

بررسی وراثت‌پذیری و تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های توتون با استفاده از نشانگرهای بین ریزماهواره‌ای و صفات مورفو-فیزیولوژیک

محمدرضا صلواتی میبدی^۱، غلامعلی رنجبر^{۲*}، سید کمال کاظمی تبار^۲ و حمید نجفی زرینی^۳

۱- دانشجوی دکتری، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری

۲- دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری

۳- استادیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۰۶ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۱/۲۹)

چکیده

تنش آبی یکی از رایج‌ترین تنش‌های محیطی است که تولید محصول توتون را در ایران با محدودیت روبرو می‌سازد. شناسایی تنوع موجود در ژرم پلاسما توتون و درک روابط ژنتیکی صفات به اصلاح ارقام متحمل به تنش خشکی کمک شایانی می‌نماید. در این مطالعه، تنوع ژنتیکی ۱۰۰ ژنوتیپ توتون گرمخانه‌ای نسبت به تنش خشکی، با استفاده از ۱۵ صفت مورفولوژیک و ۲۵ نشانگر بین ریز ماهواره مورد ارزیابی قرار گرفت. ارقام در قالب طرح لاتیس ساده ۱۰×۱۰ با ۲ تکرار (در شرایط دیم و آبی) در مؤسسه تحقیقات توتون تیرتاش کشت شدند. نتایج نشان داد مقدار محتوی نسبی آب و پایداری غشاء سیتوپلاسمی در شرایط آبیاری نرمال بیشتر از مقدار آن در شرایط تنش خشکی بود. محاسبه وراثت‌پذیری کم برای این دو صفت در شرایط تنش خشکی نشان دهنده‌ی تأثیر زیاد محیط روی دو صفت بود. نتایج بدست آمده از خوشه‌بندی ارقام به روش UPGMA با نشانگر بین ریز ماهواره و خوشه‌بندی به روش WARD با صفات مورفولوژیک منطبق نبود. آغازگر UBC814:(CT)8A با ۱۶ باند چند شکل از کل ۱۷ باند، قدرت تفکیک بالاتری نسبت به سایر آغازگرها داشت و برای بررسی‌های تنوع مولکولی توتون مناسب به نظر می‌رسد. رقم K394 نیز به دلیل عملکرد بالا و پایداری بیشتر عملکرد در دو شرایط، به‌عنوان متحمل‌ترین رقم به خشکی شناسایی و معرفی شد. با استفاده از نتایج این تحقیق می‌توان ژنوتیپ‌هایی با تفاوت ژنتیکی زیاد و صفات مطلوب را انتخاب و در برنامه‌های تولید واریته هیبرید با هتروزیس بالا جهت تحمل به تنش خشکی در توتون استفاده نمود.

واژگان کلیدی: تجزیه کلاستر، دیم، توتون، صفات مورفو-فیزیولوژیک، بین ریز ماهواره‌ای

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: a.ranjbar@sanru.ac.ir

مقدمه

توتون یکی از گیاهان صنعتی مهم دنیا می‌باشد و تنش خشکی یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده کشت این محصول است (Moon et al., 2009). یکی از یافته‌های مهم طی چند دهه گذشته در زمینه اصلاح نباتات شناخت وجود سرمایه عظیم تنوع ژنتیکی در گیاهان جهت به نژادی محصولات برای کاهش اثرات عوامل محدودکننده تولید بوده است (Rabara et al., 2015). از آنجایی که قسمت اعظم DNA ژنومی را نواحی غیر رمزکننده تشکیل می‌دهند، با اتکا به تنوع بیوشیمیایی یا مورفولوژیکی فقط قسمت محدودی از تنوع که به نواحی رمزکننده برمی‌گردد، بررسی می‌شود. در حالی که تنوع در قسمت‌های بدون رمز ژنوم، خواه در نواحی بدون ژن باشد و یا در اینترون‌ها، احتمالاً کمتر تحت فشار گزینش طبیعی کمتری است، بنابراین تعداد جایگاه‌های چندشکل در این نواحی ژنوم بیشتر بوده و در شناسایی تنوع کمک شایانی می‌نماید (Gorafi et al., 2016).

محمدی و همکاران در بررسی تنوع ژنتیکی ۳۵ جمعیت *Aegilops cylindrica* با استفاده از ۱۷ آغازگر ISSR گزارش نمودند در مجموع ۱۹۰ آلل تکثیر شدند که از این تعداد، ۱۸۸ آلل (۹۸/۹۵ درصد)، به‌عنوان آلل چندشکل تشخیص داده شدند. تعداد آلل‌های تکثیر شده از ۶ تا ۲۰ با میانگین ۱۱/۱۸ آلل متغیر بود. همچنین شاخص نشانگر از ۰/۶ برای آغازگر (GA)8YC تا ۶ برای آغازگر (AC)8TG متفاوت بود. بر اساس نتایج این مطالعه، جمعیت‌های غرب و جنوب غرب کشور، تنوع بیشتری نسبت به جمعیت‌های شمال و شمال غرب کشور نشان دادند، بنابراین مرکز تنوع و پیدایش گونه *Ae. cylindrica* احتمالاً غرب و جنوب غرب کشور بوده و از این مناطق به سمت شمال کشور انتقال یافته‌اند (Mohammadi et al., 2014). بهاری و همکاران نیز تنوع ژنتیکی درون و بین هفده توده‌ی شوید بومی مناطق مختلف ایران را با استفاده از پنج نشانگر ISSR بررسی کردند و در مجموع ۲۹ باند چند شکل را گزارش کردند. در این مطالعه

میانگین کل چند شکلی ۵۴/۷٪ بود و بیشترین و کمترین میزان محتوای اطلاعات چندشکل (PIC)، به ترتیب ۰/۴۶ و ۰/۴ برای آغازگر (CA)8G و ۰/۴ برای آغازگر (AG)8T و با میانگین ۰/۴۳ بود. تجزیه خوشه‌ای بر اساس روش UPGMA ارتباط ضعیف بین فاصله ژنتیکی و فاصله جغرافیایی را در بین توده‌های شوید نشان داد (Bahari et al., 2015).

ریگا و وارتانیان در بررسی خود بر روی تحمل تنش خشکی در توتون گزارش کردند در شرایط کم آبی توتون نسبت به سایر گیاهان زراعی تحمل بیشتری دارد و در مرحله اول کمبود آب در خاک با تنظیم فشار اسمزی سلول و بستن روزنه‌ها، محتوی نسبی آب خود را بالای ۹۰ درصد نگه می‌دارد و از استراتژی اجتناب بهره می‌برد. اما در صورت ادامه تنش خشکی که محتوی نسبی آب برگ کاهش پیدا می‌کند، با بهبود پایداری غشاء سیتوپلاسمی از استراتژی تحمل استفاده می‌کند. بدین صورت بوته‌های توتون تا دو ماه می‌توانند تنش خشکی را تحمل نموده و با دسترسی به آب رشد مجدد خود را آغاز نمایند (Riga and Vartanian, 1999). به طور کلی میانگین میزان هدایت الکتریکی در شرایط دیم بیشتر از آبی می‌باشد. در اثر خشکی دیواره‌ی سلولی تخریب و مایع سلولی واکوئولی به داخل محلول نفوذ کرده و باعث غلیظ‌شدن و در نتیجه زیادشدن میزان هدایت الکتریکی داخل اندام گیاهی می‌شود. هرچه مایع غلیظ‌تر باشد، نشان می‌دهد که سلول‌های بیشتری تخریب شده و تحمل رقم مورد نظر به خشکی کمتر است. پایداری غشاء سیتوپلاسمی فاکتور مهمی در مقاومت به تنش‌های خشکی محسوب می‌گردد و هر چه غشاء سیتوپلاسمی گیاه پایدارتر باشد، گیاه مقاومت بیشتری از خود در برابر تنش‌های محیطی نشان خواهد داد (Ahmadi Azar et al., 2015).

زیاوی و یانگ تنوع ژنتیکی ۱۰۹ رقم توتون از گونه‌ها و تیپ‌های مختلف گرمخانه‌ای، شرقی و وحشی را با ۲۱ نشانگر ISSR بررسی نمودند و ۶۷۱ باند را تکثیر کردند

واریانس کل را توجیه می‌کرد. کلاستربندی با صفات مورفولوژیک نیز، ژنوتیپ‌ها را ۵ گروه تقسیم کرد. اگرچه بعضی ژنوتیپ‌ها در گروه‌های مشابه با گروه‌بندی نشانگری قرار گرفتند، اما دو گروه‌بندی با هم تفاوت داشتند، که این موضوع به تفاوت ساختاری گروه‌بندی نشانگرها و صفات مورفولوژیک برمی‌گردد.

ارزیابی تحمل ارقام به خشکی، اولین گام جهت تولید ارقام مقاوم به تنش خشکی می‌باشد (Ashraf, 2010). بنابراین ارزیابی ساختار جمعیت به لحاظ تحمل خشکی و استفاده از نتایج آن در برنامه‌های اصلاحی توتون جهت تولید واریته‌های پرمحصول و متحمل به خشکی ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به اینکه ارزیابی تحمل به خشکی برای ارقام گرمخانه‌ای موجود در بانک ژن انستیتو تحقیقات توتون ایران - تیرتاش و در شرایط آب و هوایی مازندران انجام نشده بود، به منظور یافتن ارقام متحمل به تنش خشکی و تعیین نشانگر مناسب برای تشخیص تنوع بین ارقام، این تحقیق انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این بررسی ۱۰۰ ژنوتیپ توتون تیپ گرمخانه‌ای از بانک بذر مؤسسه تحقیقات توتون ایران - تیرتاش به طور جداگانه تحت شرایط آبیاری نرمال (آبیاری بعد از مصرف ۵۰ درصد آب قابل استفاده) و تنش خشکی (بدون آبیاری) جداگانه در قالب ۲ طرح لاتیس ساده (۱۰×۱۰) با ۲ تکرار با فاصله ۵۰ متر از یکدیگر در مزرعه تحقیقاتی این مؤسسه در سال زراعی ۱۳۹۳ کشت شد. اسامی ژنوتیپ‌های مورد استفاده در این تحقیق عبارت بود از: ۱- J514, ۲- BY 4, ۳- Beer wah H, ۴- Bel, ۵- Bel 61-1, ۶- Bel 61-10, ۷- Bel 61-11, ۸- Bel 61-12, ۹- Vega, ۱۰- Bel 71-501, ۱۱- Bel B, ۱۲- Vega, ۱۳- Ch. Mutant, ۱۴- Coker 254, ۱۵- Coker 258, ۱۶- Coker 298, ۱۷- Coker 319, ۱۸- Coker 347, ۱۹- Coker 411, ۲۰- Coker 48, ۲۱- Coker 176, ۲۲- Cu 357, ۲۳- Delhi 76, ۲۴- Deliot, ۲۵- E.X.4, ۲۶- P.R 1, ۲۷- Florida 513, ۲۸- Gewone groene

که همه چند شکل بودند. از این تعداد ۱۱۶ باند تنها در گونه *Nicotiana tabacum* دیده شد. ضریب تشابه محاسبه شده برای این جنس دارای دامنه‌ای از ۷۷ تا ۹۵ و شباهت ژنتیکی در ارقام گرمخانه‌ای دارای دامنه‌ای از ۸۱ تا ۹۳ بود (Xiao and Yang, 2007). مون و همکاران (Moon et al., 2009) در بررسی ۷۰۲ ژنوتیپ که از کشورهای مختلف جمع آوری شده بود با ۷۰ نشانگر SSR گزارش کردند که ۱۰۳۱ آلل با متوسط ۱۴/۷ آلل برای هر نشانگر شناسایی کردند. آنالیز واریانس مولکولی ژنوتیپ‌های جمع آوری شده نشان داد که ۹۲ درصد از تنوع ژنتیکی موجود بین نمونه‌ها با جمعیت‌های جمع آوری شده از کشورهای مختلف توضیح داده شده و تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های کشورهای مختلف وجود داشت.

درویش زاده و همکاران در بررسی ۱۰۰ ژنوتیپ توتون از تیپ شرقی با ۱۳ نشانگر SSR و اندازه‌گیری تعدادی صفات مزرعه‌ای، ۳۵ آلل در ۱۳ لوکوس مورد بررسی را پیدا کردند. میانگین تعداد آلل در لوکوس و تعداد آلل موثر به ترتیب ۲/۶۹ و ۲/۳۴ گزارش شد. همچنین گروه بندی ژنوتیپ‌ها با ضریب تشابه جاکارد به روش UPGMA ژنوتیپ‌ها را در سه گروه دسته‌بندی نمود. البته تشابهی بین گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با صفات زراعی و مارکر SSR دیده نشد (Darvishzadeh et al., 2013).

سمیع زاده لاهیجی و همکاران (Samizadeh Lahiji et al., 2013) نیز در بررسی ۸۹ واریته توتون گرمخانه‌ای با ۱۲ مارکر بین ریز ماهواره‌ای، ۱۴۳ باند در دامنه ۴۵۰ تا ۳۰۰۰ جفت باز مشاهده کردند. از این تعداد ۱۰۸ باند (۷۴ درصد) چند شکل بودند. در گزارش آنها اشاره شده است که نشانگرهای UBC811 و UBC814 با ۱۶ باند بیشترین تعداد باند را ایجاد کردند. گروه بندی ژنوتیپ‌ها به روش UPGMA آنها را به پنج گروه دسته‌بندی نمود و در تجزیه به مختصات اصلی بر اساس ماتریس تشابه ژنوتیپ‌ها ۱۲ مولفه اول ۶۰ درصد از واریانس کل را توجیه کردند. به طوری که ۲ مولفه اول فقط ۲۹ درصد از

اندازه‌گیری رطوبت خاک با بلوک گچی تکرار شد (Amudha and Balasubramani, 2011). آبیاری تا زمان رسیدگی برگها (زردی و افتادگی از سطح افق) ادامه یافت. در تیمار تنش هیچ‌گونه آبیاری صورت نگرفت و به‌صورت دیم و وابسته به نزولات آسمانی بود. در تیرماه و مرداد ماه این سال هیچ بارندگی رخ نداد و در خرداد ماه به میزان ۶۰، شهریورماه ۱۵ و مهرماه ۹۰ میلی‌متر بارندگی موثر بر مبنای فرمول FAO وجود داشت. در این بررسی صفات زراعی طول و عرض کمربرگ (وسط بوته)، تعداد برگ، شاخص سطح برگ^۱ (LAI)، شاخص شکل برگ (تقسیم طول بر عرض برگ)، کلروفیل (با دستگاه SPAD-502)، ارتفاع بوته، روز تا گلدهی، وزن سبز و خشک برگ‌ها، قند (به روش فهلینگ)، نیکوتین (به روش اختصاصی کرستا)، پتاسیم (با فلیم فتومتر) اندازه‌گیری شد.

در اواخر دوره رشد و ۹۰ روز پس از نشاکاری محتوای نسبی آب^۲ (RWC)، پایداری غشای سیتوپلاسمی^۳ (CMS) اندازه‌گیری شد. جهت اندازه‌گیری محتوی نسبی آب برگ، ۱۰ دیسک برگ به قطر یک سانتی‌متر از برگ‌های سبز تهیه و پس از توزین در آب مقطر و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت، سپس وزن آماس برگ‌ها اندازه‌گیری شد. جهت تعیین وزن خشک، برگ‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در نهایت درصد محتوی نسبی آب با استفاده از معادله (۱) تعیین شد:

$$\text{نسبی آب} = \frac{(\text{وزن خشک} - \text{وزن آماس})}{\text{وزن خشک}} \times 100 \quad \text{رابطه ۱}$$

شاخص پایداری غشاء از طریق اندازه‌گیری میزان نشت الکترولیت‌های برگ ارزیابی شد. برای این منظور نمونه‌های برگ به درون آب مقطر با حجم ۲۰ میلی‌لیتر منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. سپس میزان هدایت الکتریکی آب مقطر همراه نمونه به عنوان نشت اولیه اندازه‌گیری شد. نشت ثانویه نیز از

Griolla Salteno ۲۹-، H.254 D.P.R 4 ۳۰-، H 76 ۳۱-، Harrison Special ۳۲-، Hicks 55 ۳۳-، Hicks ۳۴-، Broad Leaf ۳۵-، Hicks Fixed A24-26 ۳۶-، Hicks R.G ۳۷-، Hong garten Blatte ۳۸-، K 326 ۳۹-، K326F ۴۰-، K326N.F ۴۱-، K 110 ۴۲-، Kutsaga 110 (E2346) ۴۳-، Kutsaga E 1 ۴۴-، Kutsaga 110 ۴۵-، Kutsaga 51 E ۴۶-، Kutsaga E1 (B1.75) ۴۷-، Kutsaga GA36 ۴۸-، Kutsaga E1 (B1.75) ۴۹-، Lock Wood ۵۰-، Ludo gortez 2317 ۵۱-، Mac Nair ۵۲-، M.C1 ۵۳-، M.C.101 ۵۴-، Manilla Geel ۵۵-، Mont Calm Brum ۵۶-، N.C.95 ۵۷-، N.F.B.E. ۵۸-، N.C. 11-51 ۵۹-، N.C. 60 ۶۰-، N.C. 89 ۶۱-، Orumieh 1 ۶۲-، N.C.95×Ch.Mutant no.2 ۶۳-، North ۶۴-، North Carolina(2326) ۶۵-، North Carolina 88 ۶۶-، P. 49-4625 ۶۷-، P.N. ۶۸-، Pee Dee ۶۹-، P.B.D. 6 ۷۰-، Petrich 84 ۷۱-، Previ stamm 3 ۷۲-، Previ stamm 6 ۷۳-، S392-3S ۷۴-، R.H. 211 ۷۵-، S394-5S ۷۶-، S.O. 1 ۷۷-، South Carolina ۷۸-، Speight G 28 ۷۹-، T.I. 66 ۸۰-، T.I. 998 ۸۱-، Tirtash 9 ۸۲-، Tirtash 10 ۸۳-، Tirtash 17 ۸۴-، Tirtash 19 ۸۵-، Tirtash 30 ۸۶-، Tirtash 31 ۸۷-، Tirtash 33 ۸۸-، T.L 33 ۸۹-، Orumieh 6 ۹۰-، Virginia R.P. ۹۱-، Virginia R.P. 37 ۹۲-، Virginia Aurea ۹۳-، Virginia 115 ۹۴-، Virginia Bright 88 ۹۵-، Virginia E1 ۹۶-، Virginia H.R ۹۷-، Virginia ۹۸-، Virginia ۹۹-، Virginia ۱۰۰- و Gold ۱۰۰-.

فواصل کاشت بوته‌ها روی ردیف ۵۰ و فاصله ردیف‌ها ۱۰۰ سانتی‌متر بود. هر کرت دارای ۴ خط کاشت به طول ۵ متر با فاصله ۲ متر از کرت کناری بود. آبیاری پیش از کاشت نشاء (پیش آب) و بعد از کاشت نشاء (پس آب) برای کلیه تیمارها انجام شد. پس از گذشت ۴۰ روز آبیاری برای تیمار شاهد (آبیاری نرمال) شروع و پس از هر بار رسیدن آب قابل دسترس به ۵۰ درصد با

1- Leaf Area Index
2- Relative Water Content
3- Cell Membrane Stability

۱/۲ درصد و اسپکتوفتومتری ارزیابی شد. برای بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌ها از ۲۵ آغازگر ISSR بر اساس تحقیقات گذشته (Darvishzadeh, 2012; Denduangboripant *et al.*, 2010; Edrisi Maryan *et al.*, 2012; Samizadeh Lahiji *et al.*, 2013; Xiao and Yang, 2007) استفاده شد (جدول ۱).

واکنش‌های PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، حاوی ۲۵ نانوگرم DNA ژنومی، ۲ میکرولیتر بافر PCR ۱۰ برابر، ۱/۵ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی مولار، ۰/۷۵ میکرولیتر از مخلوط dNTPs با غلظت ۱۰۰ میلی مولار، ۱ واحد آنزیم Taq و ۱/۵ میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت ۱۰ پیکومول بر لیتر به همراه آب دیونیزه در دستگاه نرمال سایکلر انجام گرفت. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به صورت: یک چرخه واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه، ۴۸ چرخه شامل ۶۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد (جهت واسرشته سازی)، ۴۵ ثانیه در دمای ۶۵-۴۸ درجه سانتی گراد (جهت اتصال بر اساس آزمون گرادینانت دمایی انجام شده) و ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد (جهت بسط) و یک چرخه بسط نهایی به مدت ۸ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد بود. تفکیک محصولات تکثیری با استفاده از ژل آگارز ۲/۳ درصد و بافر TBE یک برابر با ولتاژ ۷۵ ولت به مدت ۳ ساعت انجام و برای تعیین اندازه باندها از نشانگر اندازه شرکت فرمنتاز استفاده شد. رنگ آمیزی ژل‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید ۰/۵ میکروگرم در میکرولیتر و عکس برداری از ژل‌ها با دستگاه ژل داک انجام شد.

باندهای حاصل از همه نشانگرها بصورت یک (حضور) و صفر (عدم حضور) امتیازدهی و ماتریس حاصل برای بررسی ساختار جمعیت استفاده شد. شاخص نشانگری^۳ که بیانگر میزان چند شکلی است و می‌تواند به عنوان

طریق اندازه گیری میزان هدایت الکتریکی نمونه‌ها پس از حرارت دادن آنها به مدت یک ساعت و در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد اندازه گیری شد و شاخص پایداری غشاء از طریق معادله (۲) محاسبه شد (Shiferaw and Baker, 1996).

رابطه ۲ /نشت اولیه (۱-) = شاخص پایداری غشاء
 $100 \times ((\text{نشت ثانویه})$

پس از انجام تجزیه طرح در قالب لاتیس ساده و کم بودن مزیت نسبی آن، طرح در قالب بلوک‌های کامل تصادفی تجزیه واریانس شد. برآورد اجزاء واریانس فنوتیپی، ژنوتیپی و محیطی بر اساس امید ریاضی میانگین مربعات حاصل از تجزیه واریانس طرح بلوک کامل تصادفی انجام گرفت. واریانس فنوتیپی (۳)، واریانس ژنوتیپی (۴) و توارث‌پذیری عمومی (۵) صفات با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه شد (Kearsey and Pooni, 1998):

$$\sigma^2 p = \sigma^2 g + \frac{\sigma^2 e}{r} \quad \text{رابطه ۳}$$

$$\sigma^2 g = \frac{MSg - MSe}{r} \quad \text{رابطه ۴}$$

$$h^2 = \frac{\sigma^2 g}{\sigma^2 p} \times 100 \quad \text{رابطه ۵}$$

در این فرمول‌ها $\sigma^2 g$ واریانس ژنوتیپی، $\sigma^2 p$ واریانس فنوتیپی، MSg میانگین مربعات ژنوتیپ‌ها، MSe و $\sigma^2 e$ میانگین مربعات خطا، r تعداد تکرار و h^2 توارث‌پذیری عمومی است. ضریب تغییرات فنوتیپی^۱ (۶) و ضریب تغییرات ژنوتیپی^۲ (۷) به ترتیب با استفاده از واریانس فنوتیپی، ژنوتیپی و میانگین ($\bar{x}$) و بر اساس فرمولهای زیر محاسبه شد (Kearsey and Pooni, 1998):

$$PCV = \frac{\sqrt{\sigma^2 p}}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{رابطه ۶}$$

$$GCV = \frac{\sqrt{\sigma^2 g}}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{رابطه ۷}$$

جهت ارزیابی مولکولی DNA ژنومی ۱۰۰ ژنوتیپ مورد بررسی به روش دلاپورتا و همکاران (Dellaporta *et al.*, 1983) از بافت گیاهچه‌های ۳-۴ برگی رشد داده شده در سینی‌های یونولیتی استخراج شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده به ترتیب با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز

جدول ۱- نام، توالی و شاخص نشانگری ۲۵ نشانگر ISSR مورد استفاده

Table 1. Names, Sequence and marker indexes for 25 used ISSR Marker

نام آغازگر ردیف	نام شاخص	توالی (۵'-۳')	شاخص نشانگر	نام آغازگر ردیف	نام شاخص	توالی (۵'-۳')	شاخص نشانگر
No.	Marker Name	Sequence (5'-3')	Marker Index	No.	Marker Name	Sequence (5'-3')	Marker Index
1	UBC81:	GAGAGAGAGAGAGAGAC	2.63	14	UBC842	GAGAGAGAGAGAGAGT	3.79
2	UBC81:	GAGAGAGAGAGAGAGAA	2.96	15	UBC843	CTCTCTCTCTCTCTCTAT	0.77
3	UBC81:	CTCTCTCTCTCTCTCTA	5.49	16	UBC844	CTCTCTCTCTCTCTCTAC	2.35
4	UBC81:	CTCTCTCTCTCTCTCTAG	2.51	17	UBC845	CTCTCTCTCTCTCTCTAG	1.26
5	UBC81:	CACACACACACACACAT	2.69	18	UBC851	GTGTGTGTGTGTGTGTG	1.36
6	UBC81:	CACACACACACACACATA	2.24	19	UBC853	TCTCTCTCTCTCTCTCAT	1.18
7	UBC82:	TCTCTCTCTCTCTCTCC	3.03	20	UBC856	ACACACACACACACACTA	1.72
8	UBC82:	TCTCTCTCTCTCTCTCCG	0.87	21	UBC873	GACAGACAGACAGACA	3.34
9	UBC82:	ACACACACACACACACT	2.57	22	UBC878	GCATGCATGCATGCAT	2.89
10	UBC82:	ACACACACACACACACTC	2.99	23	UBC879	CTTCACTTCACTTCA	1.29
11	UBC83:	AGAGAGAGAGAGAGAGTT	3.15	24	UBC813	CTCTCTCTCTCTCTCT	-
12	UBC83:	AGAGAGAGAGAGAGAGTC	3.56	25	UBC857	ACACACACACACACACTG	-
13	UBC84:	GAGAGAGAGAGAGAGTT	3.06				

شاخصی جهت برآورد کارایی یک نشانگر در یک ژرم پلاسما ناشناخته استفاده گردد، با استفاده از رابطه $MI = PIC \times EMR$ محاسبه شد. میانگین محتوای اطلاعات چند شکل بر اساس رابطه $PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$ محاسبه شد. در این رابطه P_i برابر با فراوانی آلل i ام و n تعداد آلل‌ها است (Smith et al., 1997). نسبت چندگانه موثر^۱ (EMR) که بیانگر تعداد جایگاه‌های ژنی چندشکل موجود در یک ژرم پلاسما می‌باشد، بر اساس رابطه $EMR = n_p \times \beta$ محاسبه شد که n_p تعداد کل باندهای چند شکل و β نسبت تعداد باند چند شکل به تعداد کل باند می‌باشد (Powell et al., 1996). برای رسم دندروگرام و تجزیه مولفه‌های متعادل از ماتریس تشابه جاکارد به روش UPGMA از نرم افزار NTSYS-PC (Ver. 2.2) استفاده شد (Rohlf, 2000).

نتایج و بحث

اطلاعات آماری صفات مزرعه ای برای ژنوتیپ‌ها (جدول ۲) نشان داد برای کلیه صفات اندازه گیری شده تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها وجود دارد. مقادیر دو صفات مهم در بررسی‌های تنش خشکی، محتوای نسبی آب و پایداری غشاء سیتوپلاسمی در شرایط نرمال بیشتر از

شرایط تنش بود. به طوری که محتوای نسبی آب در شرایط نرمال با میانگین کل ۷۰/۹ بیشتر از مقدار آن در شرایط تنش (۶۷/۴) بود. بیشترین مقدار این صفت در شرایط نرمال و تنش به ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های ۹۶ و ۸۰ و کمترین آن مربوط به ژنوتیپ‌های ۶۶ و ۲۷ بود. محتوای رطوبت نسبی نقش مهمی در تنظیم هدایت روزنه ای و در نتیجه سرعت فتوسنتزی گیاه دارد. کاهش رشد و فعالیت ریشه در شرایط تنش و افزایش میزان تبخیر و تعرق در شرایط خشک از جامعه گیاهی از عوامل دخیل در کاهش RWC شناخته شده‌اند. محتوای نسبی آب معرف بسیار خوبی از وضعیت آبی گیاه است که به عنوان یک شاخص انتخاب جهت تحمل به خشکی نیز پیشنهاد شده است (Teulat et al., 1997).

برای صفت پایداری غشاء سیتوپلاسمی در شرایط نرمال با میانگین ۱۱۸ بیشتر از مقدار آن در شرایط تنش ۱۰۴ بود. بیشترین مقدار این صفت در شرایط نرمال و تنش به ترتیب مربوط به ژنوتیپ‌های ۷۸ و ۷۰ و کمترین آن مربوط به ژنوتیپ‌های ۹۱ و ۶۴ بود. وارتانیان و همکاران (Vartanian et al., 1992) گزارش کردند تیمار تنش خشکی از تکامل دیواره ممانعت نموده و باعث نشت الکترولیت از دیواره سلولی می‌شود. با توجه به آسیب

پذیری غشای سیتوپلاسمی، محتویات سلول به بیرون تراوش کرده و مقدار این خسارت را می‌توان با اندازه گیری نشت یونی و هدایت الکتریکی تعیین نمود و از طرفی ارقام متحمل به خشکی دارای نشت الکترولیت کمتری هستند. با توجه به وراثت‌پذیری بسیار کم برای محتوی نسبی آب و کم برای پایداری غشاء سیتوپلاسمی، به نظر می‌رسد به نژادی ارقام برای این دو صفت خیلی موثر نباشد و بهتر است از ارقام با مقادیر بالای این دو صفت برای کشت در مناطق خشک استفاده شود.

بیشترین میانگین عملکرد در شرایط نرمال و تنش به ترتیب متعلق به ژنوتیپ‌های V115 و K394 (به ترتیب ۵۹۱۴ و ۳۰۲۴ کیلوگرم در هکتار) و کمترین عملکرد در شرایط نرمال و تنش Bell 61-11 بود که نشان دهنده تفاوت در تحمل تنش در بین ژنوتیپ‌ها و امکان معرفی برخی ارقام به عنوان ارقام متحمل به تنش بود. از سوی دیگر وراثت‌پذیری برای دو صفت طول و عرض برگ و در نتیجه برای شاخص شکل برگ بالا محاسبه شد، لذا می‌توان فعالیت‌های به نژادی را برای اصلاح ارقام در منطقه

خشک روی این صفات موثر در عملکرد متمرکز نمود. بنابراین بر اساس دو صفت محتوی نسبی آب و پایداری غشاء سیتوپلاسمی و همچنین میزان عملکرد، رقم K394 با مقادیر مطلوب برای کلیه صفات اندازه‌گیری شده، متحمل‌ترین رقم به خشکی شناسایی شد و این رقم بر اساس خوشه‌بندی با صفات مورفولوژیک در شرایط تنش، به تنهایی در یک خوشه قرار گرفت. رقم Bell 61-11 نیز رقمی حساس با عملکرد پایین بود. لازم به ذکر است عملکرد پایین این رقم تنها مربوط به حساسیت به خشکی نبوده و سایر خصوصیات زراعی این رقم نیز در وضعیت مناسبی نبود. نکته قابل توجه اینکه گلدهی با تنش خشکی به طور میانگین حدود ۵ روز به تاخیر افتاد. این موضوع با استراتژی فرار از تنش در توتون سازگاری دارد (Riga and Vartanian, 1999). میزان کلروفیل نیز در شرایط تنش بیشتر از مقدار آن در شرایط نرمال بود. به نظر می‌رسد کاهش اندازه برگ باعث تجمع کلروفیل در سطح برگ شده باشد.

جدول ۲- تجزیه و تحلیل صفات مورفو- فیزیولوژیک برای ژنوتیپ‌ها در شرایط تنش

Table 2. Morpho-physiologic traits analysis for genotypes in stress condition

توارث	ضریب ضریب	ضریب ضریب	واریانس	واریانس	تنش	نرمال	تنش	میانگین*	میانگین*	صفات
پذیری	تغییرات	تغییرات	فنوتیپی	ژنوتیپی	حداقل	حداکثر	میانگین*	حداقل	حداکثر	Traits
H	PCV	GCV	PV	GV	Min.	Stress Max.	Mean	Min.	Normal Max.	Mean
0.25	6.02	2.99	16.495	4.07	51	98	67.4	55	91	70.9 RWC
0.43	11.84	7.77	153.2	65.85	56	179	104	68	177	118 CMS
0.76	10.77	9.40	23.885	18.21	27	57	45.4	37	72	57.7 Leaf length
0.78	12.58	11.10	9.18	7.155	15	36	24.1	21	87	31.9 Leaf width
0.80	15.48	13.83	374.3	298.7	67	180	125	89	220	160 High
0.43	11.98	7.90	40.63	17.67	26	71	53.2	24	60	43.9 Clorophyll
0.63	10.43	8.26	6.865	4.302	17	35	25.1	18	63	24.4 Leaves No.
0.77	14.28	12.49	187.3	143.28	57	107	95.8	69	101	90.3 Day to F.
0.64	21.76	17.35	0.43245	0.2749	0.76	5.26	3.02	1.87	12.4	4.91 LAI
0.83	8.27	7.52	0.001935	0.0016	0.42	0.66	0.53	0.42	0.77	0.55 LFI
0.50	21.89	15.41	6.07	3.009	2.01	18.6	11.3	1.70	20.5	9.56 Sugar
0.52	16.79	12.16	0.32815	0.1720	0.81	4.7	2.41	0.28	6.22	2.26 Nicotine
0.54	32.29	23.72	0.15265	0.0823	0.48	3.27	1.21	0.69	3.74	1.77 Potasium
0.57	25.96	19.58	14902561	8477286	1758	43737	14870	5812	46243	28546 Green Yield
0.64	26.66	21.39	561418.5	361694	346	6841	2812	960	8365	4921 Yield

*: میانگین همه صفات برای ژنوتیپ‌ها در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (داده‌ها نشان داده نشده است)

*: The means of all traits for genotypes were significant at 1% probability level (data not shown).

تحقیقات روی برنج نشان داد که در شرایط تنش خشکی به دلیل کاهش سطح برگ پرچم، تجمع کلروفیل افزایش می‌یابد، اما به علت تعرق بالا گیاه آب بیشتری از دست می‌دهد و در نتیجه محتوای نسبی آب و به دنبال آن فتوسنتز نیز کاهش می‌یابد (Jianchang and Zengchun, 1997). تجزیه خوشه‌ای ارقام به روش وارد برای ژنوتیپ‌ها در شرایط تنش با استفاده از ۱۵ صفت مورفولوژیک انجام شد. بر اساس گروه بندی انجام شده، ارقام در ۵ گروه دسته‌بندی شدند (شکل ۱ و جدول ۳). این گروه‌بندی با گروه‌بندی انجام‌شده‌ی قبلی (Edrisi Maryan et al., 2012; Samizadeh Lahiji et al., 2013) متفاوت بود. تفاوت در نتایج محققان می‌تواند به دلیل اختلاف در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، شرایط تنش یا نرمال مورد بررسی، صفات خاص خشکی و نرمال باشد (Darvishzadeh et al., 2013).

برای تجزیه و تحلیل نشانگری در این بررسی، تعداد ۲۵ آغازگر ISSR مورد استفاده قرار گرفت که ۲۳ آغازگر باندهای واضح و چندشکل تولید کردند (جدول ۱). از کل ۲۳۷ باند تولید شده، ۴۲ باند منومورف و ۱۹۵ باند چندشکل بودند. اندازه باندها بین ۱۰۰ تا ۱۵۰۰ جفت و تعداد باندها برای هر آغازگر از ۵ تا ۱۴ باند متفاوت بود. متوسط تعداد کل باندها و متوسط تعداد باندهای چندشکل برای هر آغازگر به ترتیب ۱۰/۳۰ و ۸/۴۸ بود. تصویر ۳ الگوی باندهای ایجاد شده با آغازگر UBC840 برای ژنوتیپ‌های ۷۴ تا ۹۰ را نشان می‌دهد. شاخص نشانگر در آغازگرهای مورد مطالعه بین ۰/۷۷ تا ۵/۴۹ قرار داشت. با توجه به اهمیت شاخص نشانگری در بیان میزان چندشکلی، آغازگر UBC814:(CT)8A با ۱۶ باند چند شکل از کل ۱۷ باند، بیشترین مقدار را داشت که نشان دهنده قدرت تفکیک بالاتر این آغازگر نسبت به سایر آغازگرها بود و برای بررسی‌های تنوع مولکولی توتون مناسب به نظر می‌رسد.

برای انجام تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های نشانگرهای ISSR، ابتدا آزمون منتل (Mantel 1967) برای ضرایب

تشابه جاکارد، دایس و تطابق ساده بر اساس روش‌های خوشه بندی انجام شد. بر اساس نتایج بدست آمده در این مطالعه روش خوشه بندی UPGMA با ضریب تشابه جاکارد، دارای بالاترین ضریب همبستگی کوفاکتیک معادل ۰/۹۶ بود که نشان دهنده برازش خوب و همبستگی بالا بین ماتریس‌های تشابه و دندروگرام نهایی بود. بر این اساس ژنوتیپ‌ها در سطح تشابه ۵۰ درصد به شش گروه مجزا تقسیم شدند (جدول ۴ و شکل ۲). اگرچه تعدادی از ژنوتیپ‌ها در گروه‌های مشابه قرار گرفتند، اما این گروه‌بندی با گروه‌بندی حاصل از صفات مورفولوژیک متفاوت بود. البته محمدی و همکاران گزارش کردند روش‌های گروه‌بندی خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی نتوانست جمعیت‌های اجیلوپس را به‌طور کامل از هم تفکیک کند (Mohammadi et al., 2014). لازم به ذکر است که ممکن است ژنوتیپ‌ها از لحاظ خصوصیات ظاهری تفاوت داشته باشند، ولی از لحاظ کل ژنوم شباهت زیادی بین آنها وجود داشته باشد، زیرا حدود ۹۰ درصد ژنوم غیر کدکننده است (Darvishzadeh et al., 2013; Samizadeh Lahiji et al., 2013).

کمترین ضریب تشابه بین دو ژنوتیپ Bel B و NFBE63 با ۴۵/۹ درصد تشابه و بیشترین ضریب تشابه بین دو ژنوتیپ NFBE63 و Coker257 با ۹۹/۵ درصد تشابه به دست آمد. از ژنوتیپ‌های با تفاوت ژنتیکی زیاد، در صورت داشتن صفات مطلوب می‌توان به عنوان والد در برنامه‌های دورگ گیری و تولید واریته هیبرید استفاده نمود. چرا که یکی از راه‌های مطمئن برای دستیابی به هتروزیس بالا، استفاده از مواردی است که دارای کمترین خویشاوندی باشند (Basirnia et al., 2014).

نتایج حاصل از تجزیه به مولفه‌های متعادل^۱ نشان داد که سه مولفه ابتدایی توانستند مجموعاً ۷۹/۶۷ از واریانس کل را توجیه کنند. اولین مولفه ۶۵/۱۲، دومین مولفه ۱۲/۳۶ و سومین مولفه ۲/۱۸ درصد از تنوع کل را توجیه نمودند. نمودار الگوی تنوع ژنوتیپ‌ها بر اساس سه مولفه متعادل ابتدایی رسم شد (شکل ۴).

جدول ۳- گروه بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس روش WARD با ۱۵ صفت مورفولوژیک در شرایط تنش

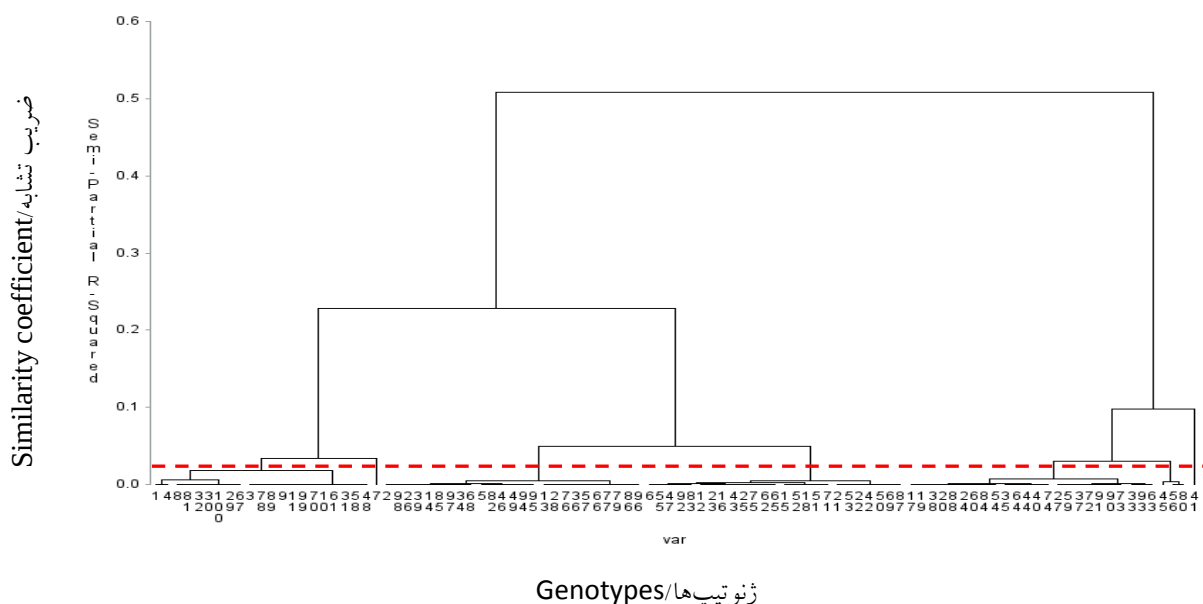
Table 3. Clustering of genotypes based on WARD with 15 morpho-physiological traits in stress condition

ژنوتیپ‌ها (به ترتیب ظهور در دندروگرام از چپ به راست) Genotypes (From left to right in order of appearance in the cluster analysis)	Group	گروه
1,4,8,81,32,30,100,29,67,3,78,89,9,11,99,70,10,61,31,58,48,7	1	یک
2,98,26,39,14,85,97,34,68,5,82,46,49,94,95,13,28,76,36,57,66,77,79,86,96	2	دو
6,55,47,92,83,12,23,16,43,25,75,62,65,15,52,18,51,71,21,53,22,42,50,69,87	3	سوم
17,19,38,20,88,24,60,84,54,35,64,44,40,74,27,59,37,72,91,90,73,33,93,63,45,56,80	4	چهار
41	5	پنج

جدول ۴- گروه بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس ماتریس جاکارد به روش UPGMA با استفاده از ۲۳ نشانگر ISSR

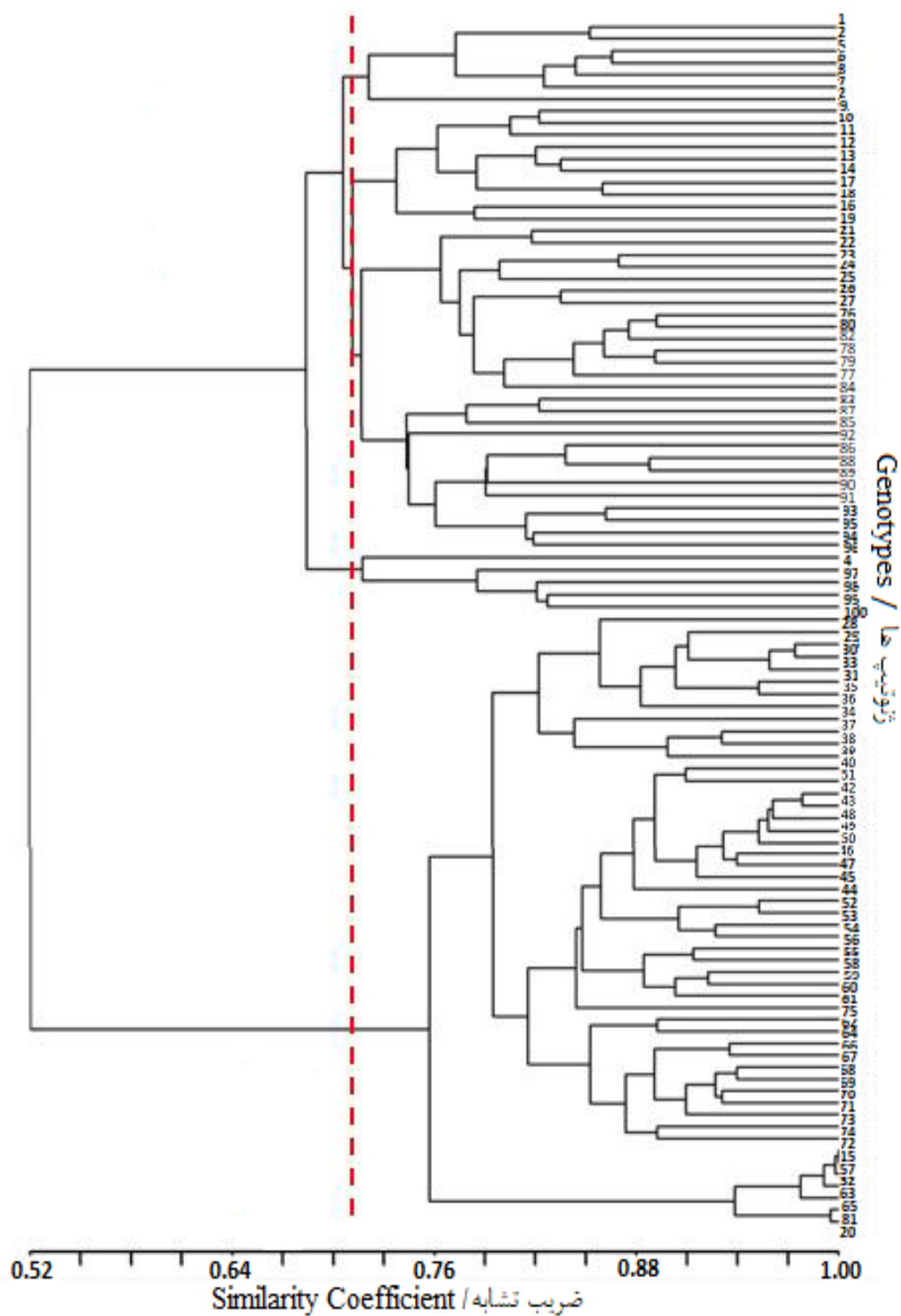
Table 4. Clustering of genotypes based on Jaccard matrix on UPGMA method with 23 ISSRs

ژنوتیپ‌ها (به ترتیب ظهور در دندروگرام از بالا به پایین) Genotypes (From up to down in order of appearance in the cluster analysis)	Group	گروه
1, 3, 2, 5, 6, 7, 8	1	یک
4	2	دو
9,11,10,12,13,14,17,18,16,19,21,22,23,24,76,80,82,78,79,77,26,27,25,83,84,87,85,92,90,96,86,88,89,91,9,8,93,95,94	3	سو
97,98,99,100	4	چهار
28,29,30,33,31,35,36,34,37,38,39,40,62,64,66,67,68,69,70,71,73,74,72,41,51,42,43,48,49,50,46,47,45,44,52,53,54,56,58,55,61,59,60,75	5	پنج
20,81,65,63,32,57,15	6	شش



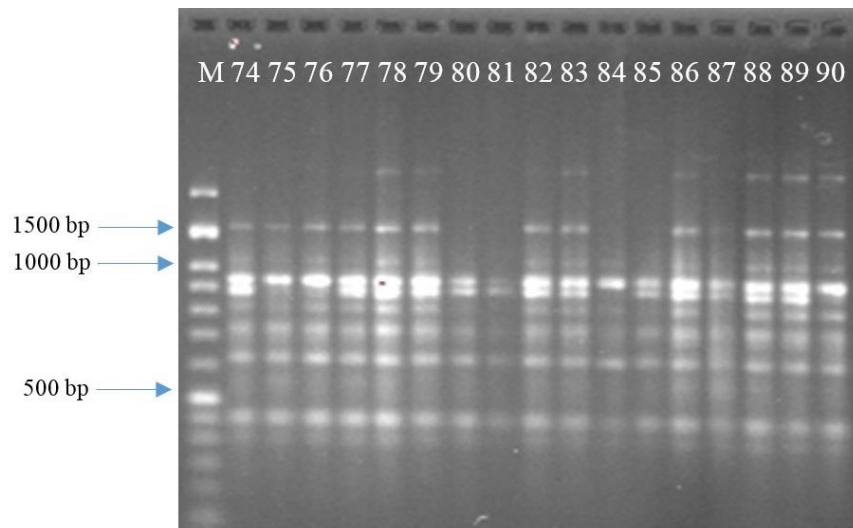
شکل ۱- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش WARD برای ۱۰۰ ژنوتیپ توتون با استفاده از ۱۵ صفت مورفو-فیزیولوژیک در شرایط تنش

Figure 1. Cluster analysis by WARD method for 100 tobacco genotypes using 15 morpho-physiological traits in stress condition

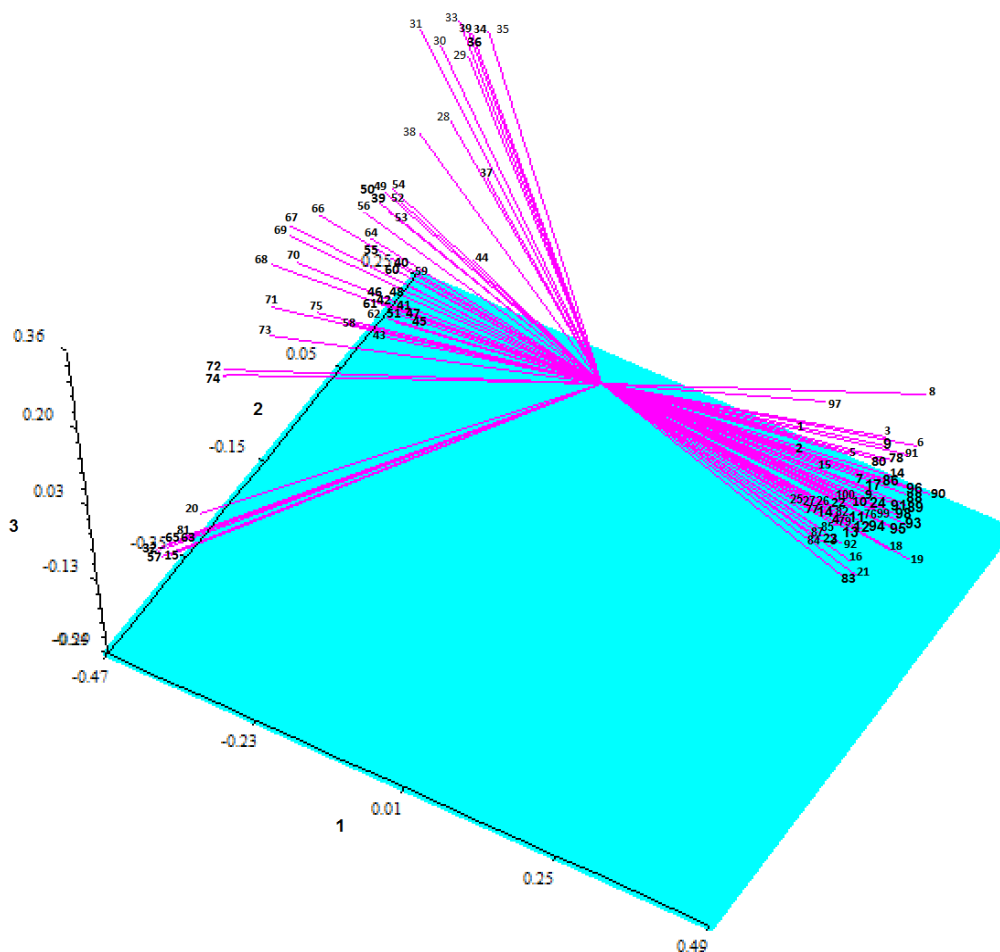


شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه ای به روش UPGMA برای ۱۰۰ ژنوتیپ توتون با استفاده از ۲۳ نشانگر ISSR براساس ضریب تشابه جاکارد

Figure 2. Cluster analysis by UPGMA method for 100 tobacco genotypes using 23 ISSR markers based on Jaccard coefficient.



شکل ۳ - الگوی بانندی ایجاد شده با آغازگر UBC840 برای ژنوتیپ‌های شماره ۷۴ تا ۹۰
Figure 3. ISSR-PCR band pattern related to UBC840 for genotypes 74-90



شکل ۴- نمودار همبستگی ژنوتیپ‌ها در سه مولفه ابتدایی در تجزیه به مولفه‌های متعادل براساس نشانگر بین ریز ماهواره
Figure 4. Genotypes correlation graph in three first components in balanced component analysis based on ISSR

نمودار پراکنش ژنوتیپ‌ها نشان داد که این گروه بندی با گروه بندی حاصل از تجزیه خوشه ای مطابقت دارد. به طوریکه بر اساس نتایج به دست آمده از گروه بندی خوشه ای ژنوتیپ‌های ۱۱ و ۵۷ بیشترین ضریب تشابه را داشته و در یک گروه و ژنوتیپ‌های ۱۵ و ۵۷ کمترین ضریب تشابه را داشته و در گروه‌های متفاوت قرار گرفته بودند و بر اساس نمودار پراکنش این نتایج تایید شد. نتایج این تحقیق نشان داد که نشانگر ISSR نشانگری کارا جهت آشکارسازی روابط مولکولی بین توده‌ها و ارقام مورد آزمایش در این بررسی می‌باشد. به طوری که

آغازگر UBC814:(CT)8A با ۱۶ باند چند شکل از کل ۱۷ باند، قدرت تفکیک بالاتری نسبت به سایر آغازگرها داشته و برای بررسی‌های تنوع مولکولی توتون مناسب به نظر می‌رسد. رقم K394 نیز به عنوان متحمل‌ترین رقم به خشکی شناسایی و معرفی شد. از نتایج این تحقیق می‌توان جهت افزایش عملکرد، کیفیت و سازگاری این گیاه در تنش خشکی استفاده نمود. علاوه بر این با استفاده از روابط مولکولی بدست آمده و با دقت و توجه کافی به گروه بندی‌های ایجاد شده، می‌توان ژنوتیپ‌های مناسب را جهت برنامه‌های به نژادی انتخاب نمود.

References

- Ahmadi Azar, F., Hasanloo, T., Imani, A. and Feiziasl, V. (2015). Water stress and mineral zeolite application on growth and some physiological characteristics of mallow (*Malva sylvestris*). *Journal of Plant Research*, **28**(3): 459-474.
- Amudha, J. and Balasubramani, G. (2011). Recent molecular advances to combat abiotic stress tolerance in crop plants. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, **6**(2): 31-58.
- Ashraf, M. (2010). Inducing drought tolerance in plants: Recent advances. *Biotechnology advances*, **28**(1): 169-183.
- Bahari, Z., Abdolali, Sh., Rashidi Monfared, S., Mirshekari, A., Nasiri, Kh. and Amiriyani, M. (2015). Investigation of genetic diversity among some iranian dill (*Anethum graveolens* L.) Landraces, using issr markers. *Journal of Plant Genetic Researches*, **2**(2): 11-22.
- Basirnia, A., Hatami Maleki, H., Darvishzadeh, R. and Ghavami, F. (2014). Mixed linear model association mapping for low chloride accumulation rate in oriental-type tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) germplasm. *Journal of Plant Interactions*, **9**(1): 666-672.
- Darvishzadeh, R., Mirzaei, L., Maleki, H., Laurentin, H. and Alavi, S.R. (2013). Genetic variation in oriental tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) by agro-morphological traits and simple sequence repeat markers. *Revista Ciência Agronômica*, **44**: 347-355.
- Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B. (1983). A plant DNA miniprep: Version ii. *Plant Molecular Biology Reporter*, **1**(4): 19-21.
- Denduangboripant, J., Setaphan, S., Suwanprasart, W. and Panha, S. (2010). Determination of local tobacco cultivars using issr molecular marker. *Chiang Mai Journal of Science*, **37**(2): 293-303.
- Edrisi, M., Samizadeh Lahiji, H. and Shoaie Deylami, M. (2012). Assessing the genetic diversity of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) varieties. *Crop Breeding Journal*, **2**(2): 125-132.
- Gorafi Yasir, S.A., Ishii, T., Kim, J., Elbashir, A.A.E. and Tsujimoto, H. (2016). Genetic variation and association mapping of grain iron and zinc contents in synthetic hexaploid wheat germplasm. *Plant Genetic Resources*, **2016**: 1-9. (doi:10.1017/S1479262116000265).
- Jianchang, Z. and Zengchun, C. (1997). Source sink characteristics related to the yield in intersubspecific hybrid rice. *Scientia Agricultura Sinica*, **3**: 228-236.
- Kearsey, M.J. and Pooni, H.S. (1998). *The Genetical Analysis of Quantitative Traits*. Stanley Thornes Publishers Ltd, Oxford, UK.
- Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, **27**: 209-220.
- Mohammadi, S., Mehrabi, A.A., Arminian, A. and Fazeli, A. (2014). Genetic diversity structure of aegilops cylindrica accessions revealed by genomic issr markers. *Journal of Plant Genetic Researches*, **1**(1): 13-26.
- Moon, H.S., Nifong, J.M., Nicholson, J.S., Heineman, A., Lion, K., Van der Hoeven, R., Hayes, A.J. and Lewis, R.S. (2009). Microsatellite-based analysis of tobacco genetic resources. *Crop Science*, **49**(6): 2149-2159.

- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalski, A.** (1996). The comparison of RFLP, RAPD, FLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, **2(3)**: 225-238.
- Rabara, R.C., Tripathi, P., Reese, R. Neil, R., Deena, L., Alexander, D., Timko, M.P., Shen, Q.J. and Rushton, P.J.** (2015). Tobacco drought stress responses reveal new targets for solanaceae crop improvement. *BMC genomics*, **16(1)**: 1-22.
- Riga, P. and Vartanian, N.** (1999). Sequential expression of adaptive mechanisms is responsible for drought resistance in tobacco. *Functional Plant Biology*, **26(3)**: 211-221.
- Rohlf, F.J.** (2000). *Ntsyspc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. Applied Biostatistics Press, New York, Stony, USA.
- Samizadeh Lahiji, H., Mohsenzadeh Golfazani, M., Edrisi Maryan, K., Shoaied Deylami, M. and Aalami, A.** (2013). Assessing the genetic diversity of 89 flue-cured tobacco varieties using morphological traits and inter-simple sequence repeat markers. *Crop Breeding Journal*, **3(2)**: 79-85.
- Shiferaw, B. and Baker, D.A.** (1996). An evaluation of drought screening techniques for eragrostis. *Tropical Science*, **36(2)**: 74-85.
- Smith, J.S.C., Chin, E.C.L., Shu, H., Smith, O.S., Wall, S.J., Senior, M.L., Mitchell, S.E., Kresovich, S. and Ziegler, J.** (1997). An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): Comparisons with data from RFLPs and pedigree. *Theoretical and Applied Genetics*, **95(1)**: 163-173.
- Teulat, B., Rekika, D., Nachit, M.M. and Monneveux, P.** (1997). Comparative osmotic adjustments in barley and tetraploid wheats. *Plant Breeding*, **116(6)**: 519-523.
- Vartanian, N., Hervochon, P., Marcotte, L. and Larher, F.** (1992). Proline accumulation during drought rhizogenesis in *Brassica napus* var. *Oleifera*. *Journal of Plant Physiology*, **140(5)**: 623-628.
- Xiao, B. and Yang, B.** (2007). Assessment of genetic diversity among tobacco germplasms by ISSR markers. *Ningbo Academy of Agricultural Sciences*, **40(10)**: 2153-2161

Investigation of Heritability and Genetic Diversity among Tobacco Genotypes using ISSR Markers and Morpho-Physiological Traits

Mohammad Reza Salavati Meybodi¹, Gholam Ali Ranjbar^{2,*}, Seyed Kamal Kazemitabar² and Hamid Najafi Zarrini³

- 1- Ph.D. Student, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Crop Sciences, Sari Agricultural Science and Natural Resources University, Sari, Iran
- 2- Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Crop Sciences, Sari Agricultural Science and Natural Resources University, Sari, Iran
- 3- Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Crop Sciences, Sari Agricultural Science and Natural Resources University, Sari, Iran

(Received: December 26, 2016 – Accepted: April 18, 2017)

Abstract

Water stress is one of the most common environmental stresses that limited tobacco production in IRAN. Identification of genetic diversity in tobacco germplasm and genetic relationships between traits help to improve tolerant varieties. In this study, the genetic diversity of 100 flue-cured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cultivars was analyzed using 15 morpho-physiological traits and 25 ISSR primers. The cultivars were cultured in a simple lattice design (10×10) with two replications (with and without water stress) in Tirtash Tobacco Institute, Iran. Results showed relative water content (RWC) and cell membrane stability (CMS) in normal condition were significantly higher than stress condition. The estimated broadsense heritability was low for RWC and CMS that represents large environmental effects on these two traits. The results of genotypes clustering by UPGMA method with ISSR markers and by WARD method with morph-physiological traits did not match. Primer UBC814: (CT) 8A with 16 polymorphic bands of the 17 bands, had higher resolution than other primers and seems appropriate for molecular diversity studies in tobacco. The K394 genotype was identified as well as drought tolerant varieties. We can use results of this study for selecting genotypes with great genetic differences and chose the desirable traits and use in breeding programs for producing high heterosis hybrid with tolerance to drought stress in tobacco.

Keywords: Cluster analysis, Rain-fed, Tobacco, Morpho-physiological traits, ISSR

* Corresponding Author, E-mail: a.ranjbar@sanru.ac.ir