

بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف توتون گرمخانه‌ای با استفاده از نشانگر ISSR و رتروترانسپوزون

محمد محسن زاده گل‌فزانی^{۱*}، حبیب‌الله سمیع‌زاده لاهیجی^۲، علی‌اعلمی^۳، مرداویج شعاعی دیلمی^۴ و سهیلا طالش ساسانی^۵
۱، ۲، ۳، ۵، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیاران، دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان، ۴، رئیس بخش ژنتیک و اصلاح نبات مرکز تحقیقات توتون گیلان
(تاریخ دریافت: ۹۰/۴/۱۳ - تاریخ تصویب: ۹۱/۳/۳)

چکیده

گام اول در برنامه‌های به‌نژادی تعیین تنوع ژنتیکی مواد اصلاحی است. استفاده از نشانگرهای مولکولی سبب کاهش مدت زمان اصلاح و هزینه‌های پروژه‌های اصلاحی می‌شود. در این مطالعه تنوع ژنتیکی، ۴۹ ژنوتیپ توتون با استفاده از ۱۲ نشانگر ISSR، ۳ نشانگر رتروترانسپوزون و یک نشانگر ترکیبی ISSR و رتروترانسپوزون مورد ارزیابی قرار گرفتند. با استفاده از ۱۶ آغازگر ۱۴۷ نوار چندشکل به‌دست آمد، که از بین آغازگرهای مورد استفاده، آغازگر TOS-2 با ۱۶ نوار و آغازگرهای UBC811 و TOS-1 با ۱۴ نوار بیشترین و آغازگرهای UBC825 و TOS-3 با ۴ نوار کمترین تعداد نوار چندشکل را ایجاد نمودند. میزان اطلاعات چندشکلی نشانگرها بین ۰/۲۷ تا ۰/۴۶ و شاخص نشانگر از ۱/۱۵ تا ۵/۸۷ متغیر بود. تجزیه به بردارهای اصلی نشان داد که دو مولفه اول توانستند در مجموع ۱۶/۷۵ درصد از واریانس کل را توجیه کنند. تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA، ۴۹ ژنوتیپ مورد مطالعه را در پنج گروه قرار داد، که به ترتیب شامل ۹، ۴، ۱، ۱۳ و ۲۲ ژنوتیپ شدند. صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای توسط تابع تشخیص کانونی به روش خطی فیشر با ۷۹/۶ درصد تأیید شد.

واژه‌های کلیدی: ضریب تشابه انطباق ساده، میزان اطلاعات چندشکلی، شاخص نشانگر، تجزیه تابع تشخیص.

مقدمه

توتون یکی از گیاهان زراعی مهم صنعتی در ایران و جهان است. توتون دارای ژرم‌پلاسم نسبتاً بزرگی متشکل از تعداد زیادی رقم و لاین است. بدیهی است شناسای 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 (Godwin et al., 1997). ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) نشانگرهای توالی DNA هدف به منظور

به‌وسیله واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در حضور یک آغازگر مکمل با یک توالی ریزماهواره در ژنوم تکثیر می‌شود (Bomet & Branchard, 2001). این نشانگر قابلیت تکثیر نواحی بین جایگاه‌های ریزماهواره را داشته و چند شکلی بیشتری را نسبت به آغازگرهای RAPD نشان می‌دهد (Nagaoka & Ogihara, 1997) و عدم نیاز به داشتن اطلاعات اولیه از توالی DNA هدف به منظور

ارزیابی تنوع ژنتیکی در درون و بین گونه‌ها از مزایای آن می‌باشد (Kalender et al., 1999). رتروترانسپوزون‌ها فراوان‌ترین و گسترده‌ترین عناصر جابه‌جا شونده در ژنوم یوکاریوت‌ها هستند که بر خلاف ترانسپوزون‌ها از طریق رونویسی پی‌درپی، رونویسی معکوس و نهایتاً تولید cDNA جدید، کپی‌های خود را در نواحی جدید ژنومی درج می‌کنند و کپی‌های قبلی در جای خود پایدار باقی می‌مانند (Wicker et al., 2007). در ژنوم توتون تعدادی ترانسپوزون کشف شده است که می‌توان از آن جمله Tnt-1، Tto-1 و Tnd-1 نام برد (Yang et al., 2007).

Denduangboripant et al. (2010) به منظور تعیین ارتباط ژنتیکی جهت توسعه یک طبقه‌بندی استاندارد از ۲۰ آغازگر ISSR بر روی ۶۶ واریته توتون (۱۳ واریته محلی و ۵۳ واریته وارداتی) استفاده کردند، آن‌ها از این ۲۰ آغازگر ۵ آغازگر را انتخاب کردند و گزارش کردند این ۵ آغازگر نوارهای قابل تکرار ایجاد می‌کنند و می‌توان با آن‌ها به ارتباط ژنتیکی ژنوتیپ‌های بومی و وارداتی پی برد. آن‌ها با استفاده از روش UPGMA ژنوتیپ‌ها را به ۴ گروه تقسیم کرد، که اکثر ژنوتیپ‌های محلی الگوی نواری مشابه با ژنوتیپ‌های وارداتی داشت. بررسی تنوع ژنتیکی ۱۱۸ رقم از تیپ‌های مختلف توتون شامل توتون‌های گرمخانه‌ای، توتون‌های سایه خشک، توتون‌های آفتاب خشک، توتون‌های بارلی، توتون‌های شرقی و توتون‌های وحشی را با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR و IRAP، نشان داد که تنوع ژنتیکی پایینی در داخل و بین تیپ‌های ژنوتیپ‌های زراعی توتون وجود دارد. در حالی که فاصله ژنتیکی و هتروزیگوتی در میان ژنوتیپ‌های وحشی بیشتر از ژنوتیپ‌های زراعی می‌باشد (Chen et al., 2007)، نتایج این محققین در تعیین استراتژی مناسب به منظور بهبود تنوع در توتون قابل توجه بود. به منظور دستیابی به اطلاعات لازم و ضروری جهت شناسایی ژرم پلاسماهای مختلف توتون و کاربرد آن‌ها (Xiao and Yang, 2007)، تنوع و روابط ژنتیکی ۱۱۹ رقم توتون را با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR، با کاربرد ۲۱ آغازگر مورد بررسی قرار دادند. در تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA نتایج به دست آمده از بررسی آن‌ها با تنوع ژنتیکی احتمالی مطابقت داشت و تنوع ژنتیکی پایینی را در ژرم

پلاسماهای توتون گرمخانه‌ای در چین گزارش کردند. این محققین پیشنهاد دادند به منظور گسترش پایه ژنتیکی توتون‌های گرمخانه‌ای باید از پتانسیل ژنتیکی موجود در ژنوتیپ‌های وحشی توتون بهره برد. از نشانگرهای مولکولی AFLP برای برآورد تنوع ژنتیکی ۵۱ رقم توتون استفاده شده است و جدا کردن تیپ‌های آمریکایی از تیپ‌های چینی با موفقیت انجام شد (Zhang et al., 2006). تعیین تنوع سیتوپلاسمی بر روی ۲۴ رقم بارور توتون و دو لاین CMS از دو آغازگر FARS (ناحیه تکثیر شده با استفاده از توالی معکوس احاطه کننده) نشان داد که بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه‌شان تنوع سیتوپلاسمی وجود دارد (Irannejad & Ahmadikhah, 2009).

نظر به بررسی‌های زیادی که در رابطه با تنوع ژنتیکی در دنیا صورت گرفته و با توجه به اینکه هنوز ژرم پلاسماهای داخل کشور از نظر نشانگر مولکولی بررسی نشده لذا در این تحقیق با هدف بررسی تنوع ژنتیکی ۴۹ ژنوتیپ توتون گرمخانه‌ای و گروه‌بندی آن‌ها از ۱۲ آغازگر ISSR، ۳ آغازگر رتروترانسپوزون و یک آغازگر ترکیبی ISSR و رتروترانسپوزون استفاده شد تا از نقطه نظر این نشانگرها وضعیت تنوع ژنتیکی تعدادی از ژنوتیپ‌های ژرم پلاسما موجود تعیین گردد و با گروه-بندی ژنوتیپ‌ها، افراد یکنواخت در داخل یک گروه و افراد متفاوت از هم در گروه‌های مختلف دسته‌بندی شوند. همچنین انتخاب ژنوتیپ‌هایی که حداکثر فاصله را از هم دارند، در برنامه‌های دورگ‌گیری جهت افزایش تنوع طبیعی استفاده شود، از طرفی آغازگرهای که کارایی بالای در تمایز ژنوتیپ‌های توتون مورد مطالعه در این تحقیق را داشتند جهت استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های توتون معرفی می‌گردد.

مواد و روش

در این تحقیق از ۴۹ ژنوتیپ (جدول ۱) توتون گرمخانه‌ای مرکز تحقیقات توتون رشت استفاده شد. نمونه‌های بذر در گلدان‌های به قطر ۲۰ سانتی‌متر در گلخانه موسسه تحقیقات توتون رشت کاشته شد. نمونه-گیری از برگ‌های جوان توتون در مرحله ۳ تا ۴ برگی انجام شد، استخراج DNA با استفاده از روش دوئل و

UBC812 استفاده گردید. واکنش PCR در حجم ۱۰ مایکرولیتر شامل ۳۰ تا ۴۰ نانوگرم DNA الگو، ۰/۱ میلی‌مول dNTP، ۰/۳ میلی‌مول آغازگر، ۱/۵ میلی‌مول $MgCl_2$ ، بافر 1X PCR و ۱ واحد آنزیم Taq پلیمرز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Biometra انجام شد.

دوئل (Doyle & Doyle, 1990) با اندکی تغییر انجام، و کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA با روش الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفتومتری تعیین شد. در این تحقیق از ۱۲ آغازگر ISSR (جدول ۲) برگرفته از Yang et al. (2007) و سه آغازگر رتروترانسپوزن Tos-1، Tos-2 و Tos-3 و همچنین یک آغازگر ترکیبی Tos-1 و

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

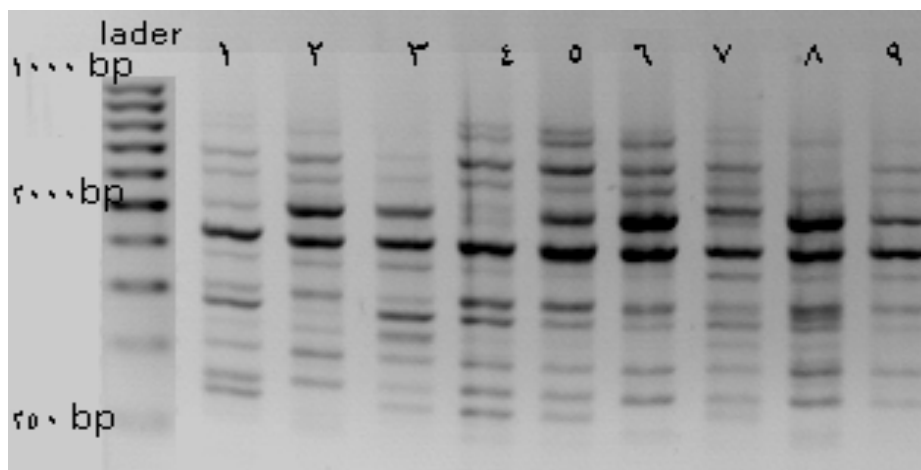
ردیف	نام ژنوتیپ	منشأ جغرافیایی	ردیف	نام ژنوتیپ	منشأ جغرافیایی
۱	Coker 254	USA	۲۶	NOD 8	Africa
۲	Coker 298	USA	۲۷	NC. 95 XCH-MUTANT NO 2	Iran
۳	Bel 61-10	USA	۲۸	Soth-Carolina	USA
۴	Chemical Mutant	Australia	۲۹	Virginia RP. 37	USA
۵	Bel 71-500	USA	۳۰	Tirtash 4	Iran
۶	Bel 71-501	USA	۳۱	Tirtash 33	Iran
۷	Bel 61-9	USA	۳۲	Pereg R. 2-228	Germany
۸	Virgin	Germany	۳۳	Pereg R. 2-234	Germany
۹	R 9	Iran	۳۴	Badisher Geudert	Germany
۱۰	R 30	Iran	۳۵	Comstock-Spanish	USA
۱۱	Fixed A1	USA	۳۶	Manilla-Geel	USA
۱۲	Honggarten Blatt	Germany	۳۷	Montcalm Brum	Switzerland
۱۳	Delhi	Canada	۳۸	Alida	USA
۱۴	Virginia American	USA	۳۹	Pfater	USA
۱۵	Virgin RP37	USA	۴۰	All Purpose	USA
۱۶	Hicks 55	USA	۴۱	Pennbel 69	USA
۱۷	Previ Stamm V6	USA	۴۲	Parfum-ditalie	Canada
۱۸	Hicks Broad Leaf	USA	۴۳	Rosecan Nela	Canada
۱۹	Virginia H. R.	USA	۴۴	BERGERAC-C	France
۲۰	Virginia Ree 40	USA	۴۵	TRUMPF	Germany
۲۱	Nort Carolina 88	USA	۴۶	TL 1112	USA
۲۲	Prev Stammv 3	USA	۴۷	Ex. 4. PR-1	USA
۲۳	Virginia Bright 88	USA	۴۸	Golden Gift	Britain
۲۴	Virginia Ree 488	USA	۴۹	C258×MC944	Iran
۲۵	Pee Dee	Germany			

در دمای 4°C بود. محصول تکثیر شده بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد تفکیک و رنگ آمیزی ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید و آشکارسازی نوارها زیر نور UV انجام گردید. الگوی نواری براساس وجود (یک) یا عدم وجود (صفر) نوارها نمره‌دهی شدند (شکل ۱). داده‌های حاصل به صورت یک ماتریس 49×190 وارد نرم افزار Excel

چرخه حرارتی به صورت ۴ دقیقه واسرشته-سازی اولیه در 94°C ، سپس ۳۵ سیکل بصورت ۴۰ ثانیه واسرشته‌سازی در 40.94°C ، ثانیه مرحله اتصال آغازگر بسته به دمای اتصال (T_m) آغازگر (جدول ۲)، ۲ دقیقه مرحله بسط در دمای 72°C و یک چرخه نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای 72°C بود. سپس نگهداری

از این مولفه‌ها میزان اطلاعات چندشکلی (Polymorphism Information Content) است که با استفاده از رابطه $(PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2)$ محاسبه شد. در این رابطه P_i فراوانی آلل i ام و n تعداد آلل می‌باشد.

شد که در آن ۴۹ تعداد ژنوتیپ توتون و ۱۹۰ تعداد نوار مشاهده شده بود، برای ارزیابی تنوع ژنتیکی با استفاده از اطلاعاتی که از نشانگرهای مولکولی بدست می‌آید، می‌توان چندین مؤلفه را مورد ارزیابی قرار داد، یکی



شکل ۱- الگوی نواری ISSR حاصل از تکثیر ژنوتیپ‌های توتون با استفاده از آغازگر UBC811.

نتایج و بحث

در این پژوهش با استفاده از ۱۶ ترکیب آغازگری در مجموع امتیازدهی ۱۹۰ نوار را نتیجه داد که از بین آن‌ها ۱۴۷ نوار چندشکل بودند (جدول ۲) و میانگین مکان‌های چندشکل به ازای هر آغازگر معادل ۹/۲ بدست آمده است.

از بین آغازگرهای مورد استفاده، آغازگر TOS-2 با تعداد ۱۷ نوار و بعد از آن، آغازگرهای UBC811، UBC814 و TOS-1 با تعداد ۱۶ نوار بیشترین تعداد نوار و آغازگرهای UBC825 و TOS-3 با تعداد ۶ نوار کمترین تعداد را داشتند (جدول ۲). همچنین تعداد ۱۶ نوار چندشکلی برای آغازگر TOS-2 و ۱۴ نوار چندشکل برای آغازگرهای UBC811 و TOS-1 بود، کمترین تعداد نوار برای آغازگرهای UBC825 و TOS-3 با ۴ نوار مشاهده شد. درصد چندشکلی بدست آمده (جدول ۲) در ژنوتیپ‌ها از ۶۱/۵ درصد برای (UBC826) تا ۹۴/۱ درصد برای (TOS-2) متغییر بود. میانگین درصد چندشکلی به دست آمده در این تحقیق (۷۷/۳۶ درصد)، تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌ها را توجیه می‌کند. (جدول ۳). بالاترین میزان PIC در آغازگر Tos-3 و UBC823 به

شاخص نشانگری (MI=Marker Index) که بیانگر میزان چندشکلی بوده و می‌تواند بعنوان شاخصی جهت برآورد کارایی یک نشانگر در یک ژرمپلاسم ناشناخته استفاده گردد، با استفاده از رابطه $MI = PIC \times EMR$ بدست آمد نسبت چندگانه موثر (EMR: Effective Multiplex Ratio) که بیانگر تعداد جایگاه‌های ژنی چندشکل موجود در یک ژرمپلاسم می‌باشد براساس رابطه $EMR = n_p \times \beta$ محاسبه شد که در این رابطه، n_p تعداد کل نوارهای چندشکل و β نسبت تعداد نوار چندشکل به تعداد کل نوار می‌باشد (Powell et al., 1996). شاخص شانون، تعیین تنوع ژنی نی با استفاده از نرم افزار POPGEN نسخه ۱/۳۱ تعیین گردید (Yeh & Yang, 1999).

جهت گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها ابتدا تفاوت‌های و مشابهت ژنوتیپ‌ها براساس روش تطابق ساده تهیه و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از روش UPGMA انجام شد که بدین منظور از نرم افزار NTSYS Rohlfs (1998) استفاده شد و جهت تجزیه به بردار اصلی از نرم افزار GenStat نسخه ۱۲ (VSN International, 2009) استفاده شد و جهت تجزیه تابع تشخیص با استفاده از نرم افزار SPSS 16.0 (Anonymous, 2007) انجام شد.

آغازگرها برای بررسی تنوع ژنتیکی توتون می‌باشد و به دلیل میزان بالای PIC برای ارزیابی تنوع ژنتیکی توتون مفید خواهند بود.

میزان ۰/۴۶ و بعد از آن‌ها UBC813 و UBC816 به میزان ۰/۴۴ تعیین شد که نشان‌دهنده کارایی بالای این آغازگرها در تمایز ژنوتیپ‌های مورد استفاده در این تحقیق می‌باشد، که نشان‌دهنده سودمندی این

جدول ۲- آغازگرهای مورد استفاده، توالی، دمای اتصال (TM)، درصد چندشکلی، تعداد نوار، تعداد نوار چندشکلی آن‌ها

ردیف	نام آغازگر	دمای TM	درصد چندشکلی	تعداد نوار	تعداد نوار چندشکلی	توالی
۱	UBC811	۴۳	۸۷/۵	۱۶	۱۴	GAGAGAGAGAGAGAC
۲	UBC812	۴۲	۷۶/۹	۱۳	۱۰	GAGAGAGAGAGAGAA
۳	UBC813	۴۲	۹۲/۳	۱۳	۱۲	CTCTCTCTCTCTCTT
۴	UBC814	۴۱	۷۵	۱۶	۱۲	CTCTCTCTCTCTCTA
۵	UBC815	۴۳	۷۲/۷	۱۱	۸	CTCTCTCTCTCTCTG
۶	UBC816	۴۷	۷۵	۱۲	۹	CACACACACACACAT
۷	UBC817	۴۷	۷۱/۴	۱۴	۱۰	CACACACACACACAA
۸	UBC823	۴۴	۷۸/۵	۱۴	۱۱	TCTCTCTCTCTCTCC
۹	UBC824	۴۵	۶۲/۵	۸	۵	TCTCTCTCTCTCTCG
۱۰	UBC825	۴۸	۶۶/۶	۶	۴	ACACACACACACACT
۱۱	UBC826	۴۹	۶۱/۵	۱۳	۸	ACACACACACACACC
۱۲	UBC876	۴۳	۷۱/۵	۷	۵	GACAGACAGACAGACA
۱۳	TOS-1	۶۱	۸۷/۵	۱۶	۱۴	TGTTGGGAATAGTCCCACA
۱۴	TOS-2	۵۲	۹۴/۱	۱۷	۱۶	TGTTGAATAGTCCACATT
۱۵	TOS-3	۴۰	۶۶/۶	۶	۴	TGTTAGAAAGTATAATATGT
۱۶	TOS1+ UBC812	۴۰	۶۲/۵	۸	۵	TGTTGGGAATAGTCCCACA GAGAGAGAGAGAGAA
کل			۷۷/۳۶	۱۹۰	۱۴۷	

شاخص نی نشان داد (جدول ۳) که میزان تنوع ژنی بین ۰/۱۶ تا ۰/۴۳ متغیر بود و آغازگرهای UBC811، UBC816، UBC813، TOS-1 و TOS-3 برترتیب بیشترین تنوع ژنی را نشان دادند. آغازگر UBC815 کمترین میزان تنوع ژنی را دارا بود. میانگین تنوع ژنی در جمعیت مورد مطالعه ۰/۳۷ بود. ضریب شانون بیانگر میزان پلی مورفیسم در بین ژنوتیپ‌ها است (Shannon, 1948).

در این تحقیق میانگین ضریب شانون ۰/۵۵ می‌باشد که نشان‌دهنده تنوع متوسط در ژنوتیپ‌های مورد بررسی است. آغازگرهای UBC811، UBC816، UBC813، TOS-1 و TOS-3 دارای بیشترین شاخص شانون بودند، این نشان‌دهنده این است که آغازگر فوق می‌تواند تنوع ژنتیکی درون جمعیتی را بهتر توجیه کند

محتوی اطلاعات چندشکل (PIC) در این تحقیق بین ۰/۲۷ تا ۰/۴۶ و میانگین محتوی اطلاعات چندشکل ۰/۴۱ بود بمنظور تعیین کارایی نشانگرها در بروز چندشکلی، شاخص نشانگری (MI) و نسبت چندگانه موثر (EMR) محاسبه شد. بیشترین میزان (EMR) برای آغازگر TOS-2 (۱۵/۰۶) و کمترین میزان برای آغازگر TOS-3 (۲/۶۶) بود (جدول ۳). میزان MI بین ۱/۱۵ تا ۵/۸۷ متغیر بود. آغازگرهای Tos-1، Tos-2، UBC811 و UBC813 به ترتیب با ۵/۸۷، ۵/۲۷، ۴/۹ و ۴/۸۷ واحد دارای بیشترین شاخص نشانگری (MI) بودند (جدول ۳) که کارایی بالا این آغازگرها را در بروز چندشکلی نشان می‌دهد. یکی از مهمترین شاخص‌ها برای ارزیابی تنوع ژنی در بین ژنوتیپ‌ها و جمعیت‌ها، شاخص تنوع ژنی نی می‌باشد (Nei, 1972). برآورد

و آغازگر UBC815 دارای کمترین شاخص شانون می‌باشد (جدول ۳).

جدول ۳- محتوی اطلاعات چندشکل (PIC)، نسبت چندگانه موثر (EMR)، شاخص نشانگری (MI)، تعداد الل موثر، تنوع ژنی نی و شاخص شانون در جایگاه ISSR و رتروترانسپوزون در ژنوتیپ‌های توتون مورد مطالعه

ردیف	نام آغازگر	PIC	EMR	MI	تعداد الل	شاخص	تنوع ژنی
آغازگر ۱	UBC811	۰/۴	۱۲/۲۵	۴/۹	۱/۸۱	۰/۶۲	۰/۴۳
آغازگر ۲	UBC812	۰/۳۷	۷/۶۹	۲/۸۵	۱/۶۴	۰/۵۵	۰/۳۷
آغازگر ۳	UBC813	۰/۴۴	۱۱/۰۸	۴/۸۷	۱/۷۶	۰/۶۱	۰/۴۲
آغازگر ۴	UBC814	۰/۴۲	۹	۳/۷۸	۱/۵۴	۰/۵	۰/۳۳
آغازگر ۵	UBC815	۰/۲۷	۵/۸۲	۱/۵۷	۱/۲	۰/۲۹	۰/۱۶
آغازگر ۶	UBC816	۰/۴۴	۶/۷۵	۲/۹۷	۱/۷۸	۰/۶۲	۰/۴۳
آغازگر ۷	UBC817	۰/۴	۷/۱۱۴	۲/۸۶	۱/۶۱	۰/۵۳	۰/۳۵
آغازگر ۸	UBC823	۰/۴۶	۸/۵۸	۳/۹۵	۱/۶۷	۰/۵۷	۰/۳۹
آغازگر ۹	UBC824	۰/۳۸	۳/۱۱۳	۱/۱۹	۱/۵۶	۰/۵	۰/۳۳
آغازگر ۱۰	UBC825	۰/۴۳	۲/۶۶	۱/۱۵	۱/۷۲	۰/۵۹	۰/۴
آغازگر ۱۱	UBC826	۰/۴۳	۴/۹۲	۲/۱۲	۱/۵۷	۰/۵۴	۰/۳۶
آغازگر ۱۲	UBC8736	۰/۴	۳/۵۸	۱/۴۳	۱/۴۸	۰/۴۷	۰/۳
آغازگر ۱۳	TOS-1	۰/۴۳	۱۲/۲۵	۵/۲۷	۱/۸	۰/۶۱	۰/۴۲
آغازگر ۱۴	TOS-2	۰/۳۹	۱۵/۰۶	۵/۸۷	۱/۵۵	۰/۵۱	۰/۳۳
آغازگر ۱۵	TOS-3	۰/۴۶	۲/۶۶	۱/۲۳	۱/۷۲	۰/۶	۰/۴۱
آغازگر ۱۶	TOS1+UBC812	۰/۴۲	۳/۱۱۳	۱/۳۱	۱/۵۶	۰/۵۱	۰/۳۴
میانگین		۰/۴۱		۲/۹۶	۱/۶۴	۰/۵۵	۰/۳۷

انتخاب شده و توزیع مناسب و یکنواخت در ژنوم دارد (Hajmansoor et al., 2010). در داده‌های مورفولوژیک برعکس داده‌های مولکولی بهترین حالت زمانی است که بیشترین واریانس توسط تعداد کمی مولفه توجیه گردد. در داده‌های مولکولی دو یا سه مولفه اول باید حدود ۱۰ تا ۲۰ درصد از تغییرات مربوط به نشانگرها را توجیه نمایند که از نظر آماری ممکن است برای نمایش گرافیکی مناسب نباشد، ولی از نظر ژنتیکی نشان دهنده نمونه‌برداری مطلوب نشانگرها از کل ژنوم می‌باشد. به عبارت دیگر، زمانی که تعداد صفات یا نوارها به تعداد کمی مولفه کاهش یابد، آغازگرهای مورد استفاده به‌طور صحیح انتخاب نشده و تعداد محدودی از کروموزوم‌ها را تحت پوشش قرار می‌دهند و در نتیجه نمی‌توانند افراد را از همدیگر به‌خوبی جدا نمایند. اما اگر تعداد مولفه‌ها زیاد باشد، آغازگرهای مورد استفاده، کروموزوم‌های بیشتری را تحت پوشش قرار داده و نشانگر به خوبی تنوع ژنتیکی افراد را تعیین می‌نماید (Siahsar et al., 2010). فاصله ژنتیکی بین دو موجود به منزله تفاوت قابل توجیه بین آن دو موجود با استفاده از تنوع آلی است. به‌عبارت دیگر فاصله ژنتیکی بیانگر میزان

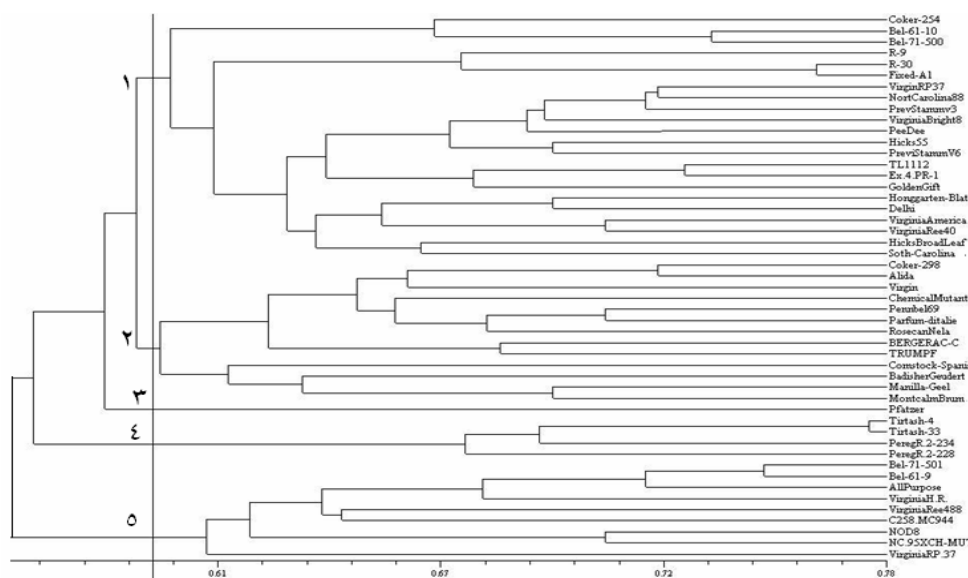
تجزیه به بردارهای اصلی در بیان تنوع ژنتیکی بر اساس صفات کیفی کاربرد زیادی دارد و با استفاده از آن می‌توان الگوهای تنوع را به صورت چندبعدی نشان داد و اجازه تفسیر بیشتری در مورد ارتباط بین افراد را فراهم کرد (Khayam Nekouei et al., 2009). میزان واریانس نسبی هر مولفه نشان دهنده اهمیت آن مولفه در واریانس کل است و به‌صورت درصد بیان می‌شود. در این تجزیه، ۱۷ مولفه اول توانستند مجموعاً ۶۶/۰۵ درصد از واریانس کل را توجیه کنند (جدول ۴). دو مولفه اول توانستند مجموعاً ۱۶/۷۵ درصد از واریانس کل را توجیه کنند. مطابق انتظار مولفه اول بیشترین سهم را در توجیه تغییرات دارا می‌باشد. از این میان مولفه اول ۹/۸۴ درصد و مولفه دوم ۶/۹۱ درصد بود. بنابراین تعداد صفات یا نوارها به تعداد زیادی مولفه کاهش یافته و انتخاب آغازگرها به خوبی انجام گرفته است و این موضوع نشان داد که نشانگرهای ISSR و رتروترانسپوزون مورد مطالعه در قسمت‌های مختلف ژنوم پراکنده هستند و این بهترین حالت در بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از داده‌های مولکولی است، بدلیل اینکه نشانگرهای مولکولی از کروموزوم‌های مختلف

تطابق ساده با ضریب کوفنتیک ۰/۶۱ بهترین روش گروهبندی از بین روش‌های مورد بررسی است. گروهبندی بر اساس ضریب تشابه با ترسیم خط برش در فاصله ۰/۵۹، ۴۹ ژنوتیپ مورد مطالعه را در پنج کلاستر قرار داد (شکل ۳).

تفاوت‌های ژنی بین جمعیت‌ها یا گونه‌هاست که با استفاده از برخی کمیت‌های عددی قابل اندازه‌گیری می‌باشد. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس نمره‌دهی صفر و یک انجام شد. تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA و اندازه‌گیری سه ضریب تشابه تطابق ساده، جاکارد و دایس، نشان داد که گروهبندی بر اساس ضریب تشابه

جدول ۴- درصد واریانس و درصد تجمعی برای ۱۰ مولفه اول

مولفه اصلی	مقادیر ویژه	درصد واریانس	درصد تجمعی
۱	۱/۹۷	۹/۸۴	۹/۸۴
۲	۱/۳۸	۶/۹۱	۱۶/۷۵
۳	۱/۰۲	۵/۰۸	۲۱/۸۳
۴	۰/۸۷	۴/۳۵	۲۶/۱۸
۵	۰/۸۱	۴/۰۷	۳۰/۲۵
۶	۰/۸	۳/۹۸	۳۴/۲۳
۷	۰/۷۵	۳/۷۴	۳۷/۹۷
۸	۰/۷۱	۳/۵۳	۴۱/۵
۹	۰/۶۸	۳/۳۹	۴۴/۸۹
۱۰	۰/۶۴	۳/۱۸	۴۸/۰۷
۱۱	۰/۵۹	۲/۹۶	۵۱/۰۳
۱۲	۰/۵۵	۲/۷۶	۵۳/۷۹
۱۳	۰/۵۴۶	۲/۷۳	۵۶/۵۲
۱۴	۰/۵۲	۲/۶	۵۹/۱۲
۱۵	۰/۴۹	۲/۴۷	۶۱/۵۲
۱۶	۰/۴۷	۲/۳۳	۶۳/۸۵



شکل ۳- دندروگرام ترسیم شده براساس روش UPGMA و ماتریس تشابه تطابق ساده برای ۴۹ ژنوتیپ توتون مورد مطالعه

تمامی ژنوتیپ‌ها را به خوبی از هم جدا و باز شناسی کنند. صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای توسط

گروه‌های یک تا پنج به ترتیب شامل ۲۲، ۱۳، ۱، ۴ و ۹ ژنوتیپ بودند. آغازگرهای مورد استفاده توانستند

تلاقی ژنوتیپ‌های NC.95 و Chemical mutant و Coker-258 MC944 که حاصل تلاقی Coker-258 و MC944 می‌باشد در گروه پنجم قرار گرفتند. این تحقیقات می‌تواند پیش‌نیازی برای برنامه‌های دورگ‌گیری به‌شمار رود. به این ترتیب برای اصلاح جمعیت می‌توان بعضی از ژنوتیپ‌ها گروه اول، دوم و سوم را با یکی از ژنوتیپ‌ها گروه چهارم یا پنجم تلاقی داد و دورگ‌های مورد نظر را ایجاد نمود.

Siva Raju et al. (2009) در بررسی تنوع ژنتیکی ۲۴ واریته با ۱۸ آغازگر RAPD و استفاده از ضریب تشابه جاکارد و تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA این واریته‌ها را در ۵ گروه اصلی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که گروه‌بندی انجام شده مطابق انتظار بود و اظهار نمودند این مطالعه یک ابزار مولکولی فیلوژنتیک در گونه‌های Nicotiana بود که امکان تشخیص چندشکلی را در سطح زیرگونه مشخص می‌کند و همچنین اظهار نمودند نشانگرهای RAPD مختص به-گونه بکار رفته در این مطالعه به‌عنوان ابزاری ارزشمند در برنامه‌های اصلاحی تلاقی مفید می‌باشد. در بررسی تنوع ژنتیکی ۵۹ ژنوتیپ توتون گرمخانه‌ای با استفاده از نشانگر IRAP تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA، مواد آزمایشی را در ۱۴ دسته قرار داد که ژنوتیپ‌های اصلاح شده در چین در یک دسته قرار گرفتند (Xiao & Yang, 2006). در بررسی تنوع ژنتیکی ۵۱ ژنوتیپ توتون گرمخانه‌ای با نشانگر AFLP، تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA ژنوتیپ‌ها را به گروه‌های عمده با منشأ آمریکا و چین دسته‌بندی نمود و نشان داده شد که تنوع ژنتیکی ژرم پلاسما‌های کنونی توتون گرمخانه‌ای، محدود می‌باشد که حمایت از تلاش در جهت نگهداری منابع ژرم پلاسما توتون گرمخانه‌ای را ایجاب می‌کند (Zhu et al., 1998). Yang et al. (2005) در بررسی تنوع ژنتیکی ۲۴ ژنوتیپ توتون گرمخانه‌ای با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR و تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA، ژنوتیپ‌ها را در ۵ گروه اصلی تقسیم بندی نمود. بزرگترین گروه ۱۲ ژنوتیپ را در بر گرفته، با توجه به پایین بودن تنوع ژنتیکی در میان ژنوتیپ‌های توتون گرمخانه‌ای پیشنهاد داده شد که گسترش زمینه ژنتیکی در میان توتون‌های گرمخانه‌ای ضروری است.

تابع تشخیص کانونی به روش خطی فیشر ۷۹/۶ درصد برآورد شد. با این ترتیب می‌توان نتیجه‌گیری نمود که تابع تشخیص تقسیم ژنوتیپ‌ها در پنج گروه به وسیله تجزیه خوشه‌ای را تأیید می‌نماید.

بر اساس آغازگرهای بررسی شده، ژنوتیپ‌های Tirtash-4 و Tirtash-33، R-30، FixedA1، Bel-71-501 و Bel-61-10، Bel-61-9، 501 Purpose و TL-1112، Bel-61-9، Ex.4.PR-1، Virgin RP37 و NortCarolina-88، Alida، Coker-298 و NortCarolina-88 و PrevStammv-3 به ترتیب با ضریب تشابه ژنتیکی ۰/۷۷۶، ۰/۷۶۲، ۰/۷۴۸، ۰/۷۳۵، ۰/۷۳۵، ۰/۷۲۸، ۰/۷۲۱، ۰/۷۲۱ و ۰/۷۲۱ بیشترین شباهت که مطابق انتظار بود و ژنوتیپ‌های Peregr.2-234 و Bel-71-501، Coker-254، Ex.4.PR-1 و FixedA1 به ترتیب با ضریب تشابه ژنتیکی ۰/۴۲۲، ۰/۴۲۲ و ۰/۴۲۲ کمترین شباهت را داشتند. با توجه به مقادیر تشابه بین ارقام می‌توان نتیجه‌گیری کرد که تلاقی بین ارقامی که کمترین تشابه را دارند (بیشترین فاصله)، می‌تواند انجام گردد. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها تا حدی با منشا جغرافیایی آن‌ها همخوانی داشتند، به‌طوری که ژنوتیپ‌های Coker-254، Bel-61-10، Bel-71-501، Virginia Hicks-55، Virginia American 71-500 و VirginiaBright-88، NortCarolina-88، Ree-40 و Soth-Carolina با منشا امریکایی، ژنوتیپ‌های Honggarten Blatt و Pee Dee با منشا آلمانی و همچنین ژنوتیپ‌های R9 و R30 با منشا ایرانی دارند با والد FixedA1 خود در گروه اول قرار گرفتند. ژنوتیپ R9 حاصل تلاقی (FixedA1×Bel61- (Coker347×Coker347) می‌باشد، ژنوتیپ R30 حاصل تلاقی (FixedA1×Bel61-10) × (Coker347×Coker347) می‌باشد. ژنوتیپ‌های Virgin، BERGERAC-C و Badisher Geudert با منشا آلمانی در گروه دوم قرار گرفتند. ژنوتیپ‌های Tirtash-4 و Tirtash-33 با منشا ایرانی همراه با ژنوتیپ‌های Peregr.2-228 و Peregr.2-234 که منشا آلمانی دارند در کنار هم در گروه چهارم قرار گرفتند. ژنوتیپ‌های Bel-61-9، Bel-71-501، Virginia-H.R.، VirginiaRee-88 و VirginiaRP.37 منشا امریکایی به همراه ژنوتیپ NC.95×CH-MUTANTNO2 که حاصل

نتیجه گیری کلی

در یک نقطه متمرکز شده‌اند، در یک گروه قرار گرفته‌اند. ژنوتیپ‌های گروه اول در تجزیه خوشه‌ای در نمودار الگوی تنوع نیز در کنار هم قرار گرفته‌اند، ژنوتیپ‌های گروه چهارم نیز چنین بود. در نهایت نتایج نشان داد با توجه به اینکه انتخاب براساس نشانگرهای مولکولی یک روش سریع در برنامه اصلاحی است (Lande & Thomson, 1990) اطلاعات ژنتیکی بدست آمده از نشانگرهای مولکولی در برنامه‌های اصلاحی نقش مهمی را ایفا می‌کنند، بنابراین برای انتخاب ژنوتیپ برتر دارای ارزش بالای هستند، همچنین با توجه به مقادیر تشابه بین ژنوتیپ‌ها در این مطالعه می‌توان نتیجه‌گیری کرد که تلاقی بین ژنوتیپ‌های که کمترین تشابه را دارند (بیشترین فاصله)، بهترین نتیجه را در دستیابی به هیبریدها و یا دستیابی به حداکثر تفکیک در نسل‌های پس از F1 خواهد شد و نیز می‌توان از گروه‌های حاصل از این پژوهش، یک رقم به‌عنوان نماینده انتخاب کرد و ژنوتیپ‌ها دوبه‌دو به‌صورت دای آل باهم تلاقی داد تا برای ساخت جمعیت QTL استفاده شود.

بالا بودن معیارهای تنوع ژنی نی، شاخص شانون و میزان PIC برای آغازگرهای UBC813، UBC816 و TOS-3 نشان‌دهنده کارایی بالای این آغازگرها در تمایز ژنوتیپ‌های توتون در این تحقیق بود و می‌توان از این آغازگرها در بررسی تنوع ژنتیکی توتون استفاده نمود. این پژوهش به‌دلیل اینکه در تجزیه به مختصات اصلی تعداد مولفه‌های زیاد توجه‌کننده درصد کمی از تغییرات کل می‌باشد، آغازگرهای مورد استفاده ناحیه کروموزومی بیشتری را تحت پوشش قرار داده و نشانگرهای ISSR و رتروترانسپوزون مورد مطالعه در قسمت‌های مختلف ژنوم پراکنده هستند و این نشانگرها به خوبی تنوع ژنتیکی افراد را تعیین کردند. گروه‌بندی براساس دو بردار اول تجزیه مختصات اصلی تا حد زیادی مشابه با گروه‌بندی تجزیه خوشه‌ای بود و تفاوت‌های اندک مشاهده شده به‌دلیل این است که دو مولفه اول نمی‌تواند نشان دهنده تنوع کل متغیرهای اولیه (تعداد کل نوارها) باشد. در نمودار الگوی تنوع ژنوتیپ‌های که

REFERENCES

1. Anonymous. (2007). The SPSS system for Windows. *Release 16.0.SPSS Inc., an IBM Company Headquarters, USA.*
2. Bornet, B. & Branchard. M. (2001). Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) marker: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19, 209-215.
3. Chen, X. J., B. C. Yang, B. G. Xiao & Shi. C. H. (2007). Assessing the genetic diversity of tobacco germplasm using intersimple sequence repeat and inter-retrotransposon amplification polymorphism markers. *Annals of Applied Biolog*, 150, 393-401.
4. Denduangboripant, J., Setaphan, S. Suwanprasart W. & Panha S. (2010). Determination of Local Tobacco Cultivars Using ISSR Molecular Marker. *Chiang Mai Journal Science*, 37(2), 293-303.
5. Doyle, J. J & Doyle, J. L. (1990). A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus*, 12, 13-15.
6. Godwin, I. D., Aitken E. A. B. & Smith L. W. (1997). Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis*, 18, 1524-1528.
7. Hajmansoor Sh., Bihamta, M. R Nabipor , A. R A. Mohammadi, S. M. Persyedi & H. R. Nickhah. (2010). Genetic Diversity in Barley Genotypes: II. Microsatellite Markers and Morphological Traits. *Seed and Plant Improvment Journal*, 26-1(2): 150-171. (In Farsi).
8. Irannejad A. & A. Ahmadihah. (2009). Genetic analysis of tobacco using mitochondrial molecular markers and development of a SSCP marker with perfect linkage to cytoplasmic male sterility. *The 6th National Biotechnology Congress of Iran. Tehran-Iran*, 384. (In Farsi).
9. Kalender, R., T. Grob, M. Regina, A. Souniemi & A H. Schulman. (1999). IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theoretical and Applied Genetics*, 98, 704-711.
10. Khayam Nekouei M., R. Jahantighi, M. Solouki, R. Mohammadi & A. A. Emamjomeh. (2009). Study on genetic diversity of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) genotypes using AFLP marker. *Journal Agricultural Sciences and Natural Resource*, 16 (Special issue 1-b). (In Farsi).
11. Lande, R. & R. Thomson. (1990). Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics*, 124, 743-756.

12. Nagaoka, T. & Y. Ogihara. (1997). Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RAPD and RFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 94, 597-602.
13. Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *Am Nat*, 106(949):283e92.
14. Powell W., M. Morgante, C. Andre, J. Vogel, S. Tingey & A. Rafalski. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2, 225-238.
15. Rohlf, F. J. (1998). NTSYSpc –Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (Version 2.0) User Guide. *Applied Biostatistics Inc.*, 3 Heritage Lane, Setauket, New York.
16. Siva Raju, K., M. Sheshumadhav, C. Chandrasekhararao & T.G.K. Murthy. (2009). Molecular diversity in genus *Nicotiana* as revealed by randomly amplified polymorphic DNA. *Indian Journal of Biotechnology*, 8, 61-66.
17. Shannon, C. E. (1948). A mathematical theory of communication. *AT and T Technical Journal*, 27, 379-423.
18. Siahshar, B. A., M. Allahdoo & H. Shahsavand Hassan. (2010). Evaluation of Genetic Diversity of Triticum, Triticale and Wheat Lines through RAPD and ISJ Markers. *Iranian Journal of Agricultural Sciences*, 41(3), 555-568. (In Farsi).
19. VSN International. (2009). GenStat for Windows 12th Edition. *VSN International, Hemel Hempstead, UK*
20. Wicker, T., F. Sabot, A. Hua-Van, J. L. Bennetzen, P. Capy, B. Chalhoub, A. J. Flavell, P. Leroy, M. Morgante, O. Panaud, E. Paux, P. SanMiguel & A. H. Schulman. 2007. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nature Reviews Genetics*, 8, 973-982.
21. Xiao, B. G. & B. C. Yang. (2006). Analysis of genetic differences among flue-cured tobacco varieties by IRAP markers. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 26 (6), 1119-1124.
22. Xiao, B. G. & B. C. Yang. (2007). Assessment of genetic diversity among tobacco germplasms by ISSR markers. *Scientia Agricultura Sinica*, 40 (10), 2153-2161.
23. Yang, B. C., X. J. Chen, B. G. Xiao & C. H. Shi. (2005). Genetic diversity of flue-cured tobacco varieties based on ISSR markers. *Hereditas*, 27(5), 753-758.
24. Yang, B. C., B. G. Xiao, X. J. Chen & C. H. Shi. (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.
25. Yeh, F.C. & R. Yang. (1999). *Popgene Ver. 1.31 Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis Quick User Guide*. University of Alberta And Tim Boyle, Centre for International Forestry Research.
26. Zhang, D., E. Germain, S. Reynders-alosis & M. G. Gandeline. (2005). Development of amplified fragment polymorphism markers for variety identification in rose. *Acta hort*, 508, 113-122.
27. Zhang, H. Y., X. Z. Liu, T. S. Li & Y. M. Yang. (2006). Genetic diversity among flue-cured tobacco (*Nicotiana Tabacum* L.) revealed by amplified fragment length polymorphism. *Botanical Studies*, 47, 223-229.
28. Zhu, J., M. D. Gale & S. Guarrie. (1998). AFLP markers for the study of rice biodiversity. *Theoretical and Applied Genetic*, 96, 602-611.