دانشکده کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح نباتات

**رساله دکتری تخصصی(Ph.D) در رشته اصلاح نباتات**

**گرایش ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک**

عنوان

# افزایش مقاومت سیب زمینی در برابر پدیده شیرین شدن در سرما از طریق RNA-Interference (RNAi)

استاد راهنما

**دکتر بهرام باغبان کهنه روز**

استاد مشاور

**دکتر اشرف قلی زاده**

پژوهشگر

**مرتضی کامرانی**

تابستان ۱۳۹۰ شماره رساله ۱

**تقدیر و تشکر**

سپاس و ستایش مر خدای را جل و جلاله که آثار قدرت او بر چهره روز روشن، تابان است و انوار حکمت او در دل شب تار، درفشان. آفریدگاری که خویشتن را به ما شناساند و درهای علم را بر ما گشود و عمری و فرصتی عطا فرمود تا بدان، بنده ضعیف خویش را در طریق علم و معرفت بیازماید. اکنون که به لطف الهی این پژوهش به ثمر رسید بر خود واجب می‌دانم از کلیه کسانی که در این تحقیق مرا یاری نمودند تشکر و قدردانی کنم. از استاد بزرگوارم جناب آقای دکتر بهرام باغبان‌کهنه‌روز به پاس روشنگری‌های عالمانه‌شان و الطاف بی‌دریغشان که در به ثمر رسیدن این پژوهش چراغ هدایت بودند نهایت تشکر را دارم. از استاد ارجمند سرکار خانم دکتر اشرف قلی‌زاده که مشاوره این رساله را بر عهده داشتند، از اساتید محترم آقایان دکتر بهزاد قره‌یاضی، مصطفی ولی‌زاده و نعمت سخندان که زحمت داوری پایان‌نامه را برعهده گرفتند و از پروفسور Jan Szopa استاد گروه ژنتیک بیوشیمی دانشکده بیوتکنولوژی دانشگاه Wroclaw لهستان به خاطر فراهم آوردن فرصت تحقیق در آزمایشگاه ایشان کمال تشکر و قدردانی را دارم. از پدر و مادرم و برادرانم که در طول تحصیل و در سختی‌های زندگی در کنارم بودند بی‌نهایت سپاسگذارم. در پایان از تمام دوستانی که به نحوی در طول دوران تحصیل بنده را یاری نمودند نهایت تشکر دارم.

تقدیم به:

# پدر

# مادر

# و برادرانم

بسم الله الرحمن الرحیم

**نام‌خانوادگی**: کامرانی **نام**: مرتضی

**عنوان پایان‌نامه**: افزایش مقاومت سیب زمینی در برابر پدیده شیرین شدن در سرما از طریق (RNAi) RNA-Interference

**استاد راهنما**: دکتر بهرام باغبان کهنه روز **استاد مشاور**: دکتر اشرف قلی‌زاده

**مقطع تحصیلی**: دکتری(PhD) **رشته تحصیلی**: اصلاح نباتات **گرایش**: ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک

**دانشگاه**: تبریز **دانشکده**: کشاورزی **تاریخ فارغ‌التحصیلی**: ۱۳۹۰/۶/۲۰ **تعداد صفحه**: ۱۴۸

**واژه‌های کلیدی**: سیب‌زمینی، شیرین شدگی در سرما، استارچ فسفریلاز L، استارچ اسوشییتد R1، RNAi

**چکیده**

سیب‌زمینی یکی از محصولات مهم در دنیا است که از نظر میزان تولید در رده چهارم قرار گرفته است. در دمای پایین در انبار نشاسته تجزیه شده و به قندهای ساده گلوکز، فروکتوز و ساکاروز تبدیل می‌شود این قندها باعث کاهش کیفیت محصول می‌شوند. برای کاهش تجمع قندها از تکنولوژی RNAi جهت خاموش سازی ژن‌های استارچ فسفریلاز L و استارچ اسوشییتد R1 درگیر در تجزیه نشاسته در دمای پایین استفاده شد. ابتدا قطعاتی از این ژن‌ها با استفاده PCR جداسازی شدند. بعد از توالی‌یابی و تایید توالی قطعات مورد نظر، ساخت سازه RNAi با این دو قطعه انجام شد. دو نوع سازه RNAi، یکی RNAi تک‌ژن برای ژن استارچ فسفرریلاز L (*p*ART-SPhL-IR) و دیگری سازه RNAi چندژن برای ژن‌های استارچ فسفریلاز L و استارچ اسوشییتد R1 (*p*BI-SPhLSAR1-IR) ساخته شد. سازه‌های RNAi ساخته شده به داخل *Agrobacterium tumefaciens* انتقال داده شد. برای تراریختی واریته‌ها از ۶۰ جداکشت در هر آزمایش استفاده شد. کلاً از واریته‌های آگریا و مارفونا به ترتیب ۲۱ و ۳۳ شاخساره در محیط شاخه‌زایی تولید شد و از شاخساره‌های تولید شده به ترتیب ۷۱/۵۵ و ۵۹/۲۵ درصد در محیط حاوی کانامایسین

ریشه‌دار شدند. برای گزینش لاین‌های تراریخته حاصل از سازه *p*ART-SPhL-IR، آزمایشات PCR برای حضور ژن *npt*II و اینترون *pdk* صورت گرفت و تمامی لاین‌های ریشه‌دار شده برای هر دو مورد مثبت بوده و به ترتیب قطعاتی به طول ٦١٢ و ٦٠٨ جفت باز تکثیر شد. برای گزینش لاین‌های تراریخته حاصل از سازه *p*BI-SPhLSAR1-IR، آزمایشات PCR برای حضور ژن *npt*II و کاست RNAi صورت گرفت. تمامی لاین‌های ریشه‌دار شده برای هر دو ژن *npt*II و کاست RNAi مثبت بوده و در الکتروفورز به ترتیب باندهایی به طول٧٨٦ و٥١٤ ایجاد شد. برای بررسی میزان بیان ژن‌ها در سطح رونویسی از Real time RT-PCR استفاده شد. میزان بیان ژن استارچ فسفوریلاز در لاین‌های تراریخت مورد بررسی حدود ٢ تا ٨ درصد نسبت به گیاه شاهد بود. میزان بیان ژن استارچ اسوشییتد R1 در حدود ١٠ تا ١٧ درصد بود. آنالیز قندهای احیاءکننده و کل در ریزغده‌های نگهداری شده در ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٣ ماه نشان داد در لاین‌های تراریخت حاصل از سازه *p*ART-SPhL-IR کاهش در تجمع قندهای کل تا ٣٨ درصد و کاهش در قندهای احیاءکننده تا ٣٩ درصد اتفاق افتاده است. در لاین‌های تراریخته حاصل از *p*BI-SPhLSR1-IR به ترتیب ٥٨ و ٦٠ درصد کاهش در تجمع قندهای کل و احیاءکننده رخ داده است. بررسی فسفریلاسیون در لاین‌های تراریخته حاصل از *p*BI-SPhLSAR1-IR نشان داد که میزان فسفات متصل به نشاسته در این لاین‌ها تا ٥١/٦٧ درصد نسبت به گیاه شاهد کاهش یافته است. همچنین بررسی محتوای نشاسته در ریزغده‌های لاین‌های تراریخته حاصل از *p*BI-SPhLSAR1-IR نشان داد که میزان نشاسته تا ٧/٩٧ درصد نسبت به گیاه شاهد افزایش یافته است.

مقدمه ..... ۱

**فصل اول بررسی منابع**

۱-۱- منشاء و گونه‌های سیب زمینی..... ۵

۱-۲- اهلی شدن سیب زمینی..... ۷

۱-۳- سطح زیر کشت و تولید سیب زمینی در ایران و جهان..... ۹

۱-٤- وضعیت جهانی کشت محصولات تراریخت در سال ۲۰۱۰..... ۱۱

۱-۵- تاریخچه انتقال ژن به سیب زمینی..... ۱۵

۱-٦- مهندسی ژنتیکی صفات مفید در سیب زمینی..... ۱۹

۱-٦-۱- مقاومت به آفات و بیماریهای مهم..... ۲۰

۱-٦-۱-۱- سوسک کلرادو سیب زمینی..... ۲۰

۱-٦-۱-۲- بید غده سیب زمینی..... ۲۰

۱-٦-۱-۳- نماتد های سیست سیب زمینی..... ۲۱

۱-٦-۱-٤- ویروس های PLRV و PVY..... ۲۲

۱-٦-۱-۵- باکتریها و قارچها..... ۲۲

۱-٦-۲- صفات کیفی غده سیب زمینی..... ۲۳

۱-٦-۲-۱- سیب زمینی های مقاوم به کبود شدگی..... ۲۳

۱-٦-۲-۲- کاهش میزان گلیکوآلکالوئیدها..... ۲۳

۱-٦-۳- ارزش تغذیه ای..... ۲٤

۱-٦-۳-۱- تغییر محتوای پروتئین و اسید آمینه..... ۲٤

۱-٦-۳-۲- افزایش اینولین..... ۲٤

۱-٦-۳-۳- افزایش کاروتنوئیدها..... ۲۵

۱-٦-۳-٤- تغییر محتوای نشاسته..... ۲۵

۱-۷- متابولیسم نشاسته - قند در غده سیب زمینی..... ۲٦

۱-۷-۱- تنفس غده سیب زمینی..... ۲۷

۱-۷-۲- روند تجمع قندها و آنزیم‌های درگیر تجزیه نشاسته به قندهای ساده..... ۲۹

۱-۷-۲-۱- آنزیم استارچ فسفوریلاز..... ۲۹

۱-۷-۲-۲- آمیلازها..... ۳۱

۱-۷-۲-۳- فسفوگلکوموتاز (PGM)..... ۳۱

۱-۷-۲-٤- UDP- گلوکز پیروفسفریلاز (UGPase)..... ۳۲

۱-۷-۲-۵- ساکارز فسفات سینتاز(SPS)..... ۳٤

۱-۷-۲-٦- اینورتاز..... ۳٦

۱-۸- خاموش‌سازی ژن توسط RNA Interference (RNAi) و مکانیسم آن..... ۳۷

۱-۸-۱- انواع مختلف RNA و نقش آنها در سیستم RNAi..... ۳۸

۱-۸-۲- نقش Dicer و RISC در سیستم RNAi..... ۳۹

۱-۸-۳- نقش hpRNA و MicroRNA در فرایند RNAi..... ٤۰

۱-۸-٤-اثر RNA های کوچک و متیلاسیون راه‌انداز در خاموشی ژن..... ٤۲

۱-۸-۵- سازه ها و روشهای خاموشی ژن بطریق hpRNA در گیاهان..... ٤۳

۱-۸-۵-۱- وکتورهای ساده و عمومی *p*KANNIBAL و *p*HANNIBAL ..... ٤٤

۱۱-۸-۵-۲- انتخاب قطعه ژنی..... ٤٦

**فصل دوم مواد و روش‌ها**

۲-۱- مواد گیاهی..... ٤۹

۲-۲- جداسازی قطعات ژنی..... ٤۹

۲-۲-۱- مطالعات بیوانفورماتیکی ژنها ..... ٤٩
۲-۲-۲- استخراج DNA ژنومی از برگ‌ها ..... ٥٠
۲-۲-۳- تکثیر قطعات ژنی با PCR ..... ٥٢
۲-۳- سویه‌های باکتری و پلاسمیدهای مورد استفاده ..... ٥٣
۲-٤- استخراج DNA پلاسمیدی ..... ٥٦
۲-٥- برش آنزیمی DNA پلاسمیدی و قطعات ژنی حاصل از PCR ..... ٥٧
۲-٦- اتصال قطعات DNA در پلاسمید ..... ٥٨
۲-۷- ساخت سازه‌های RNAi ..... ٥٩
۲-۷-۱- ساخت وکتور RNAi چند ژنی *p*BI-SPhLSAR1-IR ..... ٥٩
۲-۷-۲- ساخت وکتور RNAi تک ژنی *p*ART-SPhL-IR ..... ٦٠
۲-۸- تراریختی باکتری *E. coli* ..... ٦١
۲-۸-۱- تهیه سلول‌های باکتری مستعد ..... ٦١
۲-۸-۲- تراریختی سلول‌های باکتری *E. coli* مستعد ..... ٦٢
۲-۹- تراریختی سلول‌های باکتری *Agrobacterium tumefaciens* ..... ٦٣
۲-۹-۱- تهیه سلولهای مستعد تراریختی ..... ٦٣
۲-۹-۲- تراریختی سلول‌های الکترو- مستعد *Agrobacterium tumefaciens* ..... ٦٥
۲-۱۰- بهینه سازی کشت بافت سیب زمینی ..... ٦٦
۲-۱۱- تراریختی گیاه سیب‌زمینی ..... ٦٧
۲-۱۱-۱- کشت باکتری و تلقح جداکشت‌ها ..... ٦٧
۲-۱۱-۲- القای کالوس و باززایی گیاهچه‌های تراریخته فرضی ..... ٦٨
۲-۱۱-۳- ریزغده‌زایی گیاهان سیب زمینی تراریخت احتمالی ..... ٦٩

۲-۱۲- آنالیز مولکولی گیاهان باززا شده..... ٦٩
۲-۱۲-۱- آنالیز PCR گیاهان تراریخته برای کاست pBI-SPhLSAR1-IR..... ٦٩
۲-۱۲-۲- آنالیز PCR در گیاهان تراریخت شده با پلاسمید نوترکیب *p*ART-SPhL-IR..... ۷۰
۲-۱۲-۳- آنالیز Real time RT-PCR..... ۷۰
۲-۱۲-۳-۱- استخراج RNA از بافت گیاهی..... ۷۰
۲-۱۲-۳-۲- حذف ناخالصی‌های DNA از RNA..... ۷۱
۲-۱۲-۳-۳- تبدیل RNA به cDNA تک رشته‌ای..... ۷۲
۲-۱۲-۳-٤- انجام واکنش Real time PCR..... ۷۳
۲-۱۳- استخراج قندها از غده گیاهان تراریخت..... ۷۵
۲-۱۳-۱- استخراج قندهای محلول..... ۷۵
۲-۱۳-۲- برآورد میزان قند کل با روش آنترون..... ۷٦
۲-۱۳-۳- اندازه‌گیری قندهای احیاءکننده..... ۷۷
۲-۱٤- برآورد میزان نشاسته به روش آنترون..... ۷۸
۲-۱۵- برآورد میزان فسفات متصل به نشاسته در ریزغده‌ها..... ۷۹
۲-۱۵-۱- جداسازی گرانول نشاسته از ریزغده‌های سیب زمینی..... ۷۹
۲-۱۵-۲- برآورد میزان فسفات متصل به نشاسته در ریزغده‌ها..... ۸۰
۲-۱٦- تجزیه آماری..... ۸۱

**فصل سوم نتایج و بحث**

۳-۱- مطالعات بیوانفورماتیک قطعات ژنی مورد استفاده در ساخت RNAi ..... ۸۳
۳-۲- تکثیر قطعات ژنی با PCR..... ۸٤
۳-۳- ساخت وکتور RNAi چند ژنی *p*BI-SPhLSAR1-IR ..... ۸۵

۳-٤- ساخت سازه RNAi تک‌ژنی برای ژن استارچ فسفوریلاز L ..... ۹۳

۳-۵- بهینه‌سازی کشت بافت سیب‌زمینی ..... ۹۷

۳-٦- باززایی و گزینش شاخساره‌های تراریخته سیب زمینی..... ۹۹

۳-۷- آنالیزهای مولکولی گیاهان تراریخته..... ۱۰۲

۳-۷-۱- غربال گیاهچه‌های مقاوم به کانامایسین با استفاده از PCR..... ۱۰۲

۳-۷-۲- آنالیز Real time RT-PCR گیاهان تراریخته..... ۱۰۹

۳-۷-۲-۱- آنالیز Real time RT-PCR گیاهان تراریخت شده با سازه *p*ART-SPhL-IR..... ۱۰۹

۳-۷-۲-۲- آنالیز Real time RT-PCR گیاهان تراریخت شده با سازه *p*BI-SPhLSAR1-IR..... ۱۱۱

۳-۸- آنالیز قند غده‌های گیاهان تراریخته سیب زمینی..... ۱۱۵

۳-۸-۱- آنالیز قند در غده‌های لاین‌های تراریخت حاصل از سازه تک ژن *p*ART-SPhL-IR..... ۱۱۵

۳-۸-۲- آنالیز قند در لاین‌های تراریخت حاصل از سازه مولتی‌ژن *p*BI-SPhLSAR1-IR..... ۱۱۸

۳-۹- آنالیز محتوای فسفات متصل به نشاسته در لاین‌های تراریخت حاصل از سازه *p*BI-SPhLSAR1-IR..... ۱۲۱

۳-۱۰- آنالیز میزان نشاسته در لاین‌های تراریخت حاصل از سازه *p*BI-SPhLSAR1-IR..... ۱۲۳

۳-۱۱- نتیجه‌گیری..... ۱۲۸

۳-۱۲- پیشنهادات..... ۱۳۱

منابع..... ۱۳۲

ضمیمه..... ۱٤۲

**مقدمه**

سیب زمینی یکی از محصولات زراعی غیر غله‌ای در دنیا است و از نظر تولید بعد از برنج، گندم و ذرت در رده چهارم قرار گرفته است. این محصول بعد از ذرت دارای گسترده ترین توزیع جغرافیایی در دنیا می-باشد. قابلیت تولید انرژی و پروتئین در واحد سطح نسبت به بقیه محصولات زراعی در این گیاه بیشتر است و از نظر تغذیه تعادل بهتری از اسید امینه های ضروری مخصوصاً لیزین را دارا می‌باشد که نشان دهنده ارزش غذایی این گیاه است (رضایی و سلطانی، ۱۳۷۵).

سیب زمینی به مدت طولانی در انبار در دمای ۸-۱۵ درجه سانتی گراد نگهداری می‌شود. انبار نمودن سیب زمینی به دو دلیل صورت می‌گیرد یکی جلوگیری از عرضه بیش از تقاضای فصلی این محصول و دیگری اطمینان از دردسترس بودن این محصول در تمام طول سال است (جادها و همکاران،۱۹۹۱). در طول انبارداری در این دماها سیب زمینی جوانه می‌زند. علاوه بر این قندهای احیاء کننده در طی پیری غده افزایش یافته و کیفیت فراوری آنها کاهش می‌یابد. جوانه زنی طول دوره انبارداری را بشدت کاهش می‌دهد. انبار سیب زمینی در دماهای خنک تر (۲-٤ $^{\circ}C$) باعث جلوگیری از جوانه زنی، کاهش خسارت میکروبی و جلوگیری از اتلاف وزنی ناشی از دهیدراسیون می‌شود. با وجود این، در این دماها نشاسته تجزیه شده و باعث تجمع قندهای احیا کننده گلوکز و فروکتوز و غیراحیاء کننده ساکارز می‌گردد. فرایند شیرین شدن[۱] سیب‌زمینی در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد شروع می‌شود اما در دمای کمتر از ۷ درجه سانتی گراد بسرعت افزایش می‌یابد ( ایشروود، ۱۹۷۳ ، هیل و همکاران، ۱۹۹٦ ، ژو و هکاران، ۱۹۹۸). در فرایند شیرین شدن از طریق تجزیه نشاسته آنزیم‌های مختلفی در مراحل مختلف نقش دارند. آنزیم استارچ فسفریلاز در بالادست

[۱] Sweetening

مسیر تجزیه باعث تجزیه نشاسته به گلوکز-٦- فسفات می‌شود. پروتئین R1 (starch-associated R1) نیز یک پروتئین دای کیناز است و باعث فسفریلاسیون α- گلوکان (نشاسته) در حضور ATP می‌شود. با فسفریله شدن نشاسته خاصیت آبگرایی آن زیاد شده بیشتر در معرض آنزیم‌های تجزیه کننده قرار می‌گیرد. نتیجه این فرایندها رهاسازی بیشتر این قندهای مونومری احیاکننده[1] و تشکیل ساکارز غیراحیاکننده هستند. هنگام سرخ کردن سیب زمینی بین گروه‌های احیاء کننده قندها (گروه‌های آلدئیدی) و گروه‌های آمینه‌ای اسید آمینه‌ها واکنش صورت می‌گیرد که باعث سیاه شدن سیب زمینی سرخ کرده می‌شود این واکنش به واکنش میلارد[2] معروف است. علاوه از اینکه سیاه شدن ارزش غذایی را کاهش می‌دهد منجر به تولید اکریل‌آمید[3] شده که یک ماده ضدتغذیه‌ای مهم به شمار می‌رود و در سالهای اخیر وجود این ماده خطرناک و سرطان‌زا در سیب زمینی سرخ کرده کشف شده است که از ترکیب قندهای احیاء کننده (گلوکز و فروکتوز) با آسپاراژین از طریق برقراری پیوند N – گلیکوزیدی تولید می‌شود. همچنین این قندهای احیاء کننده باعث از دست رفتن پروتئین‌ها و اسید آمینه‌ها مخصوصاً اسید آمینه‌های ضروری می‌شوند که کاهش ارزش غذایی سیب زمینی را موجب می‌گردد (وان و هارتسمن، ۱۹۸۷). یکی از راه‌های کنترل تولید قندهای ساده و پایین نگهداشتن میزان آنها در غده‌ها خاموش کردن ژن‌های دخیل در تجزیه نشاسته و تولید قندهای ساده می‌باشد (زرنر و همکاران، ۱۹۹٦؛ رومنس و همکاران، ۲۰۰٦؛ شان-هان و همکاران، ۲۰۰۷؛ باسکار و همکاران، ۲۰۱۰). در تحقیق حاضر دستکاری ژنتیکی ژن‌های استارچ فسفریلاز L و استارچ اسوشییتد R1 گیاه سیب‌زمینی (واریته-های آگریا و مارفونا) هدف‌گیری شده است. ابتدا سازه‌های RNAi برای ژن‌های استارچ فسفریلاز L و استارچ اسوشییتد R1 توسط تکنیک‌های مرسوم کلونینگ ساخته می‌شوند. سپس سازه‌های RNAi ساخته شده

[1] Reducing sugars
[2] Millard
[3] Acrylamid

به وکتورهای بیانی گیاهی منتقل می‌شوند. این وکتورهای اختصاصی RNAi به باکتری آگروباکتریوم تومفاسینس منتقل شده و برای تراریختی گیاه استفاده می‌شوند. تا از این طریق ژن‌های درگیر در تجزیه نشاسته، استارچ فسفریلاز L و استارچ اسوشییتد R1 بلوکه شده و میزان قندهای ساده‌تر گلوکز، فروکتوز و ساکارز در دماهای پایین در غده‌های سیب‌زمینی کاهش یافته و غده‌های سیب زمینی با قابلیت انبارداری بیشتر و با درجه شیرین شدگی حداقل حاصل گردید.

# بررسی منابع

## ۱- بررسی منابع

### ۱-۱- منشاء و گونه‌های سیب زمینی

سیب زمینی گیاهی یکساله و علفی از خانواده *Solanaceae* و مربوط به جنس *Solanum* می‌باشد. گونه‌های جنس *Solanum* در دسته‌های مختلف پلوئیدی واقع شده و از 2x– 6x متغیر هستند. گونه‌های جنس *Solanum* بسیار زیاد هستند و از میان آنها سیب زمینی (*Solanum tuberosum*) به مقدار زیاد در سراسر دنیا کشت می‌شود. گونه‌های وحشی غده‌دار جنس سولانوم از جنوب غربی ایالات متحده در امریکای شمالی ( ۳۸°N) تا مرکز آرژانتین و شیلی در آمریکای جنوبی (۴۱°S) پراکنده شده‌اند و یک محدوده اکوجغرافیایی وسیعی را پوشش داده اند. در جنوب غربی آمریکا و آمریکای مرکزی غالباً در ارتفاعات متوسط تا بالا یافت می‌شوند. در آمریکای جنوبی در طول رشته کوه آند از ونزوئلا تا شمال غرب آرژانتین و همچنین در نواحی کم ارتفاء شیلی، آرژانتین، اروگوئه، پاراگوئه و جنوب شرق برزیل یافت می‌شوند (اسپونر و هیجمانس، ۲۰۰۱). گونه‌های مختلف سولانوم به شرایط آب و هوایی مختلف شامل نواحی مرتفع آند از ۳۰۰۰ متر تا ۴۵۰۰ متر جایی که یخبندان معمول است، شرایط خشک نیمه بیابانی و خارستان و بیابان‌های کاکتوس، جنگل‌های بارانی و معتدل و دشت‌های ساحلی سازگارند. گونه‌های وحشی همچنین در مقابل طیف وسیعی از آفات و بیماری‌ها مقاوم هستند. بنابراین توزیع جغرافیایی وسیع و محدوده سازگاری اکولوژیکی بزرگ یک منبع عظیمی برای اصلاح سیب زمینی فراهم آورده است. هیئت‌های اعزامی فراوانی برای جمع آوری نمونه وجود داشته اند. روس‌ها در دهه ۱۹۲۰ پیشگام در این زمینه بودند (هاوکس، ۱۹۹۰). ژرپلاسم[1] سیب زمینی در بانک‌های ژنی مختلف جهان نگهداری می‌شود. تاکسونومی[2] گونه‌های غده‌دار وحشی سولانوم پیچیده بوده و دایم در حال تجدید نظر است. هاوکس (۱۹۹۰) ۲۱۹ گونه غده دار وحشی را شناسایی کرده و

[1] Germplasm
[2] Taxonomy

در ۱۹ سری از زیر بخش[1] *Potatoe* از بخش[2] *Petota* از زیر جنس *Potatoe* از جنس *Solanum* مرتب نموده است (شکل ٤-۱). سریهای I-X را در سوپرسری *Stellata* و سریهای X-XIX را در سوپر سری *Rotata* گروهبندی کرده و تسلسل زیر بخش‌ها، سوپرسری‌ها و سری‌ها را برای منعکس کردن روند تکاملی آنها بررسی کرد و یک سناریوی ممکن برای تکامل گونه های وحشی سیب زمینی ارائه داد. همچنین ۹ گونه بدون غده را شناسایی کرده و در دو سری از زیر بخش *Estolonifera* گروهبندی نمود. اما اینها در طبقه بندی اخیر از بخش *petota* خارج شده‌اند بخشی که تمام گونه های غده دار در آن قرار دارند (اسپونر و سالاس، ۲۰۰٦). در آخرین تقسیم بندی که توسط اسپونر و سالاس (۲۰۰٦) صورت گرفته است ۱۸۸ گونه وحشی سیب زمینی در بخش *Petota* قرار گرفته اند و خود بخش *Petota* به ٤ گروه بیولوژیکی *clade* تقسیم شده‌اند. این گروهبندی بر اساس DNA پلاستید می‌باشد. کلید ۱ از گونه‌های دیپلوئید[3] آمریکای مرکزی، مکزیک و ایالات متحده به استثنای گونه‌های *S. bulbocastanum* ، *S. cardiophyllum* و *S. verrucosum* تشکیل شده است. کلید ۲ از *S. bulbocastanum* و *S. cardiophyllum* تشکیل شده، کلید۳ از تمام اعضای سریهای *Puriana* آمریکای جنوبی تشکیل شده است و کلید ٤ از تمام گونه های پلی پلوئید باقیمانده امریکای مرکزی، مکزیک، ایالات متحده و گونه S. *verrucosum* تشکیل شده است. با این وجود این گروهبندی توسط DNA پلاستیدی گونه‌های بسیار نزدیک را در کلیدهای متفاوت قرار می‌دهد و با گروهبندی توسط DNA هسته‌ای تفاوت داشته و نمایانگر گروهبندی توسط DNA هسته‌ای نمی‌باشد. بعلاوه این روش خوبی برای طبقه بندی گروه‌های آلوپلوئیدی نیست.

[1] Sub section
[2] Section
[3] Diploid

گونه‌های وحشی سیب زمینی در سریهای پلی پلوئیدی از دیپلوئید (۲n= ۲x=۲٤) تا هگزاپلوئید[1] (۲n= ٦x=۷۲) وجود دارند و در آن ژنوم‌ها در ۵ گروه A ، B ، C ، D و P طبقه بندی شده‌اند (ماتسوبایاشی، ۱۹۹۰) و گونه های بدون غده ششمین گروه، E را تشکیل داده اند. تقریباً تمام گونه های دیپلوئید دگربارور هستند و سیستم خودناسازگاری گامتوفیتی[2] دارند (دودس،۱۹٦٤). این ناسازگاری توسط یک مکان ژنی S چند آللی کنترل می‌شود. در حالی که تتراپلوئیدها و هگزاپلوئیدها اغلب آلوپلی پلوئیدهای خودسازگار بوده و وراثت دیسومی[3] نشان می‌دهند (هاوکس، ۱۹۹۰).

### ۱-۲- اهلی شدن سیب زمینی

اجداد وحشی گونه‌های زراعی سیب زمینی موضوع بسیاری از بحث ها بوده است. هاوکس (۱۹۹۰) نتیجه گیری کرد که سیب زمینی یک گیاه اهلی باستانی بوده و بقایای غذاهای تهیه شده از سیب زمینی در جاهای مختلف در سواحل پرو و یک محل مرتفع در جنوب لیما در حفاری بدست آمده است. شتاب دهنده رادیوکربن اکسفورد عمر بقایای کشف شده را ۷۰۰۰ سال تخمین زده است. با توجه به اینکه بقایای سیب زمینی یافت شده در نواحی مرکزی شیلی مربوط به دوره پلیستون زمین شناسی می‌باشد شواهد نشان می‌دهد جمع آوری غده‌های وحشی و کشت آنها و نهایتاً اهلی کردن آنها مربوط به اوایل مهاجرت بشر به قاره آمریکا ۱۲۵۰۰ سال پیش باشد (اوگنت و همکاران، ۱۹۸٦، موسلی، ۲۰۰۱). عدم شواهد کافی کشت سیب زمینی در نواحی مرتفع جایی که گونه‌های اجدادی یافت می‌شود بدلیل ضعیف بودن شرایط حفظ و نگهداری بقایا در این نواحی مرتفع با آب و هوای مرطوب فصلی می‌باشد در حالی که در محیط‌های خشک این شرایط بهتر بوده است. یک روش باستانی برای نگهداری سیب زمینی در جاهایی که سیب زمینی تحت تاثیر هوای سرد و

[1] Hexaploid
[2] Gametophitic incompatability
[3] Disomic inheritance

خشک کوهستان قرار دارد تولید چونو[1] می‌باشد. این روش در حال حاضر نیز در کشورهای آند مورد استفاده مردم می باشد. فرایند چونو یک مقدمه ضروری برای مصرف سیب زمینی های غده ریز است. زیرا باعث حذف گلیکوآلکالوئیدهای سمی می‌شود. همچنین این روش یک محصول دهیدراته می‌دهد که می توان برای چندین سال نگهداری کرد. حدس زده می شود که اهلی شدن در جهت تلخی کمتر و بنابراین غده‌های دارای سم کمتر بوده است. کشاورزان آندی تنوع بالایی از شکل غده، رنگ پوست و مغز غده را حفظ کرده‌اند که در مقایسه با گونه‌های وحشی گسترده‌تر می‌باشد (سیموندس، ۱۹۹۵) و این تنوع تنها از طریق جهش تحت شرایط اهلی شدن بوجود می آید. بعلاوه تیپ‌های تتراپلوئید[2] سیب زمینی بطور طبیعی بوجود آمده‌اند. کشاورزان این نوع سیب زمینی‌های بوجود آمده را نسبت به اجداد دیپلوئیدشان بخاطر عملکرد بالا و سایر صفات ترجیح می‌دادند. خود ناسازگاری در این تتراپلوئیدها عمل نمی‌کند. برای تولید مثل جنسی دگرباروری کافی اتفاق افتاده و باعث بقا و حفظ تنوع ژنتیکی بالا می‌شود (براون، ۱۹۹۳). گزینش های بعدی برای مدت زمان رسیدگی، دورمانسی مناسب، عملکرد و شاخص برداشت بالاتر و مقاومت در برابر تنش‌های زیستی و غیر زیستی در محیط‌های زیادی صورت گرفته است. ویژگی قابل توجه سیب زمینی‌های مدرن شاخص برداشت بالای (۵/۸۱) آنها در مقایسه با گونه های وحشی است که بعضی از گونه‌های وحشی شاخص برداشت[3] کمتر از ۰/۰۹ دارند (هوفیوس و بورنکه، ۲۰۰۷).

سیب زمینی مثل گونه‌های اجدادی وحشی خود هم تولید مثل جنسی و هم غیر جنسی از طریق غده دارد. در تکثیر جنسی سیب زمینی گل‌دهی کرده و گرده افشانی توسط حشرات صورت می‌گیرد و بذر حقیقی سیب زمینی در داخل میوه تشکیل می‌شود. در این نوع تولید مثل جنسی تنوع بالایی وجود دارد. واریانت‌های ژن‌ها توسط جهش بوجود آمده و در تولید مثل جنسی از طریق نوترکیبی باعث ایجاد تنوع ژنتیکی بالایی

[1] Chuno
[2] Tetraploid
[3] Harvest index

می‌شود. با کشت بذرهای حقیقی هر یک از بوته‌های بدست آمده ژنوتیپ منحصر به فرد بوده و با تولید غده می‌توان هر یک از ژنوتیپ‌ها را حفظ کرد. واریته‌های زراعی سیب زمینی دارای سطوح پایین گلیکوآلکالوئید[۱] بویژه سولانین[۲] و چاکونین[۳] هستند. اینها مزه تلخ داشته و در سطوح بالا سمی هستند گزینش برای سطوح پایین گلیکوآلکالوئیدها موفق می‌باشد. همچنین یک سری از گلیکوآلکالوئیدها در گونه‌های وحشی بوده که در گونه‌های زراعی یافت نمی‌شوند. بنابراین اصلاحگران سیب زمینی بایستی موقع اینتروگرسیون گونه‌های وحشی در گونه‌های زراعی به این نکته توجه کنند و سطوح گلیکوآلکالوئیدها را در غده چک کنند. گلیکوآلکالوئیدها توسط مسیرهای بیوشیمیایی پیچیده کنترل می‌شوند. از آنالیز QTL[۴] برای شناسایی کنترل ژنتیکی این صفت استفاده شده است. QTL های بزرگ اثر در چندین کروموزوم شناسایی شده اند. بویژه کروموزوم ۱ منبع مهم ژن‌های درگیر در کنترل سطوح گلیکوآلکالوئیدها است. نکته جالب اینکه در مکان‌یابی QTL های مرتبط با این صفات QTL های کنترل کننده آلفاسولانین و آلفاچاکونین در موقعیت یکسان قرار گرفته اند (برادشاو و رامسای، ۲۰۰۹).

### ۱-۳- سطح زیر کشت و تولید سیب زمینی در ایران و جهان

سیب زمینی یکی از محصولات زراعی غیر غله‌ای در دنیا است که از نظر تولید بعد از برنج، گندم و ذرت در رده چهارم قرار گرفته است و از نظر توزیع در دنیا بعد از ذرت دارای گسترده ترین توزیع جغرافیایی می‌باشد. این محصول در حدود ۱٤۰ کشور دنیا کشت می‌شود که بیش از ۱۰۰ کشور آن در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری واقع شده‌اند اما هنوز هم بیشترین تولید در مناطق معتدله در کشورهای صنعتی متمرکز است (رضایی و سلطانی،۱۳۷۵). طبق آمار FAO[۵] در سال ۲۰۰۵ میلادی میزان تولید سیب زمینی در

[1] Glycoalkaloids
[2] Solanine
[3] Chaconine
[4] Quantitative Trait Loci
[5] Food and Agriculture Organization