مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۴، شماره ۴، سال ۱۳۸۲

بررسی تنوع ژنتیکی در برخی از ارقام تجاری سیب زمینی ایران با استفاده ازتکنیکRAPD-PCR

غلامرضا صالحی جوزانی[1] ، سیروس عبد میشانی[2] ، عبدالهادی حسین زاده [3] و بدرالدین ابراهیم سید طباطبائی[4]
۱، ۲، ۳، ٤، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استاد، استادیاران دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران
تاریخ پذیرش مقاله ۸۲/۳/۷

خلاصه

به منظور مطالعه چند شکلی های DNA در ۲۸ رقم سیب زمینی ایران غده های ارقام در گلخانه کشت و در مرحله ٤-۳ برگی، DNAی ارقام با روش دلاپورتا (مینی پرپ) از برگ استخراج و کمیت و کیفیت آنها به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد. برای انجام واکنش PCR، ۱۰۰ آغازگر تصادفی انتخاب و بر روی نمونه ها آزمایش گردیدند. شانزده آغازگر تکثیر DNA ی الگو را به خوبی انجام داده و بین ارقام چند شکلی نشان دادند. نوارهای با وضوح بالا و با اندازه مناسب (۲۴۰۰-۳۰۰ جفت باز) که دارای تکرار پذیری بالایی بودند، انتخاب و وارد محاسبات شدند. این ١٦ آغازگر به طور کلی تعداد ۱۹۰ نشانگر و ۱۸٥٤ نوار در کل ارقام تولید کردند. تجزیه خوشه ای ارقام براساس حضور باند(۱) و عدم حضور باند(۰) با استفاده از ضرایب تشابه جاکارد و ضریب تطابق ساده به روش UPGMA انجام گرفت. بیشترین تمایز ژنتیکی بین ارقام ولوکس و هرتا- ۲ و کمترین تمایز ژنتیکی بین ارقام هرتا - ۱ و هرتا - ۲ بدست آمد. در نتیجه محاسبات ضریب جاکارد و تطابق ساده در تجزیه خوشه ای ، ارقام به ترتیب در ۷و۴ گروه قرار گرفتند که این نشاندهنده حساسیت بالاتر ضریب جاکارد می باشد. نتایج این تحقیق تابعیت تنوع ژنتیکی از تنوع جغرافیایی در ارقام سیب زمینی را نشان داد و ارقام آمریکایی، هلندی و آلمانی در گروههای جداگانه قرارگرفتند. بنابراین می‌توان گفت که روش RAPD-PCR برای دسته بندی ژرم پلاسم و شناسایی گروههای هتروژن سیب زمینی مفید و یک تکنیک مؤثر در برنامه‌های اصلاحی این گیاه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: سیب زمینی، تنوع ژنتیکی، نشانگرهای مولکولی، RAPD, PCR, DNA

مقدمه

بشر قرن بیستم با تمام پیشرفتهای شگرف خود، هنوز از نظر تأمین مواد غذایی خود با مسایل عدیده ای مواجه است و این بدلیل رشد روزافزون جمعیت می باشد که بر اساس آمار FAO در سال ۲۰۰۰ نزدیک به هفت میلیارد نفر رسیده است(۱). یکی از روشهای مؤثر در مبارزه با فقر غذایی روش اصلاح نباتات می باشد، که فنی مبتنی بر علم ژنتیک در جهت افزایش محصولات غذایی است. یک اصلاح گر در صورتی شانس موفقیت در برنامه های اصلاحی خواهد داشت که امکان انتخاب مواد مناسب و تنوع کافی در اختیار داشته باشد. این تنوع هم به صورت طبیعی وجود دارد و هم به صورت مصنوعی می توان آن را ایجاد کرد. بطور کلی یکی از اولین قدمها در یک برنامه موفق بهنژادی، تشخیص صحیح ژنوتیپهای مطلوب است.

سیب زمینی با نام علمی *solanum tuberasum* گیاهی است یکساله و اتوتتراپلوئید که برای استفاده از غده زیرزمینی آن کشت می گردد. این گیاه بومی نیمکره غربی در کشورهای پرو و بولیوی می باشد و بعد از ذرت، دارای گسترده ترین توزیع در دنیا می باشد و در حدود ۱۴۰ کشور جهان در سطح وسیع کشت شده و می توان آنرا در گروه محصولات بسیار غنی از لحاظ مواد غذایی قرار داد(۳). خصوصیت مهم سیب زمینی در

مکاتبه کننده: عبدالهادی حسین‌زاده

جهت اصلاح آن تکثیر غیر جنسی آن می باشد که باعث تثبیت ژنتیکی است. بنابراین هرگونه گزینش از یک ژرم پلاسم، بدون تغییر خواهد ماند و می توان واریته های جدید را از نسل F1 تلاقیها گزینش نمود، که به این دلیل ارقام سیب زمینی به شدت هتروزیگوس هستند (۳، ۹).

برای شناسایی تنوع موجود در ژرم پلاسم و انتخاب ژنوتیپ های مطلوب نشانگرهای مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی وجود دارد. نشانگرهای مورفولوژیکی دارای معایب زیادی هستند از جمله اینکه تعداد آنها کم بوده و تحت تأثیر محیط قرار می گیرند و نیز دسترسی به آنها در زمانهای خاص مشکل می باشد. نشانگرهای بیوشیمیایی نیز اندک بوده و از تنوع محدودی برخوردارند(۲، ۵ ،۸).

برای اینکه یک نشانگر بتواند برای بررسی تنوع ژنتیکی مناسب باشد باید دارای چهار خصوصیت باشد که عبارتند از توارث پذیری، داشتن چند شکلی، سهولت در ارزیابی و اندازه‌گیری آن، قابلیت انتقال نتایج آن به مطالعات دیگر. باید توجه داشت که نشانگرهای مورفولوژیکی و بیوشیمیایی هر کدام به نوعی در این خصوصیات نقص دارند. ولی اخیرا نشانگرهای مولکولی DNA که اکثرا دارای هر چهار خصوصیت می باشند کاربرد و اهمیت چشمگیری برای بررسی تنوع ژنتیکی، تشخیص محل ژنها و ترسیم نقشه های ژنی پیدا کرده اند و این بدلیل بالا بودن دقت آنها، دسترسی آسان به آنها و آنالیز مستقیم خود ماده ژنتیکی می باشد(۶، ۷، ۸).

در بین نشانگرهای مولکولی به نظر می رسد که نشانگرهای RAPD[1] که بر اساس تکثیر قطعات تصادفی DNA با استفاده از روش PCR می باشند، پتانسیل بالقوه وسیعی برای کاربرد در بررسی تنوع ژنتیکی ارقام زراعی داشته و حداقل نیاز کمتری به تکنولوژی پیشرفته و میزان کار و هزینه در مقابل سایر نشانگرهای مولکولی دارند. هزینه تولید یک انگشت نگاری DNA از طریق هیبریداسیون ساترن[2] می تواند بسیار زیاد باشد، در صورتیکه این هزینه در RAPD بسیار کمتر است و از طرفی دستیابی به اطلاعات در RAPD بسیار سریعتر است و می تواند باRFLP[3] حتی در تجزیه و تحلیل ژنوم ها با سطوح بالای هتروزیگوتی (مثل سیب زمینی) رقابت کند. مهمترین دلایل برای هزینه کم و سادگی RAPD، عدم نیاز به طراحی آغازگر (بدلیل استفاده از آغازگرهای تصادفی) و عدم استفاده از مواد پر هزینه و خطرناک مثل مواد رادیو اکتیو می باشد(۱۱،۱۰،۴،۲).

بریان و همکاران (۱۹۹۹)، کاستیلو و همکاران(۱۹۹۸) ، دمک و همکاران(۱۹۹۶)، ساسینسکی و همکاران(۱۹۹۶) از RAPD برای بررسی میزان تنوع ژنتیکی ژرم پلاسمهای سیب زمینی استفاده کردند(۵، ۶،۹ و۱۶). از این نشانگر، سینروس و همکاران (۱۹۹۵) برای تعیین پلوئیدی در سیب زمینی ، دلریو و همکاران (۱۹۹۷) برای تعیین میزان تغییرات ژنتیکی (در طول زمان) در ژرم پلاسم موجود در بانک ژن و راسموسن و همکاران (۱۹۹۵) برای تعیین هیبریدهای سوماتیکی بدست آمده از سیب زمینی و گوجه فرنگی، استفاده کردند(۷، ۸ ، ۱۶). باید توجه داشت که علی رغم تکرار پذیری کم این مارکرها (۷۰ -۵۰ درصد)، همه این محققین در مورد ارزشمند بودن آنها در این ارزشیابی ها متفق بوده اند.

علیرغم اهمیت گیاه سیب زمینی در کشور ما متأسفانه این گیاه تاکنون مورد بی مهری اصلاح گران نبات قرار گرفته و کارهای بسیار کمی در جهت اصلاح ارقام آن در جهت سازگاری با شرایط آب و هوایی کشور و افزایش عملکرد صورت گرفته است. لذا در این تحقیق سعی شده گامی اولیه در جهت بررسی میزان تشابهات و تفاوتهای ژنتیکی ارقام تجاری معرفی شده به کشور برداشته شود. برای بررسی این تنوع ها با توجه به موارد ذکر شده در بالا و امکانات موجود سعی شد علیرغم تکرارپذیری کمتر RAPD از تکنیک RAPD- PCR برای این کار استفاده شود. به امیدآنکه در آینده بتوان از نتایج تحقیق در انجام برنامه های دو رگ گیری و هتروزیس استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

تعداد ۲۸ رقم تجاری سیب زمینی مورد کشت در ایران (جدول شماره۱) در اوایل تیر ۱۳۷۷ از بخش سیب زمینی و پیاز مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر و مرکز تحقیقات سیب زمینی واقع در همدان دریافت و در گلدانهای جداگانه در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران کشت گردیدند.

1. Random Amplified Polymorphic DNA
2.Southern Hybridization
3. Restriction Fragment Length Polymorphic

دی- ان-آ -ژنومی با وزن مولکولی بالا از ۰/۵ -۰/۳ گرم بافت تازه برگی از گیاهچه های ۱۵-۱۰ روزه به روش دلاپورتا[1] (مینی پرب) (۲، ۴، ۱۴) استخراج شد. غلظت و کیفیت DNA ی نمونه ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری درطول موجهای ۲۶۰،۲۸۰،۳۲۰ نانومتر تعیین گردید. دی-ان-آ هائی که از نسبت OD260[2] (جذب نورUV توسط محلول DNA در ۲۶۰ نانومتر) به OD280 (جذب نورUV توسط محلول DNA در۲۸۰نانومتر) معادل ۲-۱/۸برخوردار بودند،برای انجام PCR[3] مورد استفاده قرار گرفتند. غلظت DNA برحسب نانوگرم بر میکرولیتر از فرمول زیر محاسبه شد (۲، ۱۵،۱۷) :

غلظتDNA = OD260 × فاکتور رقت × ۵۰

جدول ۱ –خصوصیات مورفولوژیک و شجره ارقام سیب زمینی

ردیف	رقم	خاستگاه	رنگ‌غده	رنگ‌گل	رسیدگی‌میوه	ت شاخه‌در بوته	تیپ بوته	والدین
۱	ایلونا	هلند	سفید	سفید	زودرس	۴-۵	نیمه ایستاده	
۲	ریمارکا	هلند	سفید	سفید	نیمه دیررس	۵-۶	ایستاده	Edzina & SVPSM66-42
۳	کارلیتا	هلند	سفید	بنفش	نیمه دیررس	۵-۶	ایستاده	
۴	پیکاسو	هلند	سفید	بنفش	نیمه زودرس	۶-۷	نیمه ایستاده	Cara & Ausonia
۵	بینلا	هلند	سفید	بنفش	زودرس	۴-۵	نیمه خوابیده	
۶	لسیتا	هلند	سفید	سفید	نیمه زودرس	۴-۵	ایستاده	Spunta & Svpre66-295
۷	ولوکس	آلمان	سفید	سفید	نیمه زودرس	۳-۴	نیمه خوابیده	
۸	اتیکا	آلمان	سفید	سفید	زودرس	۴-۵	خوابیده	
۹	کنکورد	هلند	سفید	سفید	نیمه زودرس	۵-۶	نیمه خوابیده	SVPY66-13 & M69-864
۱۰	ایمپالا	هلند	سفید	سفید	زودرس	۵-۶	نیمه ایستاده	ZBMSZ72 & Birano
۱۱	کنبک	آمریکا	سفید	سفید	نیمه دیررس	۵-۶	ایستاده	Chipewa & Katahdin
۱۲	سانته	هلند	سفید	سفید	نیمه زودرس	۴-۵	ایستاده	SSVPY66-13 & SSVPAM66
۱۳	موندیال	هلند	سفید	سفید	نیمه دیررس	۵-۶	نیمه ایستاده	Spunta & SVPAME66
۱۴	نووستیا	هلند	سفید	سفید	نیمه زودرس	۳-۴	نیمه ایستاده	Dijkhuis61-133
۱۵	هرتا-۱	هلند	سفید	سفید	نیمه دیررس	۴-۵	نیمه ایستاده	Dijkhuis61-133
۱۶	هرتا-۲	هلند	سفید	سفید	نیمه دیررس	۴-۵	نیمه ایستاده	Dijkhuis61-133 & Konst62
۱۷	جونیور	هلند	سفید	سفید	نیمه زودرس	۵-۶	ایستاده	
۱۸	رومانو	هلند	قرمز	سفید	نیمه زودرس	۳-۴	نیمه ایستاده	Draga & Desire
۱۹	فرسکو	هلند	سفید	سفید	نیمه زودرس	۴-۵	ایستاده	Cebeco6015-28 & Provita
۲۰	اژاکس	هلند	سفید	سفید	نیمه زودرس	۵-۶	نیمه خوابیده	Froma & Mpil9268
۲۱	اجیبا	هلند	سفید	سفید	نیمه دیررس	۴-۵	نیمه ایستاده	Aminka & Ve704
۲۲	دزیره	هلند	قرمز	بنفش	نیمه زودرس	۴-۵	نیمه خوابیده	Urgent & Depeche
۲۳	M.N	هلند	سفید	سفید	نیمه زودرس	۳-۴	نیمه خوابیده	Primura & Konst51-123
۲۴	مارفونا	هلند	سفید	سفید	زودرس	۴-۵	خوابیده	
۲۵	اگریا	هلند	سفید	سفید	دیررس	۶-۷	ایستاده	Quara & Semio
۲۶	رومینا	هلند	سفید	سفید	نیمه زودرس	۴-۵	خوابیده	
۲۷	دیامونت	هلند	سفید	بنفش	نیمه دیررس	۴-۵	ایستاده	
۲۸	تیماته	هلند	قرمز	سفید	نیمه زودرس	۴-۵	ایستاده	Ejvira & SVPAM66-42

1. Delaportya
2. Optimom Dense of 260
3. Polymerase Chain reaction

تعداد ۸۰ آغازگر تصادفی تولیدی شرکت برتیش کلمبیای کانادا[1] و ۲۰ آغازگر اپرون سری A [2] مورد استفاده قرار گرفت. برای انجام واکنش ۲۵ میکرولیتری RAPD از بافر۱۰X(۲/۵ میکرولیتر)،کلرید منیزیم (۵۰ میلی‌مول به مقدار ۰/۵۷ میکرولیتر)، dNTP [3] (۱/۲۵ میلی مول ، ۳/۵ میکرولیتر)، آغازگر (۰/۲ میکرومول ، یک میکرولیتر)، تک پلیمراز[4] (۵ واحد در ۱۰۰ میکرو لیتر، ۰/۲ میکرولیتر)، آب دو بار تقطیر(۱۲/۲۳ میکرولیتر)و ۵ میکرولیتر DNA (۵ نانوگرم در میکرولیتر) استفاده شد و در نهایت برای جلوگیری از تبخیر ۲۵ میکرولیتر روغن معدنی به هر تیوپ واکنش اضافه شد (۱۷،۱۶،۱۳،۲).

برای شروع واکنش PCR، از ۴۵ چرخه حرارتی استفاده شد که هر چرخه شامل یک دقیقه دمای ۹۲ درجه سانتیگراد برای تغییر طبع DNA [5]، ۲ دقیقه دمای ۲۵ درجه برای اتصال آغازگر[6] و ۱۲ دقیقه دمای ۷۲ درجه برای انجام بسطDNA [7] بود. ضمنا قبل از شروع چرخه اول برای تغییر طبع اولیه ۲ دقیقه دمای ۹۳ درجه داده شد و بعد از انجام آخرین چرخه ۱ دقیقه دمای ۳۵ درجه برای تکمیل اتصال آغازگرها و ۵ دقیقه دمای ۷۲ درجه به منظور تکمیل بسط استفاده شد(۱۷،۱۶،۱۵).

بعد از تکثیر نمونه‌ها توسط ترموسایکلر و به منظور آشکارسازی چند شکلی بین نمونه‌ها از دستگاه الکتروفورز عمودی با ژل اکریل آمید ۶ درصد استفاده شد. مدت زمان الکتروفورز ۲/۵ ساعت با ولتاژثابت ۲۰۰ بود. بعد از انجام الکتروفورز، ژلها به مدت ۳۰ دقیقه در محلول اتیدیوم برماید ۰/۵ میکروگرم برمیکرولیتر رنگ آمیزی شدند و سپس سه باربا آب معمولی شسته و با استفاده از دستگاه ترانس لومیناتور نوارها قابل رویت شدند (۱۲،۴،۲، ۱۳). به منظور عکسبرداری از ژل از دستگاه کامپیوتری فیلمبرداری با سیستم UVP[8] استفاده شد. برای بررسی چند شکلی بین ارقام، تنها نتایج آغازگرهایی وارد آنالیز شد که از تکرار پذیری بالایی برخوردار و دارای اندازه بالاتر از ۳۰۰ جفت باز بودند. اندازه قطعات موجود به وسیله لگاریتم اندازه نوارهای مارکر (Y) و فاصله نوارهای مارکر از ته چاهک (X) و تشکیل معادله خط رگرسیون محاسبه گردید(۱۲،۲، ۱۴). داده‌های کمی حاصله (اندازه نوار)، به صورت داده های کیفی تبدیل شدند، به حضور یک باند خاص عدد ۱ و به عدم حضور آن عدد صفر داده شد. بعد از تشکیل رتبه های صفر و یک، ماتریس تشابه ارقام با استفاده از نرم افزار SPSS به وسیله ضریب تشابه جاکارد[9] محاسبه شد. این ضریب بهترین ضریب برای بررسی میزان تنوع ژنتیکی بدست آمده از نشانگرهای غالب است زیرا که شباهت را براساس وجود نوار گروهبندی می‌کند(۱۷،۱۶،۱۵،۹). برای مقایسه نتایج این ضریب با ضرایب دیگر از ضریب تطابق ساده[10] که شبیه ضریب تشابه نی عمل می کند، استفاده شد. این ضریب میزان تشابه را براساس وجود یا عدم وجود نوار بین دو رقم اندازه گیری می کند(۱۳، ۱۴، ۱۵). در نهایت تجزیه خوشه ای براساس دو ضریب نامبرده شده بدست آمد.

نتایج و بحث

از یکصد آغازگر مورد بررسی، تنها ۲۵ آغازگر تولید نوار کردند (این می‌تواند بدلیل کهنگی آغازگرها باشد، که باعث کاهش میزان فعالیت بعضی از آنها شده بود). از این ۲۵آغازگر ۵ تا تولید باندهایی نمودند که هیچگونه چند شکلی بین ارقام نشان ندادند و ۴ آغازگر نیز باندهای ضعیف غیر قابل تکراری را تولید کردند، بنابراین تنها ۱۶ آغازگر تولید نوارهای با وضوح و تکرار پذیری بالا نمودند، که بین ارقام چند شکلی نشان دادند. این آغازگرها عبارت بودند از:

OP9,OP20,OP18,OP10,OP8,UB96,UB95,UB91,UB79,UB89,UB78,UB76,UB74,UB25,UB16,UB18.

شکل شماره ۱ عکسهای الکتروفورگرام حاصل از چند ژل را نشان می دهد. نشانگرهای تولید شده در ۲۸ رقم (بزرگتر از ۳۰۰ جفت باز) ۱۹۴ عدد (جدول شماره۲) و کل نوارهای تولید شده ۱۸۵۴ عدد بود، که بیشترین نوار را آغازگر UB79 (۲۰۰ نوار) و کمترین نوار را آغازگر UB78 (۴۸ نوار) برای ۲۸ رقم تولید نمودند. متوسط باندهی برای هرآغازگر در ۲۸ رقم ۱۱۶ نوار بود.

1. British Coloumbia University
2. Operon Set A
3. Deoxy Nucleotide Triphosphate
4. Taq Polymerase
5. Denaturation of DNA
6. Annealing of Primer
7. Extention
8. Ultraviolet Video Playback System
9. Jaccard,s Similarity Coefficient
10. Simple Matching Similarity Coefficient

شکل ۱- نمایش برخی از ژلهای بدست آمده در ارقام سیب زمینی از طریق مارکرهای RAPD

جدول ۲ - فراوانی تعداد نشانگرهای تولید شده در ۲۸ رقم سیب زمینی برای ۱۶ آغازگر

پرایمر / وزن مولکولی قطعه*	UB ۱۶	UB18 ۱۶	UB ۲۵	UB ۷۴	UB ۷۶	UB ۷۸	UB ۷۹	UB ۸۹	UB ۹۱	UB ۹۵	UB ۹۶	OP ۸	OP ۹	OP ۱۰	OP ۱۸	OP ۲۰	کل
۳۰۱-۷۰۰	۳	۴	۳	۳	۱۲	۲	۶	۷	۱۰	۷	۵	۸	۵	۸	۶	۶	۹۵
۷۰۱-۱۱۰۰	۲	۳	۱	۳	۴	۰	۲	۳	۴	۳	۳	۳	۳	۴	۲	۳	۴۳
۱۱۰۱-۱۵۰۰	۱	۲	۱	۳	۳	۰	۲	۳	۱	۲	۵	۳	۲	۲	۱	۲	۳۳
۱۵۰۱-۱۹۰۰	۰	۲	۰	۱	۱	۰	۱	۱	۲	۲	۲	۰	۱	۱	۱	۲	۱۷
۱۹۰۱-۲۳۰۰	۰	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۱	۲	۰	۱	۰	۰	۰	۰	۱	۶
کل	۶	۱۱	۶	۱۰	۲۰	۲	۱۱	۱۵	۱۰	۱۴	۱۶	۱۴	۱۱	۱۵	۱۰	۱۴	۱۹۴

*وزن مولکولی با استفاده از نشانگر اندازه pBR322 و Hind III تعیین شده است.

ضریب تشابه جاکارد مشخص کرد(جدول۳) که بیشترین تشابه ژنتیکی بین ارقام هرتا-۱ با هرتا-۲ و فرسکو با آجیبا وجود دارد(۶۴ درصد)، که بالا بودن میزان شباهت هرتا- ۱ و هرتا-۲ از قبل قابل انتظار بود، زیرا که این دو رقم لاینهای خواهری حاصل از تلاقی ارقام دیجکیوس ۶۱-۱۳۳-۳ و کونست ۶۲-۳۷۴ [1] می‌باشند. زیاد بودن میزان شباهت بین دو رقم هلندی فرسکو و آجیبا نیز مبین این قضیه می تواند باشد که

1. Dijkhius61-133-3 x Konst62-3741

این دو رقم احتمالا دارای اجداد یکسانی بوده اند. ضمن این که باید توجه نمود که نشانگرهای مولکولی از جمله RAPD می‌توانند تشابهات ژنتیکی را در سطح قسمتهای ژنومی بدون رمز نیز نشان دهند. یعنی اینکه ممکن است دو رقم از لحاظ خصوصیات ظاهری متفاوت بوده باشند ولی از لحاظ کل ژنوم با هم شباهت زیادی داشته باشند(حدود ۹۵ درصد کل ژنوم بدون رمز است). ضمنا این دو رقم از لحاظ خصوصیات مورفولوژیکی نیز بسیار شبیه هستند(۱۵،۸،۱۴). کمترین تشابه ژنتیکی نیز بین دو رقم ولوکس (رقم آلمانی) و رقم هرتا-۲ (رقم هلندی) بدست آمد (۱۶ درصد)، که این میزان نشاندهنده این است که دو رقم دارای اختلاف ژنتیکی زیاد می باشند. لذا می توان این ارقام را در صورت مطابق بودن صفات مورد اصلاح ، به عنوان والد در برنامه های دو رگ گیری برای اصلاح ارقام سیب زمینی و بدست آوردن حداکثر هتروزیس در جهت سازگاری بیشتر با شرایط کشور استفاده نمود.

نتایج ضریب تطابق ساده(جدول شماره۴)، به طور کامل نتایج ضریب تشابه جاکارد را نشان نمی‌دهد، به این ترتیب که در نتایج این ضریب بیشترین تشابه بین ارقام رومانو و جونیور به میزان ۸۳ درصد(در صورتیکه میزان شباهت آنها بر اساس ضریب جاکارد۶۰ درصد بود) و کمترین تشابه بین دو رقم ولوکس و دیاموند (۴۸ درصد) بدست آمد (در ضریب جاکارد این میزان ۱۹ درصد بود) و از طرفی میزان عددی شباهت ارقام را نسبت به ضریب جاکارد بالاتر نشان می‌دهد، چون همان طوریکه گفته شد این ضریب جفتهای صفر- صفر را شباهت حساب می‌کند، یعنی عدم وجود یک نوار خاص بین دو رقم را نیز به عنوان شباهت در نظر می‌گیرد. بنابراین با توجه به نتایج بدست آمده، مشخص می‌شود که ضریب تشابه جاکارد دارای حساسیت بالاتری نسبت به ضریب تطابق ساده در گروه‌بندی ارقام است چون جفت صفر-صفر را شباهت در نظر نمی‌گیرد.

دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه ای به روش UPGMA[1] براساس ضرایب جاکارد و ضرایب تطابق ساده در شکل ۲ آمده است. بهترین محل برش در دندروگرام حاصل از ضریب جاکارد در محل فاصله ژنتیکی ۲۰-۱۵ بود. براین اساس ۷ گروه حاصل شد: گروه اول شامل ارقام فرسکو، آجیبا، آژاکس، جونیور، رومانو، مارفونا، اگریا، هرتا-۱، هرتا-۲، دیاموند، تیماته، دزیره، M.N و رومینا بود، که همه این ارقام هلندی بوده و دارای خصوصیات ظاهری متشابه نیز بودندوباید توجه داشت که چند تا از این ارقام لاینهای خواهری و نیمه خواهری بودند. گروه دوم شامل ارقام سانته و نووستیا بود که هر دورقم هلندی بوده ودارای خصوصیات مورفولوژیکی مشابه بودند. گروه سوم شامل ارقام پیکاسو،ایلونا،کارلیتا و ریمارکا بود، که این ارقام نیز هلندی بودند. گروه چهارم فقط شامل رقم موندیال بود، که این نشاندهنده وجود اختلاف زیاد بین توالی ژنومی این رقم باسایر ارقام است. گروه پنجم شامل ارقام لسیتا، ولوکس، بینلا، آتیکا و کنکورد بود. این گروه شامل ارقام هلندی وآلمانی هستند وباید توجه داشت که در این گروه دورقم آلمانی یعنی ولوکس وآتیکا در یک زیرگروه مجزا قرارگرفتند. گروه ششم شامل رقم ایمپالا وگروه هفتم شامل یک‌رقم قدیمی‌تجاری‌آمریکا به نام‌کنبک بود.

تجزیه خوشه‌ای ضریب تطابق ساده در همان محل برش، ارقام را به ۴ گروه تقسیم‌بندی کرد، که این نشاندهنده حساسیت کم آن است. نتایج این تحقیق، نتایج دمک و همکاران (۱۹۹۶)، هوساکا و همکاران(۱۹۹۴) و کاستیلو و همکاران (۱۹۹۸) مبنی بر اینکه تنوع ژنتیکی ارقام سیب زمینی از تنوع جغرافیایی آنها تبعیت می کند و RAPD قابلیت خوبی در نشان دادن اختلافات لاینهای خواهری و ارقام مختلف دارد، تأیید می کند(۶، ۹، ۱۰، ۱۱). چرا که ارقام هلندی، آلمانی و آمریکایی در گروههای جداگانه قرار گرفتند. از بررسی‌های انجام شده برای گروهبندی ارقام سیب زمینی تجاری ایران چنین استنباط می‌شود، که تنوع ژنتیکی موجود در آنها، بسیار مناسب می‌باشد، به طوریکه در آینده می‌توان با برنامه‌های اصلاحی مناسب در جهت افزایش عملکرد، کیفیت و سازگاری این گیاه در کشور، گام‌های اساسی برداشت، به این ترتیب که به هنگام اصلاح یک صفت خاص، می‌توان از رقمی که دارای صفت مذکور می‌باشد و اختلاف ژنتیکی بالا با رقم مورد اصلاح دارد، در برنامه دورگ‌گیری استفاده کرد. همچنین می‌توان گفت که روش RAPD- PCR به همراه روشهای چند متغیره آماری مثل تجزیه خوشه‌ای، پتانسیل قابل توجهی جهت بررسی روابط خویشاوندی، سیر تکاملی، تنوع ژنتیکی و جغرافیایی گیاهان دارد.

1.Unweighted Paired Group Method Using AritmaticAverage

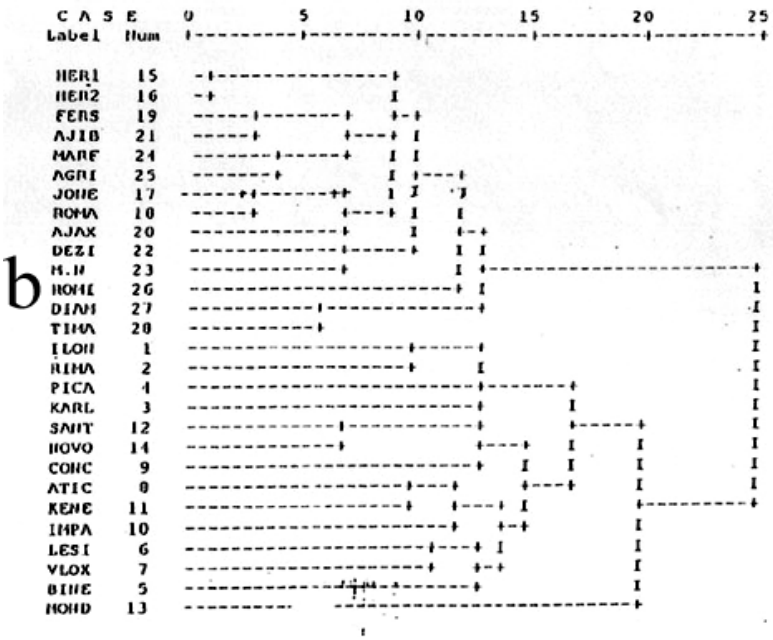
جدول ۳- ضرایب تشابه جاکارد بین ۲۸ رقم سیب زمینی تجاری ایران

case	Jaccard Measure																										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
1	1.00																											
2	.425	1.00																										
3	.457	.436	1.00																									
4	.492	.412	.468	1.00																								
5	.383	.341	.381	.357	1.00																							
6	.392	.306	.368	.400	.435	1.00																						
7	.352	.330	.308	.340	.395	.443	1.00																					
8	.372	.359	.363	.439	.432	.416	.375	1.00																				
9	.337	.270	.360	.423	.382	.398	.256	.376	1.00																			
10	.305	.297	.224	.343	.312	.256	.343	.351	.314	1.00																		
11	.293	.276	.257	.316	.373	.373	.263	.403	.313	.358	1.00																	
12	.339	.274	.386	.347	.376	.376	.318	.254	.367	.217	.203	1.00																
13	.362	.236	.383	.360	.354	.320	.297	.287	.309	.260	.242	.315	1.00															
14	.390	.250	.233	.275	.353	.369	.250	.267	.209	.216	.244	.422	.368	1.00														
15	.229	.250	.302	.217	.302	.283	.144	.306	.234	.208	.230	.278	.217	.285	1.00													
16	.268	.247	.300	.229	.300	.287	.168	.233	.247	.198	.240	.250	.252	.329	.640	1.00												
17	.229	.233	.271	.236	.305	.257	.200	.244	.235	.196	.240	.245	.282	.263	.512	.467	1.00											
18	.224	.204	.282	.222	.320	.257	.206	.254	.266	.190	.279	.270	.200	.251	.512	.518	.802	1.00										
19	.193	.231	.280	.264	.314	.302	.220	.307	.285	.185	.212	.255	.257	.287	.489	.447	.538	.523	1.00									
20	.234	.205	.264	.270	.295	.306	.197	.275	.295	.225	.233	.287	.252J	.280	.488	.490	.579	.533	.589	1.00								
21	.255	.223	.230	.700	.259	.321	.229	.314	.272	.248	.271	.316	.283	.295	.494	.453	.559	.545	.640	.545	1.00							
22	.198	.275	.306	.250	.296	.284	.239	.252	.272	.248	.245	.250	.274	.281	.482	.394	.559	.447	.490	.545	.591	1.00						
23	.183	.191	.273	.244	.270	.270	.183	.262	.211	.224	.242	.212	.250	.253	.506	.511	.553	.473	.515	.540	.536	.555	1.00					
24	.2288	.233	.220	.328	.769	.259	.211	.248	.219	.185	.202	.226	.226	.290	.529	.500	.511	.462	.554	.531	.576	.510	.521	1.00				
25	.238	.268	.306	.235	.223	.259	.232	.286	.281	.218	.267	.230	.283	.353	.563	.494	.505	.542	.533	.480	.591	.474	.464	.593	1.00			
26	.235	.221	.302	.224	.227	.278	.243	.269	.229	.231	.250	.251	.291	.260	.506	.462	.505	.457	.489	.438	.475	.446	.441	.474	.500	1.00		
27	.245	.261	.225	.780	.240	.240	.189	.241	.225	.185	.211	.227	.262	.231	.416	.495	.449	.490	.431	.455	.435	.491	.529	.435	.456	.454	1.00	
28	.244	.2755	.306	.292	.221	.251	.205	.276	.272	.180	.232	.202	.283	.230	.478	.500	.528	.511	.446	.443	.451	.510	.552	.422	.469	.446	.612	1.00

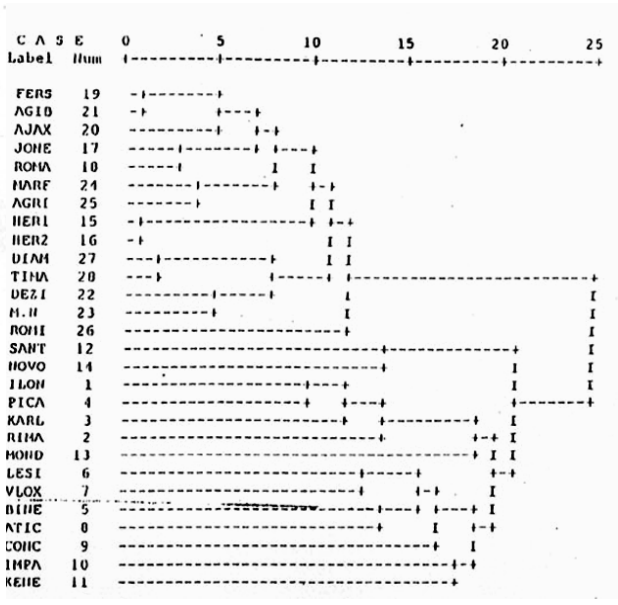
جدول ۴- ضرایب تشابه تطابق ساده بین ۲۸ رقم سیب زمینی تجاری ایران

case	Simple Matching Measure																										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
1	1.00																											
2	.758	1.00																										
3	.732	.721	1.00																									
4	.753	.700	.695	1.00																								
5	.695	.684	.658	.658	1.00																							
6	.716	.663	.647	.668	.726	1.00																						
7	.700	.689	.611	.632	.711	.742	1.00																					
8	.714	.704	.656	.709	.735	.425	.709	1.00																				
9	.700	.658	.663	.705	.711	.721	.705	.720	1.00																			
10	.672	.672	.635	.646	.661	.693	.698	.723	.688	1.00																		
11	.695	.684	.605	.647	.726	.726	.732	.757	.711	.746	1.00																	
12	.711	.679	.705	.663	.721	.721	.695	.720	.737	.704	.721	1.00																
13	.684	.663	.658	.626	.684	.632	.626	.619	.647	.608	.521	.668	1.00															
14	.753	.668	.663	.611	.711	.721	.653	.667	.705	.640	.689	.789	.688	1.00														
15	.605	.637	.611	.526	.647	.616	.568	.667	.621	.598	.647	.674	.711	.746	1.00													
16	.621	.611	.595	.521	.632	.621	.532	.608	.616	.571	.642	.737	.737	.704	.721	1.00												
17	.574	.584	.547	.505	.616	.574	.537	.582	.600	.545	.616	.611	.647	.608	.621	.668	1.00											
18	.600	.589	.584	.521	.653	.611	.574	.619	.637	.571	.674	.658	.537	.6580	.795	.789	.826	1.00										
19	.534	.576	.553	.532	.621	.611	.553	.630	.605	.534	.589	.616	.558	.647	.763	.726	.874	.779	1.00									
20	.584	.532	.516	.516	.584	.595	.505	.582	.611	.545	.584	.621	.532	.621	.737	.742	.789	.774	.795	1.00								
21	.568	.500	.595	.521	.553	.621	.563	.630	.605	.582	.632	.658	.568	.647	.763	.726	.784	.789	.832	.763	1.00							
22	.579	.611	.574	.511	.600	.589	.563	.577	.605	.582	.611	.605	.568	.637	.742	.684	.784	.726	.737	.763	.800	1.00						
23	.532	.532	.537	.505	.574	.574	.505	.582	.547	.561	.605	.568	.542	.611	.768	.763	.779	.742	.753	.758	.763	.774	1.00					
24	.532	.584	.495	.474	.584	.584	.547	.582	.568	.534	.684	.674	.532	.653	.789	.763	.758	.742	.784	.758	.795	.753	.758	1.00				
25	.589	.621	.595	.521	.653	.600	.584	.630	.637	.582	.653	.689	.600	.711	.816	.768	.763	.800	.779	.732	.811	.737	.742	.816	1.00			
26	.568	.579	.574	.489	.632	.589	.574	.598	.574	.577	.621	.637	.589	.626	.744	.737	.753	.737	.726	.689	.726	.705	.700	.732	.758	1.00		
27	.537	.568	.563	.500	.516	.516	.479	.534	.532	.487	.547	.563	.526	.563	.689	.737	.689763	.737	.674	.679	.674	.716	.742	.679	.705	.695	1.00	
28	.579	.611	.574	.553	.621	.558	.532	.598	.605	.519	.600	.563	.558	.595	.753	.758	.763	.768	.705	.689	.705	.747	.774	.689	.747	.705	.800	1.00

b



a



شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس (a) ضرایب تشابه جاکارد و (b) ضرایب تشابه جفت شدن ساده، در ۲۸ رقم سیب زمینی

مراجع مورد استفاده REFERENCES

۱. بابایی،گ،م،۱۳۷۴. بررسی فقر غذایی و گرسنگی در جهان. مجموعه خلاصه مقالات روز جهانی غذا، دفتر سازمانهای بین المللی و منطقه ای وزارت کشاورزی.

۲. بهنام،ب، ۱۳۷۶. استفاده از تکنیک RAPD-PCR برای تعیین پلیمورفیسم در بین برخی ارقام جو ایرانی و گندمهای دوروم ایتالیایی. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران.

۳. رضایی،ع،م و ا، سلطانی، ۱۳۷۵. زراعت سیب زمینی، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.

۴. سعیدی، ز، ۱۳۷۶ . بررسی چند شکلی های DNA بین جمعیت های سن گندم در ایران با استفاده از تکنیک RAPD- PCR. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران.

5. Bryan, G., J. Provan & J. McNicoll. 1999. Tools for assessing genetic diversity in potato and other *solanaceae* plant species, Plant & Genome Conference, Sandiego,Ca. USA.
6. Castillo, R. & D. M. Spooner. 1998. Phylogenetic relationships of wild potatoe, *Solanum* series conicibaccata, Agricultural Research Service, TEKTRAN.
7. Cisneros, P.L., & C. F. Guiros. 1995. Variation and phylogeny of the triploid cultivated potato *Solanum chuacha* based on RAPD and isoenzyme markers. Genetic Resources and Crop Evolution. 42(4): 375-386
8. DelRio, A.H, J. B. Bambery, Z. Huamon & A. Salas. 1997. Assessing changes in the genetic diversity of potato gene banks.1) Effects of seed increasing, 2) Insito vs ex-sito, Theor. Appl. Genet., 95: 191-204.
9. Demeke, T., D. R. Lynch & L. M. Kawchuck. 1996. Genetic diversity of potato determined by RAPD analysis, Plant Cell Report, 15: 662-667.
10. Hosaka, K. & K.Ogawa.1994. Genetic diversity in Japanesis and North American potato cultivars evaluated by RAPD analysis, Science Report of Facualty of Agriculture, Kobe University , 21(1):30-42
11. Hosaka, K., M. Mori & K. Ogawa. 1994. Genetic relationship of Japan's potato cultivars assessed by RAPD analysis. Amer Potato Jour., 71(8): 535-546.
12. Martin, R. 1996. Gel electrophoresis nucleic acid. Bios Scientific Publishers. Oxford, UK.
13. Newton, C. & A. Groham. 1994. PCR, Bios Scientific Publishers. Oxford, UK.
14. Oganisyan, A., S. Ezkochieva, & A. P. Ryskov. 1996. Fingerprinting potato species and cultivars using the RAPD-PCR method. Genetika Moskva, 32(3): 448-451.
15. Paz, M. M. & R. E.Veillux. 1998. Genetic diversity based on RAPD and it`s relationship with the performance of diploid potato hybrids. Jour Amer Hort. Science. 122(6): 740-747.
16. Rasmussen. J. O. & O. S. Rasmussen. 1995. Characterisation of somatic hybrids of potato by use of RAPD markers and Isozyme analysis, Physiologica Plantarum, 93:357-394.
17. Sosinnski. B. & D. S. Douches. 1996. Using PCR-based DNA amplification to fingerprinting north american potato cultivars, Hort. Science, 31(1): 130- 133.

Genetic Diversity Analysis of Commercial Potato Cultivars (*Solanum tuberosum*) in Iran Using RAPD-PCR Technique

GH. R. SALEHI JOZANI[1], S. ABD-MISHANI[2], A. H. HOSEINZADEH[3], AND B. E. SEIED TABATABAEI[4]

1, 2, 3, 4, Former Graduate Student, Professor and Assistant Professors, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran

Accepted May. 28, 2003

SUMMARY

The RAPD procedure was used to evaluate genetic diversity of 28 commercial potato cultivars in Iran. DNA of genotypes was extracted from leaves at 3-4 leafy stage by miniprep method. One hundred decamer primers were selected randomly and tested on each sample genotype. Sixteen primers yielded 194 polymorphic DNA fragments (marker), ranging in size from 300 to 2400 bp. A total of 1854 bands were observed among the 28 potato genotypes. Cluster analysis of cultivars was performed based on presence (1) and absence (0) of bands using Jaccards (j.s.c) and Simple Matching Similarity Coefficient (S.M.S.C.) by UPGMA method. These analyses indicated that the greatest genetic difference & similarity was between vlox & herta-2 and herta-1 & herta-2 (plus fersco & ajiba), respectively. Cluster analysis of j.s.c. indicated 7 groupe and that of S.M.S.C indicated 4 groups. Therefore, it was concluded that, j.s.c is more sensitive than S.M.C and is more suitable for comparing cultivar bands produced by RAPD. It was concluded that genetic diversity of potato cultivars was related to their geographical distance and RAPD is useful for classification of germplasm as well as identification of divergent groups.

Key words : Genetic diversity, Polymorphism, PCR , RAPD, Potato.