

ارزیابی تنوع ژنتیکی برخی ژرم پلاسم‌های توتون شرقی و نیمه شرقی ایران با استفاده از نشانگر های ریز ماهواره

Evaluation of genetic variation in some Iranian oriental and semi oriental tobacco germplasms by using simple sequence repeat markers

الهام وقاری آذر^۱، حمید حاتمی ملکی^۲، اشکان بصیرنیا^۱، داریوش احمدی^۳، رضا درویشزاده^{۱*}

۱- به ترتیب دانشآموختگان کارشناسی ارشد و دانشیار، دانشگاه ارومیه

۲- استادیار، دانشگاه مراغه

۳- دانشآموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه پیام نور کرج

Vaghari Azar E¹, Hatami Maleki H², Basirnia A¹, Ahmadi D³, Darvishzadeh R^{*1}

1. Graduated Students, Associate Professor, Urmia University, Urmia, Iran.

2. Assistant Professor, University of Maragheh, Maragheh, Iran

3. Graduated Student, Payame Noor University, Karaj, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: r.darvishzadeh@mail.urmia.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۲/۴/۲۲ - تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۱/۱۴)

چکیده

بررسی تنوع ژنتیکی توتون از اهداف اصلی در برنامه‌های اصلاحی توتون می‌باشد. در این تحقیق، تنوع ژنتیکی موجود در ژرم پلاسم‌های توتون شرقی و نیمه شرقی شامل ۹۰ ژنوتیپ، تهیه شده از مرکز تحقیقات توتون ارومیه با استفاده از نشانگر ریز ماهواره بررسی شد. از مجموع ۲۷۸ جفت آغازگر ریز ماهواره ۲۶ جفت آغازگر رتوانستند چند شکلی موجود در سطح DNA ژنوتیپ‌ها را بخوبی مشخص نمایند. با ۲۶ جفت آغازگر ریز ماهواره انتخاب شده در مجموع ۶۷ آل شناسایی شد. میانگین تعداد آلل‌ها برای هر مکان ریز ماهواره‌ای ۲/۴۸۱، میانگین تعداد آلل‌های موثر ۲/۱۵۹ و هetroزیگوستی مورد انتظار در دامنه‌ای از ۰/۳۲۶ تا ۰/۶۶۲ با ۰/۵۱۲ می‌باشد. بر اساس ضریب تشابه جاکارد، تشابه ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های توتون از ۰/۰۴ الی ۰/۷۸ نوسان داشت که دلیلی بر وجود تنوع ژنتیکی در ژرم پلاسم مذکور بود. گروه‌بندی ژرم پلاسم توتون با استفاده از الگوریتم تجربی خوش‌های UPGMA، آنها را در چهار گروه مجزا قرار داد. نتایج تجزیه خوش‌های نشان داد که گروه‌بندی حاصله با پراکنش جغرافیایی آنها مطابقت ندارد.

واژه‌های کلیدی

تجربیه خوش‌های

تنوع ژنتیکی

توتون

ضریب تشابه جاکارد

SSR نشانگر

Raju (2011) تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف توتون جویدنی با استفاده از نشانگرهای RAPD و SSR مشخص شد که نشانگر SSR در مقایسه با نشانگر RAPD، با کارایی بیشتری می‌تواند ارقام مختلف را از همدیگر متمایز کند. همچنین، Gholizadeh et al. (2012) با استفاده از ۳۰ نشانگر ریزماهواره، خصوصیات مولکولی و تشابهات بین ۷۲ ژنوتیپ توتون گرمانه‌ای را بررسی کرده و آنها را در سه گروه مجزا گروه‌بندی کردند. در مطالعه‌ای که توسط Darvishzadeh et al. (2013a) انجام گرفت، تنوع ژنتیکی موجود در بخشی از ژرم پلاسم توتون موجود در مرکز تحقیقات توتون بطور همزمان با استفاده از صفات مورفولوژیک و نیز ۱۳ نشانگر ریزماهواره بررسی شد و نتایج نشان داد که گروه‌بندی ژنوتیپ‌های توتون با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیک و نشانگرهای ریزماهواره از همدیگر متفاوت می‌باشدند. در این مطالعه تعداد الل موثر بین ۱/۵-۲/۹۶ و هتروزیگوتی مشاهده شده بین ۰/۸-۱ و هتروزیگوتی موجود انتظار بین ۰/۶۶-۰/۳۳-۰/۹۶ متغیر بود. در مطالعه دیگری (Darvishzadeh et al. 2013b) در بررسی تنوع ژنتیکی موجود در ۱۳ ژنوتیپ تباکوی بومی ایران با استفاده از ۳۰ نشانگر ریزماهواره، گزارش کردند که در اکثر مکان‌های ژئی ریزماهواره هتروزیگوتی وجود ندارد و میانگین هتروزیگوتی مشاهده شده ۰/۲۲ می‌باشد. در این بررسی، هتروزیگوتی موجود انتظار بین ۰/۷۸-۰/۲۱ و میانگین آن ۰/۵۳ بدست آمد. میانگین تعداد الل و تعداد الل موثر به ترتیب ۳/۳ و ۲/۴ بود (Darvishzadeh et al. 2013b). تحقیقات کمی در مورد بررسی تنوع ژنتیکی ژرم پلاسم توتون شرقی و نیمه شرقی موجود در کشور ایران انجام گرفته است حال آنکه ارزیابی تنوع ژنتیکی این گیاه بسیار مهم بوده و راه‌گشای بسیاری از مسائل به زراعی و به نژادی در مورد این گیاه زراعی و صنعتی خواهد بود. این مطالعه در تکمیل مطالعات قبلی با هدف ارزیابی تنوع ژنتیکی ژرم پلاسم توتون شرقی و نیمه شرقی موجود در مرکز تحقیقات توتون ارومیه با استفاده از ۲۶ نشانگر SSR انجام شد. در این تحقیق، بذور ۹۰ ژنوتیپ مختلف توتون شرقی و نیمه شرقی (*Nicotiana tabacum* L.) از بانک بذر مرکز تحقیقات توتون ارومیه دریافت شد. اطلاعات تکمیلی در مورد ژنوتیپ‌های مورد مطالعه توسط Hatami Maleki et al. (2012) ارائه شده است. بذور

توتون گیاهی است چندساله متعلق به خانواده بادنجانیان (Solanaceae) که جنس آن در سال ۱۷۵۳ میلادی توسط لینه Nicotiana نامگذاری شد. جنس *Nicotiana* شامل ۶۴ گونه می‌باشد که *Nicotaina tabacum* یکی از رایج‌ترین گونه‌های زیرکشت در بین آن‌ها می‌باشد (Raju et al. 2008). انواع مختلفی از توتون بر اساس معیارهایی از قبیل ناحیه تولیدی، نوع مصرف، روش عمل‌آوری (گرمانه‌ای، آفتاب خشک و هوایشک)، ویژگی‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی تعریف شده است (Ren and Timko 2001). یکی از متداول‌ترین و مرسوم‌ترین طبقه‌بندی‌ها، بر اساس تیپ رشدی می‌باشد که به سه تیپ غربی، شرقی و نیمه‌شرقی تقسیم‌بندی می‌شوند. تخمین میزان تنوع ژنتیکی به عنوان یکی از گام‌های پایه‌ای و اساسی در نگهداری و حفاظت مواد ژنتیکی در بانک‌های ژئی و اجرای برنامه‌های به نژادی است. به منظور تخمین تنوع ژنتیکی انواع مختلفی از سیستم‌های نشانگری توسط اصلاح‌گران گیاهی استفاده می‌شوند که از جمله آن‌ها می‌توان به نشانگرهای مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی اشاره کرد. نشانگرهای مولکولی نسبت به روش‌های فنوتیپی بهتر هستند. این نشانگرها اغلب پایدار بوده و در همه بافت‌ها صرف نظر از مرحله رشد، تمايز، توسعه یا حالات دفاعی سلول قابل تشخیص هستند. به علاوه آن‌ها تحت تاثیر پلیوتروپی، محیط و تاثیرات اپیستازی قرار نمی‌گیرند (Mondini et al. 2009). از بین نشانگرهای مبتنی بر DNA، نشانگرهای ریزماهواره^۱ به دلیل توارث همبارز و ماهیت چند آللی کارایی بالایی در ارزیابی تنوع ژنتیکی، روابط شجره‌ای و تهیه نقشه‌های ژنتیکی دارند (Thomas and Scott 1993). در مورد استفاده از نشانگرهای مورفولوژیک در ارزیابی تنوع ژنتیکی در جنس *Nicotiana* گزارشات کمی وجود دارد حال آنکه مطالعات فراوانی جهت بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره وجود دارد. در مطالعه‌ای (Hatami Maleki et al. 2012) تنوع ژنتیکی موجود در ژرم پلاسم توتون شرقی موجود در ایران را با استفاده از صفات مورفولوژیک مورد ارزیابی قرار دادند. آنها بر اساس اندازه‌گیری ۸ صفت مورفولوژیک، ژنوتیپ‌های توتون مورد مطالعه را در چهار گروه مجزا قرار دادند. در مطالعه Siva

^۱ Simple sequence repeat: SSR

می باشد. به منظور ارزیابی کارآیی هر یک از این نشانگرها در بررسی تنوع ژنتیکی، معیارهای مختلفی از قبیل تعداد آلل در هر مکان، تعداد آلل‌های موثر، میزان هتروزیگوستی مشاهده شده و مورد انتظار و فراوانی آلل‌ها در هر مکان محاسبه شد (جدول ۱). با استفاده از ۲۶ جفت آغازگر در مجموع ۶۷ آلل شناسایی شد. تعداد آلل در هر جایگاه بین دو تا ۳ و میانگین تعداد آلل در هر جایگاه ۲/۴۸۱ بدست آمد (جدول ۱). این اطلاعات با یافته‌های Davalieva et al. (2010) Darvishzadeh et al. (2013a) با تعداد دو تا ۳ آلل در مکان‌های مورد مطالعه با نشانگر SSR مطابقت دارد. از آنجا که میانگین تعداد آلل در هر نشانگر ریزماهواره مناسب بودن آن مکان ژئی برای تخمین تنوع ژنتیکی را نشان می‌دهد، بنابراین آغازگرهایی که تعداد آلل زیادی نشان داده‌اند برای بررسی تنوع ژنتیکی مناسب تشخیص داده می‌شوند (Darvishzadeh et al. 2013a).

میانگین تعداد آلل‌های موثر ۲/۱۵۹ بود که بیشترین میزان آن مربوط به نشانگر PT30014 (۲/۹۵۶) و کمترین میزان آن متعلق به نشانگر PT30094 (۱/۴۸۴) می‌باشد (جدول ۱). پارامتر تعداد آلل موثر از محاسبه تعداد آلل‌ها و فراوانی آن‌ها بدست می‌آید و به وسیله آن می‌توان ژنوتیپ‌هایی با تعداد و توزیع آللی کاملاً متفاوت را با یکدیگر مقایسه کرد. میانگین هتروزیگوستی مشاهده شده برای مجموعه نشانگرها ۰/۱۴۶ بود. نشانگر PT30205 با ۰/۶۵۸ دارای بالاترین میزان هتروزیگوستی مشاهده شده بود و ۱۶ نشانگر هیچ هتروزیگوتی مشاهده شده‌ای را نشان ندادند (جدول ۱). پایین بودن هتروزیگوتی مشاهده شده از مقادیر مورد انتظار در اکثر جایگاه‌های ژئی به جز جایگاه‌های ریزماهواره‌ای PT30205، PT30324 و PT30132 ناشی از وجود افراد هموزیگوت و یا آلل‌های خشی در آن جایگاه‌ها می‌باشد (Dolati Baneh et al. 2010).

نبودن تلاقی بین ارقام توتون به دلیل محدودیت برنامه‌های اصلاحی یکی دیگر از عوامل افزایش جایگاه‌های هموزیگوت می‌تواند باشد و نظری آن در انگور توسط (Dolati Baneh et al. 2010) نیز گزارش شده است.

بیشترین میزان هتروزیگوستی مورد انتظار ۰/۶۶۲ در نشانگر PT30094 و کمترین میزان آن ۰/۳۲۶ در نشانگر PT30014 مشاهده شد. میانگین هتروزیگوستی مورد انتظار برای مجموعه

ژنوتیپ‌ها در گلدان‌های مستقل کاشته شده و جهت رشد در اتفاق رشد و در دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. DNA ژنومی از برگ گیاهان ۵۰ روزه با استفاده از روش CTAB (Reichardt and Rogers 1994) استخراج شد. غلاظت DNA در ۲۶۰ هر نمونه با استفاده از روش اسپکتروفوتومتری در طول موج نانومتر مشخص شد. تعیین کیفیت DNA استخراجی با استفاده از الکتروفورز ژل آکارز یک درصد انجام گرفت. از بین ۲۷۸ جفت آغازگر SSR موجود در نقشه پیوستگی توتون (Blinder et al. 2007) ۲۶ جفت آغازگر SSR شامل آغازگرهای PT30014، PT30241، PT30165، PT30250، PT30202، PT30172، PT30285، PT20343، PT30034، PT30021، PT30027، PT30260، PT30205، PT30159، PT30008، PT30126، PT30061، PT30046، PT30324، PT30319، PT30292، PT30110، PT30094، PT30075، PT30067 و PT30132 جهت انگشتنگاری ژنوم توتون و بررسی تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفتند. نشانگرهای انتخابی علاوه بر داشتن باندهای چندشکل با وضوح بالا، دارای پوشش ژنومی مناسب از ژنوم توتون می‌باشند (Blinder et al. 2007). واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز طبق روش Darvishzadeh et al. (2013 a, b) انجام شد. الگوی باندهای حاصل به صورت صفر و یک به ترتیب برای عدم حضور و حضور باندها نمره‌دهی شد. پارامترهای تعداد آلل در هر جایگاه (n_a)، تعداد آلل مؤثر (n_e)، فراوانی آللی، هتروزیگوستی مشاهده شده (H_e) و هتروزیگوستی مورد انتظار (H_0) و ساختن (Peakall and GenAIEx (I) با استفاده از نرم افزار Smouse 2006) و از طریق روابط زیر محاسبه شدند.

$$(1) N_e = 1/H_e \quad (2) H_0 = \text{Number of heterozygotes}/N$$

$$(3) H_e = 1 - \sum P_i^2 \quad (4) I = -\sum P_i \ln P_i$$

در روابط بالا، P_i فراوانی آمین‌الل می‌باشد. شاهت ژنتیکی در بین افراد با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و تجزیه خوشبای بر اساس ماتریس تشابه و با استفاده از الگوریتم UPGMA در نرم-افزار NTSYS (Rohlf 1998) انجام گرفت. ضریب همبستگی کوفتیک (r) با استفاده از نرم‌افزار NTSYS محاسبه شد. انگشت نگاری ژنوتیپ‌های توتون مورد مطالعه با استفاده از ۲۶ جفت آغازگر ریزماهواره بیانگر وجود تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاسم مذکور

جدول ۱- تعداد آلل (Na)، تعداد آلل موثر (Ne)، شاخص شانون (I)، هتروزیگوتی مشاهده شده (Ho)، هتروزیگوتی مورد انتظار (He)، فراوانی آلل‌های نشانگرها و چند شکل مورد مطالعه در ژنوتیپ توتون شرقی.

مکان ژنی	N	Na	Ne	I	Ho	He	UHE	F	فراوانی الی		
									A	B	C
PT30014	۸۵	۳	۲/۹۰۶	۱/۰۹۱	۰/۰۸۲	۰/۶۶۲	۰/۶۶۶	۰/۸۷۶	۰/۳۳۵	۰/۳۸۲	۰/۲۸۲
PT30172	۸۴	۳	۱/۹۰۲	۰/۰۵۱	۰/۰۰۰	۰/۶۸۸	۰/۴۹۱	۱/۰۰۰	۰/۱۵۵	۰/۶۷۹	۰/۱۶۷
PT30202	۸۶	۲	۱/۷۳۰	۰/۶۱۳	۰/۰۰۰	۰/۴۲۲	۰/۴۲۴	۱/۰۰۰	۰/۳۰۲	۰/۶۹۸	
PT30250	۸۴	۲	۱/۹۹۵	۰/۶۹۲	۰/۰۰۰	۰/۴۹۹	۰/۵۰۲	۱/۰۰۰	۰/۵۲۴	۰/۴۷۶	
PT30165	۸۱	۲	۱/۴۹۶	۰/۰۵۱۴	۰/۰۰۰	۰/۳۳۲	۰/۳۳۴	۱/۰۰۰	۰/۲۱۰	۰/۷۹۰	
PT30241	۸۱	۲	۱/۸۹۶	۰/۶۶۵	۰/۰۰۰	۰/۴۷۲	۰/۴۷۵	۱/۰۰۰	۰/۶۱۷	۰/۳۸۳	
PT30027	۸۴	۳	۲/۸۴۳	۱/۰۷۰	۰/۴۲۹	۰/۶۴۸	۰/۶۵۲	۰/۳۳۹	۰/۴۱۱	۰/۳۶۳	۰/۲۲۶
PT30021	۸۰	۳	۲/۰۵۲	۰/۹۹۹	۰/۰۰۰	۰/۶۰۵	۰/۶۰۹	۱/۰۰۰	۰/۳۵۰	۰/۵۰۰	۰/۱۵۰
PT30034	۸۱	۳	۲/۷۸۶	۱/۰۶۱	۰/۰۰۰	۰/۶۴۱	۰/۶۴۵	۱/۰۰۰	۰/۳۰۹	۰/۴۵۷	۰/۲۳۵
PT20343	۷۳	۳	۲/۳۲۶	۰/۹۴۶	۰/۰۲۷	۰/۵۷۰	۰/۵۷۴	۰/۹۵۲	۰/۳۱۵	۰/۵۶۲	۰/۱۲۳
PT30285	۸۲	۳	۲/۶۰۴	۱/۰۳۶	۰/۴۰۲	۰/۶۲۳	۰/۶۲۷	۰/۳۵۴	۰/۲۲۰	۰/۵۰۰	۰/۲۸۰
PT30126	۷۱	۲	۱/۸۱۰	۰/۶۴۰	۰/۰۰۰	۰/۴۴۸	۰/۴۵۱	۱/۰۰۰	۰/۶۶۲	۰/۳۳۸	
PT30008	۸۵	۳	۲/۹۳۶	۱/۰۸۸	۰/۰۱۸	۰/۶۰۹	۰/۶۶۳	۰/۲۱۵	۰/۴۰۰	۰/۲۸۲	۰/۳۱۸
PT30159	۶۵	۲	۱/۶۶۸	۰/۰۵۰	۰/۰۰۰	۰/۴۰۰	۰/۴۰۴	۱/۰۰۰	۰/۲۷۷	۰/۷۴۳	
PT30205	۷۶	۲	۱/۷۹۰	۰/۶۳۳	۰/۶۵۸	۰/۴۴۱	۰/۴۴۴	-۰/۴۹۰	۰/۳۲۹	۰/۶۷۱	
PT30260	۴۸	۲	۱/۶۰۳	۰/۰۵۸۴	۰/۱۶۷	۰/۳۹۵	۰/۳۹۹	۰/۵۷۸	۰/۷۲۹	۰/۲۷۱	
PT30292	۷۴	۲	۱/۷۸۰	۰/۶۳۰	۰/۰۰۰	۰/۴۳۸	۰/۴۴۱	۱/۰۰۰	۰/۳۲۴	۰/۶۷۶	
PT30319	۷۷	۳	۱/۳۶۳	۰/۹۷۳	۰/۰۱۳	۰/۵۷۷	۰/۵۸۱	۰/۹۷۷	۰/۲۲۱	۰/۵۷۸	۰/۲۰۱
PT30324	۷۴	۲	۱/۶۳۴	۰/۰۵۷۷	۰/۰۲۷	۰/۳۸۸	۰/۳۹۱	-۰/۳۵۸	۰/۲۶۴	۰/۷۳۶	
PT30046	۵۸	۳	۲/۶۸۳	۱/۰۳۳	۰/۰۰۰	۰/۶۷۷	۰/۶۳۳	۱/۰۰۰	۰/۴۳۱	۰/۱۷۲	۰/۳۹۷
PT30061	۸۲	۳	۲/۷۷۶	۱/۰۵۸	۰/۰۰۰	۰/۶۴۰	۰/۶۴۴	۱/۰۰۰	۰/۲۲۰	۰/۴۵۱	۰/۳۲۹
PT30067	۵۵	۳	۲/۳۴۰	۰/۹۲۸	۰/۰۰۰	۰/۵۷۳	۰/۵۷۸	۱/۰۰۰	۰/۵۰۹	۰/۴۰۰	۰/۰۹۱
PT30075	۶۸	۳	۲/۹۲۳	۱/۰۸۵	۰/۰۰۰	۰/۶۰۸	۰/۶۶۳	۱/۰۰۰	۰/۳۹۷	۰/۲۶۵	۰/۳۳۸
PT30094	۷۸	۲	۱/۴۸۴	۰/۰۵۷	۰/۰۰۰	۰/۳۲۶	۰/۳۲۸	۱/۰۰۰	۰/۷۹۵	۰/۲۰۵	
PT30110	۷۸	۲	۱/۹۱۹	۰/۶۷۲	۰/۰۰۰	۰/۴۷۹	۰/۴۸۲	۱/۰۰۰	۰/۳۹۷	۰/۶۰۳	
PT30132	۵۹	۲	۱/۷۵۶	۰/۶۲۲	۰/۶۲۷	۰/۴۳۰	۰/۴۳۴	-۰/۴۵۷	۰/۳۱۴	۰/۶۸۶	
میانگین	۷۴/۳۳۳	۲/۴۸۱	۲/۱۵۹	۰/۸۰۵	۰/۱۴۶	۰/۵۱۲	۰/۵۱۶	۰/۶۹۴			
خطای معيار	۲/۰۴۶	۰/۰۹۸	۰/۰۹۸	۰/۰۴۲	۰/۰۴۵	۰/۰۲۱	۰/۰۲۱	۰/۰۹۹			

می‌دهد بین -۰/۴۹۰- الی یک متغیر بوده و میانگین آن ۰/۶۹۴ می‌باشد (جدول ۱). در این مطالعه، با توجه به بالا بودن میزان ضریب همبستگی کوفتیک بین ماتریس تشابه جاکارد و ماتریس کوفتیک حاصل از دندروگرام با الگوریتم UPGMA (۰/۵۲)، از ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA برای بدست آوردن مقدار شاباهت ژنتیکی و نیز گروهبندي ژنوتیپ‌های توتون‌های مورد مطالعه استفاده شد (شکل ۱). ضریب همبستگی کوفتیک (Sokal and Rolf 1962) عبارت است از همبستگی ساده بین ماتریس

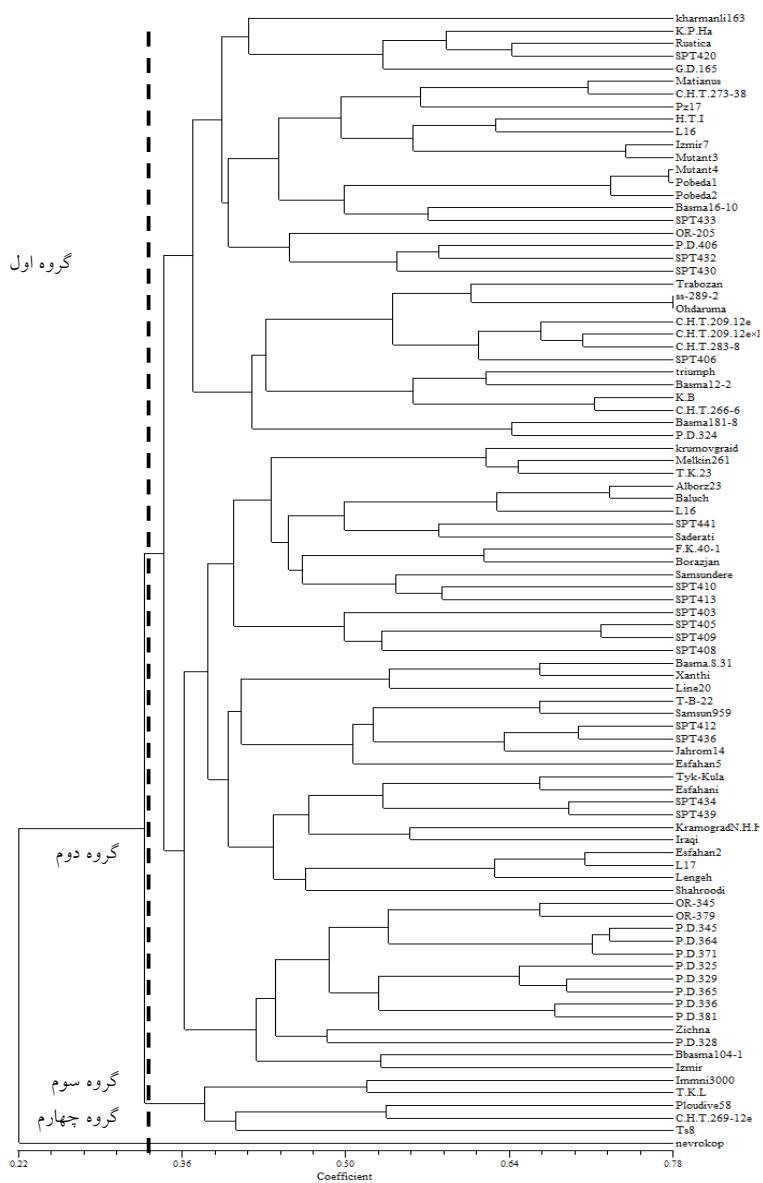
نشانگرها، ۰/۵۱۲ بدست آمد (جدول ۱). با توجه به جدول ۱، نشانگرها SSR با میزان هتروزیگوتی بالا شامل PT30014 و PT30008 می‌توانند در مطالعات تنوع ژنتیکی موثر واقع شوند. تفاوت قابل توجهی مابین هتروزیگوتی مشاهده شده و مورد انتظار در چندین مکان SSR مورد مطالعه وجود دارد که نشان دهنده عدم وجود تعادل هارדי- واینبرگ بوده و می‌تواند نتیجه آمیش‌های خویشاوندی باشد. در تحقیق حاضر، میزان ضریب خویش‌آمیزی (F) که میزان ثبتیت در مکان‌های ژنی را نشان

مورد بررسی در این تحقیق از طریق روش گرینش لاین خالص از توده‌های بومی در مرکز تحقیقات توتون ارومیه انتخاب شده‌اند. ویژگی بارز این تیپ توتون‌ها ارتفاع کمتر آنها در مقایسه با سایر توتون‌ها بویژه توتون‌های تیپ شرقی است. ژنوتیپ‌های P. D., Dubec 566 و لاین‌های اینبرد نوترکیبی هستند که از تلاقی 31 Basma seres 31 بوجود آمدند. از ویژگی‌های بارز گروه دوم، قرار گرفتن ژنوتیپ توتون شرقی 31 Basma seres 5 می‌باشد که این نوع توتون، تیپیک توتون‌های تیپ شرقی می‌باشد. نتایج گروه‌بندی نشان داد که گروه سوم شامل ۵ ژنوتیپ ($5/5$ درصد ژنوتیپ‌ها) و در نهایت گروه چهارم شامل یک ژنوتیپ (ژنوتیپ Nevrokop) می‌باشدند (شکل ۱). یکی از معیارهای انتخاب والدین برای تلاقی و بهره‌مندی از پدیده هتروزیس، فاصله ژنتیکی می‌باشد. معمولاً هر چه والدین فاصله بیشتری داشته باشد تنوع و هتروزیس بیشتری در نتایج مشاهده خواهد شد (Falconer and Mackey 1997).

(Falconer and Mackey 1997) بنابراین در این مطالعه هیبریداسیون بین ژنوتیپ‌های با فاصله زیاد می‌تواند یک استراتژی مناسب برای برنامه‌های اصلاحی آتی باشد. نتایج نشان داد که با استفاده از نشانگر ریزماهواره می‌توان تیپ‌های مختلف رشدی توتون از قبیل شرقی و نیمه‌شرقی را از یکدیگر تفکیک کرد. در این مطالعه، گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها از پراکنش جغرافیایی آنها تبعیت نمی‌کند و این امر در توافق با گزارش Darvishzadeh et al. (2013a) در مطالعه قسمتی از ژرم پلاسم مزبور و با استفاده از مجموعه ۱۳ تایی از مکان‌های ریزماهواره‌ای می‌باشد. مطالعه حاضر نشان داد که تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه در ژرم پلاسم توتون شرقی و نیمه‌شرقی مورد مطالعه وجود دارد که می‌تواند جهت بهبود ژنتیکی آنها مورد استفاده قرار گیرد. استفاده از نشانگر های SSR یک موضوع ارزشمند برای مطالعه تنوع ژنتیکی در جنس Nicotiana می‌باشد به طوری که می‌توان از این نشانگر در ایجاد کلکسیون هسته برای مطالعات به نژادی آتی استفاده کرد.

Fu and Horbach (2011) نظیر چنین ایده‌ای در گیاهانی از قبیل جو (Fu and Horbach 2011) و باadamزمینی (Haouane et al. 2012) کنجد (Zhang et al. 2012)، زیتون (Kottapallia et al. 2007) بکار گرفته شده است.

تشابه و ماتریس حاصل از دندروگرام (ماتریس کوفتیک) و معیاری است که نشان می‌دهد تا چه اندازه دندروگرام حاصله می‌تواند فاصله دوتایی بین مشاهدات را حفظ کند. بیشترین میزان شباهت ژنتیکی براساس ضربی تشابه جاکارد (GSj) بین ژنوتیپ‌های ss-289-2 و Ohdaruma با ارزش عددی 0.78 ± 0.04 مشاهده شد. فاصله ژنتیکی بدست آمده وجود تنوع ژنتیکی بالایی را در بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی نشان داد و ثابت کرد که نه تنها ژرم پلاسم ارزشمندی از توتون در ایران وجود دارد بلکه تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای قابل ملاحظه‌ای نیز وجود دارد که با نتایج تحقیقات Moon et al. (2009) و Davalieva et al. (2010) با استفاده از نشانگر SSR در توافق می‌باشد. همچنین Darvishzadeh et al. (2013a) با استفاده از مجموعه‌ای از ۱۳ نشانگر ریزماهواره تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای قابل ملاحظه‌ای را در بخشی از ژرم پلاسم توتون موجود در مرکز تحقیقات توتون ارومیه که برخی از آنها در این مطالعه نیز استفاده شده، گزارش کرده‌اند. برخلاف نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر، در مطالعات قبلی و با استفاده از نشانگرها RAPD (Ren and Timko 2006) AFLP (Arsalan and Okumus 2006) (2001) سطح پایینی از تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه گزارش شده است. تفاوت در نتایج تحقیقات محققان مختلف می‌تواند به دلیل اختلاف در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، نوع نشانگرها مورد استفاده و روش‌های بکار رفته برای تشخیص چند شکلی باشد. با توجه به فواصل ژنتیکی و طبقه‌بندی دندروگرام، الگوی مشخصی از گروه‌های هتروزیکی در ژرم پلاسم توتون مورد مطالعه مشاهده شد. بر اساس دندروگرام حاصل از تجزیه خوش‌های، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در چهار گروه کلی تقسیم‌بندی شدند. در گروه اول که شامل $34/37$ ژنوتیپ بود (C. H. T. 2011) ژنوتیپ می‌باشد که جزو توتون‌های نیمه شرقی محسوب می‌شوند (شکل ۱). توتون‌های نیمه شرقی از لحاظ خصوصیات ظاهری حداکثر توتون‌های شرقی و غربی می‌باشند. در گروه دوم که شامل $50/55$ ژنوتیپ بود (Fu and Horbach 2011) ژنوتیپ‌های تیپ چپق (SPT) و P.D. قرار گرفتند (شکل ۱). ژنوتیپ‌های چپق



شکل ۱- گروه‌بندی ژنوتیپ‌های توتون شرقی مورد مطالعه بر اساس داده‌های ریز ماهواره با استفاده از الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه جاکارد

منابع

- Arslan B, Okumus A (2006) Genetic and geographic polymorphism of cultivated tobacco (*Nicotiana tabacum*) in Turkey. Russian Journal of Genetics 42: 667-671.
- Bindler G, van der Hoeven R, Gunduz I, Plieske J, Ganal M, Rossi L, Gadani F, Donini P (2007) A microsatellite marker based linkage map of tobacco. Theoretical and Applied Genetics 114: 341-349.
- Darvishzadeh R, Mirzaei L, Hatami Maleki H, Laurentin H, Alavi R (2013a) Genetic variation in oriental tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) by agromorphological traits and

- simple sequence repeat markers. Revista Ciência Agronômica 44: 347-355.
- Darvishzadeh R, Gholizadeh S, Hatami Maleki H, Abdollahi B, Bernousi I (2013b) Study on genetic diversity among Iranian water pipe's tobacco (*Nicotiana* spp.) varieties by using simple sequence repeat markers. Bulgarian Journal of Agricultural Science 19: 557-562.
- Davalieva K, Maleva I, Filiposki K, spiroski O, Efremov GD (2010) Genetic variability of Macedonian tobacco varieties determined by microsatellite marker analysis. Diversity 2: 439-449.

- Dolati Baneh H, Mohammadi SA, Labra M (2010) Genetic relationship, synonyms and homonyms within grapevine cultivars of west Azarbaijan province. *Seed and Plant Improvement Journal* 26: 517-529 (In Farsi).
- Falconer DS, Mackay TFC (1997) Introduction to quantitative genetics. Longman Press, Essex.
- Fu YB, Horbach C (2012) Genetic diversity in a core subset of wild barley germplasm. *Diversity* 4: 239-257.
- Gholizadeh S, Darvishzadeh R, Abdollahi Mandoulakani B, Bernousi I, Alavi SR, Kharabian Masouleh A (2012) Molecular characterization and similarity relationships among flue-cured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) genotypes using simple sequence repeat markers. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici* 40: 247-253.
- Hatami Maleki H, Karimzadeh GH, Darvishzadeh R, Alavi R (2012) Genetic variation of oriental tobaccos using multivariate analysis. *Iranian Journal of Field Crop Research* 10: 100-106 (In Farsi).
- Haouane H, Bakkali AE, Moukhli A, Tollon C, Santoni S, Oukabli A, Modafar CE, Khadari B (2011) Genetic structure and core collection of the world olive germplasm bank of Marrakech: towards the optimized management and use of Mediterranean olive genetic resources. *Genetica* 139: 1083-1094.
- Kottapallia KR, Burowb MD, Burowc G, Burkec J, Puppala N (2007) Molecular characterization of the U.S. peanut mini core collection using microsatellite markers. *Crop Science* 47: 1718-1727.
- Mondini L, Noorani A, Pagnotta MA (2009) Assessing plant genetic diversity by molecular tools. *Diversity* 1: 19-35.
- 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: 2149-2159.
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Raju KS, Madhav MS, Sharma RK, Murthy TGK, Mohapatra T (2008) Genetic polymorphism of Indian tobacco types as revealed by amplified fragment length polymorphism. *Current Science* 94: 633-639.
- Reichardt M, Rogers S (1994) Preparation of plant DNA using CTAB. In: Ausubel F, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (Eds.). *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, New York, 2.3.3-2.3.7 pp.
- 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 2.02, Exeter Software, Setauket, New York.
- Siva Raju K (2011) Genetic diversity in Indian chewing tobacco (*Nicotiana tabacum*) as revealed by RAPD and SSR markers. *Indian Journal of Agricultural Science* 81: 15-19.
- Sokal RR, Rohlf FJ (1962) The comparison of dendograms by objective methods. *Taxon* 11: 33-40.
- Thomas MR, Scott NS (1993) Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphism when analyzed as sequence-tagged sites (STSS). *Theoretical and Applied Genetics* 86: 985-990.
- Zhang HY, Liu XZ, Sheng HC, Yang YM (2008) Genetic diversity among flue-cured tobacco cultivars based on RAPD and AFLP markers. *Brazilian Archive of Biology and Technology* 6:1097-1101.
- Zhang Y, Zhang X, Che Z, Wang L, Wei W, Li D (2012) Genetic diversity assessment of sesame core collection in China by phenotype and molecular markers and extraction of a mini-core collection. *BMC Genetics* 13: 102.