

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: ۱۳۹۴/۱۰/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۲۴)

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 نواری بر اساس وجود و عدم وجود نوارها به ترتیب با یک و صفر نشان داده شدند. از تعداد ۲۳۷ قطعه‌ای که در کل ارقام تولید شدند، تعداد ۱۹۵ قطعه چندشکل بودند و میانگین چندشکلی از ۴ تا ۱۲ به ازای هر آغازگر متفاوت بود. میانگین درصد چندشکلی تعیین شده در مجموع ژنوتیپ‌های مورد بررسی ۹۴/۱۰ 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 کوفتیک بدست آمده برابر ۰/۹۶۳۲ 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 ۷۹/۶۵ 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

مقدمه

توتون (*Nicotiana tabacum* L.) گیاهی است از خانواده سولاناسه^۱ و از جنس نیکوتیانا، روزکوتاه، یکساله، خودگشن^۲ و از محصولات با ارزش زراعی، صنعتی و اقتصادی می‌باشد. در میان گونه‌های جنس *Nicotiana*، گونه *N. tabacum* یک گونه آلپلی پلوئید ($2n=4X=48$) است که از هیبریداسیون بین گونه‌های جنس *N. tomentosiformis* و *N. glauca* و دو برابر شدن تعداد کروموزوم‌های 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 ۱۴۱۴۵ 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 پلاسما فعالیت می‌کنند، به اطلاعاتی در مورد میزان تنوع نیاز دارند (Arslan and Okunus, 2006). توتون دارای ژرم پلاسما نسبتاً 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 وابسته‌های 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^۴ ابزار قدرتمندی جهت ارزیابی تنوع و روابط ژنتیکی هستند. نشانگرهای مولکولی ابزارهای توانمندی را برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گیاهی و اصلاح گیاهان فراهم آورده‌اند. آن‌ها کاربردهای زیادی در بررسی تنوع ژنتیکی، انگشت‌نگاری، تسهیل ایتروگرسیون، 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^۵ (PCR) 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^۶ (نواحی بین توالی‌های تکراری ساده) به طور وسیعی توسط محققان برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفته‌اند و کارآمد گزارش شده‌اند. نشانگر ISSR مبتنی بر واکنش زنجیره ای پلیمراز و

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

1-Solanaceae
2-Nicotiana
3-Self-pollination

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 ۰/۸۴ 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 ۴۰ 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 ژرم‌پلاسماهای توتون گرمخانه‌ای گزارش کردند. ضریب کوفنتیک محاسبه شده توسط آن‌ها برابر با $r = 0.9$ 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 پلاسما توتون، تنوع و روابط ژنتیکی ۱۰۰ ژنوتیپ توتون را با استفاده از نشانگر ISSR مورد بررسی قرار دادند. نتایج

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 لنگرهای 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 در آشکار 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 می‌توان 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 ۶۶ وارپته توتون (۱۳ وارپته محلی و ۵۳ وارپته وارداتی) استفاده شد. آن‌ها گزارش کردند که از بین آغازگرهای مورد استفاده، ۵

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 ۹/۶ باند بود. بر اساس تجزیه خوشه‌ای 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 ۴ 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 80°C - نگهداری شدند.

استخراج 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 ۲۶۰ 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 پلیمرز مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور ارزیابی کیفی، نمونه‌های DNA استخراجی روی ژل آگارز ۰/۸ درصد مورد بررسی قرار گرفتند.

واکنش زنجیره ای پلیمرز (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 پلیمرز (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 1000TM Thermal Cycler) و چرخه‌های PCR بدین

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: $PIC=1-fi$. در این رابطه fi برابر با فراوانی آلل نام 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 ۲۵ آغازگر ISSR مورد استفاده در این پژوهش، ۲۳ عدد از آنها باندهای واضح و چندشکل تولید کردند. از کل ۲۳۷ باند تولید شده ۴۲ عدد نومورف و ۱۹۵ عدد از آنها چندشکل بودند. میانگین کل چندشکلی در مجموع ژنوتیپ‌ها ۹۴/۱۰ درصد برآورد شد. اندازه باندها بین ۱۰۰ تا ۱۵۰۰ جفت باز (bp) متغیر بود. تعداد باندهای امتیازدهی شده برای هر آغازگر از ۶ تا ۱۴ باند متغیر بود. از بین آغازگرهای مورد استفاده، آغازگرهای UBC 814، UBC811 و UBC835 به ترتیب با تعداد باند ۱۴، ۱۴ و ۱۲ عدد دارای بیشترین تعداد باندهای چندشکلی و آغازگرهای UBC845 و UBC853 با تعداد ۵ باند، کمترین تعداد باند چندشکلی را تولید کردند (جدول ۲). درصد چندشکلی برای هر آغازگر از ۶۳/۶ 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

شرح انجام شد: یک چرخه واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه، ۴۸ چرخه شامل واسرشت سازی در دمای ۹۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای بین ۴۴ - ۳۶ درجه سانتی گراد (بسته به نوع آغازگر) به مدت ۰/۵ 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 ۲/۵ درصد استفاده شد. لازم به ذکر است که غلظت ژل آگارز ۲/۵ 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 ۵ µl برداشته و به آن 2 µl بافر بارگذاری^۱ (به نسبت ۵:۲) 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 ۵۰bp استفاده شد. بعد از انجام الکتروفورز، ژل‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید ۰/۵ میکروگرم در میکرولیتر رنگ آمیزی شدند و سپس رنگ‌بری آنها با آب مقطر انجام شد. به منظور عکس برداری از ژل‌ها از دستگاه ژل داگ مدل BIORAD زیر نور UV استفاده شد. برای بررسی چندشکلی بین توده‌ها و ارقام، حضور و عدم 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 از سه شاخص Dice, Jaccard, SM) و رسم دندروگرام و تجزیه مولفه‌های متعادل به کمک نرم افزار NTSYSpC Ver 2.02 استفاده

1- Loading buffer

ترتیب ۱۰/۳۰ و ۸/۴۷ بود. میانگین درصد چندشکلی بدست آمده در این تحقیق (۹۴/۱۰ درصد)، تنوع ژنتیکی بالای ژنوتیپ‌ها را توجیه می‌کند (جدول ۲). نمونه‌ای از الگوی بانندی 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 شاخص‌های 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 ۰/۸۴ و ۰/۱۰ مربوط به آغازگرهای UBC 840 و UBC 817 بود. توزیع مقادیر PIC بین ۰/۱۰ تا ۰/۸۴ 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 ۰/۶۸ 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 ۰/۵۴ 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 داشته‌اند. 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 خوشه‌ای نشانگرهای ISSR، ابتدا آزمون ماتل (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 کوفتیک (۰/۹۶) بود که نشان دهنده برآزش 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 ۰/۷۶ بود. بیشترین شباهت بین توده‌های ۱۵ و ۵۷ و کمترین شباهت بین توده‌های ۲۵ و ۴۲ 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 گرفته‌اند، نتایج نوترکیب متجاوز جهت انتخاب در برنامه‌های اصلاحی تولید شود، چرا که یکی از راه‌های

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

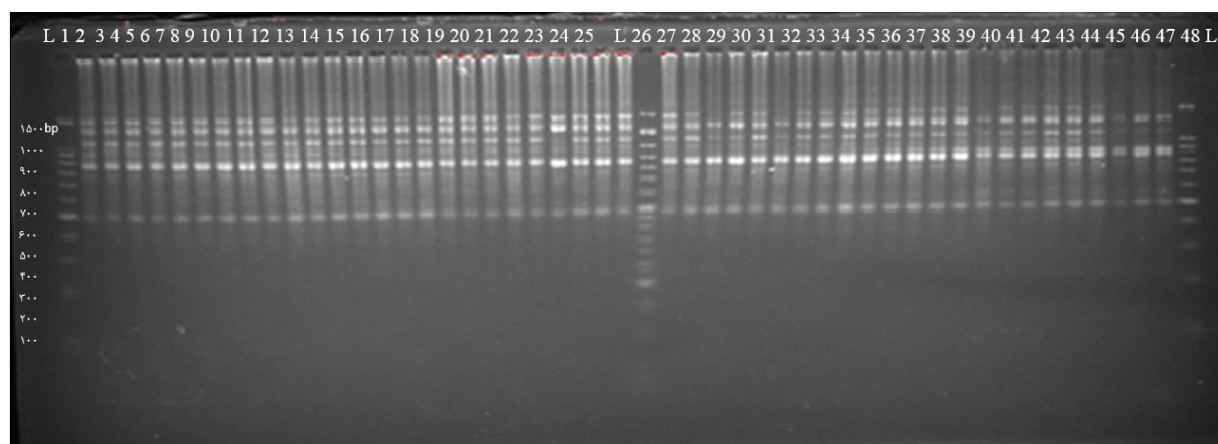
Table 1. Tobacco genotypes and their geographical origin.

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

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 Primer name	توالی 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



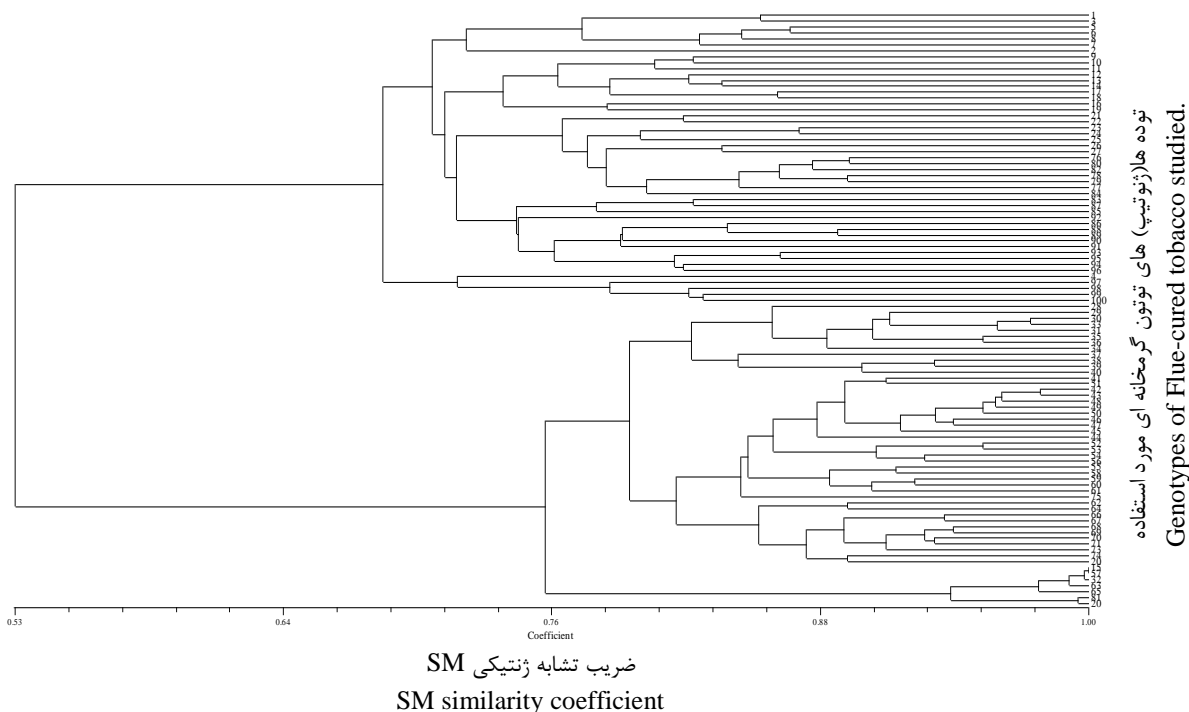
شکل ۱- الگوی باندهای حاصل از ISSR-PCR مربوط به آغازگر UBC 851 در ۴۸ ژنوتیپ توتون (چاهک ۱ تا ۴۸) روی ژل آگارز ۲/۵ درصد، L: نشانگر تعیین اندازه

Figure 1. ISSR-PCR band pattern related to (UBC 851) of 48 tobacco genotypes (lane 1 - 48) on 2.5 % agarose gel, (L₁₀₀ 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

درصد تشابه ژنتیکی بین این ارقام از ۰/۲۵ تا ۰/۷۵ متغیر است و میانگین درصد تشابه برابر با ۰/۵۹ بود. سارالو و راثو (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 کوفتیک 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 کوفتیک 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 ۷۹/۶۵ درصد از واریانس کل را توجیه کنند. اولین مولفه که بزرگترین مولفه به شمار می‌رود ۶۵/۱۱، مولفه دوم ۱۲/۳۶ 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).

محصولات هیبرید است و معمولاً 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 آغازگرهای ISSR و IRAP، تنوع ژنتیکی ۲۰ رقم توتون را مورد بررسی قرار دادند و مشخص کردند که



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

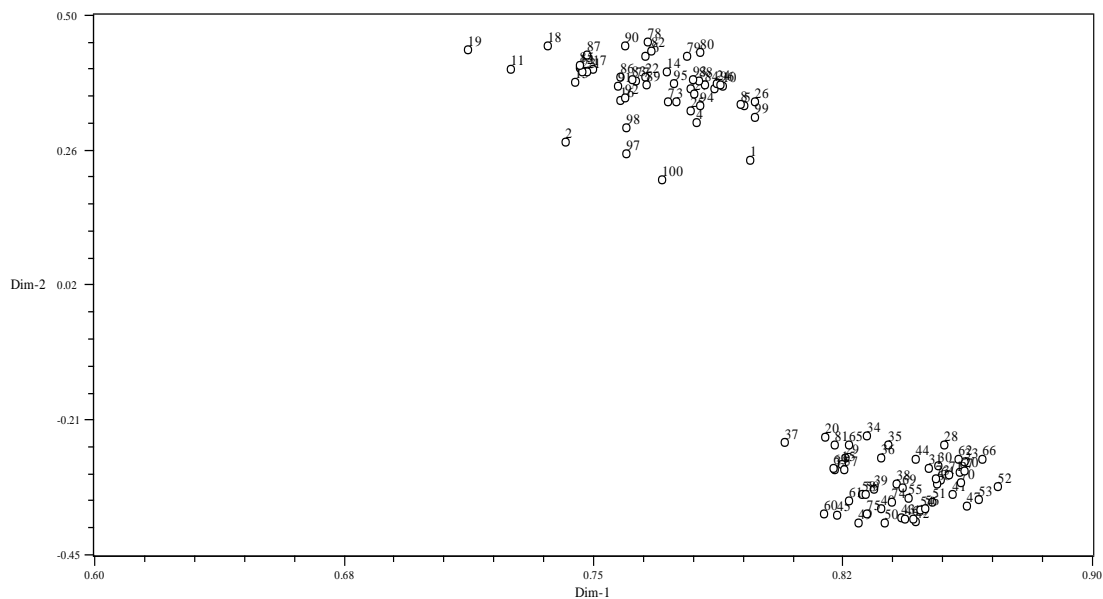
در پژوهش کنونی، همه ژنوتیپ‌های مورد بررسی (۱۰۰ رقم) تشکیل دو خوشه‌ی مجزا دادند که بیانگر کارایی بالای آغازگرهای ISSR مورد استفاده در تکثیر قطعات مناسب از ژنوم است.

نمودار همبستگی توده‌ها و ارقام براساس تجزیه به مولفه‌های متعادل در شکل ۳ نشان داد که این گروه‌بندی با گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای کاملاً 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 می‌تواند نقطه عطف مهمی برای برنامه‌های اصلاحی و حفاظت ژرم پلاسما 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 و توجه کافی به گروه‌بندی‌های 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 خوشه‌ای براساس ضریب تشابه SM نشان داد که دو توده شماره ۲۵ و ۴۲ 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، نتایج 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 مهم‌ترین قدم در تولید محصولات هیبرید است و معمولا والدین با قدرت ترکیب‌پذیری بالاتر و فاصله ژنتیکی بیشتر می‌توانند هیبریدهایی با عملکرد بالاتر تولید نمایند. لذا با توجه به مطالب فوق توصیه می‌شود که به نژادگران در انتخاب والدین مناسب برای انجام دورگ‌گیری‌ها علاوه بر صفات مطلوب ظاهری و زراعی، به بررسی و طبقه‌بندی مولکولی آن‌ها نیز توجه داشته باشند. چنین ایده‌ای در تحقیقی که توسط مادزینگنی و همکاران (Mwadzingeni et al., 2013) که تنوع ژنتیکی ۲۸ رقم توتون گرمخانه‌ای (۱۶ رقم از چین، ۶ رقم از برزیل، ۲ رقم از آفریقای جنوبی و ۴ رقم از زیمبابوه) را ابتدا بر اساس صفات فنوتیپی مورد بررسی تنوع ژنتیکی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که برای انتخاب ارقام خوب در برنامه‌های 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 این نتیجه 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.



شکل ۳- نمودار همبستگی ارقام درسه مولفه ابتدایی در تجزیه به مولفه‌های متعادل براساس نشانگر ISSR
Figure 3. Correlation charts on three basic components in a balanced component analysis based on ISSR marker

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.

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

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 miniprep: 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.

- Edrisi Maryan, K., Samizadeh Lahiji, H. and Shoaie 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 Shoaie-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 Shoaie 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., Shoaie 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).
- Mwadingeni, L., Kashangura, C., Gasura, E., Garwe, D. and Lewis, R.** (2013). Genetic diversity of Zimbabwean 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., Shoaie 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, S.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.

- 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.

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

Marziyeh Shazdehahmadi^{1,*} and Mahin Kharrazi²

- 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