

بررسی تنوع ژنتیکی بین و درون تیپ‌های توتون با استفاده از نشانگرهای ISSR

Study of genetic diversity among and within types of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) using ISSR markers

سیده‌فاطمه حسنی‌تسیه^۱، حبیب‌الله سمیع‌زاده‌lahiji^{*}^۱، مرادویج شعاعی‌دلیمی^۲

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیار دانشگاه گیلان

۲- مریمی مرکز تحقیقات توتون گیلان

Hassani Tesie F¹, Samizadeh Lahiji H^{*1}, Shoaei Deilami M²

1. MSc Student and Associate Professor, University of Guilan

2. Instructor, Guilan Tobacco Research Center

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: hsamizadeh@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۱ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۷/۳۰)

چکیده

در این مطالعه به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی ۴۵ ژنوتیپ از تیپ‌های توتون شامل هوا خشک (بارلی)، گرمخانه‌ای (ویرجینیا) و آفتاب خشک (شرقی) از ۱۲ آغازگر ISSR استفاده شد. از تعداد ۱۷۰ نواری که تولید شدند، ۱۲۸ نوار چندشکل بودند به طوری که تعداد نوارهای چندشکل از ۶ تا ۱۴ به ازای هر آغازگر متغیر بود. محتوای اطلاعات چندشکل آغازگرها در ژنوتیپ‌ها بین ۰/۱۶ تا ۰/۳۳ و شاخص نشانگری بین ۱/۲۱ تا ۳/۵۵ در هر آغازگر در نوسان بودند. تجزیه به مختصات اصلی نشان داد که ۵۵ مولفه اول توانستند در مجموع، ۶۹/۶۱ درصد از واریانس کل را توجیه کنند. همچنین روابط ژنتیکی بین نمونه‌ها با استفاده از ضربیت تطبیق تشابه ساده محاسبه شد و تجزیه خوش‌های به روش WPGMA، ۴۵ ژنوتیپ مورد مطالعه را در ۶ گروه قرار داد، که به ترتیب گروه‌های ۱ و ۳ ژنوتیپ‌های هوا خشک (بارلی)، گروه ۲ ژنوتیپ‌های گرمخانه‌ای (ویرجینیا) و گروه‌های ۴، ۵ و ۶ ژنوتیپ‌های آفتاب خشک (شرقی) را شامل شدند. صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوش‌های توسط تابع تشخیص کانونی به روش فیشر با ۷۳/۳ درصد تایید شد.

واژه‌های کلیدی

تجزیه تابع تشخیص

تجزیه خوش‌های

توتون

چندشکلی

ISSR

مقدمه

اساس توالی‌های مجاور ریزماهواره‌هایی که در سراسر ثنومن پراکنده‌اند استفاده می‌شود (Nagaoka and Ogihara 1997) و به دلیل ویژگی‌های بسیار مطلوبی مانند تکرارپذیری، تجزیه و تحلیل همزمان تعداد زیاد جایگاه‌زنی، دقت بالا، تنوع بسیار بالا، هزینه پایین، سرعت و سهولت اجرا، به طورگسترده‌ای به خصوص در گیاهان به کار گرفته شده است (Souframanien and Gopalkrishna 2004). به طور مثال این نشانگر غالب به عنوان ابزاری مفید در تعیین تنوع ژنتیکی بسیاری از گیاهان مهم زراعی مانند ذرت (Kantety et al. 1995)، گندم (Hou et al. 1999)، برنج (Blair et al. 1999)، جو (Ogihara 1997) و همچنین بررسی تنوع ژنتیکی توتون و انگشت‌نگاری (Del Piano et al. 2000; Yang et al. 2007).

به منظور دستیابی به اطلاعات لازم و ضروری جهت شناسایی ژرم‌پلاسم توتون، تنوع و روابط ژنتیکی ۱۱۹ ژنوتیپ توتون با استفاده از نشانگر ISSR مورد بررسی قرار گرفت که تنوع ژنتیکی پایینی در ژرم‌پلاسم توتون‌های گرمنخانه‌ای در چین مشاهده شد، این محققین پیشنهاد کردند که جهت گسترش پایه ژنتیکی توتون-های گرمنخانه‌ای باید از پتانسیل ژنتیکی موجود در ژنوتیپ‌های وحشی توتون بهره برد (Xio and Yang 2007). در بررسی تنوع و روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های توتون با استفاده از نشانگر ISSR تشابه ژنتیکی میان ژنوتیپ‌ها در محدوده ۰/۲۶ تا ۰/۹۶ متغیر بود و این تشابه بین ژنوتیپ‌های زراعی در مقایسه با ژنوتیپ‌های وحشی توتون نسبتاً بالا بود. نتایج این پژوهش نشان داد که نشانگر ISSR نسبت به نشانگر RAPD دارای ثبات بهتری بوده و جهت تعیین تنوع و روابط ژنتیکی میان ژنوتیپ‌ها، ایجاد زمینه علمی برای تحقیقات ژنتیکی، اصلاح توتون و همچنین انتخاب والدین مناسب جهت تهیه نقشه پوستگی مناسب می‌باشد (Qi et al. 2006). در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های توتون با استفاده از نشانگر AFLP جدا کردن ارقام محلی از وارداتی با موفقیت انجام شد و ژنوتیپ‌ها در هفت گروه قرارگرفتند توسعه یک طبقه‌بندی استاندارد از ۲۰ آغازگر ISSR بر روی ۶۶ واریته توتون استفاده شد که ۵ آغازگر نوارهای قابل تکرار ایجاد

توتون گیاهی است دولپه‌ای و نهاندانه از خانواده Solanaceae که دارای سه زیرجنس Rustica و Tabacum و Petunioides با ۶۵ گونه مختلف می‌باشد (Gerstel 1963). توتون‌ها از نظر عمل آوری به چهار تیپ آتش خشک، آفتاب خشک، هوا خشک و گرمخانه‌ای (Ren and Timko 2001) و از نظر جغرافیایی به سه گروه غربی، شرقی، و نیمه شرقی تقسیم می‌شوند. توتون‌های غربی دارای برگ‌های بزرگی بوده و مهم‌ترین آن‌ها بارلی (هوا خشک) و ویرجینیا (گرمخانه‌ای) می‌باشند. توتون‌های شرقی (آفتاب خشک) نیز دارای بوته و برگ‌های کوچکتر و عطر و طعم مطبوعی هستند. توتون‌های نیمه شرقی نیز حد واسط توتون‌های شرقی و غربی می‌باشند (Khodabande 1987). این گیاه زراعی از مهم‌ترین محصولات تجاری در سطح جهان است، به طوری که طبق آخرین گزارش فانو، عملکرد توتون به طور متوسط در جهان به ۱۷۸۳۸ هکتارگرم در هکتار رسیده است، بنابراین می‌تواند نقش مهمی در اقتصاد کشاورزی کشورهای تولید کننده داشته باشد. ایران نیز به ویژه نواحی شمالی آن به علت شرایط اقلیمی خاص، از مناطق مستعد کشت توتون می‌باشد که در سال ۲۰۱۰ سطح زیر کشت آن به ۹۵۸۶ هکتار و میزان تولید برگ خشک آن به ۱۴۱۴۵ تن رسیده است (FAO 2010). یکی از یافته‌های مهم طی چند دهه گذشته در زمینه اصلاح نباتات، شناخت وجود سرمایه عظیم تنوع ژنتیکی در گیاهان بوده است (Von Braun and Virchow 1996). از آنجا که قسمت اعظم DNA ژنومی در بسیاری از گونه‌ها نواحی غیر رمزکننده هستند، با اینکا به تنوع بیوشیمیایی یا مورفو‌لوزیکی فقط قسمت محدودی از تنوع که به نواحی رمزکننده برمی‌گردد بررسی می‌شود، در حالی که تنوع در قسمت‌های بدون رمز ژنوم، خواه در نواحی بین ژنی باشد و یا در ایترون‌ها، احتمالاً کمتر تحت فشار گزینش طبیعی است، بنابراین تعداد جایگاه‌های چندشکل در این نواحی ژنوم فوق العاده زیاد خواهد بود (Kearsey 1997) که از جمله نشانگرهای مبتنی بر نواحی غیر رمزکننده، می‌توان از SSR، ISSR و IRAP (Inter Simple Sequence Repeat) نام برد. نشانگر ISSR برای انگشت‌نگاری DNA به کار برده شد (Zitkiewicz 1994 et al. 1994). در این روش از آغازگرهای SSR تغییر یافته بر

در این بررسی از ۱۲ آغازگر ISSR (جدول ۲) برگرفته از Yang et al. (2007) اجهت تکثیر DNA ژنومی استفاده شد. واکنش PCR در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل ۳۰ تا ۴۰ نانوگرم DNA الگو ۰/۱ میلی‌مولار dNTP، ۰/۳ میکرومولار آغازگر، ۱/۵ میلی‌مولار MgCl₂، بافر PCR با غلظت ۱X و یک واحد آنزیم Taq پلی‌مراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Biometra انجام شد.

چرخه حرارتی به صورت ۴ دقیقه و اسرشته‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، سپس ۳۵ چرخه به صورت ۴۰ ثانیه و اسرشته‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ ثانیه مرحله اتصال آغازگر بسته به دمای اتصال آغازگر (جدول ۲)، ۲ دقیقه مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و یک چرخه نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، سپس نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. به منظور آشکارسازی چندشکلی بین نمونه‌ها از دستگاه الکتروفورز و ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد، همچنین رنگ‌آمیزی ژل با استفاده از محلول اتیدیوم بروماید و آشکارسازی نوارها زیر نور UV انجام گرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

جهت بررسی چندشکلی بین ژنوتیپ‌ها، حضور و عدم حضور هر نوار خاص با اعداد یک و صفر مشخص شدن و برای تشکیل ماتریس داده‌های خام، سطرهای به ژنوتیپ‌ها و ستون‌ها به نوارها اختصاص یافت. برای بررسی محتوای اطلاعات چندشکل آغازگرها از پارامتر PIC (Polymorphism Information Content) استفاده شد. میانگین محتوای اطلاعات چندشکل بر اساس رابطه $PIC = \sum p_i^2$ محاسبه شد که در این رابطه p_i برابر فراوانی آلل I_a و n تعداد آلل است. شاخص نشانگری MI (Marker Index) که بیانگر میزان چندشکلی بوده و می‌تواند به عنوان شاخصی جهت برآورد کارایی یک نشانگر در یک ژرم-پلاسم ناشناخته استفاده شود، با استفاده از رابطه $MI = PIC \times n_p / n_t$ به دست آمد که در این رابطه n_t تعداد کل نوارهای چندشکل و n_p نسبت تعداد نوار چندشکل به تعداد کل نوارها می‌باشد (Powell et al. 1996). پارامترهای مربوط به ساختار ژنتیکی جمعیت شامل شاخص شانون (I)، تنوع ژنی نی (H_s)، هتروزیگوستی درون تیپ‌ها (H_s)، هتروزیگوستی بین تیپ‌ها

کرده و ارتباط ژنتیکی ارقام بومی و وارداتی را مشخص کردند که بر این اساس ارقام محلی الگوی نواری مشابه با ارقام وارداتی نشان دادند (Dadras et al. 2010). (Denduangboripant et al. 2012) از نشانگر AFLP و نرم افزار GGT به عنوان ابزارهایی جهت تمایز ژنوتیپ‌های توتون استفاده کردند و توانستند ژنوتیپ‌هایی را که همگی منشا آمریکایی داشتند از سایر ژنوتیپ‌ها متمایز کنند، آن‌ها اظهار کردند در صورتی که بتوان برای تعداد بیشتری از ژنوتیپ‌ها با منشا آمریکایی این نتیجه را اثبات کرد، این تفاوت در سطح DNA مربوط به خصوصیاتی می‌باشد که آن‌ها را از سایر ژنوتیپ‌ها متمایز می‌سازد.

از آنجا که آگاهی از تنوع ژنتیکی، ضمن حفظ ذخایر ژنتیکی گیاهی، قابلیت استفاده از آن‌ها را در برنامه‌های بهثادی تامین می‌کند و همچنین اطلاع از فاصله ژنتیکی بین افراد و جمیعت‌ها و روابط خویشاوندی بین آن‌ها، امکان تهیه جمیعت‌های مناسب برای ترسیم نقشه ژنتیکی و مکان‌یابی ژن‌ها را فراهم می‌سازد، این بررسی نیز به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی و میزان شباهت درون و بین تیپ‌های توتون و تعیین میزان چندشکلی موجود با استفاده از آغازگرها نشانگر ISSR انجام شد تا از بین آن‌ها آغازگرهای با کارایی بالا در ارزیابی تنوع ژنتیکی توتون معرفی شوند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این بررسی بذور ۴۵ ژنوتیپ توتون از مرکز تحقیقات توتون رشت تهیه شد که ۱۵ ژنوتیپ از هر یک از تیپ‌های هوا خشک (بارلی)، گرمانه‌ای (ویرجینیا) و آفتابخشک (شرقی) مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). DNA ژنومی از بافت برگ گیاهچه‌های رشدیافته در گلدان و در مرحله ۳-۴ برگی با استفاده از روش Doyle and Doyle (1990) با اندکی تغییرات استخراج شد. نمونه‌های DNA استخراج شده جهت ارزیابی دقیق کمی و کیفی با روش الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد و اسپکتروفوتومتری در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفتند.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

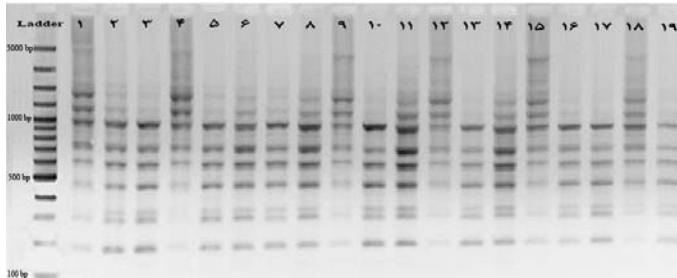
جدول ۱- اسامی ژنوتیپ‌های توتون مطالعه شده در این تحقیق

| ردیف | منشا جغرافیایی ژنوتیپ‌های هواختشک (بارلی) | ردیف | منشا جغرافیایی ژنوتیپ‌های گرمخانه‌ای (ویرجینیا) | ردیف | منشا جغرافیایی ژنوتیپ‌های آفتاب خشک (شرقی) | ردیف | منشا جغرافیایی ژنوتیپ‌های آفتاب خشک (شرقی) | |
|------|---|-------------|---|-------------------|--|------|--|-----------------|
| ۱ | Burley W.R 14 | USA | ۱۶ | Erzegovina | Erzegovin | ۳۱ | B 12-2 | Iran |
| ۲ | Burley white IV Geel | USA | ۱۷ | K. S1. E. | USA | ۳۲ | B 16-10 | Iran |
| ۳ | Burley 7022 | USA | ۱۸ | Pereg 234 | Germany | ۳۳ | BS36 | Greece |
| ۴ | Burley B5 | Germany | ۱۹ | Perega | Germany | ۳۴ | Basma 178-2 | Iran |
| ۵ | Burley pr-144 | Germany | ۲۰ | Speight G. 28 | USA | ۳۵ | Ch T 269-12 | Iran |
| ۶ | Burley Ree103 | USA | ۲۱ | N. 2 | USA | ۳۶ | D-566 | Iran |
| ۷ | Burley PMR | Switzerland | ۲۲ | Coker 298 | USA | ۳۷ | F.K.40-1 | Iran |
| ۸ | Burley semparant | Australia | ۲۳ | Bel 61-12 | USA | ۳۸ | H-169 | Iran |
| ۹ | Badisher Burley E | Germany | ۲۴ | Virgin aurea | USA | ۳۹ | Kromovgrad 42 | Bulgaria |
| ۱۰ | Basket A1 | Zimbabwe | ۲۵ | TL 13 | USA | ۴۰ | Izmir | Turkey |
| ۱۱ | BB16A | France | ۲۶ | Deliot | Belgium | ۴۱ | Imine | Australia |
| ۱۲ | Burley 1 | USA | ۲۷ | S. 392-35 | Germany | ۴۲ | Mutant 4 (no4) | Iran |
| ۱۳ | Burley 151 | USA | ۲۸ | Virginia A-mutant | Germany | ۴۳ | Sota 7644 | Switzerlan d |
| ۱۴ | Burley 7 | USA | ۲۹ | Harrison Speacial | USA | ۴۴ | Samatra | Belgium |
| ۱۵ | Burley A1 | USA | ۳۰ | RH-211 | USA | ۴۵ | B104-1 | IRAN |

جدول ۲- نام و توالی آغازگرهای مورد استفاده و اطلاعات چندشکلی آن‌ها

| نام آغازگر | توالی آغازگرها ($5' \rightarrow 3'$) | دماه اتصال | درصد چندشکلی | تعداد نوار چندشکل | شناخت نشانگر |
|------------|--|------------|--------------|-------------------|--------------|
| UBC811 | GAGAGAGAGAGAGAC | ۵۱/۳۵ | ۸۸/۸۹ | ۹ | ۸ |
| UBC812 | GAGAGAGAGAGAGAA | ۵۰/۳۳ | ۷۰ | ۲۰ | ۱۴ |
| UBC813 | CTCTCTCTCTCTCTCTTT | ۵۰/۳ | ۶۴/۲۹ | ۱۴ | ۹ |
| UBC814 | CTCTCTCTCTCTCTCTA | ۴۹/۲۴ | ۸۵/۷۱ | ۱۴ | ۱۲ |
| UBC815 | CTCTCTCTCTCTCTCTG | ۵۱/۳۳ | ۸۷/۵ | ۱۶ | ۱۴ |
| UBC816 | CACACACACACACACAT | ۵۵/۳۷ | ۷۵ | ۸ | ۶ |
| UBC817 | CACACACACACACACAA | ۵۵/۶۴ | ۸۰ | ۱۰ | ۸ |
| UBC823 | TCTCTCTCTCTCTCTCC | ۵۲/۵۲ | ۷۱/۴۳ | ۱۴ | ۱۰ |
| UBC824 | TCTCTCTCTCTCTCTCG | ۵۳/۰۸ | ۹۰ | ۱۰ | ۹ |
| UBC825 | ACACACACACACACACT | ۵۶/۵۶ | ۶۴/۷۱ | ۱۷ | ۱۱ |
| UBC826 | ACACACACACACACACC | ۵۷/۷۸ | ۷۰ | ۲۰ | ۱۴ |
| UBC873 | GACAGACAGACAGACA | ۵۱/۴۲ | ۷۲/۲۲ | ۱۸ | ۱۳ |
| میانگین | | | ۷۵/۲۹ | ۱۷۰ | ۱۲۸ |

نواربندی ISSR با استفاده از آغازگر UBC825 در شکل ۱ ارائه شده است.



شکل ۱- الگوی نواری ISSR حاصل تکثیر ژنوتیپ‌های توتون (جدول ۱) با استفاده از آغازگر UBC825

میزان اطلاعات چندشکل (PIC) هر آغازگر، برای کل ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، همچنین به طور جداگانه برای هر یک از تیپ‌های مورد مطالعه محاسبه شد و میانگین این شاخص برای کل ژنوتیپ‌های مورد مطالعه و هر یک از تیپ‌های بارلی (هوخشک)، ویرجینیا (گرمخانه‌ای) و شرقی (آفتاب خشک) به ترتیب $0/24$, $0/22$, $0/26$ و $0/23$ به دست آمد (جدول ۳). آغازگر UBC816 دارای بیشترین مقدار PIC در تیپ‌های هوخشک (بارلی) و آفتاب خشک (شرقی) و آغازگر UBC817 دارای بیشترین مقدار PIC در تیپ‌های هوخشک و گرمخانه‌ای بودند، همچنین آغازگرهای UBC812 و UBC823 دارای کمترین مقدار PIC، به ترتیب $0/16$ و $0/17$ در کل ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بودند. بنابراین آغازگرهای UBC816 و UBC817 با بیشترین مقدار PIC، بهتر از سایر آغازگرهای به کار رفته توائستند فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را مشخص کنند. در بررسی تنوع ژنتیکی میان 22 واریته و دو هیبرید توتون نیز که از آغازگر RAPD استفاده شده بود، میانگین PIC $0/27$ گزارش شد (Siva Raju et al. 2009). همچنین در ارزیابی تنوع ژنتیکی میان 312 ژنوتیپ توتون با استفاده از نشانگر SSR، میزان PIC تقریباً در همه مکان‌های ژنی بیشتر از $0/4$ بود و بالاترین میزان آن نیز $0/85$ گزارش شد (Fricano et al. 2012). میزان MI بین $1/21$ تا $3/55$ متغیر بود و آغازگرهای UBC815, UBC826, UBC873, UBC817 به ترتیب با $3/55$, $2/55$, $2/44$ و $2/11$ واحد داری

(D_{st})، هتروزیگوستی کل ($H_t = H_s + D_{st}$), ضریب تمایز ژنی بین تیپ‌ها ($G_{st} = D_{st} / H_t$) و جریان ژنی (N_m) برای هر یک از مکان‌های آلی توسط نرم‌افزار POPGEN نسخه $1/31$ (Yang 1999) محاسبه شد. همچنین شاخص ثبت (F_{st}) از طریق Lynch and Milkingan (F_{st} = $1 - H_s / H_t$) به دست آمد (Lynch and Milkingan 1994). جهت گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، تعیین تفاوت‌ها و شباهت‌های ژنوتیپ‌ها ابتدا بر اساس روش‌های مختلف انجام و در نهایت بهترین گروه‌بندی بر اساس شاخص‌های آماری انتخاب گردید که بدین منظور از نرم‌افزار NTSYS استفاده شد (Rohlf 1998)، مقایسه نتایج روش‌های مختلف تجزیه خوش‌ای با استفاده از ضرایب تشابه متفاوت بر اساس ضریب کوفتیک نشان داد که بهترین روش در محاسبه ماتریس تشابه، روش تطبیق ساده و دندروگرام حاصل از تجزیه خوش‌ای به روش WPGMA می‌باشد و سایر روش‌ها به دلیل ایجاد گروه‌های نامشخص و تمایل گروه‌های ایجاد شده به یک سمت، گروه‌بندی مناسب ارایه ندادند. همچنین بررسی روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها بر اساس تجزیه به مختصات اصلی با استفاده از نرم‌افزار GenStat نسخه 12 (VSN International 2009)، تجزیهتابع تشخیص با نرم‌افزار (Anonymous 2007) SPSS 16.0 و تجزیه واریانس مولکولی با Peakall and Smous نرم‌افزار GenAIEx 6.4 انجام گرفت (Peakall and Smous 2006).

نتایج و بحث

اطلاعات چندشکلی

تمامی 12 آغازگر ISSR به کار رفته در این آزمایش الگوی نواری مشخص داشتند که در مجموع 170 نوار نمره‌دهی شد که 128 نوار چندشکل بودند. تعداد نوارها از 8 نوار برای آغازگر UBC826 تا 20 نوار برای آغازگرهای UBC812 و UBC816 متغیر بود که بیانگر قدرت این آغازگرهای در تفکیک ژنوتیپ‌ها بود (جدول ۲). درصد چندشکلی از $64/29$ درصد برای آغازگر UBC813 با کمترین درصد چندشکلی تا 90 درصد برای آغازگر UBC824 با بیشترین درصد چندشکلی، متغیر بود و میانگین میزان چندشکلی $75/29$ درصد محاسبه شد (جدول ۲). الگوی

جدول ۳- محتوای اطلاعات چندشکل در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه و تیپ‌های توتوون

| نام آغازگر | هواخشک (بارلی) | گرمخانه‌ای (ویرجینیا) | آفتاب خشک (شرقی) | کل | PIC |
|------------|----------------|-----------------------|------------------|------|-----|
| UBC811 | ۰/۲۷ | ۰/۲۲ | ۰/۲۴ | ۰/۲۴ | |
| UBC812 | ۰/۱۵ | ۰/۱۲ | ۰/۲۲ | ۰/۱۶ | |
| UBC813 | ۰/۳ | ۰/۲۸ | ۰/۲۳ | ۰/۲۷ | |
| UBC814 | ۰/۲۶ | ۰/۱۵ | ۰/۱۸ | ۰/۲ | |
| UBC815 | ۰/۲۶ | ۰/۳۱ | ۰/۳۱ | ۰/۲۹ | |
| UBC816 | ۰/۳۴ | ۰/۳۱ | ۰/۳۴ | ۰/۳۳ | |
| UBC817 | ۰/۳۴ | ۰/۴۸ | ۰/۱۶ | ۰/۳۳ | |
| UBC823 | ۰/۱۵ | ۰/۱۹ | ۰/۱۶ | ۰/۱۷ | |
| UBC824 | ۰/۲۹ | ۰/۱۵ | ۰/۱۹ | ۰/۲۱ | |
| UBC825 | ۰/۲۲ | ۰/۲۵ | ۰/۲۴ | ۰/۲۴ | |
| UBC826 | ۰/۲۴ | ۰/۳۱ | ۰/۲۴ | ۰/۲۶ | |
| UBC873 | ۰/۱۸ | ۰/۳۴ | ۰/۲۷ | ۰/۲۶ | |
| میانگین | ۰/۲۲ | ۰/۲۶ | ۰/۲۳ | ۰/۲۴ | |

جدول ۴- شاخص‌های اندازه‌گیری شده در مورد تنوع ژنتیکی کل و درون‌تیپ‌های توتوون

| نام آغازگر | تنوع ژنی نی | شاخص شانون |
|------------|-------------|-------------|
| UBC811 | ۰/۲۴ | ۰/۳۹ |
| UBC812 | ۰/۲۴ | ۰/۳۹ |
| UBC813 | ۰/۳۷ | ۰/۵۵ |
| UBC814 | ۰/۳ | ۰/۴۷ |
| UBC815 | ۰/۳۲ | ۰/۴۹ |
| UBC816 | ۰/۳۶ | ۰/۵۳ |
| UBC817 | ۰/۳۷ | ۰/۵۴ |
| UBC823 | ۰/۳۴ | ۰/۵۲ |
| UBC824 | ۰/۲۹ | ۰/۴۵ |
| UBC825 | ۰/۲۶ | ۰/۴۱ |
| UBC826 | ۰/۳ | ۰/۴۵ |
| UBC873 | ۰/۳۶ | ۰/۵۴ |
| میانگین | ۰/۳۶ | ۰/۴۷ ± ۰/۲۹ |
| | ۰/۳۱ ± ۰/۲۱ | |

بیشترین شاخص نشانگری (MI) بودند (جدول ۲) که نشان‌دهنده کارایی بالای این آغازگرها را در برگز چندشکلی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در این تحقیق می‌باشد.

تنوع ژنتیکی درون و بین تیپ‌ها

تنوع ژنی نی (H) که از شاخص‌های مهم برای ارزیابی تنوع ژنی بین ژنوتیپ‌ها و جمعیت‌ها می‌باشد (Nei 1972)، برای کل ژنوتیپ‌های مورد مطالعه ۰/۳۱ و شاخص شانون آن‌ها ۰/۴۷ محاسبه شد. آغازگرهای UBC813، UBC817، UBC823 و UBC816 دارای بیشترین مقدار شاخص شانون و تنوع ژنی نی بودند. بالا بودن مقدار این شاخص و تنوع ژنی نی در آغازگرهای فوق، نشان‌دهنده این است که نسبت به سایر آغازگرهای به کار رفته، می‌توانند تنوع ژنتیکی درون جمعیتی را بهتر توجیه کنند لذا می‌توان از آن‌ها به عنوان آغازگرهایی کارا جهت بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های توتوون در مطالعات بعدی استفاده کرد (جدول ۴).

در بررسی تنوع ژنتیکی ۱۱۸ ژنوتیپ از تیپ‌های مختلف توتون شامل گرمخانه‌ای، آفتاب‌خشک، بارلی، شرقی و تیپ وحشی از نشانگرهای ISSR و IRAP استفاده کردند که مقدار F_{st} را ۰/۳۱ و تنوع کمی بین تیپ‌های مورد مطالعه گزارش کردند.

جدول ۵- شاخص‌های اندازه‌گیری شده در مورد تنوع بین تیپ‌های توتون

| مقدار محاسبه شده (St.d) | شاخص |
|-------------------------|------------|
| ۰/۳۰۹۸ ± ۰/۰۲ | H_t^* |
| ۰/۲۱۱۱ ± ۰/۰۱۷ | H_s^* |
| ۰/۲۲ | h_1 |
| ۰/۱۷ | h_2 |
| ۰/۲۴ | h_3 |
| ۰/۳۱۸۴ | G_{st}^* |
| ۰/۳۲۷۳ | F_{st}^* |
| ۱/۰۷۰۲ | N_m^* |

(H_t) هتروزیگوستی کل؛ (H_s) هتروزیگوستی درون تیپ‌ها؛ (h₁) هتروزیگوستی درون تیپ هوا خشک (بارلی)؛ (h₂) هتروزیگوستی درون تیپ گرمخانه‌ای (ویرجینیا)؛ (h₃) هتروزیگوستی درون تیپ آفتاب‌خشک (شرقی)؛ (G_{st}) ضریب تمایز ژنی؛ (F_{st}) شاخص ثبت؛ (N_m) جریان ژنی.

تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA)

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی (جدول ۶) نشان داد که تنوع ژنتیکی بین و درون تیپ‌های توتون مورد مطالعه در این تحقیق در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود و از تنوع ژنتیکی کل (صد درصد)، ۳۲/۷۳ درصد آن مربوط به تنوع ژنتیکی بین تیپ‌ها و ۶۷/۲۷ درصد آن مربوط به تنوع درون تیپ‌ها بود. بنابراین واریانس درون تیپ‌ها سهم عمدتی از واریانس کل را شامل شد، با این حال میزان واریانس بین تیپ‌ها نیز قابل توجه بود. نتایج حاصل از تجزیه واریانس مولکولی با میانگین ضریب تمایز ژنی یا G_{st} (۰/۳۲) مطابقت نشان داد.

جدول ۶- تجزیه واریانس مولکولی برای تیپ‌های مختلف توتون مورد مطالعه

| احتمال | مجموع مربعات درصد واریانس | درجه آزادی | منبع تغییرات |
|--------|---------------------------|------------|--------------|
| ۰/۰۰۱ | ۱۷۹/۱۷۸ | ۲ | بین تیپ‌ها |
| ۰/۰۰۱ | ۴۷۲/۴۴ | ۴۲ | درون تیپ‌ها |
| ۱۰۰ | ۶۵۱/۴۲۲ | ۴۴ | کل |

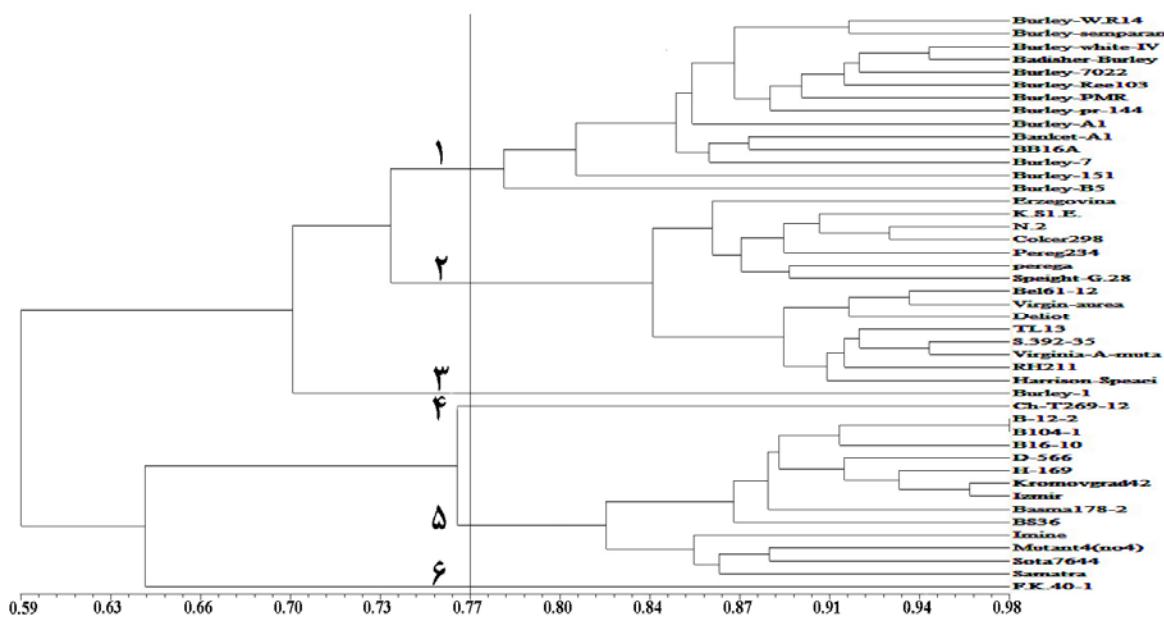
جهت بررسی روابط بین تیپ‌های هوا خشک (بارلی)، گرمخانه‌ای (ویرجینیا) و آفتاب‌خشک (شرقی)، شاخص‌های مربوط به ساختار ژنتیکی بین تیپ‌ها محاسبه شدند (جدول ۵). میزان هتروزیگوستی کل (H_t) و هتروزیگوستی درون تیپ‌های مورد مطالعه (H_s) به ترتیب ۰/۳۱ و ۰/۰۲ به دست آمدند، بر این اساس میزان هتروزیگوستی بین تیپ‌ها (D_{st}) ۱/۰، برآورد شد که نشان-دهنده بالا بودن میزان تنوع درون تیپ‌ها نسبت به تنوع بین تیپ‌ها بود. همچنین با توجه به مقادیر هتروزیگوستی درون تیپ‌های مورد مطالعه، تیپ آفتاب‌خشک (شرقی) نسبت به سایر تیپ‌ها دارای ساختار ژنتیکی متفاوت‌تری می‌باشد (جدول ۵).

تمایز ژنتیکی ممکن است به دلیل اختلاف در صفات ژنتیکی که بر اثر تغییر شرایط محیطی و انتخاب طبیعی ایجاد شده است، باشد. همچنین به دلیل فرآیندهای تصادفی مثل جهش، مهاجرت و میزان یا درجه تمایز جمعیت‌ها باشد که می‌توان آن را از طریق پارامترهای متفاوت تخمین زد (Bossdorf et al. 2007). در این مطالعه میانگین ضریب تمایز ژنی (G_{st})، شاخص ثبت (F_{st}) و جریان ژنی (N_m) به ترتیب ۰/۳۲، ۰/۳۲ و ۱/۰۷ به دست آمد. از آنجا که میزان جریان ژنی کمتر از یک به عنوان آستانه تمایز در نظر گرفته می‌شود و میزان برآورد کمتر از آن، نشان‌دهنده میزان کم تبادل ژنی خواهد بود (Slatkin 1987)، مقدار جریان ژنی در این بررسی (۱/۰۷) بیانگر بالا بودن تبادل ژنی بین تیپ‌های مورد مطالعه می‌باشد. به طور کلی زمانی که افراد از نظر فراوانی آللی کاملاً مشابه باشند، مقدار F_{st} برابر با صفر و زمانی که افراد از نظر آللی، متفاوت باشند این مقدار با یک برابر می‌شود. این شاخص برای مطالعه تفاوت بین جمعیت‌ها نیز به کار می‌رود، در هر صورت اگر میزان F_{st} بیشتر از ۰/۱۵ به دست آید، نشان می‌دهد که جمعیت‌های مورد مطالعه از هم تمایز هستند و از نظر ساختاری شباهتی با هم ندارند (Weir 1996). در این مطالعه شاخص‌های G_{st} و F_{st} نشان دادند که بیش از ۶۰ درصد از تنوع کل، حاصل تنوع در درون تیپ‌ها بود و تنوع اندکی بین تیپ‌ها وجود داشت. این موضوع نشان می‌دهد که اکثر تنوع مشاهده شده ناشی از تنوع میان افراد درون تیپ‌ها بوده و بررسی آن به صورت کلی در جمعیت، باعث مشاهده تنوع اندکی در بین تیپ‌ها شد که با نتایج Yang et al. (2007) هم خوانی داشت. آن‌ها نیز

متفاوت می‌باشد. در این بررسی فاصله ژنتیکی بین تیپ‌های توتون مورد مطالعه بین ۰/۱۵ تا ۰/۲۵ به دست آمد که تیپ‌های بارلی (هوا خشک) و شرقی (آفتاب خشک) با میزان فاصله ۰/۲۵ حداقل تفاوت را در بین تیپ‌های مورد مطالعه از آن خود کردند و دلیل آن را می‌توان متفاوت بودن ژنوتیپ‌های بین دو تیپ مذکور بیان ذکر کرد. همان‌طور که انتظار می‌رفت حداقل تشابه نیز بین ژنوتیپ‌های بارلی و ویرجینیا با منشا غربی مشاهده شد (جدول ۹). در بررسی Yang et al. (2007) نیز نتایج مشابهی به دست آمد. آن‌ها مقدار فاصله ژنتیکی بین تیپ‌های مختلف توتون را کمتر از ۰/۳ گذاشتند.

تجزیه به مختصات اصلی و گروه‌بندی جهت گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها، از روش‌های مختلف استفاده شد و در نهایت تجزیه خوش‌های به روش WPGMA بر اساس ماتریس تطابق ساده انتخاب شد. ضریب کوفتیک بر اساس ضریب تشابه تطابق ساده، 76% بود که نشان‌دهنده برازش متوسط بین دندروگرام و ماتریس تشابه و نیز کارایی نسبی این روش برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بود. گروه‌بندی بر این اساس با ترسیم خط برش در فاصله $0/77$ ، 45 ژنوتیپ مورد مطالعه را در 6 گروه قرار داد (شکل ۲). گروه 1 و 3 به ترتیب شامل 13 و یک فرد از تیپ هوا خشک (بارلی)، گروه دو شامل 15 ژنوتیپ گرمخانه‌ای (وبیرجینیا) و گروه‌های 4 ، 5 و 6 به ترتیب شامل یک، 13 و یک فرد از تیپ آفتتاب خشک (شرقبی) شدند.

صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوش‌های توسط تابع تشخیص کانونی به روش خطی فیشر $\frac{73}{3}$ درصد برآورد شد (جدول ۷). به طوری که توابع تشخیص اول تا پنجم به ترتیب $\frac{79}{2}$ درصد، $\frac{13}{5}$ درصد، $\frac{5}{1}$ درصد، دو درصد و $\frac{3}{0}$ درصد از واریانس موجود و در مجموع صد درصد تنوع داده‌های حاصل از نشانگر ISSR را توصیف کردند (جدول ۸)، بنابراین تقسیم ژنوتیپ‌ها در ۶ گروه به سیله تجزیه خوش‌های، توسط تابع تشخیص تایید شد. در پژوهشی که از نشانگرهای ISSR و IRAP جهت بررسی تنوع ژنتیکی توتون استفاده شد نیز روش UPGMA ژنوتیپ‌ها را به ۷ گروه تقسیم کرد، گروه اول شامل سه زیرگروه بارلی، شرقی و ژنوتیپ‌های وحشی شد، بیشتر ژنوتیپ‌های آفتاب‌خشک در گروه دو و سه توزیع شدند و ژنوتیپ‌های گرمخانه‌ای در گروه‌های ۴، ۵ و ۶ قرار گرفتند (Yang et al. 2007). Hatami et al. (2013) در بررسی تنوع ژنتیکی صد ژنوتیپ توتون شرقی با آغازگر SSR و استفاده از ضریب تشابه جاکارد و تجزیه خوش‌های به روش UPGMA ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را در سه گروه قرار دادند که به ترتیب شامل $\frac{1}{4}$ درصد، $\frac{88}{6}$ درصد و $\frac{10}{1}$ درصد از ژنوتیپ‌ها شدند. همچنین تجزیه خوش‌های ۲۳ ژنوتیپ توتون با استفاده از نشانگرهای ISSR و SSR، ژنوتیپ‌ها را به دو گروه و دو نوع منحصر به فرد (Cocker147، Val16 یا G140) تقسیم کرد (Nie and Liu 2011) که تفاوت موجود در گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در تحقیقات مختلف، به دلیل استفاده از آغازگرها و ژنوتیپ‌های



شکل ۲- دندروگرام ترسیم شده با روش WPGMA و ماتریس تشابه تطبیق ساده برای تیپ‌های مختلف توتون مورد مطالعه

جدول ۷- نسبت موفقیت افراد درون گروه‌ها با تابع تشخیص با استفاده از داده‌های حاصل از نشانگر ISSR

| گروه‌ها و میزان صحت گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در هر گروه با تجزیه تابع تشخیص بر اساس داده‌های نشانگر ISSR | | تعداد ژنوتیپ | گروه |
|---|--------|--------------|------|
| ۱ | ۶ | | |
| ۱۴ | %۲۱/۴۳ | ۱۰ | ۱ |
| ۱۵ | %۱۳/۳۳ | ۱۳ | ۲ |
| ۱ | %۱۰۰ | ۱ | ۳ |
| ۱ | %۱۰۰ | ۱ | ۴ |
| ۱۳ | %۷۶/۹۲ | ۱۰ | ۵ |
| ۱ | %۷۳/۳ | ۱ | ۶ |

جدول ۸- توابع تشخیص کانونی حاصل از تجزیه تشخیص خطی فیشر بر اساس گروه‌بندی اولیه حاصل از تجزیه خوشای

| همبستگی کانونی | تابع تشخیص کانونی | مقادیر ویژه | واریانس (%) | واریانس تجمعی (%) | |
|----------------|-------------------|-------------|-------------|-------------------|-------|
| ۰/۹۹۹ | ۷۹/۲ | ۷۹/۲ | ۵۶۲/۳۹ | ۵۶۲/۳۹ | اول |
| ۰/۹۹۵ | ۹۲/۷ | ۱۳/۵ | ۹۵/۹۹ | ۹۵/۹۹ | دوم |
| ۰/۹۸۶ | ۹۷/۶ | ۵ | ۳۵/۴۱ | ۳۵/۴۱ | سوم |
| ۰/۹۶۷ | ۹۹/۷ | ۲ | ۱۴/۳۴۶ | ۱۴/۳۴۶ | چهارم |
| ۰/۸۴ | ۱۰۰ | ۰/۳ | ۲/۳۸۹ | ۲/۳۸۹ | پنجم |

و ۱۲-B، Badisher Burley E، Kromovgrad ۴۲، Izmir و S. ۳۹۲-۳۵، Virginia A-mutant، Burley white IV Gee و Burley white IV Geel که دارای بیشترین ضریب تشابه تطابق ساده بودند نیز، با هم در یک گروه قرار گرفتند.

جدول ۱۰- درصد واریانس و درصد تجمعی برای ۱۰ مولفه اول

| مولفه اصلی | درصد تجمعی | درصد واریانس | درصد واریانس | مولفه اصلی |
|------------|------------|--------------|--------------|------------|
| ۱ | ۲/۴۱ | ۲۳/۶۶ | ۲۳/۶۶ | ۲۳/۶۶ |
| ۲ | ۱/۳۹ | ۱۳/۶۶ | ۱۳/۶۶ | ۳۷/۳۲ |
| ۳ | ۰/۶۴ | ۶/۳۳ | ۶/۳۳ | ۴۳/۶۵ |
| ۴ | ۰/۶ | ۵/۸۹ | ۵/۸۹ | ۴۹/۵۴ |
| ۵ | ۰/۴۷ | ۴/۶۴ | ۴/۶۴ | ۵۴/۱۸ |
| ۶ | ۰/۳۶ | ۳/۵۶ | ۳/۵۶ | ۵۷/۷۴ |
| ۷ | ۰/۳۲ | ۳/۱۹ | ۳/۱۹ | ۶۰/۹۳ |
| ۸ | ۰/۳ | ۲/۹۹ | ۲/۹۹ | ۶۳/۹۲ |
| ۹ | ۰/۳ | ۲/۹۷ | ۲/۹۷ | ۶۶/۹۱ |
| ۱۰ | ۰/۲۷ | ۲/۷ | ۲/۷ | ۶۹/۶۱ |

با توجه به مقدار شاخص ضریب تمایز ژنی (G_{st}) در این تحقیق، هر چند تیپ‌های توتون مورد مطالعه از نظر ساختاری از یکدیگر قابل تمایزاند ولی توجیه بیش از ۶۰ درصد تنوع کل بر اساس تنوع درون تیپ‌ها، ناشی از تفاوت زیاد بین گیاهان و ژنوتیپ‌های درون تیپ‌ها می‌باشد. با دقت و توجه کافی به گروه‌بندی‌های ایجاد شده برای ژنوتیپ‌های موجود، به سهولت می‌توان ژنوتیپ‌های مناسب را جهت برنامه‌های بهترادی انتخاب کرد.

بالا بودن معیارهای تنوع ژنی نی، شاخص شانون و میزان PIC برای آغازگرهای UBC813، UBC816، UBC817 و UBC873 نشان‌دهنده کارایی بالای این آغازگرهای در تمایز ژنوتیپ‌های توتون در این پژوهش بود. تیپ‌های مورد بررسی بر اساس نشانگر ISSR در گروه‌های مجزا قرار گرفتند، که در برنامه‌های تلاقی و تولید واریته‌های ستیک می‌توان در انتخاب والدین از این گروه‌بندی‌ها استفاده نمود. این نشانگر ضمن تمایز موثر تیپ‌های مورد بررسی، تنوع ژنتیکی بین و درون آنها را نیز آشکار

جدول ۹- مقادیر فاصله ژنتیکی و تشابه ژنتیکی نی. فاصله ژنتیکی (پایین قطر جدول) و تشابه ژنتیکی (بالای قطر جدول)

| آفتاب خشک (بارلی) (شرقی) ۰/۷۵ | گرمخانه‌ای (ویرجینیا) ۰/۸۵ | هوای خشک (بارلی) - | هوای خشک (بارلی) ۰/۸۵ |
|-------------------------------------|----------------------------------|-----------------------|--------------------------|
| - | - | ۰/۱۵ | ۰/۱۵ |
| - | ۰/۲ | ۰/۲۵ | ۰/۲۵ |

در پژوهشی میزان تشابه ژنتیکی بین ۲۳ ژنوتیپ توتون با ۸ آغازگر ISSR و ۸ آغازگر SSR به ترتیب بین ۰/۱ تا ۰/۸۲ و ۰/۳۳ تا ۰/۸۶ گزارش شد (Nie and Liu 2011). در بررسی تنوع ژنتیکی روی ۷۰۲ ژنوتیپ توتون با ۷۰ آغازگر SSR، فاصله ژنتیکی از ۰ تا ۰/۸۹ به دست آمد (Moon et al. 2009). همچنین فاصله ژنتیکی بین ۱۳ ژنوتیپ زراعی توتون با استفاده از ۲۰ آغازگر SSR بین ۰/۰۹ تا ۰/۴۳ متغیر بود (Ye et al. 2009) که با توجه به نوع ژنوتیپ‌های مورد مطالعه و منشا آنها در بررسی-های مذکور، تفاوت مشاهده شده در محدوده فاصله‌های ژنتیکی طبیعی می‌باشد. به منظور تعیین روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها و نیز مشاهده فواصل بین تیپ‌ها، تجزیه به مختصات اصلی نیز به عنوان روش مکمل تجزیه خوش‌های، انجام گرفت (جدول ۱۰). نتایج نشان داد که ده مولفه اصلی اول مجموعاً ۶۹/۶۱ درصد از تغییرات داده‌ها را توجیه کردند. مولفه اول ۲۳/۶۶ درصد از تنوع کل را تبیین کرد و این مقدار برای مولفه دوم ۱۳/۶۶ درصد بود. نمایش دو بعدی ارقام بر اساس دو مولفه اصلی اول گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوش‌های را تایید کرد و طبق نتایج به دست آمده، ژنوتیپ‌های F.K.40-1 و BB16A، F.K.40-1 و Burley، F.K.40-1 و 151، F.K.40-1 و Banket A1، F.K.40-1 و 7022، F.K.40-1 و Erzegovina که بر اساس ضریب تشابه تطابق ساده کمترین شباهت ژنتیکی را داشتند، در گروه‌بندی خوش‌های و نمودار حاصل از تجزیه به مختصات اصلی نیز در گروه‌های جداگانه قرار گرفتند، همچنین تیپ‌های هوای خشک (بارلی)، گرمخانه‌ای (ویرجینیا) و آفتاب خشک (شرقی) مطابق با روش تجزیه خوش‌های، از هم تفکیک شدند. ژنوتیپ‌هایی مانند B104-1

جهت توسعه و بهره‌گیری از آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی آینده باشد.

منابع

- Anonymous (2007) The SPSS system for Windows version 16.0. SPSS Inc, an IBM Company.
- Blair MW, Panaud O, McCouch SR (1999) Intersimple sequence repeats (ISSR) amplification for analysis of micro-satellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 98: 780-92.
- Bossdorf O, Auge H, Lafuma L, Rogers WE, Siemann E, Prati D (2005) Phenotypic and genetic differentiation between native and introduced plant populations. *Oecologia* 144: 1-11.
- Dadrás AR, Mohammadi Nejad G, Sabouri H, Sabouri A, Shoaei Deilami M (2012) Evaluation of different tobacco genotypes based on AFLP markers using GGT: Graphical Genotypes software In: Proceedings of 12th Iranian Genetics Congress. Iran, Sh. Beheshti university, 22-24 May. (In Farsi).
- Darvishzadeh R, Mirzaei L, Hatami Maleki H, Laurentin H, Alavi SR (2013) Genetic variation in oriental tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) by agromorphological traits and simple sequence repeat markers. *Revista Ciência Agronômica* 44: 347-355.
- Del Piano L, Abet M, Sorrentino C, Acanfora F, Cozzolino E, Di Muro A (2000) Genetic variability in *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana* species as revealed by RAPD procedure. *Beiträge zur tabakforschung. International Contribution to Tobacco Research* 19: 1-15.
- Denduangboripant J, Setaphan S, Suwanprasart W, Panha S (2010) Determination of local tobacco cultivars using ISSR molecular marker. *Chiang Mai Journal Science* 37: 293-303.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 12: 13-15.
- FAO (2010) FAOSTAT. Projections of tobacco production, consumption and trade to the year online. Available at <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>.
- Fricano A, Bakaher N, Del Corvo M, Piffanelli P, Donini P, Stella A, Ivanov NV, Pozzi C (2012) Molecular diversity, population structure, and linkage disequilibrium in a worldwide collection of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) germplasm. *BMC Genetics* 13:18. doi:10.1186/1471-2156-13-18.
- Gerstel DU (1963) Segregation in new allopolyploids of *Nicotiana*. II. Discordant ratios from individual loci in 6 × (*N. tabacum* × *N. sylvestris*). *Genetics* 48: 677-689.
- Hou YC, Yan ZH, Wei YM, Zheng YL (2005) Genetic diversity of barley from west China based on RAPD and ISSR analysis. *Barley Genetics Newsletter* 35: 9-22.
- Kantety RV, Zeng XP, Bennetzen JL, Zehr BE (1995) Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Molecular Breeding* 1: 365-373.
- Kearsey MJ (1997) Genetic resources and plant breeding. In: Callow JA, Ford-Lloyd BV, Newbury HJ (Eds.), *Biotechnology and Plant Genetic Resources*. CAB International, Wallingford, UK, pp. 1-19
- Khodabandeh N (1987) *Agriculture of industrial plants*. Sepehr Publication Center, Iran. (In Farsi).
- Lynch M, Milligan BG (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91-99.
- Moon HS, Nifong JM, Nicholson JS, Heineman A, Lion K, Van Der Hoeven R, Hayes AJ, Lewis RS (2009) Microsatellite-based analysis of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) genetic resources. *Crop Science* 49: 1-11.
- Nagaoka T, Ogihara Y (1997) Applicability of intersimple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 94:597-602.
- Nei M (1972) Genetic distance between populations. *American Naturalis* 106: 283-292.
- Nie Q, Liu RX (2011) Genetic diversity of 23 tobacco germplasm resources by SSR and ISSR analysis. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences* 24: 15-19.
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6.4: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295
- Piteekan T, Denduangboripant J, Suwanprasart W (2009) In: The 4th Conference on Science and Technology for Youth. 26- 37.
- Powell W, Morgante M, Andre C, Vogel J, Tingey S, Rafalski A (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2: 225-238.
- Qi JM, Liang JX, Chen MX, Xu JT, Niu XP, Zhou DX, Wang T, Chen SH (2006) Genetic diversity and genetic relatives analysis of tobacco germplasm based on intersimple sequence repeat (ISSR). *Acta Agronomica Sinica* 32: 373-378.
- Ren N, Timko MP (2001) AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild *Nicotiana* species. *Genome* 44: 559-571.
- Rohlf FJ (1998) NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.0. Setauket, New York.
- Siva Raju K, Sheshumadhav M, Chandrasekharao C, T. Murthy TGK (2009) Molecular diversity in genus *Nicotiana* as revealed by randomly amplified polymorphic DNA. *Indian Journal of Biotechnology* 8: 61-66.
- Slatkin M (1987) Gene flow and geographic structure of natural populations. *Science (Washington, DC)* 236:787-792.

- Soufmanien J, Gopalakrishna T (2004) A comparative analysis of genetic diversity in blackgram genotypes using RAPD and ISSR markers. *Theoretical and Applied Genetics* 109: 1687-1693.
- Von Braun J, Virchow D (1996) Economic evaluation of biotechnology and plant diversity in developing countries. *Plant Research and Development* 43: 50-61.
- VSN International (2009) GenStat for Windows 12th edition. VSN International, Hemel Hempstead, UK.
- Weir BS (1996) Intraspecific differentiation In: Hillis DM, Moritz C, Mable BK (Eds.), *Molecular systematic*, 2nd ed. Sunderland: Sinauer Associates pp: 385-403.
- Xiao BG, Yang BC (2007) Assessment of genetic diversity among tobacco germplasms by ISSR markers. *Scientia Agricultura Sinica* 40: 2153-2161.
- Yang BC, Xiao BG, Chenl XJ, Shi CH (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.
- Ye L, Xin M, Du J, Xie C, Li Y, Zhou Q (2009) Genetic diversity revealed by SSR markers of the tobacco cultivars. *Chinese Agricultural Science Bulletin* 25: 56-62
- Yeh FC, Yang R (1999) popgene version 1.31. microsoft window-based freeware for population genetic analysis, University of Alberta And Centre for International Forestry Research.
- Zitkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.