ژنتیک نوین
دوره دوازدهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۶
صفحه ۱۸۴ - ۱۷۵

ردیابی ژن‌های دخیل در مسیر بیوسنتزی آنتوسیانین بر اساس الگوهای باندی هضم آنزیمی در ارقام سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) رنگی و سفید

Detection of anthocyanin biosynthesis key genes and their restriction fragment patterns in colourful and white cultivars of *Solanum tuberosum* L.

هاله سلیمی[۱]، مسعود بهار[۲]، آقافخر میرلوحی[۱]، مجید طالبی[*۳]

۱- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۲- استاد، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

Salimi H[1], Bahar M[2], Mirlohi A[1], Talebi M[*3]

1- PhD Student, Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Isfahan University of Technology
2- Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Isfahan University of Technology
3- Associate Professor, Department of Biotechnology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mtalebi@cc.iut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۲/۳۱)

چکیده

با توجه به فواید مصرف مواد گیاهی حاوی آنتوسیانین بالا و تاثیر آن بر سلامتی افراد، تولید و مصرف سیب‌زمینی‌های با غده رنگی غنی از آنتوسیانین، در سال‌های اخیر اهمیت زیادی پیدا کرده است. به‌دلیل اینکه درک روابط آلل‌های غالب و مغلوب ژن‌های R، P و D برای تعیین عملکرد غده‌های سرشار از آنتوسیانین ضروری است، در مطالعه حاضر، آرایش ژن‌های آنتوسیانین ۱۷ ژنوتیپ سیب‌زمینی دارای رنگ پوست متفاوت، با استفاده از روش تکثیر نواحی ژنی R، P و D در این ارقام با جفت آغازگرهای اختصاصی و برش آنزیمی محصولات PCR بررسی شد. نتایج نشان داد که آلل عملکردی P در ارقام بنفش غالب است و ارقام سفید و قرمز آلل غیرعملکردی p را دارند. با وجود اینکه ارقام سفید دارای آلل مغلوب r تشخیص داده شدند، ارقام قرمز و بنفش واجد هر دو آلل غالب R و مغلوب r بودند که نشان داد ارقام رنگی تتراپلویید استفاده شده هتروزایگوت بوده، ولی ژنوتیپ آن‌ها مشخص نیست. در پژوهش حاضر، بر اساس الگوی هضم آنزیمی، هیچکدام از سیب‌زمینی‌های سفید مورد آزمایش دارای آلل غالب D نبودند، ولی ارقام رنگی حالت هتروزایگوت با ترکیب نامشخصی از دو آلل Dd را داشتند. مکان ژنی D در سیب‌زمینی برای تنظیم ژن‌های کلیدی R و P در تولید آنتوسیانین و تظاهر آن در بافت غده ضروری است و به همین دلیل، با وجود حضور دو ژن کلیدی R و P به‌صورت غالب در ارقام سفید، در غیاب آلل غالب ژن D غده‌های رنگی تولید نمی‌شود. به‌رغم آنکه، روش تعیین الگوی هضم آنزیمی مکان‌های ژنی ارقام سیب‌زمینی، برای تفکیک نتاج ارقام رنگی از ارقام سفید سیب‌زمینی حاوی آلل‌های مغلوب p و r مناسب تشخیص داده شد، در پژوهش حاضر به‌دلیل تاثیر مستقیم لوکوس D در بیان ژن‌های P و R، تعیین غالبیت آلل D در این ارقام ضروری می‌باشد.

واژه‌های کلیدی

آنتوسیانین
آنزیم‌های برشی
سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.)
مکان‌های ژنی *R*، *P* و *D*

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-04]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.3.5]

مقدمه

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.)[1] متعلق به خانواده Solanaceae گیاهی اتوتتراپلوئید (۲n=٤x=٤٨) با هتروزیگوسیتی شدید است (Salaman 1910) که به‌دلیل محتوای بالای نشاسته، پروتئین و ویتامین، اهمیت زیادی در رژیم غذایی مردم جهان دارد. در سال‌های اخیر نیز، حضور مواد آنتی اکسیدان در غده ارقام جدید سیب‌زمینی و هم‌چنین سیب زمینی‌های با پوست رنگی قرمز و بنفش بر اهمیت تغذیه‌ای آن افزوده است (Brown 2005). باور عمومی بر این است که مصرف موادغذایی غنی از مواد آنتی اکسیدانی فلاونوئیدی و کاروتنوئیدی در کاهش بیماری‌های مختلف از جمله بیماری‌های قلبی و سرطان مؤثر است (Horakova 2011) و به این لحاظ، استفاده از محصولات گیاهی سرشار از مواد فلاونوئیدی آنتوسیانینی مانند سیب‌زمینی‌های با پوست و گوشت رنگی به سلامت جامعه کمک می‌کند.

تنوع طبیعی رنگ غده سیب‌زمینی از تفاوت میزان تجمع آنتوسیانین‌ها در بافت‌های اختصاصی آن سرچشمه می‌گیرد. آنتوسیانین‌ها وسیع‌ترین زیرگروه فلاونوئیدها می‌باشند که به‌عنوان رنگدانه‌های اصلی، عامل ایجادکننده رنگ قرمز، آبی و بنفش در گیاهان هستند. آنتوسیانین‌ها تحت تاثیر تنش‌های محیطی در بافت‌های رویشی تولید می‌شوند و در حفاظت گیاه در برابر تشعشع آفتاب، جذب حشرات برای گرده‌افشانی، سیگنال‌دهی بین گیاهان و میکروب‌ها، وجود نربارروری در برخی از گونه‌ها و دفاع میزبان در مقابل عوامل میکروبی نقش دارند (Albert 2010).

عملکرد آنتوسیانین‌ها در فیزیولوژی گیاه و نقش آن‌ها در تامین سلامتی مصرف کنندگان باعث شده‌است که تحقیقات زیادی در رابطه با تولید آنتوسیانین در گیاهان از جمله سیب‌زمینی صورت گیرد (De Jong 1987, De Jong et al. 2003a, 2003b, 2004; Stushnoff et al. 2010). نتایج اولیه نشان داد که در سیب‌زمینی تتراپلوئید سه مکان ژنی (Flavonoid-3′,5′-hydroxylase (f3'5'h))،P (Dihydrofavonol 4-reductase (dfr)) و R (Developer (Myb)) D تنوع رنگ پوست غده سیب‌زمینی را کنترل می‌کنند که به‌صورت مشابه در سیب‌زمینی‌های دیپلوئید نیز وجود دارند (Brown 2005). ژن R که روی کروموزوم ۲ قراردارد، در سنتز رنگ قرمز دخالت می‌کند و ژن P در کروموزوم ۱۱ مسئول تولید رنگ آبی یا ارغوانی است (Tanksley et al. 1992; Van Eck et al. 1993, 1994; Zhang et al. 2009a). یافته‌ها نشان می‌دهند که مکان‌های ژنی R و P به تنهایی برای تولید رنگ قرمز و ارغوانی کافی نبوده و هر دو مکان ژنی به فعالیت ژن‌های تنظیم‌کننده بافت اختصاصی، نظیر مکان ژنی D (Developer) برای تولید آنتوسیانین در پوست غده و یا مکان ژنی F به‌منظور سنتز آنتوسیانین در بافت گل، وابسته می‌باشند. این مکان ژنی در سیب‌زمینی‌های دیپلوئید، I (inhibitor) نامیده می‌شود (Dodds and Long 1956). در تحقیقات بعدی و بر اساس تفرق توام[2]، ژن *Dihydrofavonol 4-reductase (dfr)* به‌عنوان ژن ضروری در مسیر بیوسنتزی آنتوسیانین‌ها در سیب‌زمینی‌های حاوی گل و پوست غده قرمز رنگ معرفی شد که در واقع، قسمتی از همان مکان ژنی R است. این ارتباط ژن *dfr* با مکان ژنی R، زمانی مشخص شد که طی تجزیه و تحلیل ژنتیکی یک لاین دیپلوئید سیب‌زمینی هتروزیگوس در مکان ژنی R، معلوم شد که تمامی کلون‌های سیب‌زمینی با رنگ پوست قرمز حاوی مکان ژنی *dfr* هستند (De Jong et al. 2003a; Zhang et al. 2009b). هم‌چنین، آنزیم F3′5′H (Flavonoid-3′,5′-Hydroxylase) که یکی دیگر از آنزیم‌های ضروری موجود در چرخه بیوسنتزی آنتوسیانین است، توسط آللی از ژن *(f3'5'h)Flavonoid-3′,5′-hydroxylase* کد می‌شود که همان ژن P می‌باشد (Jung et al. 2005).

تجزیه و تحلیل مواد آنتوسیانینی موجود در غده‌های رنگی نشان داده است که آنتوسیانین موجود در غده‌های آبی یا ارغوانی از دلفینیدین (Delphinidin) و در غده‌های قرمز رنگ از پلارگونیدین (Pelargonidin) مشتق شده‌اند. محصول پروتئینی هر کدام از سه مکان ژنی R، P و D در یک همکاری مشترک و در چرخه بیوسنتزی آنتوسیانین منجر به تولید دلفینیدین و پلارگونیدین می‌شوند که در نهایت به تولید رنگ در غده‌ها می‌انجامد.

[1] *Solanum tuberosum* L.

[2] Cosegregation

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-04]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.3.5]

بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت برای تولید رنگ قرمز یا بنفش در غده‌های ارقام مختلف سیب‌زمینی حضور و بیان هر سه مکان ژنی ذکر شده ضروری است (Dodds and Long 1956). علاوه بر ژن‌های ساختاری مسیر بیوسنتزی آنتوسیانین، نقش فاکتورهای رونویسی در تنظیم بیان این ژن‌ها اهمیت زیادی دارد. این فاکتورها، تنظیم رونویسی ژن‌های ساختاری در جهت افزایش یا کاهش ژن‌های دخیل در این مسیر بیوسنتزی را به عهده دارند و این که چه نوع فلاونوئیدی در نهایت در اندام یا بافت خاصی تولید شود، به‌وسیله این روابط متقابل پروتئینی تعیین می‌شود. هرکدام از ژن‌های تنظیمی درگیر در این مسیر بیوسنتزی تحت تأثیر شرایط محیطی متفاوت قرار گرفته و در نتیجه بیان متفاوتی نیز در بافت خاص نشان می‌دهند (Quattrocchio et al. 1998, 1999; Albert et al. 2010; Petroni and Tonelli 2011). یکی از این فاکتورهای رونویسی مهم MYB[1] می‌باشد که توسط ناحیه‌ای از مکان ژنی D ساخته می‌شود. بیان فاکتور رونویسی MYB به عنوان بخشی از مکان ژنی D، منجر به تجمع آنتوسیانین در تمامی بافت‌های سیب‌زمینی غیر از گوشت غده (flesh) می‌شود. به منظور افزایش بیان این فاکتور، جایگزینی یک پروموتر (تقویت‌کننده) قوی به نام ubi7 یا پروموتر Gbss می‌تواند تولید آنتوسیانین را در بافت‌های آوند آبکش و پریدرم سیب‌زمینی افزایش دهد (Rommens et al. 2008). فرایند ژنتیکی تولید آنتوسیانین در گوجه‌فرنگی نیز شرایط مشابهی دارد و دخالت ژن *Dihydrofavonol 4-reductase (dfr)* با مکان ژنی R روی کرموزوم ۲، ژن *Flavonoid-3',5'-hydroxylase (f3'5'h)* با مکان ژنی P روی کروموزوم ۱۱ و ژن *an2* (فاکتور رونویسی R2R3 MYB) با مکان ژنی I/D روی کروموزوم ۱۰ در سنتز آنتوسیانین گوجه‌فرنگی معلوم شده‌است (De Jong et al. 2004). بنابراین، تولید رنگدانه قرمز یا بنفش در گیاهان ارتباط مستقیمی با حضور این سه ژن کلیدی در مسیر بیوسنتزی آنتوسیانین دارد. نکته قابل توجه این است که فاکتور رونویسی R2R3 MYB که نقش آن در تنظیم ژن‌های ساختاری تولید آنتوسیانین سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی مشخص شده‌است (Jung et al. 2009)، همپوشانی قابل توجهی با ژن‌های تنظیم کننده تولید آنتوسیانین در گیاهان دیگر مثل اطلسی، بادمجان و فلفل دارد. به این دلیل، می‌توان تصور نمود که جایگاه ژنی یکسانی در تنظیم عملیات تولید آنتوسیانین در گیاهان خانواده سولاناسه ایفای نقش می‌کند (De Jong et al. 2004).

با توجه به اهمیت مصرف مواد گیاهی حاوی آنتوسیانین بالا در کمک به سلامتی افراد، تولید سیب‌زمینی‌های واجد آنتوسیانین مورد اقبال عمومی است (Sorenson, 1992; Johnson, 1995; Lachman et al. 2000; Stintzing and Carle 2004 Brown, 2005). به این لحاظ، تشخیص ارقام سیب‌زمینی دارای آلل‌های غالب سه مکان ژنی *P*، *R* و *D* که تولید آنتوسیانین می‌کنند، برای کشت ضروری می‌باشد. اخیرا به‌منظور تشخیص سه مکان ژنی R P و D در سیب‌زمینی‌های رنگی وسفید، روشی بر مبنای الگوی برش آنزیمی این نواحی ژنی ارائه شده‌است. در این روش، با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی، نواحی خاصی از ژن‌های مورد نظر تکثیر می‌یابد که جایگاه‌های برشی خاصی با آنزیم‌های *Bam*HI، *Taq*I و *Cla*I در آلل‌های غالب و ژن‌های مغلوب و جهش‌یافته دارند. تفاوت در اندازه قطعات حاصل از برش آنزیمی، تعیین‌کننده حضور آلل غالب و مغلوب ژن‌های مذکور خواهد بود (De Jong et al. 2003a; Jung et al. 2005; Jung et al. 2009).

در اصلاح ارقام سیب‌زمینی، درک روابط آلل‌های غالب و مغلوب نواحی ژنی *P*، *R* و *D* برای تعیین عملکرد غده‌های سرشار از آنتوسیانین ضروری است. انتظار می‌رود ژنوتیپ‌های با آرایش ژنی I-R-P یا I-rr-P ظرفیت تولید آنتوسیانین دلفینیدین و ژنوتیپ‌های I-R-pp با تولید پلارگونیدین و ژنوتیپ‌های ii— به ترتیب رنگ آبی/ ارغوانی، قرمز و سفید داشته باشند (Jung et al. 2009). از آنجایی‌که تعیین آرایش ژنی برای انتخاب نتاج مورد نظر از نظر تولید آنتوسیانین و رنگ غده برای تکثیر غیر جنسی بعدی اهمیت زیادی دارد، در پژوهش حاضر سعی شده با استفاده از روش الگوی برش آنزیمی، مطابقت روابط آللی جایگاه‌های ژنی *P*، *R* و *D* در ارقام سفید و رنگی با محتوای آنتوسیانینی مختلف مورد بررسی قرار گیرد.

[1] myeloblastosis

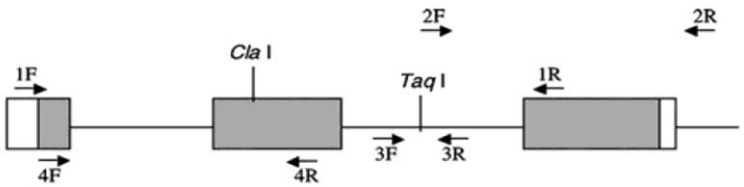
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.3.5]

مواد و روش‌ها

در این بررسی، هفده رقم سیب‌زمینی با رنگ‌های متفاوت مورد استفاده قرار گرفت که غده آن‌ها ازکشورهای هلند، آمریکا و کانادا جمع‌آوری شده بود (جدول ۱). غده‌ها در گلخانه کشت شده و پس از رشد تا مرحله گلدهی، از برگ آن‌ها استخراج DNA صورت گرفت. استخراج DNA از برگ‌های جوان هر رقم سیب‌زمینی به روش CTAB انجام گرفت. برای این منظور، یک گرم برگ در هاون چینی استریل با نیتروژن مایع پودر شده و پس از انتقال به لوله اپندورف، به نمونه مزبور ۸۰۰ میکرولیتر CTAB ۲٪ و ۲۰۰ میکرولیتر بتا- مرکاپتواتانول اضافه شد و لوله‌ها به مدت ٤٥ دقیقه در دمای ٦٥°C در بن‌ماری قرار گرفتند. سپس به هر لوله ٤٠٠ میکرولیتر محلول کلروفرم-ایزوآمیل الکل (۲٤:۱) اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه با ۲۰۵۹۰g سانتریفیوژ شد. مایع رویی هر نمونه با احتیاط به لوله جدید انتقال یافت و به اندازه حجم اولیه کلروفرم-ایزوآمیل الکل به هر کدام اضافه شد. پس از سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه با ۲۰۵۹۰g، فاز رویی جدا و در یک لوله جدید به نسبت ۳:۱ با ایزوپروپانول مخلوط شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۰°C- قرار گرفت. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با ۲۰۵۹۰g سانتریفیوژ شدند و پس از حذف مایع رویی، رسوب DNA دو بار با الکل ۷۰ درصد شستشو داده شد. رسوب DNA در محیط آزمایشگاه خشک شده و سپس به هر کدام از نمونه‌ها ۳۰ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شد. برای بررسی کیفیت و اندازه‌گیری کمیت DNA استخراج شده غلظت DNA استخراج شده با غلظت استاندارد نشانگر III (DNA فاژ لامبدا برش‌یافته با دو آنزیم *Eco*RI و *Hin*dIII) با الکتروفورز روی ژل آگارز مقایسه شد. آزمایشات بهینه‌سازی واکنش PCR، تحت شرایط دمایی پنج درجه سلسیوس بالاتر و پایین‌تر از T_m جفت آغازگرهای مورد استفاده، انجام گرفت تا بهترین شرایط تکثیر به‌دست آید. مخلوط واکنش PCR شامل ۲۰ نانوگرم DNA الگو، ۱۰ پیکومول آغازگر پیشرو و پسرو، یک واحد آنزیم *Taq* DNA polymerase، نه میکرولیتر از محلول 2X Master mix (شرکت Ampliqon دانمارک)، بود و برنامه زمانی تکثیر به‌صورت یک چرخه سه دقیقه‌ای برای واسرشت اولیه در دمای ۹۵°C، ۳۵ چرخه به مدت یک دقیقه برای هر کدام از واکنش‌های واسرشت در دمای ۹٤°C، اتصال بسته به جفت آغازگر استفاده و بسط در دمای ۷۲°C در نظر گرفته شد.

جدول ۱- ارقام سیب‌زمینی مورد بررسی در این پژوهش

نام رقم	رنگ پوست	نام کشور مبدا
Amorosa	قرمز	هلند
BildStar	صورتی	هلند
Charlotte	سفید	هلند
Desiree	صورتی	هلند
Frisia	سفید	هلند
Multa	سفید	هلند
Muza	سفید	هلند
Picasso	سفید چشم بنفش	هلند
Red Roseval	قرمز	هلند
Roseval	صورتی	هلند
Maltaje	سفید	هلند
Gold Doree	سفید	کانادا
Robin	سفید	کانادا
Red Robin	صورتی	کانادا
Purple Majesty	بنفش	آمریکا
Purple Pelisse	قرمز	آمریکا
Istanbuli	سفید	ایران



شکل ۱- محل اتصال جفت آغازگر اختصاصی *Stan2Cla*I-F / *Stan2Cla*I-R در مکان ژنی *Stan2* (D).

اگزون‌های دارای ساختار عملکردی ۱ *(R2)*، ۲ *(R3 MYB)* و نیز ۳ به‌صورت جعبه هاشور زده و اینترون بین آن‌ها با خطوط افقی مشخص شده‌است. پیکان‌ها نشان‌دهنده محل اتصال جفت آغازگرهای *Stan2Cla*I-F / *Stan2Cla*I-R می‌باشند. موقعیت مکان برشی آنزیم *Cla*I نیز بین دو ساختار عملکردی ژن نشان داده شده‌است.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-04]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.3.5]

برنامه شامل یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه بود. به‌منظور تایید تکثیر قطعات مورد نظر در واکنش PCR از ژل آگارز ۱/۲ درصد و بافر TBE استفاده شد. پس از تعیین دمای بهینه برای هر جفت آغازگر (جدول ۲)، تکثیر قطعات DNA هدف در هر رقم با واکنش و برنامه PCR مشابه با روش بهینه سازی انجام گرفت.

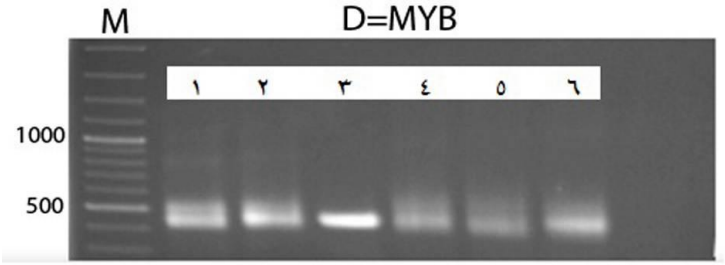
برای تشخیص الگوی باندی نمونه‌های سیب‌زمینی رنگی و سفید، از برش آنزیمی قطعات DNA تکثیر شده مکان‌های ژنی R، P1، P2 و D هر رقم توسط آنزیم‌های *Bam*HI، *Taq*I و *Cla*I استفاده شد. به این منظور، مخلوط واکنش هضم آنزیمی شامل ۱۰ میکرولیتر فرآورده PCR، ۱۷ میکرولیتر آب عاری از آنزیم نوکلئاز، دو میکرولیتر آنزیم برشی مورد نظر با غلظت یک واحد در میکرولیتر و دو میکرولیتر از بافر آنزیم با غلظت ۱۰X تهیه شد و واکنش به مدت سه ساعت در دمای مناسب قرار گرفت. دمای مناسب برای هضم مکان ژنی R با *Bam*HI و مکان ژنی D و P2 با آنزیم *Cla*I، ۳۷°C و برای مکان ژنی P1 با آنزیم برشی *Taq*I، ۶۵°C بود. پس از اتمام واکنش هضم آنزیمی، الگوی قطعات حاصل از برش آنزیمی روی ژل آگارز ۱/۲ درصد با بافر TBE بررسی شد.

نتایج و بحث

با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی *stan2-Cla*I (جدول ۲)، ناحیه مورد انتظار ۴۰۰ نوکلئوتیدی شامل قسمتی از اینترون حد واسط اگزون‌های ۲ و ۳ و بخشی از اگزون ۳، به‌طور یکسان در ارقام مختلف سیب‌زمینی رنگی و سفید، تکثیر شد (شکل ۲). برش آنزیمی این محصولات PCR با *Cla*I منجر به تولید سه باند (<۴۰۰، <۲۰۰ و <۱۰۰) جفت‌بازی در ارقام رنگی (بنفش یا قرمز) شد، در حالی که در ارقام سیب‌زمینی با غده‌های سفید باند <۴۰۰ جفت‌بازی تکثیر نشد و تنها دو باند <۲۰۰ و <۱۰۰ پس از هضم آنزیمی روی ژل آگارز مشاهده شد (شکل ۳).

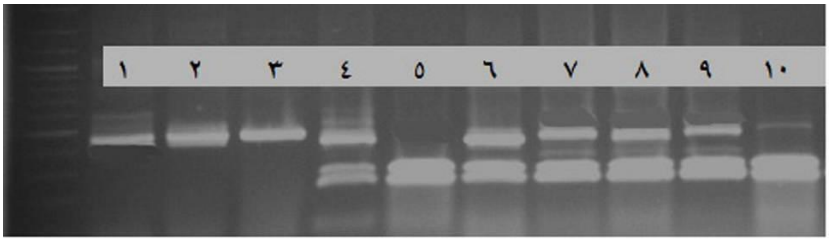
جدول ۲- مشخصات جفت آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش

نام آغازگر	توالی جفت آغازگر	دمای اتصال جفت آغازگر	مکان ژنی	طول فرآورده PCR (bp)	منبع
*Stan2Cla*I-F *Stan2Cla*I-R	5'GTGATTATGTCATCCAAAAGTTTATAG 5'GAATTTCTGAGGTTGAGGTCTTA	۵۷	*D*	۴۴۱	(Jung et al. 2009)
*P2Cla*I-F *P2Cla*I-R	5'GTTGTTGCYTCTACCCCTAAT 5'AACTTTTCATCCCTTTTTCAA	۵۷/۴ ۵۲/۸	*P*	>۱۰۰۰	(Jung et al. 2005)
*P1Taq*I-F *P1Taq*I-R	5'ATGAACGTGTGCAAAAGAAAACTC 5'AATTTATAGTACTTTTCGTATAGTTTTTGA	۶۰/۱ ۵۹/۸	*P*	<۴۰۰	(Jung et al. 2005)
*RBam*HI-F *RBam*HI-R	5'GGCTCTTGGCTTGTCATGAG 5'ARCAYTCCCCTGACTGTTGG	۶۰/۵ ۵۸/۴	*R*	>۵۰۰	(De Jong et al. 2009)

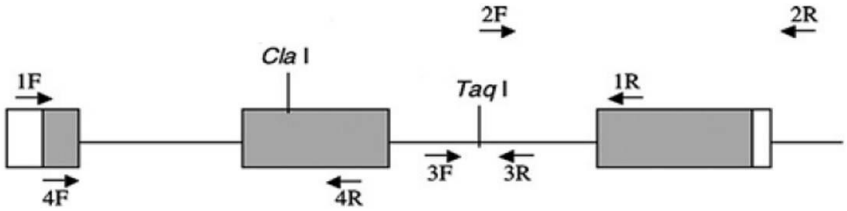


شکل ۲- نتایج تکثیر اختصاصی مکان ژنی *D* در ارقام سیب‌زمینی. ۱. Red Robin ۲. Desiree ۳. Bildstar ۴. Roseval ۵. Red Roseval ۶. Istanbuli.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.3.5]



شکل ۳- نتایج هضم آنزیمی با *Cla*I مکان ژنی *D* تکثیر شده با جفت آغازگر *DCla*I در ارقام سیب‌زمینی محصول PCR هضم‌نشده Red Robin (۱)، Frisia (۲)، Purple Majesty (۳) و محصول PCR هضم‌شده Red Robin (٤) ، Frisia (٥)، Purple Majesty (٦)، Bildstar (۷)، Roseval (۸)، Amorosa (۹)، Istanbuli. (۱۰).



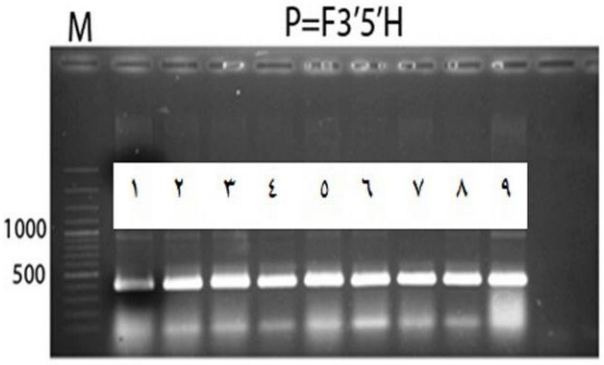
شکل ٤- محل اتصال جفت آغازگرهای اختصاصی *P1Taq*I-F / *P1Taq*I-R (3F/3R) و *P2Cla*I-F / *P2Cla*I-R(4F/4R) (مشخص شده با پیکان) و محل برش آنزیم‌های *Cla*I و *Taq*I در مکان ژنی *P*.

از آنجایی‌که ناحیه تکثیر شده با این جفت آغازگر در آلل d دارای یک مکان برشی *Cla*I است که این محل برش در ارقام رنگی دارای آلل D وجود ندارد، به‌نظر می‌رسد وجود باندهای ۲۰۰> و ۱۰۰> به‌همراه باند ٤۰۰> جفت‌بازی در ارقام رنگی به دلیل وجود توامان آلل مغلوب d به‌همراه آلل غالب D در این ارقام باشد. از طرف دیگر، حضور دو باند ۲۰۰> و ۱۰۰> و عدم حضور باند ٤۰۰> در ارقام سفید نشان‌دهنده فقدان آلل غالب D در این واریته‌ها بود. از آنجایی‌که به دلیل اتوتتراپلویید بودن سیب‌زمینی، امکان حضور چهار آلل در هر مکان ژنی وجود دارد، می‌توان نتیجه گرفت که ارقام رنگی از لحاظ ژنتیکی حالت هتروزایگوت با ترکیب نامشخصی از دو آلل Dd را دارند، اما نمی‌توان دقیقا مشخص نمود که از دو آلل Dd به چه تعداد در این مکان ژنی توزیع شده‌است. به این ترتیب کارآمدی حضور مکان برشی آنزیمی *Cla*I در متمایز نمودن آرایش آللی ارقام سیب‌زمینی دیپلویید رنگی و سفید (Jung et al. 2009) در ارقام تتراپلوئید مورد آزمایش در این بررسی نیز تایید شد. در پژوهش حاضر، بر اساس الگوی هضم آنزیمی، هیچ‌کدام از سیب‌زمینی‌های سفید مورد آزمایش واجد آلل غالب D تشخیص داده نشدند. مکان ژنی D در سیب‌زمینی فاکتور رونویسی R2R3 MYB را کد می‌کند که برای تنظیم ژن‌های کلیدی R و P در تولید آنتوسیانین و تظاهر آن در بافت غده ضروری است (Jung et al. 2009). به نظر می‌رسد تفاوت بین آلل‌های غالب و مغلوب مکان ژنی D در سطح رونویسی است و به همین دلیل، با وجود حضور دو ژن کلیدی R و P به صورت غالب در ارقام سفید، در غیاب آلل غالب ژن D غده‌های رنگی تولید نمی‌شود. علت اصلی این است که آلل مغلوب d (غیرعملکردی) نمی‌تواند به‌عنوان فاکتور رونویسی به افزایش بیان دو ژن کلیدی مسیر بیوسنتزی آنتوسیانین کمک نماید و به این لحاظ، ژن‌های R یا P در این ارقام برای تولید آنتوسیانین و تظاهر رنگ در غده بیان کافی ندارند.

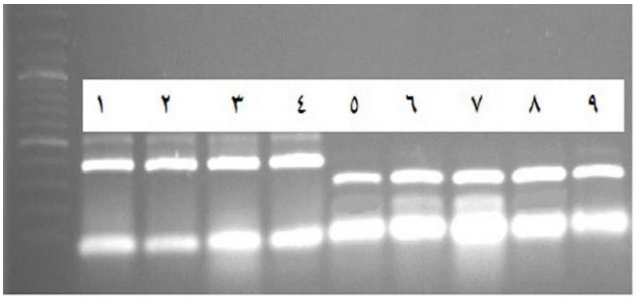
در این بررسی، از دو جفت آغازگر P1TaqI و P2ClaI برای تکثیر بخشی از ژن P استفاده شد. مکان‌های آنزیم برشی *Taq*I در قطعه تکثیری P1TaqI-F / P1TaqI-R و *Cla*I در محصول PCR جفت آغازگر P2ClaI-F / P2ClaI-R برای تمایز دو آلل این ژن در سیب‌زمینی‌های بنفش دیپلویید لازم است. یکی از آلل‌های P در ارقام بنفش دارای مکان برشی *Taq*I اما فاقد مکان برشی *Cla*I است، در حالی که آلل دیگر این ژن مکان برشی *Taq*I را ندارد، اما می‌تواند با *Cla*I برش یابد (Jung et al. 2005). در واکنش PCR با جفت آغازگر اختصاصی P1TaqI ، قطعه مورد انتظار حدود ٤۰۰ نوکلئوتیدی مربوط به مکان ژنی P در کلیه نمونه‌های

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.3.5]

با غده سفید، قرمز و بنفش تکثیر یافت (شکل ۵). پس از هضم محصول PCR با آنزیم *Taq*I، ارقام بنفش Purple Pelisse و Purple Majesty دو قطعه ۲۱۰ و ۲۸۰ جفت‌بازی تولید نمودند، در حالی‌که، ارقام با پوست قرمز (Red Robin و Bildstar) و سفید (Istanbuli) تنها یک قطعه ۲۸۰ جفت‌بازی ایجاد کردند (شکل ٦). حضور قطعه ۲۱۰ نوکلئوتیدی پس از هضم جایگاه ژنی P با آنزیم *Taq*I در سیب‌زمینی هاپلوتایپ بنفش، نشانگر وجود تنها آلل اختصاصی رنگ بنفش است (Jung et al. 2005) که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد (شکل ٦).



شکل ۵- نتایج تکثیر اختصاصی مکان ژنی *P* با استفاده از جفت آغازگر *P1TaqI* در ارقام سیب‌زمینی. ۱. *Red Robin* ۲. *Desiree* ۳. *Bildstar* ٤. Roseval ٥. Red Roseval ٦. Istanbuli ۷. Purple Majesty ۸. Picasso ۹. Charlotte.



شکل ٦- نتایج هضم آنزیمی با *Taq*I مکان ژنی *P* تکثیر شده با جفت آغازگر *P1Taq*I در ارقام سیب‌زمینی

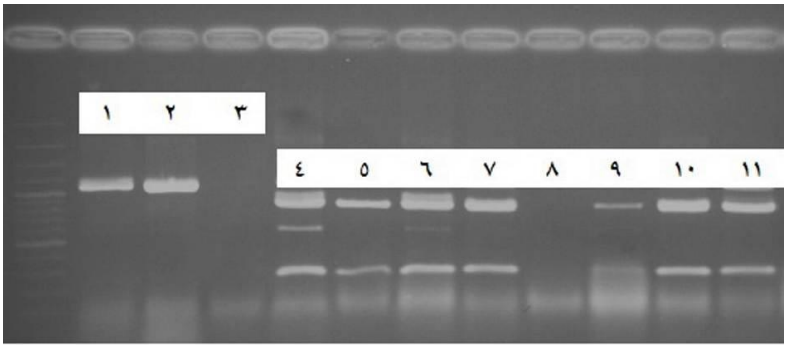
محصول PCR هضم‌نشده Red Robin (۱)، Frisia (۲)، Purple Majesty (۳)، Picasso (٤) و محصول PCR هضم‌شده Red Robin (٥)، Purple Pelisse (٦)، Purple Majesty (۷)، Bildstar (۸)، Istanbuli. (۹).

با توجه به عدم حضور باند ۲۱۰ جفت‌بازی در ارقام سفید و قرمز چنین استنباط می شود که توالی این قطعه در این ارقام با ارقام بنفش تفاوت‌هایی دارد، به‌طوری‌که به‌علت داشتن تعداد زیادی جایگاه برش آنزیمی *Taq*I به قطعات کوچکتری تقسیم شده‌است که تشخیص این قطعات به خاطر کوچکی اندازه روی ژل آگارز ممکن نیست. اگر چنین فرضیه‌ای درست باشد، می‌توان نتیجه گرفت حضور قطعه ۲۱۰ جفت‌بازی در هضم آنزیمی با *Taq*I نشان دهنده آلل عملکردی (غالب) P در ارقام بنفش است و ارقام سفید و قرمز دارای آلل غیرعملکردی p میباشند. در ارقام قرمز و سفید (در صورتی‌که ارقام سفید حاوی آلل غالب D و آلل غیرعملکردی p باشند) پس از هضم قطعه ۲۸۰ جفت‌بازی با *Taq*I، تعداد زیادی قطعه کوچک‌تر ایجاد می‌شود که احتمالا تشخیص قطعات کوچکتر روی ژل آگارز به دلیل اندازه کوچک آن‌ها امکان‌پذیر نیست.

به‌دلیل تاثیر گذاری ژن *D* بر بیان ژن *P* به‌عنوان کد کننده آنزیم فلاونوئید ′۳، ′٥- هیدروکسیلاز برای تظاهر رنگ بنفش، عدم تظاهر رنگ بنفش در غده‌های قرمز را، علی‌رغم داشتن ژن D، می‌توان به عدم وجود آلل عملکردی رنگ بنفش (P) نسبت داد. در غده‌های سفید نیز چون هیچ تظاهری از رنگ در ارقام سفید دیده نمی‌شود، پیش‌فرض این است که ارقام سفید حتی اگر واجد آلل عملکردی رنگ بنفش (P) باشند، به‌دلیل فقدان لوکوس D قادر به تظاهر رنگ نیستند.

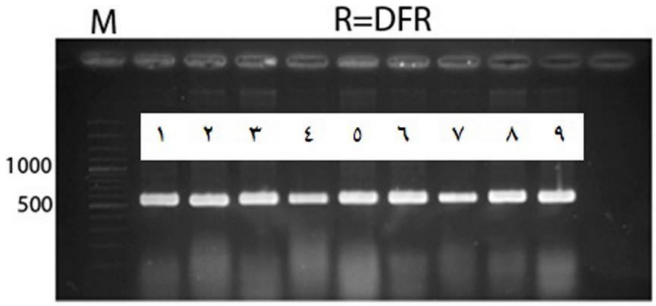
با جفت آغازگر اختصاصی P2ClaI یک قطعه ۱۱۰۰ جفت‌بازی از آلل P2 ژن f3′5′h در کلیه نمونه‌های سیب‌زمینی با غده سفید، قرمز و بنفش تکثیر شد، ولی چنین باندی در سیب‌زمینی شیرین (Ipomoea batatas) از خانواده Convolvulaceae تولید نشد. عدم تکثیر ژن P2 در رقم سیب‌زمینی شیرین نشان داد که این جفت آغازگر اختصاصی خانواده Solanaceae می‌باشد. هضم آنزیمی این قطعه با *Cla*I در همه نمونه‌ها منجر به تولید دو قطعه ۹۰۰ و ۲۵۰ نوکلئوتیدی شد، ولی در ارقام بنفش یک باند حدود ٦٥۰ جفت‌بازی نیز به‌دست آمد که در الگوی هضم آنزیمی ارقام سفید و قرمز مشاهده نشد (شکل ۷). مقایسه الگوی هضم آنزیم *Cla*I در قطعات ژنومی حاصل از تکثیر ژن P2 در این تحقیق با الگوی هضم قطعات cDNA پس از بیان تحقیق قبلی (Jung et al. 2005) نشان داد که در هر دو الگوی هضم، قطعه ۲۵۰ جفت‌بازی وجود دارد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.3.5]



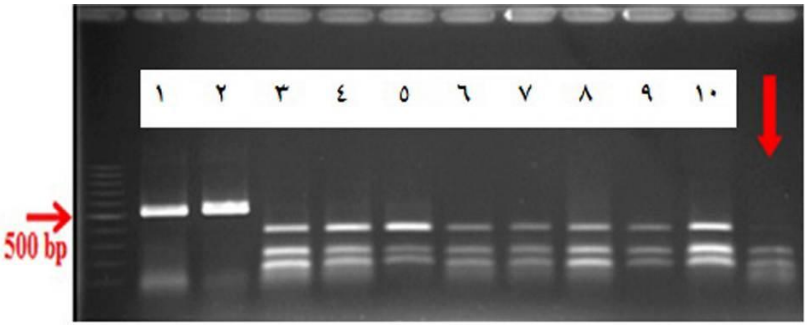
شکل ۷- نتایج هضم آنزیمی با *Cla*I مکان ژنی P2 تکثیر شده با جفت آغازگر P2ClaI در ارقام سیب‌زمینی.

محصول PCR هضم‌نشده Purple Majesty (۱)، Picasso (۲)، Sweet Potato (۳) و محصول PCR هضم‌شده Purple Majesty (٤)، Picasso (٥)، Purple Pelisse (٦)، Amorosa (۷)، Sweet Potato (۸)، Istanbuli (۹)، Gold Doree (۱۰)، Charlotte (۱۱).



شکل ۸- نتایج تکثیر اختصاصی مکان ژنی *R* با استفاده از جفت آغازگر R*Bam*HI در ارقام سیب‌زمینی.

. ۱. Red Robin ۲. Desiree ۳. Bildstar ٤. Roseval ٥. Red Roseval ٦. Istanbuli ۷. Purple Majesty ۸. Picasso ۹. Charlotte.



شکل ۹- نتایج هضم آنزیمی با *Bam*HI مکان ژنی *R* تکثیر شده با جفت آغازگر R*Bam*HI در ارقام سیب‌زمینی.

محصول PCR هضم‌نشده Red Robin (۱)، Frisia (۲) و محصول PCR هضم‌شده Purple Majesty (۳)، Desiree (٤)، Red Robin (٥)، Purple Pelisse (٦)، Red Roseval (۷)، Bildstar (۸)، Roseval (۹)، Amorosa (۱۰)، Frisia (۱۱).

چون جایگاه برش آنزیم *Cla*I در داخل اگزون دوم ژن *P* می‌باشد احتمالا می‌توان توجیه کرد که این قطعه حاصل برش حد فاصل دو جایگاه چند شکل برش *Taq*I و *Cla*I (شکل ٤) در داخل اگزون دوم است. به‌نظر می‌رسد قطعه باقی‌مانده در توالی ژنومی P که در ارقام بنفش حدود ٦٥٠ جفت‌باز است، همان قطعه دوم حاصل از هضم *Cla*I در داخل اگزون و اینترون دوم باشد. وجود قطعه حدود ۹۰۰ جفت‌بازی در ارقام سفید و قرمز را می‌توان احتمالا به عدم وجود جایگاه برش این آنزیم در اگزون دوم نسبت داد. وجود قطعه ۹۰۰ جفت‌بازی در ارقام بنفش شاید با هتروزایگوت بودن این ارقام در این لوکوس مرتبط باشد. از

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.3.5]

آنجایی‌که این دو آلل اختصاصی ارقام بنفش هستند، می‌توانند باعث تمایز این ارقام از انواع سفید و قرمز شوند.

مکان ژنی R سیب‌زمینی، آنزیم دی هیدروفلاونول ٤-ردوکتاز را کد می‌کند (De Jong et al. 2003a; Zhang et al. 2009b). قطعه حاصل تکثیر این مکان ژنی به وسیله جفت آغازگر RBamHI، دارای یک جایگاه برش آنزیم *Bam*HI است که پس از هضم منجر به تمایز ارقام سفید و رنگی می‌شود.

در واکنش PCR با جفت آغازگر R*Bam*HI دارای جایگاه برشی *Bam*HI، قطعه مشابه حدود ٦٠٠ جفت‌بازی در ارقام مورد بررسی تکثیر شد (شکل ٨). هضم قطعه مزبور با *Bam*HI منجر به تولید دو قطعه ٢٣١ و ١٦٢ جفت‌بازی شد. در ارقام بنفش و قرمز یک قطعه ٣٧٠ جفت‌بازی نیز ظاهر شد که چنین قطعه‌ای در ارقام سفید وجود نداشت (شکل ٩). برش آنزیمی *Bam*HI قطعه مزبور در یک تحقیق مشابه دیگر (De Jong et al. 2003a)، به ظهور قطعات حدود ٣٧٠ و ١٦٢ جفت‌بازی در ارقام رنگی و تولید قطعات حدود ٢٣١، ١٥٨ و ١٤٤ جفت‌بازی در ارقام سفید منجر شده بود. بر مبنای این نتایج چنین تفسیر شد که حضور یا عدم حضور قطعه ٣٧٠ جفت‌بازی می‌تواند به تفکیک ارقام رنگی و سفید کمک نماید. با توجه به عدم تفکیک قطعات ١٥٨ و ١٤٤ جفت‌بازی از قطعه ١٦٢ جفت‌بازی در ژل آگارز، می‌توان چنین فرض نمود که نتایج برش آنزیمی قطعه ٦٠٠ نوکلئوتیدی با *Bam*HI در پژوهش حاضر با نتایج تحقیق قبلی (De Jong et al. 2003a) مطابقت دارد. در پژوهش حاضر ارقام قرمز و بنفش با تولید دو قطعه ٣٧٠ و ١٦٢ (با یک جایگاه برش آنزیم *Bam*HI) واجد آلل غالب R و ارقام سفید با تولید سه قطعه ١٤٤، ١٥٨ و ٢٣١ جفت‌باز (با دو جایگاه برش آنزیم *Bam*HI) دارای آلل مغلوب r تشخیص داده شدند. در این پژوهش، چون ارقام رنگی هر دو نوع آلل غالب R (قطعه ٣٧٠ جفت‌بازی) و مغلوب r (٢٣١ جفت‌بازی) را پس از هضم نشان دادند می‌توان نتیجه گرفت ارقام رنگی تتراپلویید استفاده شده هتروزایگوت بوده ولی ژنوتیپ آن‌ها مشخص نیست.

نتایج بررسی ژن‌های مسیر بیوسنتزی آنتوسیانین ارقام حاوی غده‌های سفید، قرمز و بنفش‌رنگ نشان داد که تمامی این ارقام در سطح ژنومی دارای سه ژن کلیدی P، R و D (I در گونه‌های دیپلوئید سیب‌زمینی) مورد نظر هستند. با این وجود، توالی نوکلئوتیدی این ژن‌ها در بین ارقام رنگی و سفید تغییراتی دارند که بر اساس این تفاوت‌های نوکلئوتیدی، جایگاه‌های هضم آنزیمی اختصاصی برای تشخیص آلل‌های غالب و مغلوب طراحی شده‌است (De Jong et al. 2003a; Jung et al. 2005; Jung et al. 2009).

اگر چه این روش برای تعیین آلل‌های عملکردی و غیرعملکردی در سیب‌زمینی‌های دیپلویید طراحی شده‌است (Jung et al. 2005; Jung et al. 2009). ولی تعمیم کاربرد آن در سیب‌زمینی‌های تتراپلویید رنگی و سفید در این تحقیق نیز موفقیت آمیز بود. حضور آلل‌های غالب P1 و P2 در ارقام بنفش و آلل غالب R در ارقام بنفش و قرمز نشان داد که تعیین حضور این آلل‌های غالب به روش برش آنزیمی قطعات تکثیر یافته، برای تفکیک نتاج ارقام رنگی از ارقام سفید سیب‌زمینی حاوی آلل‌های مغلوب p و r مناسب است. با این وجود، به دلیل تاثیر مستقیم لوکوس D در بیان ژن‌های P و R، تعیین غالبیت آلل D در این ارقام الزامی می‌باشد.

این روش تعیین الگوی هضم آنزیمی مکان‌های ژنی ارقام سیب‌زمینی، می‌تواند به‌عنوان یک نشانگر در برنامه‌های اصلاحی کاربرد مناسبی داشته باشد. هم‌چنین، پس از تشخیص ژن‌های *P* یا *R* به این روش، می‌توان آن‌ها را به‌همراه آلل عملکردی *D* با راه‌اندازهای مناسب بیانی اختصاصی بافت، به ارقام سفید سیب‌زمینی منتقل نمود تا ارقامی با الگوهای رنگی به‌دست آید.

منابع

Albert NW, Lewis DH, Zhang H, Schwinn KE, Jameson PE, Davies KM (2010) Members of an R2R3-MYB transcription factor family in *Petunia* are developmentally and environmentally regulated to control complex floral and vegetative pigmentation patterning. The Plant Journal 65: 771-784.

Brown CR (2005) Antioxidants in potato. American Journal of Potato Research 82: 163-172.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-04]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.3.5]

De Jong H (1987) Inheritance of pigmented tuber flesh in cultivated diploid potatoes. American Potato Journal 64: 337-343.

De Jong WS, De Jong DM, De Jong H, Kalazich J, Bodis M (2003a) An allele of dihydroflavonol 4-reductase associated with the ability to produce red anthocyanin pigments in potato (*Solanum tuberosum* L.). Theoritical Applied Genetics 107: 1375-1383.

De Jong WS, De Jong DM, Bodis M (2003b) A fluorogenic 5́ nuclease (TaqMan) assay to assess dosage of a marker tightly linked to red skin color in autotetraploid potato. Theoritical Applied Genetics 107: 1384-1390.

De Jong WS, Eannetta NT, De Jong DM, Bodis M (2004) Candidate gene analysis of anthocyanin pigmentation loci in the Solanaceae. Theoretical and Applied Genetics 108: 423-432.

Dodds KS, Long DH (1956) The inheritance of colour in diploid potatoes. II. A three-factor linkage group. Journal of Genetics 54:27-41.

Horakova L (2011) Flavonoids in prevention of diseases with respect to modulation of Ca-pump function. Interdisciplinary Toxicology 4: 114-124.

Johnson CA (1995) 1995-1996 seed acres reflect more varieties, market shifts. Valley Potato Grower 61: 13-16.

Jung CS, Griffiths HM, De Jong DM, Cheng S, Bodis M, De Jong WS (2005) The potato *P* locus codes for flavonoid 3',5'-hydroxylase. Theoritical Applied Genetics 110:269-275.

Jung CS, Griffiths HM, De Jong DM, Cheng S, Bodis M, Kim TS, De Jong WS (2009) The potato developer (*D*) locus encodes an R2R3 MYB transcription factor that regulates expression of multiple anthocyanin structural genes in tuber skin. Theoritical Applied Genetics 120: 45-57.

Lachman J, Hamouz K, Orsak M, Pivec V (2000) Potato tubers as a significant source of antioxidants in human nutrition. Rostlinna Vyroba 46: 231-236.

Petroni k, Tonelli CH (2011) Recent advances on the regulation of anthocyanin synthesis in reproductive organs. Plant Science 181: 219-229.

Quattrocchio F, Wing JF, van der Woude K, Mol JN, Koes R (1998) Analysis of bHLH and MYB domain proteins: species-specific regulatory differences are caused by divergent evolution of target anthocyanin genes. Plant Journal 13:475-488.

Quattrocchio F, Wing J, van der Woude K, Souer E, de Vetten N, Mol J, Koes R (1999) Molecular analysis of the anthocyanin2 gene of *petunia* and its role in the evolution of flower color. Plant Cell 11:1144-1433.

Rommens CM, Richael CM, Yan H, Navarre DA, Krucker JYeM, Swords K (2008) Engineered native pathways for high kaempferol and caffeoylquinate production in potato. Plant Biotechnology Journal 6: 870-886.

Salaman RN (1910) The inheritance of colour and other characters in the potato. Journal of Genetics 1:7-46.

Sorenson EJ (1992) Specialty potatoes. American Vegetable Grower 1: 36-39.

Stintzing FC, Carle R (2004) Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. Trends Food Science Technology 15: 19-38.

Stushnoff C, Ducreux LJM, Hancock RD, Hedley PE, Holm DG, McDougall GJ, Jiang W, McNicol JW, Morris J, Morris WL, Sungurtas JA, Verrall SR, Zuber T, Taylor MA (2010) Flavonoid profiling and transcriptome analysis reveals new gene–metabolite correlations in tubers of *Solanum tuberosum* L. Journal of Experimental Botany 61:1225-1238.

Tanksley SD, Ganal MW, Prince JP, de-Vicente MC, Bonierbale MW, Broun P, Fulton JJ, Giovannoni TM, Grandillo S, Martin GB, Messeguer R, Miller JC, Miller L, Paterson AH, Pineda O, Roder MS, Wing RA, Wu W, Young ND (1992) High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. Genetics 132: 1141-1160.

Van Eck HJ, Jacobs JME, Van Dijk J, Stiekema WJ, Jacobsen E (1993) Identification and mapping of three flower colour loci of potato (*S. tuberosum*) by RFLP analysis. Theoritical Applied Genetics 86: 295-300.

Van Eck HJ, Jacobs JME, Van Den Berg PMMM, Stiekema WJ, Jacobsen E (1994) The inheritance of anthocyanin pigmentation in potato (*Solanum tuberosum* L.) and mapping of tuber skin color loci using RFLPs. Heredity 73: 410-421.

Zhang Y, Jung CS, De Jong WS (2009a) Genetic analysis of pigmented tuber flesh in potato. Theoritical Applied Genetics 119: 143-150.

Zhang Y, Cheng S, De Jong D, Griffiths H, Halitschke R, De Jong W (2009b) The potato R locus codes for dihydroflavonol 4-reductase. Theoritical Applied Genetics 119: 931-937.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-09-04]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.2.3.5]