استفاده از نشانگر مولکولی ISSR در بررسی تنوع ژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های توتون

مرضیه شازده‌احمدی[۱،*] و مهین خرازی[۲]

۱- مربی، گروه بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش، بهشهر، مازندران

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۱۰/۳۰ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹٤/۱۲/۲٤)

چکیده

گام اول در برنامه‌های به‌نژادی، تعیین تنوع ژنتیکی مواد اصلاحی است. بررسی تنوع ژنتیکی توتون برای برنامه‌های اصلاحی و حفاظت از ذخایر ژنتیکی، امری حیاتی بوده و اطلاع از سطح تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ‌های توتون برای انتخاب والدین در برنامه‌های اصلاحی از اهمیت زیادی برخوردار است. استفاده از نشانگرهای مولکولی، سبب کاهش مدت زمان اصلاح و هزینه‌های پروژه‌های اصلاحی می‌شود. در این تحقیق، تنوع ژنتیکی ۱۰۰ ژنوتیپ گیاه توتون با استفاده از ۲۵ نشانگر ISSR ارزیابی شد. الگوی نواربندی بر اساس وجود و عدم وجود نوارها به‌ترتیب با یک و صفر نشان داده شدند. از تعداد ۲۳۷ قطعه‌ای که درکل ارقام تولید شدند، تعداد ۱۹۵ قطعه چندشکل بودند و میانگین چندشکلی از ٤ تا ۱۲ به ازای هر آغازگر متفاوت بود. میانگین درصد چندشکلی تعیین شده در مجموع ژنوتیپ‌های مورد بررسی ۹٤/۱۰ بود. به‌منظور تعیین کارایی نشانگرها، محتوای اطلاعاتی چندشکلی (PIC) و همچنین درصد چندشکلی آن‌ها محاسبه شد. آغازگرهای UBC815، UBC812 و UBC878 با دارا بودن بهترین پارامترهای نشانگری به عنوان بهترین آغازگرها جهت بررسی تنوع ژنتیکی در این تحقیق معرفی شدند. به‌منظور ارزیابی تشابه ژنتیکی بین ارقام، ضرایب تشابه مختلف Dice، Jaccard و SM محاسبه شده و آزمون تطابق مانتل انجام و دندروگرام براساس ضریب تشابه SM و الگوریتم UPGMA ترسیم شد. ضریب کوفنتیک بدست آمده برابر ۰/۹٦۳۲ بود. همه ژنوتیپ‌های مورد بررسی تشکیل دو خوشه‌ی مجزا دادند که بیانگر کارایی بالای آغازگرهای مورد استفاده در تکثیر قطعات مناسب از ژنوم بود. تجزیه به مختصات اصلی نشان داد که سه مولفه اول توانستند در مجموع ۷۹/٦۵ درصد از واریانس کل را توجیه کنند. با توجه به اهداف این تحقیق، می‌توان به این نتیجه رسید که بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های توتون با استفاده از نشانگر ISSR مفید بوده و نشانگر ISSR می‌تواند به عنوان یک سیستم نشانگر مناسب جهت تشخیص تنوع و روابط ژنتیکی در اصلاح این گیاه مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: تجزیه خوشه‌ای، تنوع ژنتیکی، توتون، چندشکلی، نشانگر ISSR

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: **noshinshazdeahmadi@yahoo.com**

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-07-16]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.3.7]

[DOI: 10.29252/pgr.2.2.33]

مقدمه

توتون (*Nicotiana tabacum* L.) گیاهی است از خانواده سولاناسه[1] و از جنس نیکوتیانا[2]، روزکوتاه، یکساله، خودگشن[3] و از محصولات با ارزش زراعی، صنعتی و اقتصادی می‌باشد. در میان گونه‌های جنس *Nicotiana*، گونه N.*tabacum* یک گونه آلوپلی پلوئید (2n= 4X= 48) است که از هیبریداسیون بین گونه‌های جنس N.*Sylvestris* و N.*tomentosiformis* و دو برابر شدن تعداد کروموزوم های هیبرید حاصل از آن‌ها بوجود آمده است (Arslan and Okunus, 2006). اهمیت توتون در داشتن نیکوتین است. نیکوتین آلکالوئیدی است با فرمول $C_{10}H_{14}N_2$ که در ریشه‌ی توتون ساخته می‌شود (Conolly *et al*., 2007). طبق آخرین گزارش فائو، عملکرد توتون به طور متوسط در جهان به ۱۷۸۳۸ کیلوگرم در هکتار رسیده است. نواحی شمالی ایران به علت شرایط اقلیمی خاص از مناطق مستعد کشت توتون می‌باشند که در سال ۲۰۱۰ سطح زیر کشت آن به ۹۵۸۶ هکتار و میزان تولید برگ خشک آن به ۱٤۱٤٥ تن در کل رسیده است (FAO, 2010).

با عنایت به اهمیت اقتصادی توتون، اولین قدم برای اجرای برنامه‌های اصلاحی روی توتون، اطلاع از تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی بین اکوتیپ‌های مختلف آن می‌باشد. اصلاح کنندگان نباتات که در جهت دستیابی به تنوع ژنتیکی موجود در کلکسیون ژرم پلاسم فعالیت می‌کنند، به اطلاعاتی در مورد میزان تنوع نیاز دارند (Arslan and Okunus, 2006). توتون دارای ژرم پلاسم نسبتا بزرگی متشکل از تعداد زیادی رقم و لاین است. بدیهی است شناسایی و ردیابی هر ژنوتیپ در بانک بذر و برنامه‌های اصلاحی، کمک شایانی به پیشرفت امور مربوط به اصلاح ژنوتیپ‌ها و به کارگیری آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی خواهد کرد (Denduang boripant *et al*., 2010). مطالعه‌ی تنوع ژنتیکی نه تنها برای سازماندهی و حفاظت مواد گیاهی، بلکه برای پدیده هتروزیس و تولید بذور هیبرید نیز اهمیت دارد. تنوع ژنتیکی بین و داخل جمعیت‌های گونه‌های گیاهی، یکی از موارد اصلی مورد مطالعه به نژادگران و متخصصان ژنتیک می‌باشد تا واریته‌های با عملکرد بالا و مقاوم انتخاب شوند (Gepts, 2006).

در شیوه سنتی، ارزیابی تنوع ژنتیکی بر اساس خصوصیات فنولوژیک و مورفولوژیک صورت می‌گرفت، این روش زمان‌بر بوده و در آن، تعدادی از صفات تحت تأثیر تغییرات محیطی قرار می‌گیرند و با توجه به اثرات متقابل محیط و ژنوتیپ بر فنوتیپ گیاهان، این روش کارایی لازم را نخواهد داشت. از بین انواع روش‌هایی که برای تخمین میزان تنوع ژنتیکی در بین گونه‌های گیاهی موجود هستند، ثابت شده است که نشانگرهای مولکولی DNA[4] ابزار قدرتمندی جهت ارزیابی تنوع و روابط ژنتیکی هستند. نشانگرهای مولکولی ابزارهای توانمندی را برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گیاهی و اصلاح گیاهان فراهم آورده اند. آن‌ها کاربردهای زیادی در بررسی تنوع ژنتیکی، انگشت‌نگاری، تسهیل اینتروگرسیون، یافتن روابط خویشاوندی بین گونه‌ها، شناسایی ارقام، تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنیک، انتخاب دقیق والدین مناسب جهت تولید دورگ‌های قوی دارند (Ren and Timko, 2001).

روش‌های بر پایه‌ی واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)[5] به دلیل سهولت، هزینه پایین، سرعت و عدم نیاز به کاوشگرهای رادیواکتیو، امروزه به طور گسترده ای در بررسی تنوع ژنتیکی ارقام مختلف گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در بین نشانگرهای مبتنی بر PCR، نشانگرهای ISSR[6] (نواحی بین توالی‌های تکراری ساده) به طور وسیعی توسط محققان برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفته اند و کارآمد گزارش شده اند. نشانگر ISSR مبتنی بر واکنش زنجیره ای پلیمراز و

1-Solanaceae
2-Nicotiana
3-Self-pollination

4-DNA molecular marker
5-Polymerase chain reaction(PCR)
6-Inter simple sequence repeat(ISSR)

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-07-16]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.3.7]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.33]

جزء انواع تغییر یافته‌ی نشانگرهای ریزماهواره می‌باشد. نشانگرهای ISSR، توسط PCR و با استفاده از توالی‌های مرکزی ریزماهواره به عنوان آغازگر، همراه با چند نوکلئوتید انتخابی در انتهای ´۳ یا ´۵ به عنوان لنگرهایی داخل مناطق غیر تکراری مجاور تکثیر می‌شوند (Li *et al.*, 2008). نشانگر ISSR یک تکنیک ساده، سریع و موثر و بسیار تکرار پذیر است و دارای ویژگی‌های بسیار مطلوبی مانند تجزیه و تحلیل همزمان تعداد زیادی جایگاه ژنی، دقت بالا، تنوع بسیار بالا، هزینه پایین، سرعت و سهولت اجرا به طور گسترده ای در گیاهان به کار گرفته شده است. نشانگر ISSR نیمه تصادفی بوده و از تکرار پذیری و چندشکلی بالایی برخوردار است و در دامنه وسیعی از گیاهان کاربرد دارد. همچنین به علت غالبیت، سادگی، سرعت عمل و قدرت تفکیک بالا، قدرت بیشتری درآشکار سازی تنوع ژنتیکی دارد (Reddy *et al.*, 2002; Hasani *et al.*, 2013). مزایای استفاده از نشانگر ISSR این است که اختصاصی بودن نشانگرهای ریزماهواره را به نمایش می‌گذارد، اما با بهره گیری از مزیت‌های نشانگرهای تصادفی، نیاز به هیچ گونه اطلاعات توالی برای سنتز آغازگر ندارد. از جمله مزایای دیگر آن می توان به داشتن چندین مقر ژنی چند شکل، قابل کاربرد با تعداد زیادی نمونه و هزینه پایین اشاره کرد. تجزیه و تحلیل ISSR می‌تواند در مطالعات مربوط به هویت ژنتیک، نسب، کلون، شناسایی سویه و مطالعات تاکسونومیک گونه‌های بسیار نزدیک و همچنین در مطالعات نقشه برداری ژن مورد استفاده قرار گیرد (Reddy *et al.*, 2002).

مطالعاتی در زمینه ارزیابی تنوع ژنتیکی توتون در جهان و ایران در منابع موجود است. در پژوهشی، دندوانگ بوری پانت و همکاران (Denduang boripant *et al.*, 2010) به منظور تعیین ارتباط ژنتیکی جهت توسعه یک طبقه بندی استاندارد از ۲۰ آغازگر ISSR روی ٦٦ واریته توتون (۱۳ واریته محلی و ۵۳ واریته وارداتی) استفاده شد. آن‌ها گزارش کردند که از بین آغازگرهای مورد استفاده، ۵ آغازگر نوارهای قابل تکرار ایجاد می‌کنند و می‌توان با آن‌ها به ارتباط ژنتیکی ژنوتیپ‌های بومی و وارداتی پی برد. یانگ و همکاران (Yang *et al.*, 2007) تنوع ژنتیکی ۱۱۸ رقم از تیپ‌های مختلف توتون شامل توتون‌های گرمخانه‌ای، آفتاب خشک، بارلی، شرقی و تیپ وحشی را با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR مورد مطالعه قرار دادند. نتایج بررسی آن‌ها نشان داد که تنوع ژنتیکی پایینی در داخل و بین تیپ‌های زراعی توتون وجود دارد. در حالی که فاصله ژنتیکی و هتروزیگوتی در میان ژنوتیپ‌های وحشی بیشتر از ژنوتیپ‌های زراعی می‌باشد. قلی‌زاده و همکاران (Gholizadeh *et al.*, 2012)، در مطالعه ای تنوع ژنتیکی ۷۲ ژنوتیپ توتون گرمخانه‌ای را با استفاده از نشانگرهای SSR مورد ارزیابی قرار دادند. میزان تشابه ژنتیکی در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه آن‌ها توسط ضریب تشابه جاکارد در دامنه ای بین ۰/۰۸ تا ۰/۸٤ قرار داشت که نشان دهنده تنوع ژنتیکی بالا در این ژنوتیپ‌ها بود. در پژوهشی دیگر، ادریسی ماریان و همکاران (Edrisi Maryan *et al.*, 2012)، تنوع ژنتیکی ٤۰ رقم توتون را با استفاده از ۱۲ آغازگر ISSR مورد بررسی قرار دادند. در تجزیه خوشه ای به روش UPGMA نتایج به دست آمده از بررسی آن‌ها با تنوع ژنتیکی احتمالی مطابقت داشت و تنوع ژنتیکی قابل قبولی را در ژرم‌پلاسم‌های توتون گرمخانه‌ای گزارش کردند. ضریب کوفنتیک محاسبه شده توسط آن‌ها برابر با r =۰/۹ بدست آمد. این محققین پیشنهاد دادند به منظور گسترش پایه ژنتیکی توتون‌های گرمخانه‌ای باید از پتانسیل ژنتیکی موجود در ژنوتیپ‌های توتون بهره برد. حسنی و همکاران (Hassani *et al.*, 2013) از نشانگرهای مولکولی ISSR برای برآورد تنوع ژنتیکی ۵۰ رقم توتون استفاده کردند و با استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای، تیپ‌های مختلف توتون در گروه‌های مجزای ژنتیکی قرار گرفتند. کی و همکاران (Qi *et al.*,2006) جهت شناسایی ژرم پلاسم توتون، تنوع و روابط ژنتیکی ۱۰۰ ژنوتیپ توتون را با استفاده از نشانگر ISSR مورد بررسی قرار دادند. نتایج

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-07-16]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.3.7]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.33]

آن‌ها نشان داد که نشانگر ISSR دارای ثبات بهتری بوده و جهت تعیین تنوع و روابط ژنتیکی میان ژنوتیپ‌ها، ایجاد زمینه علمی برای تحقیقات ژنتیکی، اصلاح توتون و هم چنین انتخاب والدین مناسب جهت تهیه نقشه پیوستگی مناسب می‌باشد.

تائو و همکاران (Tao *et al*., 2009) با استفاده از نشانگرهای مولکولی IRAP و ISSR به مقایسه تنوع ژنتیکی ۲۸ رقم توتون پرداختند. ضریب تشابه ژنتیکی بین آغازگرهای IRAP و ISSR برابر با ۰/۸۲ بدست آمد و در نهایت مشخص گردید که در تحقیق آن‌ها، نشانگرهای ISSR به دلیل داشتن فاصله ژنتیکی بیشتر، پایداری بهتر و میزان PIC بالاتر، برای مطالعه تنوع ژنتیکی ارقام توتون مناسب‌تر تشخیص داده شدند. ژانگ و همکاران (Zhang *et al*., 2008)، جهت بررسی تنوع ژنتیکی ۲۸ رقم توتون گرمخانه‌ای از نشانگرهای RAPD و AFLP استفاده کردند. تعداد باند چند شکلی ایجاد شده توسط هر آغازگر به طور متوسط ۹/٦ باند بود. بر اساس تجزیه خوشه ای به روش UPGMA، ژنوتیپ‌های مورد بررسی در سه خوشه‌ی اصلی قرار گرفتند.

با توجه به پراکندگی توتون در ایران و به منظور دستیابی به اطلاعات لازم و ضروری جهت شناسایی ژرم پلاسم توتون، این تحقیق با هدف بررسی امکان کاربرد نشانگر ISSR در ارزیابی تنوع ژنتیکی و دسته بندی ژنوتیپ‌های توتون، کمک به مطالعات بعدی برای اهداف به نژادی و نیز تعیین میزان خویشاوندی ژنوتیپ‌های توتون انجام شد. مطالعه تنوع ژنتیکی این تعداد ژنوتیپ توتون گرمخانه‌ای که در این تحقیق آورده شده اند، با استفاده از این تعداد آغازگر تاکنون انجام نشده است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: تحقیق حاضر در آزمایشگاه بیوتکنولوژی مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش انجام شد. در این تحقیق از ۱۰۰ ژنوتیپ توتون تیپ گرمخانه‌ای موجود در بانک بذر مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش استفاده شد (جدول ۱). نمونه‌های بذر در گلدان‌هایی به قطر ۲۰ سانتی‌متر در گلخانه تحقیقاتی مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش کاشته شدند. نمونه‌گیری از برگ‌های جوان توتون مربوط به یک گیاه از هر ژنوتیپ در مرحله ۳ تا ٤ برگی انجام شد. نمونه‌ها با استفاده از ازت مایع پودر گردید و در تیوپ‌های دو میلی لیتری ریخته شد و تا زمان استخراج DNA در فریزر ^{o}C ۸۰ - نگهداری شدند.

استخراج DNA: DNA ژنومی گیاهان از بافت برگ گیاهچه‌های جوان با استفاده از روش دلاپورتای تغییر یافته (Dellaporta *et al*., 1987) استخراج شد. سپس، ارزیابی کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA استخراج شده انجام گردید. غلظت نمونه‌های DNA با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (ساخت شرکت Bio RAD)، در طول موج‌های ۲٦۰ و ۲۸۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفتند و براساس نتایج روش اسپکتروفتومتری، نمونه‌های DNA تا غلظت ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شدند و سپس در واکنش زنجیره ای پلیمراز مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور ارزیابی کیفی، نمونه‌های DNA استخراجی روی ژل آگارز ۰/۸ درصد مورد بررسی قرار گرفتند.

واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR): تعداد ۲۵ آغازگر ISSR برای بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌ها مورد استفاده قرار گرفت. آغازگرها بر اساس مطالعات قبلی انجام شده روی جنس توتون انتخاب شدند. نام، توالی، دمای اتصال و سایر خصوصیات تمام آغازگرها در جدول ۲ آورده شده است. اجزای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در حجم ۲۵ میکرولیتر تهیه شدند که شامل: ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR با غلظت ۱ برابر (1X)، ۲ میکرولیتر از DNA ژنومی (با غلظت ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر)، ۲ میکرولیتر $MgCl_2$ (با غلظت ۲/۲ میلی مول)، ۱/۵ میکرولیتر آغازگر (با غلظت ۱ پیکومول)، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (۰/۷ واحد در میکرو لیتر)، ۰/۸ میکرولیتر dNTP (با غلظت ۰/۲ میلی مول) و ۱۵/۹ میکرولیتر آب مقطر استریل بود. مواد مورد استفاده از شرکت سیناژن تهیه شدند. تکثیر در دستگاه ترموسایکلر (Bio RAD, C 1000^{TM} Thermal Cycler) و چرخه‌های PCR بدین

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-07-16]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.3.7]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.33]

شرح انجام شد: یک چرخه واسرشت سازی اولیه در دمای ۹٤ درجه سانتی گراد به مدت ٤ دقیقه، ٤۸ چرخه شامل واسرشت سازی در دمای ۹۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٥ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای بین ٤٤ – ۳٦ درجه سانتی‌گراد (بسته به نوع آغازگر) به مدت ۰/٥ دقیقه، مرحله بسط به مدت ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و یک چرخه بسط نهایی به مدت ۸ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد.

الکتروفورز، مشاهده نوارهای تکثیر شده و تحلیل داده‌ها: پس از اتمام مراحل PCR به منظور آشکارسازی چندشکلی بین نمونه‌ها از دستگاه الکتروفورز و ژل آگارز ۲/٥ درصد استفاده شد. لازم به ذکر است که غلظت ژل آگارز ۲/٥ درصد، بر اساس چند بار آزمون و خطا به روش تجربی در حین انجام این تحقیق، به عنوان غلظت بهینه بدست آمد. از هر نمونه مقدار µl ٥ برداشته و به آن µl 2 بافر بارگذاری[1] (به نسبت ٥: ۲) افزوده شد. سپس نمونه‌ها در چاهک‌ها بارگیری شدند. الکتروفورز با ولتاژ ۱۰۰ و به مدت ۱۸۰ دقیقه اجرا شد. برای تعیین اندازه‌ی قطعات از نشانگر با باندهای استاندارد ٥۰bp استفاده شد. بعد از انجام الکتروفورز، ژل‌ها به مدت ۱٥ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید ۰/٥ میکروگرم در میکرولیتر رنگ آمیزی شدند و سپس رنگ‌بری آن‌ها با آب مقطر انجام شد. به منظور عکس برداری از ژل‌ها از دستگاه ژل داک مدل BIORAD زیر نور UV استفاده شد. برای بررسی چندشکلی بین توده‌ها و ارقام، حضور وعدم حضور هر باند خاص به ترتیب با اعداد یک و صفر مشخص شد و برای تشکیل ماتریس داده‌های خام، ستون‌ها به داده‌ها (یا ارقام) و سطرها به باندها اختصاص یافت و این اعداد وارد نرم افزار Excel شدند. از این ماتریس برای بدست آوردن تشابه ژنتیکی (با استفاده ازسه شاخص Dice, Jaccard, SM) و رسم دندروگرام و تجزیه مولفه‌های متعادل به کمک نرم افزار NTSYSpc Ver 2.02 استفاده شد. پس از تشکیل ماتریس تشابه، تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار NTSYSpc Ver 2.02 انجام شد.

برای بررسی محتوای اطلاعاتی چندشکلی نشانگرها و آغازگرها از پارامتر PIC (قدرت تفکیک) استفاده شد. میانگین محتوای اطلاعات چندشکل براساس رابطه پاول و همکاران (Pawell *et al*., 1999) محاسبه شد: $PIC=1-\sum fi$. در این رابطه fi برابر با فراوانی آلل iام است. جهت تخمین آماری و حمایت شاخه‌های داخلی دندروگرام حاصله، از گروه بندی توده‌ها و ارقام براساس ضریب تشابه SM به روش UPGMA استفاده شد. رسم درخت‌واره بر اساس روش گروه‌های غیر وزنی جفت شده (UPGMA) با استفاده از نرم افزار NTSYSpc Ver. 2.02 انجام شد.

نتایج و بحث

بررسی کیفیت نمونه‌های DNA استخراج شده با استفاده از ژل آگارز و دستگاه اسپکتروفتومتر نشان داد که DNAها از کیفیت مطلوبی برخوردارند. از مجموع ۲٥ آغازگر ISSR مورد استفاده در این پژوهش، ۲۳ عدد از آن‌ها باندهای واضح و چندشکل تولید کردند. از کل ۲۳۷ باند تولید شده ٤۲ عدد منومورف و ۱۹٥ عدد از آن‌ها چندشکل بودند. میانگین کل چندشکلی در مجموع ژنوتیپ‌ها۹٤/۱۰ درصد برآورد شد. اندازه باندها بین ۱۰۰ تا ۱٥۰۰ جفت باز (bp) متغیر بود. تعداد باندهای امتیازدهی شده برای هر آغازگر از ٦ تا ۱٤ باند متغیر بود. از بین آغازگرهای مورد استفاده، آغازگرهای UBC 814، UBC811 و UBC835 به ترتیب با تعداد باند ۱٤، ۱٤ و ۱۲ عدد دارای بیشترین تعداد باندهای چندشکلی و آغازگرهای UBC845 و UBC853 با تعداد ٥ باند، کمترین تعداد باند چندشکلی را تولید کردند (جدول ۲). درصد چندشکلی برای هر آغازگر از ٦۳/٦ درصد برای آغازگر UBC851 تا ۱۰۰ درصد برای آغازگرهای UBC878، UBC812 و UBC815 متغیر بود و مقدار متوسط آن ۸۳/۳ درصد بود. متوسط تعداد کل باندها و متوسط تعداد باندهای چندشکل برای هر آغازگر به

1- Loading buffer

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-07-16]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.3.7]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.33]

ترتیب ۱۰/۳۰ و ۸/٤۷ بود. میانگین درصد چندشکلی بدست آمده در این تحقیق (۹٤/۱۰ درصد)، تنوع ژنتیکی بالای ژنوتیپ‌ها را توجیه می‌کند (جدول ۲). نمونه‌ای از الگوی باندی حاصل از محصولات ISSR-PCR روی ژل آگارز ۲/۵ درصد در شکل ۱ نمایش داده شده است. برای بررسی قدرت تفکیک نشانگرها در نمایش چندشکلی در یک جمعیت، محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) برای هر نشانگر محاسبه شد. میزان اطلاعات چندشکلی، یکی از شاخص های مهم جهت مقایسه نشانگرهای مختلف از نظر قدرت تمایز آن‌ها به شمار می‌رود. تعداد PIC بر اساس تعداد آلل شناسایی شده و نحوه پراکنش آن‌ها در جمعیت محاسبه می‌شود. مقادیر بالای این معیار دلالت بر چندشکلی زیاد در یک جایگاه نشانگری دارد که در تفکیک و تمایز افراد نقش بسزایی دارد. بنابراین نشانگرهایی با PIC بالا برای تمایز ژنوتیپ‌های خویشاوندی نزدیک مفید هستند (Ren and Timko, 201).

در این مطالعه، بیشترین و کمترین مقدار PIC به ترتیب برابر با ۰/۸٤ و ۰/۱۰ مربوط به آغازگرهای UBC 840 وUBC 817 بود. توزیع مقادیر PIC بین ۰/۱۰ تا ۰/۸٤ متغیر بود. بالا بودن میزان PIC در بعضی از آغازگرهای مورد استفاده نشان دهنده کارایی بالای این آغازگرها در تمایز ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در این تحقیق می‌باشد که نشان دهنده سودمندی این آغازگرها برای بررسی تنوع ژنتیکی توتون می‌باشد و به دلیل میزان بالای PIC برای ارزیابی تنوع ژنتیکی توتون مفید خواهند بود. کی و همکاران (Qi *et al*., 2006) گزارش دادند که آغازگرهایی که PIC بزرگتر از ۰/۵ داشته باشند، دارای اطلاعات سودمند زیادی هستند، آغازگرهایی که مقادیر PIC آن‌ها بین ۰/۲۵ و ۰/۵ باشد سودمند هستند و آن‌هایی که کمتر از ۰/۲۵ باشد، حاوی اطلاعات سودمند اندکی هستند. در مطالعات قبلی محسن زاده گلفزانی و همکاران (Mohsenzadeh Golfazani *et al*., 2012) مقادیر PIC در ژنوتیپ‌های توتون گرمخانه‌ای را بین ۰/۱۵ تا ۰/٦۸ گزارش کردند. همچنین در پژوهشی دیگر، سمیع زاده لاهیجی و همکاران (Samizadeh Lahiji *et al*., 2013) در بررسی تنوع ژنتیکی ۸۹ رقم توتون تیپ گرمخانه‌ای با استفاده از ۱۲ آغازگر ISSR، مقادیر PIC را در ژنوتیپ‌های توتون مورد بررسی به طور متوسط ۰/٥٤ گزارش نمودند.

با توجه به اینکه حداکثر PIC برای نشانگرهای غالب کمتر از ۰/۵ ذکر شده است، در مطالعه‌ی حاضر، اکثر آغازگرهای مورد استفاده، PIC بیشتر از ۰/۵ داشتند که بیانگر این است که این آغازگرها حاوی اطلاعات مفیدی بوده و پراکندگی مناسبی در ژنوم جمعیت مورد بررسی داشته اند. به عبارت دیگر دارای توالی‌های مکمل مکان‌هایی در ژنوتیپ‌های مورد بررسی هستند، که این توالی‌ها در ژنوتیپ‌ها تغییرات دارند، زیرا پس از تکثیر چندشکلی نشان دادند.

به منظور تجزیه خوشه ای نشانگرهای ISSR، ابتدا آزمون مانتل (Mantel, 1967) برای ضرایب تشابه جاکارد، دایس و تطابق ساده براساس روش خوشه بندی UPGMA انجام شد. براساس نتایج بدست آمده در این مطالعه ضریب تشابه تطابق ساده (SM) دارای بالاترین ضریب همبستگی کوفنتیک (۰/۹٦) بود که نشان دهنده برازش خوب و همبستگی بالا بین ماتریس‌های تشابه و دندروگرام نهایی براساس ضریب تشابه تطابق ساده می‌باشد. تشابه ژنتیکی ژنوتیپ‌ها با استفاده از نشانگر ISSR و براساس ضریب تشابه SM (تطابق ساده) از ۰/۵۳ تا ۱۰۰ در نوسان بوده و متوسط آن ۰/۷٦ بود. بیشترین شباهت بین توده‌های ۱۵ و ۵۷ و کمترین شباهت بین توده‌های ۲۵ و ٤۲ مشاهده شد. میزان کم شباهت نشان دهنده این است که دو ژنوتیپ دارای اختلاف ژنتیکی زیادی می‌باشند، لذا می‌توان آن‌ها را در صورت داشتن صفات مطلوب، به عنوان والد در برنامه‌های دورگ‌گیری برای اصلاح توتون‌های زراعی استفاده کرد. تصور می‌شود با تلاقی بین ژنوتیپ‌هایی که در گروه‌های دور از هم قرار گرفته اند، نتاج نوترکیب متجاوز جهت انتخاب در برنامه‌های اصلاحی تولید شود، چرا که یکی از راه‌های

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-07-16]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.3.7]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.33]

جدول ۱- اسامی ژنوتیپ‌های توتون مورد مطالعه و منشا جغرافیایی آن‌ها

Table 1. Tobacco genotypes and their geographical origin.

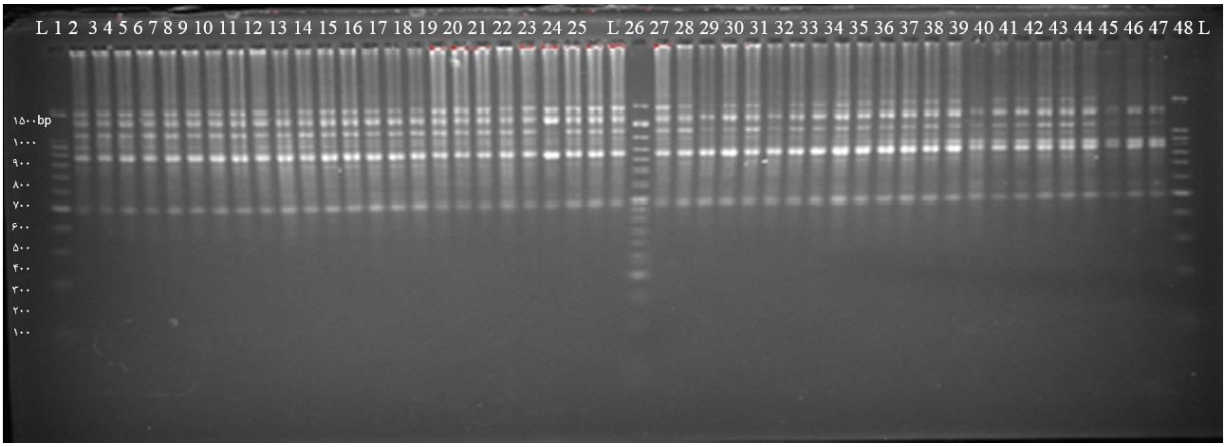
شماره No.	نام ژنوتیپ Genotype	منشا جغرافیایی Geographical origin	شماره No.	نام ژنوتیپ Genotype	منشا جغرافیایی Geographical origin	شماره No.	نام ژنوتیپ Genotype	منشا جغرافیایی Geographical origin	شماره No.	نام ژنوتیپ Genotype	منشا جغرافیایی Geographical origin
1	K394	USA	26	Virginia Bright 88	USA	51	R.H 211	Australlia	76	South Carolina	USA
2	Previ stamm6	USA	27	N.C 60	Germany	52	T.I 998	USA	77	Hicks Resistant	USA
3	N.C 95	Germany	28	K326 N. F	USA	53	K110	USA	78	Hicks 55	USA
4	M.C 1	USA	29	Previ stamm 3	USA	54	Tirtash 33	IRAN	79	Kustaga 110	USA
5	Hicks Broad Leaf	USA	30	H76	Africa	55	North Carolina (2326)	USA	80	Bel B	USA
6	Coker 411	USA	31	Tirtash 31	IRAN	56	Hong garten	Germany	81	K 1514	USA
7	Deliot	Canada	32	Tirtash 19	IRAN	57	Florida 513	USA	82	Bel 71-500	USA
8	Previ stamm 9	USA	33	Bel 61-10	USA	58	N.F.B.E 63	Switzerland	83	N.R 23	Africa
9	Kustaga E1	USA	34	Coker 48	USA	59	Virginia R.P 178	USA	84	Harrison special	USA
10	Virginia 115	USA	35	Mac Nair 944	USA	60	Lock wood	USA	85	E.X. 4p. R 1	Canada
11	Vinica	USA	36	Tirtash 10	IRAN	61	Manilla - Geel	USA	86	Virginia Gold	USA
12	Delhi 76	Canada	37	Coker 347	USA	62	P.N 10-26	Switzerland	87	Griolla salteno	Germany
13	M.C. 101	USA	38	N.C 95×ch.Mutant no.2	IRAN	63	Orumieh 2	IRAN	88	N.C 11-51	Germany
14	Kustaga E1(B1.75)	Africa	39	Tirtash 9	IRAN	64	Orumieh 1	IRAN	89	P 49-4625	Switzerland
15	Speight G28	USA	40	Coker 298	USA	65	Kustaga 51E	USA	90	S 394-5s	Canada
16	Coker 319	USA	41	Tirtash 17	IRAN	66	Mont Calm Brum	Switzerland	91	T.I 66	USA
17	K326 F	USA	42	Hicks Fixed A 24-26	USA	67	S 392-3 s	Canada	92	Bel 71-501	USA
18	Cu 357	USA	43	T.L 33	USA	68	Kustaga 110(E 2346)	USA	93	P.B.D 6	USA
19	Coker 254	USA	44	Orumieh 6	IRAN	69	Hicks R. G	USA	94	Ludo gortez 2317	Germany
20	Virginia RP 37	USA	45	Ch.Mutant	Ausralia	70	North Carolina 88	USA	95	Bel	USA
21	Tirtash 30	IRAN	46	Coker 176	USA	71	BY 4	Australlia	96	Virginia H. R	USA
22	K326	USA	47	Gewone groom	Germany	72	Virginia E1	USA	97	Bel 61-9	USA
23	Pee Dee	Germany	48	Virginia Aurea	USA	73	S.O 1	Africa	98	Petrich 84	Canada
24	Coker 258	USA	49	Vega 1	Canada	74	Beer wah H	Germany	99	Bel 61-12	USA
25	N.C 89	Germany	50	Kustaga GA 36	USA	75	H. 254 D.P.R 4	Canada	100	Bel 61-11	USA

[DOI: 10.29252/pgr.2.2.33] [DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.3.7] [Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-07-16]

جدول ۲- نام، توالی، دمای اتصال(TM)، درصد چندشکلی، تعداد کل باندها، تعداد باند چندشکلی و محتوای اطلاعات چندشکلی(PIC) آغازگرهای ISSR مورد استفاده در این آزمایش.

Table 2. Name, sequence, annealing temperature (Tm), polymorphism (%), No. of scored bands, No. of polymorphic bands and PIC of ISSR primers

شماره No.	نام آغازگر Primer name	توالی آغازگر Primer Sequence	دمای اتصال Annealing temperature	تعداد کل باندها No. of Scored bands	تعداد باند چند شکل No. of polymorphic bands	درصد چند شکلی Polymorphism (%)	محتوای اطلاعات چندشکلی PIC
1	UBC 811	GA8 C3	45	16	12	75	0.27
2	UBC 812	GA8 A3	47	10	10	100	0.55
3	UBC 814	GA8 A3	43	17	16	94.1	0.53
4	UBC 815	GA8 G3	45	9	9	100	0.48
5	UBC 816	GA8 T3	47	12	10	83.3	0.50
6	UBC 817	GA8 A3	45	9	8	88.8	0.10
7	UBC 823	GA8 C3	54	11	10	90.9	0.31
8	UBC 824	GA8 G3	44	6	5	83.3	0.19
9	UBC 825	GA8 T3	47	9	7	77.77	0.54
10	UBC 826	GA8 C3	47	14	10	71.42	0.55
11	UBC 873	(GA) 4 (CA)3	48	14	11	78.57	0.49
12	UBC 834	AG8 TT	42	11	10	90.09	0.51
13	UBC 835	AG8 TC	49	17	12	70.58	0.54
14	UBC 840	GA8 TT	47	11	9	81.81	0.84
15	UBC 842	GA8 TT	55	12	11	91.6	0.56
16	UBC 843	CT8 AC	43	6	5	83.3	0.14
17	UBC 844	CT8 AC	54	12	9	75	0.41
18	UBC 845	CT8 AC	48	5	4	80	0.56
19	UBC 851	GT8 TG	53	11	7	63.6	0.50
20	UBC 853	TC8 AT	44	5	4	80	0.54
21	UBC 856	(AC)8 TA	54	7	5	71.42	0.43
22	UBC 879	(CTTCA)3	48	6	5	83.3	0.41
23	UBC 878	(GCAT)4	44	6	6	100	0.50
24	UBC 813	(CT)8 T	45	8	6	75	0.35
25	UBC 857	(AC)8 TG	52	6	4	80.3	0.43



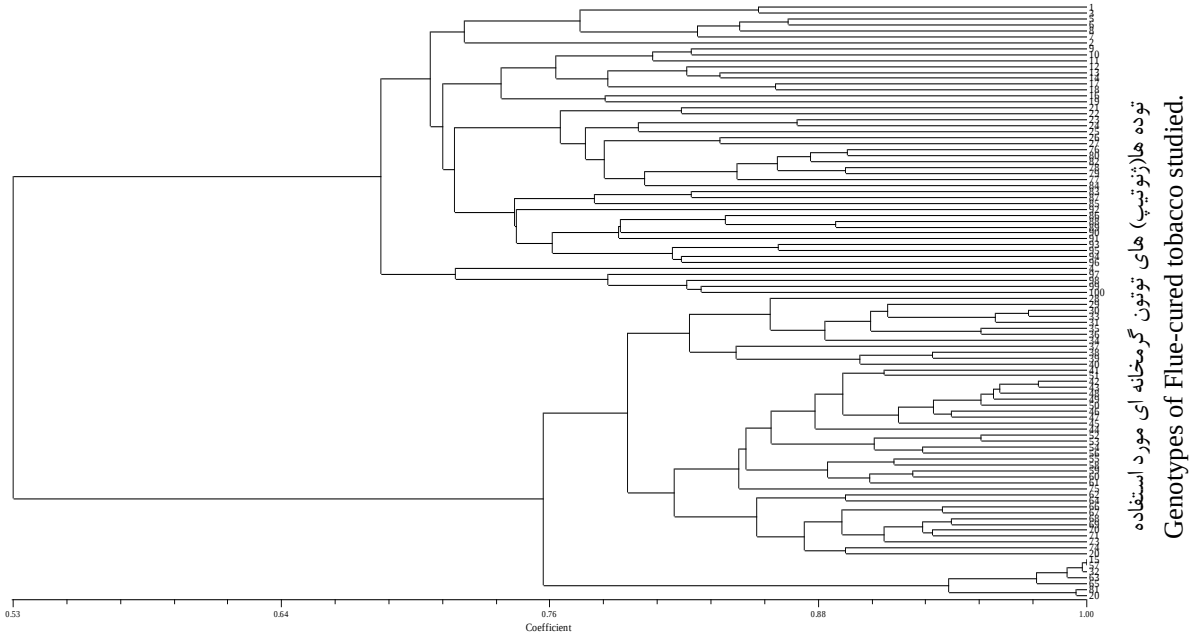
شکل ۱- الگوی باندی حاصل از ISSR-PCR مربوط به آغازگر UBC 851 در ٤٨ ژنوتیپ توتون (چاهک ۱ تا ٤٨) روی ژل آگارز ۲/۵ درصد، L: نشانگر تعیین اندازه

Figure 1. ISSR-PCR band pattern related to (UBC 851) of 48 tobacco genotypes (lane 1 - 48) on 2.5 % agarose gel, (L_{100} bp): DNA Ladder

مطمئن برای دست‌یابی به هتروزیس بالا که در توتون از اهمیت زیادی برخوردار است، استفاده از مواردی است که دارای کمترین خویشاوندی باشند و شناسایی تلاقی‌های حاوی هتروزیس بالا مهم ترین قدم در تولید

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-07-16]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.3.7]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.33]

محصولات هیبرید است و معمولا والدین با قدرت ترکیب پذیری بالاتر و فاصله ژنتیکی بیشتر می‌توانند هیبریدهایی با عملکرد بالاتر تولید کنند (Yang *et al.*, 2005). ضریب تشابه SM بهترین ضریب برای بررسی میزان تنوع ژنتیکی بدست آمده از نشانگرهای غالب است زیرا شباهت را براساس وجود باند گروه‌بندی می‌کند. بنابراین در تجزیه‌های بعدی از این ضریب استفاده شد. نتایج حاصل از تجزیه خوشه ای بر اساس ضریب تشابه SM در شکل ۲ آورده شده است. یانگ و همکاران (Yang *et al.*, 2007)، در مطالعه‌ای تنوع ژنتیکی ۱۱۸ رقم مختلف توتون را با استفاده از نشانگرهای ISSR و IRAP مورد بررسی قرار دادند و میزان شباهت ژنتیکی ارقام مورد مطالعه به طور متوسط برابر با ۰/۷۵ بود، که نتایج آن‌ها از این جهت به نتایج پژوهش حاضر نزدیک می‌باشد. حسنی و همکاران (Hassani *et al.*, 2015) با استفاده از آغازگرهایISSR و IRAP، تنوع ژنتیکی۲۰ رقم توتون را مورد بررسی قرار دادند و مشخص کردند که درصد تشابه ژنتیکی بین این ارقام از ۰/۲۵ تا ۰/۷۵ متغیر است و میانگین درصد تشابه برابر با ۰/۵۹ بود. سارالاو رائو (Sarala and Rao, 2008)، در بررسی تنوع ژنتیکی ارقام توتون گرمخانه ای و بارلی در هند با استفاده از نشانگرهای ISSR با انجام آزمون مانتل، ضریب همبستگی کوفنتیک بالایی (۰/۹۵)، بین ماتریس تشابه نشانگرها بدست آوردند. با توجه به نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر و مقایسه با نتایج دیگر محققین، نتیجه گرفته می‌شود که همبستگی مناسب بین ماتریس تشابه SM و کوفنتیک وجود دارد که این موضوع، صحت گروه‌بندی انجام شده را تایید می‌کند. نتایج حاصل از تجزیه به مولفه‌های متعادل نشان داد که سه مولفه ابتدایی توانستند در مجموع ۷۹/٦٥ درصد از واریانس کل را توجیه کنند. اولین مولفه که بزرگترین مولفه به شمار می‌رود ٦٥/۱۱، مولفه دوم ۱۲/۳٦ و مولفه سوم ۲/۱۸ درصد از تنوع کل را توجیه نمودند. براساس سه مولفه ابتدایی همبستگی میان توده‌ها و ارقام توتون رسم شد (شکل ۳).



ضریب تشابه ژنتیکی SM
SM similarity coefficient

شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه ای به روش UPGMA برای ۱۰۰ ژنوتیپ توتون با استفاده از نشانگر ISSR براساس ضریب تشابه SM

Figure 2. Dendrogram of cluster analysis using UPGMA method for 100 tobacco genotypes based on SM coefficient for ISSR marker

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-07-16]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.3.7]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.33]

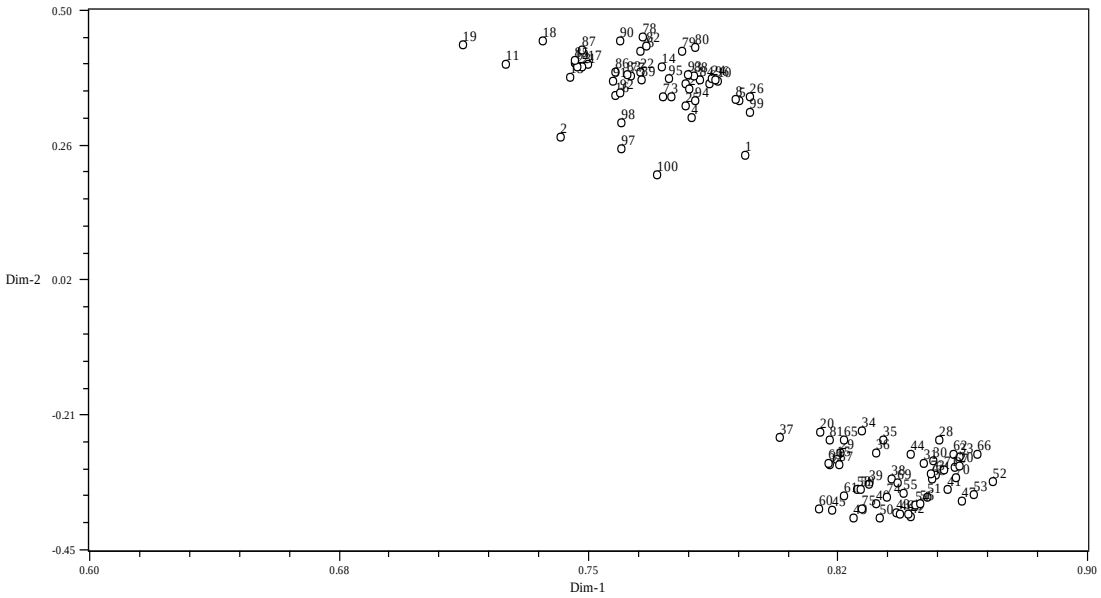
در پژوهش کنونی، همه ژنوتیپ‌های مورد بررسی (۱۰۰ رقم) تشکیل دو خوشه‌ی مجزا دادند که بیانگر کارایی بالای آغازگرهای ISSR مورد استفاده در تکثیر قطعات مناسب از ژنوم است.

نمودار همبستگی توده‌ها و ارقام براساس تجزیه به مولفه‌های متعادل در شکل ۳ نشان داد که این گروه‌بندی با گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه ای کاملا مطابقت دارد. نتایج این تحقیق نشان داد که نشانگر ISSR نشانگری کارآمد جهت آشکارسازی روابط مولکولی بین توده‌ها و ارقام مورد آزمایش در این بررسی می‌باشد. از این بررسی‌های انجام شده برای گروه‌بندی توده‌ها و ارقام توتون چنین استنباط می‌شود که سطح تنوع ژنتیکی موجود در آن‌ها در حد مطلوبی است. به این معنی که نشانگر ISSR ابزار مهمی جهت مطالعه تنوع ژنتیکی در توتون می‌باشد (Reddy *et al*., 2002).

هم چنین این نتایج می تواند نقطه عطف مهمی برای برنامه‌های اصلاحی و حفاظت ژرم پلاسم ارقام توتون باشد. به طوری که در آینده می‌توان بر اساس روابط مولکولی ایجاد شده از این مطالعه که نشان دهنده روابط بین توده‌ها و ژنوتیپ‌های توتون مورد بررسی هستند، ممکن است در برنامه‌های اصلاحی توتون مفید باشند و با دقت وتوجه کافی به گروه بندی‌های ایجاد شده برای توده‌ها و ارقام موجود به سهولت می‌توان توده‌ها و ارقام مناسب را جهت برنامه‌های به‌نژادی انتخاب نمود و با برنامه‌های اصلاحی مناسب جهت افزایش عملکرد، کیفیت و سازگاری این گیاه در کشور گام‌های اساسی برداشت.

نتایج حاصل از تجزیه خوشه ای براساس ضریب تشابه SM نشان داد که که دو توده شماره ۲۵ و ٤۲ از نظر ژنتیکی فاصله زیادی با هم دارند. بنابراین می‌توان انتظار داشت با تلاقی بین آن‌ها که در گروه‌های دور از هم قرار گرفته اند، نتاج نوترکیب متجاوز جهت انتخاب در برنامه‌های اصلاحی تولید شود.چرا که یکی از راه‌های مطمئن برای دستیابی به هتروزیس بالا، استفاده از موادی است که دارای کمترین خویشاوندی باشند و شناسایی تلاقی‌های حاوی هتروزیس بالا مهم ترین قدم در تولید محصولات هیبرید است و معمولا والدین با قدرت ترکیب‌پذیری بالاتر و فاصله ژنتیکی بیشتر می‌توانند هیبریدهایی با عملکردبالاتر تولید نمایند. لذا با توجه به مطالب فوق توصیه می‌شود که به نژادگران در انتخاب والدین مناسب برای انجام دورگ گیری‌ها علاوه بر صفات مطلوب ظاهری و زراعی، به بررسی و طبقه بندی مولکولی آن‌ها نیز توجه داشته باشند. چنین ایده ای در تحقیقی که توسط مادزینگنی و همکاران (Mwadzingeni *et al*., 2013) که تنوع ژنتیکی ۲۸ رقم توتون گرمخانه‌ای (١٦ رقم از چین، ٦ رقم از برزیل، ۲ رقم از آفریقای جنوبی و ٤ رقم از زیمباوه) را ابتدا بر اساس صفات فنوتیپی مورد بررسی تنوع ژنتیکی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که برای انتخاب ارقام خوب در برنامه های اصلاحی و بررسی میزان تنوع ژنتیکی آن‌ها، علاوه بر بررسی‌های فنوتیپی و مورفولوژیکی، باید از نشانگرهای مولکولی نیز استفاده نمود. همچنین، در پژوهشی دیگر، درویش زاده و همکاران (Darvishzadeh *et al*., 2013)، تنوع ژنتیکی ۱۰۰ ژنوتیپ توتون شرقی را با استفاده از صفات مورفولوژیکی و نیز ۱۳ نشانگر مولکولی SSR مورد ارزیابی قرار دادند و به ایـــن نتیـــجه رسیدند که استفاده از نشانگرهای مولکولی دارای کارایی بهتری در ارزیابی تنوع ژنتیکی می‌باشد. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA ژنوتیپ‌ها را در سه گروه اصلی طبقه‌بندی کرد. نتایج حاصل از تحقیق کنونی، به خوبی نشان داد که ۲۵ نشانگر ISSR مورد استفاده در این پژوهش، دارای قابلیت‌های لازم برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های توتون هستند.

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-07-16]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.3.7]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.33]



شکل ۳- نمودار همبستگی ارقام درسه مولفه ابتدایی در تجزیه به مولفه‌های متعادل براساس نشانگرISSR

Figure 3. Correlation charts on three basic components in a balanced component analysis based on ISSR marker

این نتایج می‌تواند زمینه ساز انجام کارهای اصلاحی در ارتباط با به‌نژادی و شناسایی ذخایر موجود و حفظ این ذخایر ارزشمند در مراحل بعدی باشد. آغازگرهای UBC815، UBC812 و UBC878 با دارا بودن بیشترین PIC به عنوان بهترین آغازگرها جهت بررسی تنوع ژنتیکی در این تحقیق معرفی شدند، که این امر نشان دهنده کارایی بالای این آغازگرها در تمایز ژنوتیپ‌های توتون مورد مطالعه بود و می‌توان از این آغازگرها در مطالعات آتی تنوع ژنتیکی توتون نیز استفاده نمود. تنوع ژنتیکی و فاصله ژنتیکی که بین ژنوتیپ‌های توتون مورد مطالعه مشاهده شده است، می‌تواند برای کارهای اصلاحی بعدی و انجام تلاقی بین ژنوتیپ‌ها، به منظور بالا بردن کیفیت و کمیت عملکرد که هدف نهایی در اصلاح گیاهان می‌باشد، به کار رود.

سپاسگزاری

از مدیریت و معاونت محترم پژوهشی مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش و نیز از زحمات همکاران محترم بخش بیوتکنولوژی آن مرکز، به خاطر همکاری در اجرای این تحقیق، تقدیر و تشکر می‌شود.

References

Arslan, B. and Okunus, A. (2006). Genetic and geographic polymorphism of cultivated tobacco (*Nicotianatabacum*) in Turkey. *Russian Journal of Genetics*, **42**: 667-671.

Conolly, G.N., Alpert, H.R., Woyne, G.F. and Koh, H. (2007). Trends in nicotine yield in smoke and its relationships with design characteristics among popular US cigarette brands, *Tobaccoscience*, **16**: 11-25.

Darvishzadeh, R., Mirzaei, L., Hatami Maleki, H., Laurentin, H. and Alavi, S.R. (2013). Genetic variation in oriental tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) by agromorphological traits and simple sequence repeat markers. *Revista Ciência Agronômica*, **44(2)**: 347-355.

Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B. (1983). A plant DNA minipreparation: Version II. Plant *Molecular Biology Reports*, **1**: 19-21.

Denduangboripant, J., Setaphan, S., Suwanprasart, W. and Panha, S. (2010). Determination of genetic diversity in local tobacco cultivars using ISSR molecular marker. *Chiang Mai Journal of Science*, **37(2)**: 293-303.

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-07-16]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.3.7]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.33]

Edrisi Maryan, K., Samizadeh Lahiji, H. and Shoaei Deylami, M. (2012). Assessing the genetic diversity of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Varieties. *Crop Science*, **14**: 23-32.

FAO. (2010). FAOSTAT, Projections of tobacco production, consumption and trade to the year. Available at: http://faostat3.fao.org/home/E.

Gepts, P. (2006). Plant genetic resources conservation and utilization: The accomplishments and future of a societal insurance policy. *Crop science*, **46**: 2278-2292.

Gholizadeh, S., Darvishzadeh, R., Abdollahi Mandoulakani, B., Bernousi, I., Alavi, R. and Khorabian, A. (2012). Molecular characterization and similarity relationships among Flue-cured tobacco (*Nicotiana tabacum*L.) genotypes using simple sequence repeat markers. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici cluj-Napoca*, **40(1)**: 247-253.

Hasani, F., Samizadeh Lahiji, H. and Shoae-Deylami, M. (2013). Assessment of genetic diversity between and within of tobacco genotypes using ISSR markers. *Journal of Modern Genetics*, **1**: 1-12 (In Persian).

Hasani, F., Samizadeh Lahiji, H. and Shoae Deylami, M. (2015). Evaluation of genetic diversity between and within of tobacco genotypes using IRAP and REMAP markers. *Journal of Modified Crop Plants*, **16**: 1-9.

Li, Q., Liu, Q.C., Zhai, H., Ma, D.F., Wang, X., Li, X.Q. and Wang, Y.P. (2008). Genetic diversity in main parents of Sweet Potato in China as revealed by ISSR markers. *Acta Agronomica Sinica*, **34**: 972-977.

Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, **27**: 209-220.

Mohsenzadeh Golfazani, M., Samizadeh Lahiji, H., Alami, A., Shoae Deylami, M. and Talesh Sasani, S. (2012). Study of genetic diversity of different flue-cured tobacco genotypes using ISSR marker and Retrotransposons. *Iranian Journal of Field Crop Science*, **43**: 371-380 (In Persian).

Mwadzingeni, L., Kashangura, C., Gasura, E., Garwe, D. and Lewis, R. (2013). Genetic diversity of Zimbawean and exotic flue-cured tobacco varieties based on phenotypic traits and simple sequence repeats. *African Journal of Agricultural Research*, **8(46)**: 5845-5853.

Powell, W., Margenta, M., Andre, C., Hanfrey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalsky, A. (1996). The utility of RFLP, RAPD, AFLP and SSR markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, **2**: 225-238.

Qi, J.M., Liang, J.X, Chen, M.X., Xu, J.T., Niu, X.P., Zhou, D.X., Wang, T. and Chen, S.H. (2006). Genetic diversity and genetic relative's analysis of tobacco germplasm based on Inter Simple Sequence Repeat (ISSR). *Acta Agronomica Sinica*, **32**: 373-378.

Reddy, P.M., Sarla, N. and Siddig, E.A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, **128**: 9-17.

Ren, N. and Timko, M.P. (2001). AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild Nicotiana species. *Genetics*, **44**: 559-571.

Samizadeh Lahiji, H., **Mohsenzadeh Golfazani, M., Edrisi Maryan, K., Shoaei Deylami, M. and Alami, A.** (2013). Assessing the genetic diversity of 89 flue-cured tobacco varieties using morphological traits and inter-simple sequence repeat markers. *Journal of Crop Breeding*, **3(2)**: 79-85 (In Persian).

Sarala, K. and Rao, R.V.S. (2008). Genetic diversity in Indian FCV and burley tobacco cultivars. *Journal of Genetics*, **2**: 159-163.

Tao, A.F., Liu, Z.H., Qi, J.M., Zhou, D.X., Wang, T. and Chen, SH.H. (2009). Comparison and analysis of IRAP and ISSR molecular methods used for assessment of genetic diversity in tobacco. *Journal of Wuhan Botanical Research*, **27(6)**: 589-594.

Yang, B.C., Xiao, B.G., Chen, X.J. and Shi, C.H. (2005). Genetic diversity of flue-cured tobacco varieties based on ISSR markers. *Yi Chuan-Hereditas*, **27**:753-758.

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-07-16]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.3.7]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.33]

Yang, B.C., Xiao, B.G., Chen, X.J. and Shi, C.H. (2007). Assessing the genetic diversity of tobacco germplasm using inter-simple sequence repeat and inter-retrotransposon amplification polymorphism markers. *Annals of Applied Biology*, **150**: 393-401.

Zahng, H.Y., Liu, X.Z., He, C.S. and Yang, Y.M. (2008). Genetic diversity among Flue-cured tobacco based on RAPD and AFLP markers. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, **51**: 1097-1101.

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-07-16]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.3.7]

[DOI: 10.29252/pgr.2.2.33]

Application of ISSR Molecular Markers for Genetic Diversity Study of Some Tobacco Genotypes

Marziyeh Shazdehahmadi[1,*] and Mahin Kharrazi[2]

1- Instructor, Department of Biotechnology, Tirtash Tobacco Research and Education Center, Behshahr, Iran
2- M.Sc. Student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Sari Agricultural Science and Natural Resources University, Sari, Iran

(Received: January 20, 2016 – Accepted: March 14, 2016)

Abstract

Determination of genetic diversity of breeding material is the first step in breeding programs. Evaluation of tobacco genetic diversity is essential for breeding programs and preservation of genetic resources. Genetic diversity level in tobacco genotypes, is very important for selection of parents in breeding programs. In this study, genetic diversity of 100 tobacco genotypes was evaluated using 25 ISSR markers. Banding pattern based on the presence or absence of the bands showed with 0 and 1, respectively. Out of 237 fragments produced in total cultivars, 195 bands were polymorphic and average of polymorphism ranged from 4 to 12 per primer. Average of polymorphism percentage was 94.10. To determine the efficiency of ISSR markers, PIC and their polymorphic percentage was calculated. UBC 818, UBC 812 and UBC 815 had the best marker parameters and were introduced as the best primers for assessment of genetic diversity. In order to evaluate the genetic similarity between cultivars, different similarity coefficient (SM, Dice and Jaccard) was calculated and Mantel corresponding test was performed. Finally, dendrogram was drawn based on SM similarity coefficient and UPGMA algorithm and the Cofenetic coefficient was calculated. All genotypes formed two distinct clusters indicating the high efficiency of used primers in amplification the approximate parts of the genome. The principle coordinate analysis showed that the first three components could explain 79.65 % of total variance. Totally, evaluation the tobacco genetic diversity using ISSR markers is suitable and ISSR marker can be used as appropriate marker system to identify the diversity and genetic relationship for breeding programs of this plant.

Keywords: Cluster analysis, Genetic diversity, Tobacco, Polymorphism, ISSR marker

* **Corresponding Author, E-mail: noshinshazdeahmadi@yahoo.com**

[Downloaded from journals.lu.ac.ir on 2024-07-16]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1394.2.2.3.7]
[DOI: 10.29252/pgr.2.2.33]