشان داده بودند (۲ و ۲۴).

واکنش‌های PCR با استفاده از مواد شرکت (Roche Co., Germany) و در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ۱/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X حاوی کلرید منیزیم ۱۵ میلی مولار، یک واحد آنزیم Taq DNA Polymerase، ۰/۳ میکرومولار از هر آغازگر، ۰/۲ میلی مولار مخلوط نوکلئوتیدی (dNTPs) و ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی انجام شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر اپندورف (Mastercycler gradient) با برنامه حرارتی یک چرخه سه دقیقه‌ای در 94°C و ۳۰ چرخه با یک دقیقه در 94°C ، ۳۰ ثانیه در 58°C ، یک دقیقه در 72°C و مرحله تکثیر نهایی با ۵ دقیقه در 72°C انجام شد. محصول واکنش PCR با استفاده از ژل پلی اکریل آمید شش درصد

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.

گرچه 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 پلیمرز 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 نواریها (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 امتیازدهی 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 طوری که 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، به طوری که 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 همباز 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 باشند 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 (۱۰۰ درصد) 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 و همکاران 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

خوشه‌ای به روش UPGMA با سه ضریب تطابق ساده (SM)، جاکارد و دایس نشان داد که گروه بندی بر اساس ضریب جاکارد با ضریب کوفتیک (۰/۹۹۴) بهترین روش گروه بندی است. در گروه بندی به دست آمده بیشترین تشابه بین ارقام آنولا و نیکولا با ضریب تشابه ۰/۸۶ و کمترین تشابه بین ارقام نوتاشل و سانتانا با ضریب ۰/۳۲ مشاهده شد. در دندروگرام ترسیم شده (شکل ۲) 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 A₁ و A₂ تقسیم کرد. زیر گروه A₁ شامل ارقام مارادونا، سانتا، فلوریدا، آتلانتیک، کنک و دیامونت با ضریب تشابه ۰/۵۲ می‌باشد و در زیر گروه A₂ ارقام راموس، دزیره، میلو، اگریا، کزیم، ایمپالا و نوتاشل با ضریب ۰/۵۴ قرار دارند. همین طور گروه B را می‌توان به ۲ زیر گروه B₁ و B₂ تقسیم کرد. ارقام سانتانا، بارن، آنولا، نیکولا، استامبولی، ایمازکا، کارتوفل، لاییدا، موندیال، راجا و مارکینز با ضریب تشابه ۰/۴۱ در زیر گروه B₁ و ارقام مارفونا، فرسکو، کایزر و پیکاسو با ضریب ۰/۴۵ در زیر گروه B₂ 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.

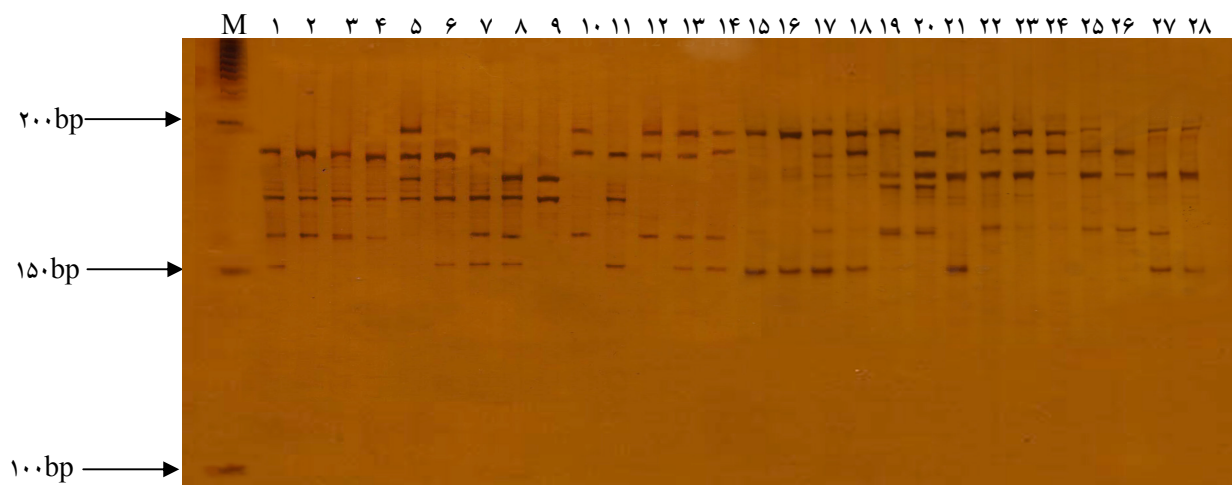
دندروگرام ترسیم شده از یک‌نواختی کمی برخوردار است که به دلیل سطوح پایین تشابه در بین ارقام سیب زمینی تجاری می‌باشد. پایین بودن تشابه ژنتیکی و نیز اختلاف در انشعاب‌های دندروگرام، گوناگونی ژنتیکی بالا در این ارقام را نشان می‌دهد. قابل ذکر است که در این دندروگرام، ارقام سیب زمینی آمریکایی فلوریدا، آتلانتیک و کنک در زیر گروه A₁ قرار گرفتند. در حالی که 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 به صورت کاملاً مجزا از ارقام اروپایی گروه بندی شدند.

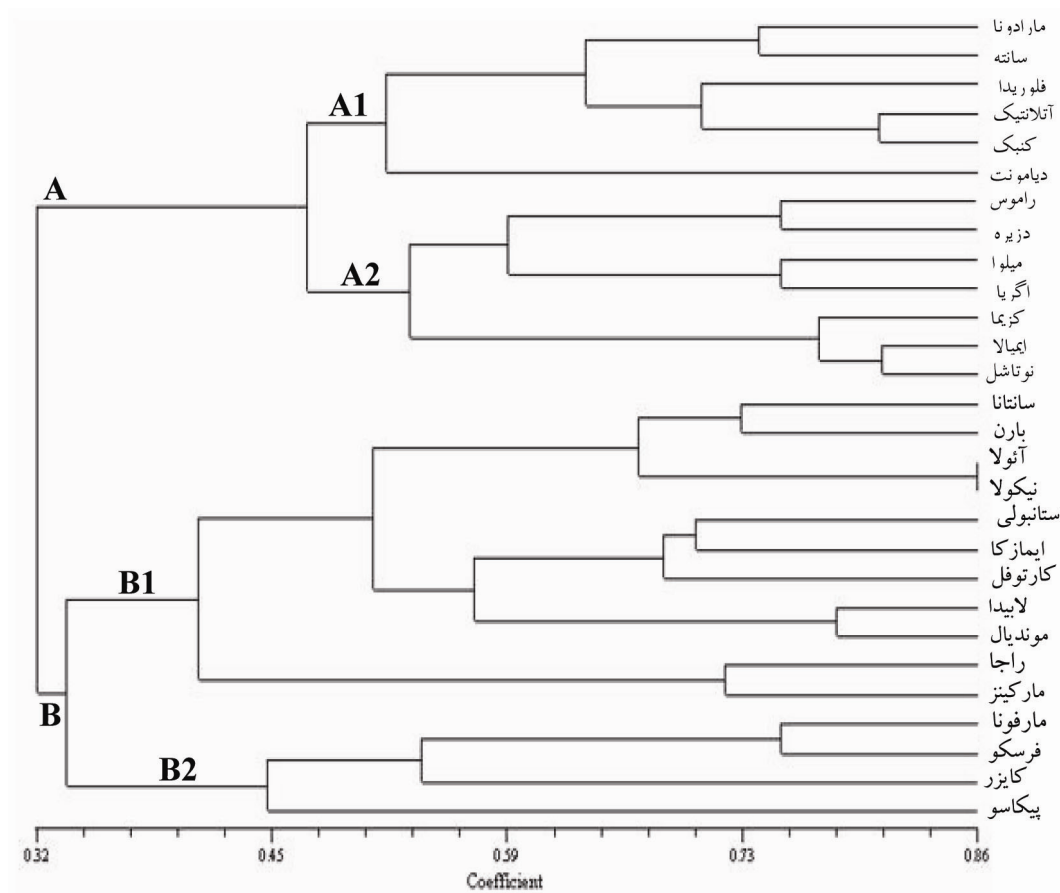
بر اساس دندروگرام رسم شده، سیب زمینی رقم استانبولی که منشا آن مشخص نیست در گروه ارقام اروپایی قرار گرفت. به دلیل سابقه کوتاه کشت سیب زمینی در ایران که عمدتاً از طریق کشورهای همسایه مانند روسیه و ترکیه معرفی شده و با توجه به توانایی نشانگرهای ملکولی در تمایز ارقام انگور (۳۹)، پسته (۱۵) و سیب زمینی (۶) 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 به دست آمده (شکل ۲)، در برخی از زیرگروه‌ها مطابقت‌هایی 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



شکل ۱. محصولات تکثیری ۲۸ رقم زراعی سیب زمینی با جفت آغازگر STM 0031 در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز 50 bp Ladder -M ۱- فلوریدا ۲- آتلانتیک ۳- سانتانا ۴- سانه ۵- مارادونا ۶- مارفونا ۷- راموس ۸- فرسکو ۹- پیکاسو ۱۰- دیامونت ۱۱- اگریا ۱۲- دزیره ۱۳- آتولا ۱۴- نیکولا ۱۵- استانبولی ۱۶- راجا ۱۷- کزیما ۱۸- مارکینز ۱۹- کایزر ۲۰- ایمازکا ۲۱- نوتاشل ۲۲- بارن ۲۳- میلوا ۱۴- لاییدا ۲۵- ایمپالا ۲۶- موندیال ۲۷- کارتوفل ۲۸- کنیک



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

زیادی برخوردار است. با تعیین دقیق اندازه آللی برای هر رقم از اطلاعات به دست آمده می توان به عنوان یک شناسنامه معتبر در کار شناسایی ارقام مشابه ظاهری، کلون های 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 اطلاع رسانی بالا، در مدیریت کلکسیون های ژرم پلاسِم سیب زمینی بسیار مفید است.

سپاسگزاری

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

مطالعات مربوط به شناسایی ارقام، انطباق اسامی مشابه واریته ها و نیز بررسی تنوع ژنتیکی و نقشه یابی ژنتیکی استفاده می شود. جفت آغازگرهای SSR مورد استفاده در این تحقیق که جهت انگشت نگاری ارقام سیب زمینی توسعه یافته اند (۲ و ۲۴)، قادر به تمایز کردن ۲۸ رقم سیب زمینی از یکدیگر بودند. به طوری که با در نظر گرفتن وضعیت ارقام در مکان های ژنی مختلف، مشاهده شد که ارقام در چند مکان دارای الگوی آللی متفاوت هستند که می توان از این اطلاعات آللی به عنوان نشانگر در شناسایی ارقام استفاده نمود. به عنوان مثال رقم استانبولی دارای الگوی آللی مشخصی است که از طریق آن می توان به راحتی این رقم را از سایر ارقام شناسایی کرد. این تمایز الگوی آللی به ویژه در تعیین خلوص ارقام سیب زمینی بذری از اهمیت

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 annuus* 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. Schachtschael, 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 *Pistacia 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.

17. Hoska, K., M. Mori and K. Ogawa. 1994. Genetic relationships of Japanese potato cultivars assessed 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-Marooif, 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.