بسم الله الرحمن الرحيم

همه امتیازات این پایان نامه به دانشگاه لرستان تعلق دارد. در صورت استفاده از تمام یا بخشی از مطالب در مجلات، سمینارها یا سخنرانی ها، باید نام دانشگاه لرستان (استاد یا اساتید راهنمای پایان نامه) و نام دانشجو با ذکر مأخذ و ضمن کسب مجوز از دفتر تحصیلات تکمیلی دانشگاه ثبت شود در غیر این صورت مورد پیگرد قانونی قرار خواهد گرفت.

دانشگاه لرستان

دانشکده کشاورزی

عنوان پایان نامه:

بررسی تنوع سوماکلونال در کلونال های حاصل از ریزازدیادی ارقام سیب زمینی (*Solanum tuberosum*) با استفاده از نشانگرهای MSAP

نگارش:

محسن حسینی

اساتید راهنما:

دکتر فرهاد نظریان فیروزآبادی

دکتر محمود اطرشی

اساتید مشاور:

دکتر احمد اسماعیلی

دکتر هادی احمدی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته اصلاح نباتات

بهمن ماه ۱۳۹۳

شماره: .....
تاریخ : .....
پیوست: .....

بسمه تعالی

دانشگاه لرستان
مدیریت تحصیلات تکمیلی

صورتجلسه ارزشیابی پایان نامه دوره کارشناسی ارشد

پایان نامه آقای **محسن حسینی** به شماره دانشجویی **۹۱۳۰۱۳۳۰۰۳** با عنوان: **" بررسی تنوع سوماکلونال در کلونال های حاصل از ریز ازدیادی ارقام سیب زمینی با استفاده از نشانگر MSAP"** در ساعت **۱۰** مورخ **۹۳/۱۱/۲۷** در دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان ارائه گردید و تصمیمات ذیل اتخاذ شد:

۱ . پایان نامه با نمره **۱۸/۸۰ (هجده و هشتاد صدم)** در رشته: مهندسی زراعت و اصلاح نباتات مورد تصویب هیأت داوران قرار گرفت و مقرر گردید دانشجو در اسرع وقت ظرف مدت یک ماه اشکالات ذکر شده به شرح پیوست توسط هیأت داوران را برطرف نموده و به تأیید استاد راهنما برساند.

اعضاء هیأت داوران

۱-استاد راهنما اول:	دکتر فرهاد نظریان	مرتبه علمی:	دانشیار	امضاء
۲-استاد راهنما دوم:	دکتر محمود اطرشی	مرتبه علمی:	استادیار	امضاء
۳-استاد مشاور اول:	دکتر احمد اسماعیلی	مرتبه علمی:	استادیار	امضاء
٤- استاد مشاور دوم:	دکتر هادی احمدی	مرتبه علمی:	استادیار	امضاء
۵-استاد داور اول:	دکتر بهمن زاهدی	مرتبه علمی:	استادیار	امضاء
۶- استاد داور دوم:	دکتر سهیلا افکار	مرتبه علمی:	استادیار	امضاء
۷-نماینده تحصیلات تکمیلی دانشکده(استاد ناظر)	دکتر علی کیانی	مرتبه علمی:	استادیار	امضاء

مدیر گروه مهندسی زراعت و اصلاح نباتات
دکتر فرهاد نظریان

مدیر تحصیلات تکمیلی دانشکده کشاورزی
دکتر علی کیانی

رییس دانشکده کشاورزی
دکتر جهانشیر شاکرمی

مدیر تحصیلات تکمیلی دانشگاه لرستان
دکتر بهمن عضدی

چکیده

تکنیک کشت بافت به طورگسترده برای تکثیر کلونال و تولید بذورمصنوعی گیاهان یکسان از نظر ژنتیکی و عاری از عوامل بیماری‌زایی مانند غده‌ی بذری سیب‌زمینی استفاده می‌شود. بروز تغییرات سوماکلونال طی ریزازدیادی یکی از مشکلات پیش روی تولید محصولات کلونال می‌باشد. به منظور بررسی جنبه‌ی اپی‌ژنتیکی تنوع سوماکلونال، میزان چند شکلی و نوع تغییرات متیلاسیون DNA استخراج شده از برگ گیاهان حاصل از شش مرتبه زیرکشت گیاه مادری در جریان ریز ازدیادی در گیاه سیب‌زمینی با روش MSAP مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع تعداد ۳۵۰۱۱ باند توسط ۱۳ ترکیب آغازگری که هر کدام نماینده‌ای از جایگاه برشی دو آنزیم ایزوشیزومر حساس به متیلاسیون سیتوزین (*Msp*I و *Hpa*II) هستند، تکثیر و آشکار شدند. میانگین مجموع چند شکلی‌های مشاهده شده حاکی از ۲۹/٤۸ درصد تغییرات اپی‌ژنتیکی در کلونال‌های حاصل از ریزازدیادی گیاه سیب‌زمینی بود. از میان ارقام بررسی شده ارقام آگریا و میلوا به طور متوسط با میزان ۲۳/۷ درصد پلی‌مورفیسم و رقم اسپریت با میزان ۳۸/۹٤ درصد پلی‌مورفیسم به ترتیب کمترین و بیشترین میزان تنوع سوماکلونال را نشان دادند. ارقام آگریا، میلوا، ساوالان، آریندا، سانته، فونتانه، کایزر، بورن، ساتینا و اسپیریت دارای ثبات اپی‌ژنتیکی بیشتری از نظر تنوع سوماکلونال می‌باشند.

بیشترین تغییرات کلونال‌ها نسبت به والد مادری در تمام ارقام به صورت کاهش متیلاسیون در توالی-'5 CCGG-3' و در قالب همی‌متیلاسون سیتوزین خارجی رخ داد. این نتایج بیانگر سودمندی روش MSAP در تشخیص تغییرات متیلاسون سیتوزین می‌باشد. به‌علاوه، نتایج این تحقیق نشان داد که نوع ژنوتیپ بر میزان تنوع سوماکلونال تاثیرگذار است. از این‌رو، میزان چند شکلی متیلاسیون میان گیاهچه‌های مادری و کلونال‌های حاصل از آنها در این مطالعه بسته به نوع رقم متفاوت بود.

واژه‌های کلیدی: اپی‌ژنتیک، تنوع سوماکلونال سیب‌زمینی، کشت‌بافت، متیلاسیون سیتوزین، نشانگر MSAP

العلم میراث کرانهائی است و ادب لباس فاخر و زینتی است و فکر آئینه ای است صاف.

امام علی(ع)

الهی...

در وادی آگاهی، دست نیرومند تو هدایت گر شد هم آمدنم را هم ماندنم را هم رفتنم را، تو در لحظه لحظه هایم جای گرفته که نه، من در لحظه لحظه هایت جای دارم. گامم را اصلابت بخشیدی و چه خوب میدانم هر کجا نتیجه ای امید بخش به بار نشسته، ردپای مهر تو بر جاست و من دنباله رویی بیش نیستم و مگر می شود بی مدد تو.

سپاسم را چگونه در آغوشت رها کنم که ذره بودنم در برابر دریا بودنت هویدا نشود. مگر نه اینکه رسالتم جز این بوده که ذره ذره را جستوجو کنم تا بنمایم ذره ای هستم در برابر تو، از تو مدد می گیرم و تو را سپاس می گویم.

تقدیم به:

پدر و مادر مهربانم

به پاس گوشه ای از الطاف بیکرانشان

که در تک تک لحظات تحصیلم مشوق و یاری رسانم بودند

تقدیر و تشکر

حمد و سپاس ذات پاک بی نیاز معبودی که به قلم قداست و به انسان کرامت بخشید. اکنون که به لطف و کمک ایزد منان موفق به گذراندن این دوره از تحصیلاتم شده‌ام، سپاس بی پایان خود را نثار می کنم به: اساتید فرزانه و بزرگوارم جناب آقای دکتر فرهاد نظریان فیروزآبادی و دکتر محمود اطرشی که وجودشان دریایی از علم و محبت است و آموختن علم در محضر ایشان از افتخارات بزرگ زندگیم می باشد. از این دو عزیز به پاس زحمات و راهنمایی ها و محبت هایشان تشکر می کنم و می دانم آنچه مرا آموخته اند جبران کردنی نیست.

از جناب آقای دکتر بهمن زاهدی و دکتر سهیلا افکار که زحمت مطالعه و داوری پایان نامه را قبول نمودند، سپاسگزارم.

در اینجا بر خود وظیفه می دانم که از زحمات بی دریغ همسرم عزیزم سرکار خانم **فرزانه احمدی** و برادر و خواهر عزیزم آقای **مجتبی حسینی** و خانم **نفیسه حسینی** تشکر کنم. به واقع گذر عمر به من نشان داد، که چقدر دلسوزی، همراهی، زحمات و مشاوره فکری ایشان راهگشای لحظه های سخت زندگی من بود.

امیدوارم بتوانم اندک پاسخی نه به عنوان جبران، که فقط به نماد قدرشناسی، بعنوان آگاهی به زحمت و مرارت آنها، به گوشه ای از گذشته شان بدهم. بر خود واجب میدانم مراتب قدردانی خویش را از دکتر امیریان و خانم مرادی از کارکنان پژوهشکده بیوتکنولوژی اصفهان که مرا در حین اجرای پروژه یاری رساندند ابراز نمایم.

محسن حسینی

بهمن ماه ۱۳۹۳

Mo.hoseiny@yahoo.com

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱-۱-مقدمه: ۲

۱-۲- اهداف ۵

فصل دوم: کلیات و بررسی منابع

۲-۱- اهمیت اقتصادی گیاه سیب‌زمینی ۷

۲-۱-۱- اهمیت سیب‌زمینی در جهان ۷

۲-۲- گرایش به تولید سیب زمینی ۸

۲-۳- اهمیت سیب‌زمینی در تغذیه ۸

۲-٤- اهمیت سیب‌زمینی در ایران ۹

۲-۵- مناطق کشت سیب‌زمینی و ارقام رایج در ایران ۹

۲-٦- ترکیبات و خواص غده سیب‌زمینی ۱۰

۲-۷- ارقام سیب‌زمینی ۱۱

۲-۸- تکثیر سیب‌زمینی ۱۲

۲-۸-۱- بذر حقیقی سیب‌زمینی ۱۳

۲-۸-۲- غده بذری ۱٤

۲-۹- بذر سیب‌زمینی با کیفیت مطلوب ۱۵

۲-۱۰- کشت در محیط‌های مصنوعی و اهمیت آن ۱٦

۲-۱۰-۱-انتخاب وتیمار گیاهان مادری ۱۸

۲-۱۱-ریز ازدیادی در سیب‌زمینی ۱۹

۲-۱۲- تنوع سوماکلونال ۲۱

۲-۱۳- اهمیت بررسی تنوع ۲٤

۲-۱۳-۱- نشانگرها ۲٤

۲-۱۳-۲- نشانگرهای مبتنی بر **DNA** ۲۵
۲-۱۳-۳- نشانگرهای مبتنی بر **PCR** ۲۶
۲-۱۳-۳-۱- نشانگرهای **STS** ۲۶
۲-۱۳-۳-۲- نشانگرهای **RAPD** ۲۷
۲-۱۳-۳-۳- نشانگر **AFLP** ۲۷
۲-۱۳-۳-٤- نشانگر **MSAP** ۲۸
۲-۱٤- بررسی تنوع سوماکلونال به کمک نشانگرهای مولکولی ۳۰

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱- تهیه نمونه‌های گیاهی ۳۵
۳-۲- استخراج **DNA** ۳۷
۳-۳- تعیین کمیت وکیفیت **DNA** ۳۸
۳-۳-۱- اندازه‌گیری غلظت **DNA** به روش اسپکتروفتومتری ۳۸
۳-۳-۲- الکتروفورز **DNA** روی ژل آگارز ۳۸
۳-٤- مراحل **MSAP** ۳۹
۳-٤-۱- هضم آنزیمی ۳۹
۳-٤-۲-مرحله اتصال سازگار دهندها ٤۱
۳-٤-۲-۱-اتصال قطعات سازگار دهنده به قطعات حاصل از هضم ٤۱
۳-٤-۳- تکثیر ٤۲
۳-٤-۳-۱- تکثیر اولیه ٤۲
۳-٤-۳-۲-مرحله تکثیر انتخابی ٤٤
۳-۵- الکتروفورز عمودی محصول **PCR** با استفاده از ژل اکریل‌آمید ٤۷
۳-۵-۱- آماده سازی شیشه‌های الکتروفورز ٤۷
۳-۵-۲-تهیه و تزریق ژل ٤۸
۳-۵-۳-مرحله پیش‌ران ٤۸

۳-۵-٤- واسرشت سازی **DNA** ٤٨
۳-۵-۵- بارگذاری ٤٩
۳-۵-٦- رنگ آمیزی نیترات نقره ٤٩
۳-۵-۷- تجزیه و تحلیل داده‌ها ۵۰
۳-٦- درصد چند شکلی ۵۱
۳-۷- تجزیه خوشه‌ای ۵۱
۳-۸- تفکیک تغییرات متیلاسیون ۵۱

فصل چهارم: نتیجه گیری

٤-۱- نتایج حاصل از بررسی‌های مولکولی ۵۵
٤-۱-۱ -کیفیت و کمیت **DNA** استخراج شده ۵۵
٤-۱-۲ -نتایج حاصل از مراحل اجرای **MSAP** ۵۵
٤-۱-۳ -انتخاب ترکیب آغازگری ۵۷
٤-۲-نتایج حاصل از تجزیه داده‌ها ۵۸
٤-۲-۱-پلی‌مورفیسم ترکیب آغازگری ۵۸
٤-۲-۲-درصد پلی‌مورفیسم ٦۰
٤-۲-۳- تفسیر دندوگرام فاصله ژنوتیپ‌های مادری ٦۲
٤-۲-٤- نوع تغییرات متیلاسیون ٦۳
٤-۲-٤-۱- تجزیه تغییرات متیلاسیون ٦۵
٤-۲-٦- تفکیک نوع تغییرات متیلاسیون در هر ژنوتیپ ٦٦
٤-۳- نتیجه گیری کلی ٦۸
٤-٤- پیشنهادات ٦۹
فهرست منابع: ۷۰
پیوست ۷۸

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول۳-۱ ..... ۳۶

جدول۳-۲ ..... ۴۰

جدول۳-۳ ..... ۴۰

جدول۳-۴ ..... ۴۱

جدول۳-۵ ..... ۴۲

جدول۳-۶ ..... ۴۳

جدول۳-۷ ..... ۴۴

جدول۳-۸ ..... ۴۵

جدول۳-۹ ..... ۴۵

جدول۳-۱۰ ..... ۴۶

جدول۳-۱۱ ..... ۴۷

جدول۴-۱ ..... ۵۷

جدول۴-۲ ..... ۵۸

جدول۴-۳ ..... ۵۹

جدول۴-۴ ..... ۶۲

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۲-۱ ..... ۲۹

شکل ۳-۱ ..... ۵۲

شکل ۳-۲ ..... ۵۳

شکل ٤-۱ ..... ۵۵

شکل ٤-۲ ..... ۵٦

شکل ٤-۳ ..... ۵٦

شکل ٤-٤ ..... ٦۰

شکل ٤-۵ ..... ٦۳

شکل ٤-٦ ..... ٦٤

شکل ٤-۷ ..... ٦۵

شکل ٤-۸ ..... ٦۷

فصل اول:

مقدمه و اهداف

۱-۱-مقدمه:

امروزه اهمیت کشاورزی و نقش آن در توسعه بر هیچ کس پوشیده نیست. محدود بودن اراضی قابل کشت، هزینه زیاد نهاده‌های کشاورزی و بهبود عملکرد این گیاهان، مهمترین عامل تولید بهینه غذا می‌باشد . با توجه به این موضوع، بازده مطلوب مهمترین عامل برای تولید غذای کافی در جهان و سرعت بخشیدن به روند توسعه کشورهای جهان سوم می باشد.

جمعیت جهان در سال ۲۰۰۱ حدود ٦/۱ میلیارد نفر بوده و انتظار می‌رود تا سال ۲۰۲۵ به ۹/۳میلیارد نفر برسد. بنابراین تولید غذای لازم و کافی برای جمعیت جهان که هر روز ۲۵۰ هزار نفر بدان افزوده می‌گردد و رقمی در حدود یک میلیارد نفر در گرسنگی و سوء تغذیه به سر می‌برند، یکی از اهداف مهم دولت‌ها در مقابله با گرسنگی و بالا بردن سطح تغذیه می‌باشد(Flowers, 2004). در بین محصولات مختلف تأمین کننده منابع غذایی انسان پانزده گیاه زراعی وجود دارند که۹۰ درصد نیازمندی های غذای مردم جهان را تأمین می‌نماید. سیب‌زمینی یکی از این پانزده محصول محسوب می‌شود. سیب‌زمینی با توجه به عناصر غذایی گوناگون نظیر مواد پروتینی ، نشاسته و املاح معدنی یکی از غنی‌ترین منابع غذایی برای انسان به شمار می‌رود. اهمیت سیب‌زمینی و مصرف آن به عنوان یک ماده غذایی در نظام تغذیه محدود نشده بلکه این محصول ارزشمند یکی از منابع تأمین بعضی مواد مورد مصرف در صنعت نیز می‌باشد. (رهنما، ۱۳۸٦).

سیب‌زمینی با نام علمی *Solanum tuberosum L* از خانواده *Solanaceae* یا گوجه فرنگی می‌باشد، که با نام‌های سیب‌زمینی ایرلندی و سیب‌زمینی سفید نیز شناخته می‌شود. سیب‌زمینی گیاهی یک ساله و آتوتتراپلوئید با ٤۸ کروموزوم می‌باشد (Khurana *et al*., 2003). این گیاه بومی منطقه آند در نزدیکی مرز پرو و بولیوی در آمریکای جنوبی است (Ahmad, 1978;Horton, 1987; Pushkarnath, 1976;Rowe and Curwen, 1993). سیب‌زمینی از اواخر قرن ۱٦ از آمریکای جنوبی به اروپا (ابتدا اسپانیا و سپس انگلستان) وارد شد. پس از اروپا به آسیا و سایر کشورهای جهان منتقل گردید (Harris, 1992). گیاه سیب زمینی دارای گونه‌های بسیار متنوعی شامل *S. tuberosum L.*، *S. ajanhuiri*، *S. curtilobum*، *S. caucha*، *S. goniocalyx*، *S.phureja*، *S.juzepczukii*، *S.stenotomum* است (Struik and Wiersema, 1999).

در قرن شانزدهم کاشفین اسپانیای آمریکا آن را به اروپا برده و بعدا" به آمریکای شمالی برده شد و پس از آن در سایر نقاط جهان گسترش یافت (Bradshaw and Mackay, 1994). سیب‌زمینی یکی از مهمترین منابع غذایی است که در بسیاری از کشورها و در نواحی آب و هوایی مختلف از جمله در نواحی گرمسیری و نیمه گرمسیری کشت وکار می‌شود (Li, 1985). سیب‌زمین از نظر ارزش غذای و تولید پروتئین و انرژی در واحد سطح تقریبا" در بین کلیه محصولات زراعی بی‌رقیب می‌باشد. ساقه زیرزمینی ذخیره ای (غده) آن که مورد

مصرف معمول می‌باشد، حدود ۷۷ درصد آب، ۲۰/۱۳ درصد کربوهیدرات، ۱/۸درصد پروتئین، ۰/۱ درصد چربی و ۰/۹۷ درصد ویتامین‌های (A,B,C) و مواد معدنی مانند کلسیم، فسفر و آهن را دارا می‌باشد (Bradshaw and Mackay, 1994). به نظر می‌رسد تأمین مقدار کافی این محصول و قرار گرفتن بیشتر آن در نظام غذایی مردم ایران می‌تواند علاوه بر امکان تغذیه بهتر، فشار استفاده از گندم و برنج را نیز کاهش دهد.

سیب‌زمینی بیش از یک قرن پیش به عنوان یک گیاه جدید وارد ایران شد و امروزه در بیشتر نقاط کشور از جمله استان های مرکزی، آذربایجان شرقی و غربی، خراسان، اصفهان، کردستان، همدان، کرمانشاه، فارس، سمنان، تهران و...کشت می شود. سطح زیر کشت سیب زمینی ایران در سال ۱۳۳۹ بیست هزار هکتار و عملکرد آن ٤/۸ تن در هکتار بوده است. پس از چهار دهه تلاش‌های ترویجی و تحقیقی سطح زیر کشت آن به حدود ۱۹۰ هزار هکتار با میانگین عملکرد ٢٤ تن در هکتار رسیده است. میانگین جهانی این محصول ١٦ تن در هکتار و میانگین عملکرد آن در ایران ۷ تن بیشتر نمی‌باشد (کشاورزی، ۱۳۸۵).

سیب‌زمینی بیش از حد انتظار، در معرض بیماری‌های باکتریایی، قارچی، مایکوپلاسمی و ویروسی قرار دارد و وجود این عوامل موجب افت شدید عملکرد در واحد سطح در مناطق آلوده به این عوامل می‌شود (Zobayed *et al*., 2001). به طور کلی، در سیستم‌های سنتی، غده‌های بذری برای تکثیر و تولید سیب‌زمینی استفاده می‌شوند (Struik and Wiersema, 1999) و حدود ۱۵ درصد سطح زیر کشت سیب‌زمینی در هر سال برای تولید غده‌های بذری سال بعد مورد نیاز است (Lommen, 1995; Struik and Wiersema, 1999). این روش معایبی دارد که از آن جمله می توان به سرعت پایین تکثیر، ناکارآمدی، احتمال زیاد ابتلا به بیماری‌ها (قارچی، ویروسی و باکتریای) و آفات مختلف، نیاز به کنترل شدید و نیز زمین بیشر اشاره نمود (Beukema and van der Zaag, 1990;Struik and Wiersema, 1999). محصول بذری که در ابتدا سالم است، بعد از چند نسل کشت و کار، به عوامل بیماری زا آلوده خواهد شد و میزان تباهی از منطقه ای به منطقه دیگر و از فصلی به فصل دیگر متفاوت خواهد بود. در بعضی اوقات حمله ویروس‌ها به سیب‌زمینی می‌تواند باعث نابودی ۸۰ درصدی محصول شود و از آنجای که از یک سو، مبارزه شیمیایی با بیماری‌های ویروسی امکان پذیر نیست و از سوی دیگر، استفاده از بذر حقیقی سیب‌زمینی[1]با محدودیت‌های روبرو است، بنابر این مؤثرترین راه برای مبارزه با عوامل ویروسی استفاده از غده‌های بذری گواهی شده می‌باشد. برآورد شده است که استفاده از بذر سالم و عاری از عوامل بیماری‌زا، حداقل باعث افزایش ۳۰ درصدی محصول می‌گردد. بنابراین برای مقابله با تغییر نتایج، تزریق مرتب و مداوم مواد گیاهی سالم و عاری از عوامل بیماری‌زا در

1-True Potato Seed,(TPS)

سیستم تولید بذر و یا به عبارت دیگر تولید غده‌های بذری با کیفیت بسیار بالا ضروری می‌باشد (ضرغامی و بلندی, ۱۳۸۲).

سیب‌زمینی گیاهی است که به تکنیک‌های کشت بافت متمایل است و ریزازدیادی[1] و ریزغده‌دهی[2] روش‌هایی هستند که مسلما" سریع‌ترین راه برای تکثیر واریته‌های تولید کننده بذر می‌باشد (Donnelly *et al.*, 2003;Gopal *et al.*, 2005). یکی از راهکارهای مؤثر در این زمینه تولید گیاهچه‌های عاری از عوامل بیماری‌زا با استفاده از تکنیک کشت‌بافت می‌باشد.

با استفاده از تکنیک‌های کشت‌بافت گیاهی، می‌توان تعداد قابل توجهی گیاهچه‌های سالم و عاری از عوامل بیماری‌زای گیاهی را در یک دوره زمانی کوتاه و در تمام طول سال تولید نمود. در سال‌های اخیر تولید مینی‌تیوبر و میکروتیوبر سیب‌زمینی به طور چشم‌گیر در کشورهای مختلف رایج گردیده است.

گیاه یا بذر حاصل از کشت‌بافت، یک محصول کلونال بوده که از طریق جنین‌زایی سوماتیکی حاصل می‌شود. لازمه تحقق این امر بازگشت برنامه‌ریزی بیان ژنوم سلول یا بافت کشت شده به حالت اولیه و تولید گیاهچه مربوطه می‌باشد، بنابراین کشت بافت‌گیاهی می‌تواند انواع تغییرات ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی را القا کند و موجب پدیده‌ای به نام تنوع سوماکلونال شود. چون اساس کار اصلاح نباتات مبتنی بر وجود تنوع می‌باشد، از این نظر بروز تنوع سوماکلونال یک مزیت محسوب می‌شود ولی از نکته نظر تولید محصول کلونال و یکسان عاری از عوامل بیماری‌زا وجود تنوع سوماکلونال یکی از معایب تکنیک کشت‌بافت محسوب می‌شود. عوامل مختلفی از قبیل ژنوتیپ، منشا ساقه در شرایط آزمایشگاهی[3]، تعداد زیرکشت، انتخاب ریزنمونه و درجه تمایز بافت مورد کشت بر روی احتمال وقوع و میزان وقوع تنوع سوماکلونال اثرگذار هستند (Peraza-Echeverria *et al.*, 2001).

تنوع سوماکلونال در گیاهان ناشی از آشکار شدن تغیرات اپی‌ژنتیک[4] و ژنتیک در حین و یا بعد از کشت سلول‌های گیاهی، کالوس‌ها و یا اندام‌ها می‌باشد. لذا در طول کشت تغیرات ارثی ممکن است ناشی از تغیرات در ژنوم هسته‌ای و یا پلاستید باشد (Ehsanpour *et al.*, 2007). بنابراین بررسی میزان تنوع ایجاد شده ناشی از کشت‌بافت و تعیین ماهیت تنوع مشاهده شده به منظور بهره‌برداری و یا کنترل این نوع تنوع یک مسئله مهم می‌باشد. مشاهده تفاوت اندک در الگوی باندهای حاصل از نشانگرهای مبتنی بر تفاوت ژنتیکی، بیان‌گر کاهش احتمال ژنتیکی بودن ماهیت این نوع تنوع می‌باشد. مشاهده تفاوت الگوی متیلاسیون DNA در چندین گونه از گیاهان باززایی شده حاکی از آن است که این مکانیسم اپی‌ژنتیکی به روند تنوع

1-Micro propagation
2-Micro tuberization
3 -In vitro
4- Epigenetic

سوماکلونال کمک می‌کند (Kaeppler *et al*., 2000)، لذا مطالعات اخیر تنوع سوماکلونال روی آنالیز ناپایداری اپی‌ژنتیکی گیاهان حاصل از کشت بافت متمرکز شده است. اثر ژنوم که در آن بیان متفاوتی از ژن‌های موروثی از ژنوم والدین می‌باشد به وسیله اختلاف متیلاسیون دو ژنوم در آندوسپرم دیده می‌شود (Vielle-Calzada *et al*., 1999). متیلاسیون سیتوزین DNA یکی از تغییرات مهم اپی‌ژنتیک DNAی هسته‌ای بسیاری از یوکاریوت‌هاست و نقش مهمی را در تنظیم فعالیت ژن و حفظ یکپارچگی ژنوم بازی می‌کند (Rangwala and Richards, 2004; Selker, 1997).

نشانگر MSAP[1] مبتنی بر روش AFLP[2] می‌باشد و با بهره‌گیری از خاصیت ایزوشیزومری دو آنزیم *Hpa*II و*Msp*I قادر به شناسایی تغییرات در الگوی متیلاسیونDNA ژنومی می‌باشد. از مزایای این نشانگر می‌توان به توانایی زیاد در شناسایی تغییرات متیلاسیون حاصل با استفاده از تعداد کم ترکیب‌های آغازگری، داشتن توانایی لازم جهت مشخص کردن باندهای متیله شده برای بررسی توالی‌یابی و عدم نیاز به اطلاعات ژنومی گیاه مورد نظر اشاره کرد.

۱-۲- اهداف

در اکثر کشورهای جهان از جمله ایران غده‌های بذری گیاه سیب‌زمینی از طریق تکنیک کشت بافت تهیه می‌گردد. این پژوهش بوسیله تکنیک MSAP برای بررسی تغییرات اپی‌ژنتیکی در تنوع سوماکلونال ۱۰ رقم گیاه سیب‌زمینی به منظور دسترسی به اهداف زیر اجرا شد:

۱- بررسی میزان تنوع سوماکلونال از نظر تغییرات متیلاسیون DNA در گیاه سیب‌زمینی

۲- معرفی پایدارترین رقم مورد کشت و کار در کشور به تنوع سوماکلونال.

۳- بررسی سهم سیتوزین داخلی و خارجی توالی '5-CCGG-3' در تغییرات متیلاسیون نتاج حاصل از ریز ازدیادی سیب‌زمینی.

1- Methylation-Sensitive Amplification Polymorphisms
2- Amplified Fragment Length Polymorphism

فصل دوم:

کلیات و بررسی منابع

۲-۱- اهمیت اقتصادی گیاه سیب‌زمینی

۲-۱-۱- اهمیت سیب‌زمینی در جهان

امروزه سیب‌زمینی یکی از مهمترین تأمین کننده مواد غذایی جهان است (مبلی و همکاران ،۱۳۸۸) و بیش از یک میلیارد نفر در سراسر جهان سیب‌زمینی را به عنوان موادغذایی مصرف می کنند (Khurana *et al*., 2003). مصرف سیب‌زمینی در حال افزایش است و به ازای هر ۱۰ تا ۱۵ سال، میزان مصرف دو برابر می‌شود (Sawyer, 1984).

بیشترین تولید سیب‌زمینی در مناطق معتدله و در کشورهای صنعتی متمرکز است. از نظر اهمیت غذایی، سیب‌زمینی نسبت به غلات، مواد غذایی و انرژی بیشتری در واحد سطح تولید می‌کند. به طوری که متوسط عملکرد گندم ٤ تن در هکتار و سیب‌زمینی ۵۲ تن در هکتار است و علیرغم آنکه تقریبا" ۷۵ درصد وزن سیب‌زمینی را آب و فقط ۲۵ درصد آن را ماده خشک تشکیل می‌دهد (یعنی در حدود ٦/۲۵ تن ماده‌ی خشک در هکتار تولید می‌کند)، این مقدار حدود ۵۰٪ بیشتر از عملکرد گندم است. با توجه به این که ۲/۲ درصد از ترکیبات غده سیب‌زمینی پروتیئن و نزدیک ۲۰ درصد آن را ماده قندی تشکیل می‌دهد، بنابراین انرژی بیشتری در واحد سطح تولید می‌کند، در نتیجه از یک هکتار با تولید ۲۵ تن سیب‌زمینی،۵۵۰ کیلوگرم پروتیئن تولید می‌شود (مبلی و همکاران، ۱۳۸۸).

هزینه تولید سیب‌زمینی در مقایسه با سایر محصولات عمده، مانند گندم و برنج زیاد است، ولی در مقایسه با سبزیجات در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته کمتر است. باید توجه داشت که برنج از محصولاتی است که هزینه تولید نهاده‌هایی مانند آب، کود و سموم در آن زیاد است (Struik and Wiersema, 1999). در آمریکای شمالی، ضریب تولید ماده خشک سیب‌زمینی در واحد سطح نسبت به ماده خشک حاصل از گندم، جو و ذرت به ترتیب ۳/۰٤، ۲/٦۸ و ۱/۲۱ بیشتر است و بازده پروتیئن در واحد سطح سیب‌زمینی در مقایسه با پروتیئین حاصل از گندم، برنج و ذرت نیز با ضرایب ۲/۰۲، ۱/۳۳ و۱/۲۰ بیشتر است (مبلی و همکاران، ۱۳۸۸).

سیب‌زمینی در زندگی کشاورزان کم‌بنیه و خودکفا اهمیت دارد، و به صورت محصول قابل فروش روزانه نیز مطرح است. توسعه‌ای از این دست مدیون گسترش سریع صنعت فرآوری و قیمت زیاد خرید است (Struik and Wiersema, 1999).

سیب‌زمینی از جمله محصولاتی است که به صورت غیرجنسی تکثیر می‌شود. اندام‌های غیرجنسی آن مصرف غذایی دارند. تولید سرانه هنوز در کشورهای در حال توسعه، به ویژه افریقا و خاور دور اندک است در نتیجه