مجله بیوتکنولوژی کشاورزی

علمی-پژوهشی و ISC

مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت های گل جالیز (*Orobanche* spp.) مزارع توتون شمال غرب ایران

سمانه عابدی[1]، رضا درویش زاده*[2]، ایرج برنوسی[3]، بابک عبدالهی مندولکانی[4]

[1]دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه.

[2]دانشیار گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

[3] دانشیار گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

[4]دانشیار گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

تاریخ دریافت: 1391/09/15، تاریخ پذیرش: 1392/03/02

چکیده

گل‌جالیز (*Orobanche* spp.) پارازیت اجباری ریشه‌ی گیاهان زراعی مختلفی است. جهت بررسی تنوع ژنتیکی 51 نمونه متعلق به جمعیت‌های مختلف از 3 گونه گل جالیز منطقه‌ی شمال‌غرب ایران، 34 آغازگر ISSR استفاده شد. از بین آغازگرهای مورد مطالعه، 20 آغازگر باندهای چند شکل تولید نمودند. از مجموع 261 باند تولید شده توسط آغازگرها، 254 باند (94٪) چندشکل بودند. در بین گونه های مورد مطالعه، گونه "*O. aegyptiaca* Pers." دارای دو باند اختصاصی بود. تجزیه خوشه ای، نمونه های گل جالیز جمع آوری شده را در 6 گروه اصلی قرار داد، بطوریکه تفاوت منطقه‌ی جغرافیایی تاثیر چندانی بر تنوع ژنتیکی نمونه ها نداشت. براساس نتایج تجزیه واریانس مولکولی، تنوع ژنتیکی درون گونه ها 100٪ بود. سطح بالای تنوع ژنتیکی درون گونه ها، ضرورت توجه به تنوع پارازیت در طراحی پروژه‌های اصلاحی، جهت ایجاد مقاومت در گیاهان میزبان را نشان می‌دهد.

واژه های کلیدی: *تنوع ژنتیکی، تجزیه خوشه‌ای ،تجزیه واریانس مولکولی، گل‌جالیز، نشانگر ISSR*

* نویسنده مسئول: رضا درویش زاده تلفن: 04412972785 Email: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

مقدمه

خانواده *Orobanchaceae* از بزرگترین خانواده های گیاهی در میان پارازیت‌های اجباری است. جنس *Orobanche* دارای 170 گونه پارازیت می باشد که از این تعداد، 39 گونه در ایران گزارش شده و 9 گونه انحصاری منطقه‌ی "فلور ایرانیکا" می باشند (Saeidi Mehrvarz *et al.*, 2010; Schneeweiss *et al.*, 2004). مرکز پراکندگی طبیعی گل جالیز (*Orobanche* spp.) منطقه‌ی مدیترانه بوده و در مناطق دیگر یک علف هرز وارداتی است (Paran *et al.*, 1997). گونه-های جنس *Orobanche* باعث خسارت شدید در تعداد زیادی از محصولات زراعی از جمله آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.)، توتون (*Nicotiana tabacum* L.)، شبدر (*Trifolium* spp.)، کلزا (*Brassica oleracea* L.) گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum* Mill.) و یونجه (*Medicago sativa* L.) می‌شوند (Rispail *et al.*, 2007). بدلیل ارتباط مستقیم با میزبان، زندگی طولانی مدت در زیر خاک و تعداد زیاد بذور ریز و پایدار، کنترل گل جالیز بسیار مشکل می باشد. بنابراین، ایجاد گیاه میزبان مقاوم می‌تواند به عنوان یکی از مؤثرترین روش های کنترل آن به حساب آید. در این راستا بررسی تنوع ژنتیکی پارازیت پیش‌نیاز برنامه های اصلاحی است (Buschmann *et al.*, 2005; Roman *et al.*, 2004; Rubiales, 2003). به دلیل تعداد اندک ویژگی‌های در دسترس پارازیت‌های اجباری، بررسی تنوع ژنتیکی آنها با اندازه گیری صفات مورفولوژیک و یا بیوشیمیایی زیاد قابل اعتماد نیست (Verkleij *et al.*, 1986). در دهه های اخیر نشانگرهای مبتنی بر DNA بطور موفقیت آمیزی در تمایز گونه ها و حتی افراد ژنوتیپ‌ها در طیف گسترده‌ای از گیاهان مورد استفاده قرار گرفته است (Ben Harrat *et al.*, 2002). نشانگرهای مولکولی DNA از قبیل RAPD (Roman *et al.*, 2007)، AFLP (Vaz Patto *et al.*, 2008) و ISSR (Benharrat *et al.*, 2002; Buschmann *et al.*, 2005; Roman *et al.*, 2002) در سالهای اخیر به طور گسترده ای در مطالعه سطح تنوع در جمعیت های مختلف گل جالیز استفاده شده است. در بین نشانگرهای مورد استفاده، نشانگر ISSR[1]، یک تکنیک مبتنی بر PCR[2] است که توسط Zietkiewicz *et al.* (1994) معرفی شد. در این تکنیک با استفاده از موتیف‌های SSR به عنوان آغازگر و بدون نیاز به داشتن اطلاعات در مورد توالی‌های مجاور، سطح بالایی از تکرار پذیری و چندشکلی طی فرآیند واکنش زنجیره ای پلی مراز بدست می آید (Bornet *et al.*, 2001). به عنوان مثال، Buschman *et al.* (2005) با استفاده از نشانگرهای ISSR توانستند دو جمعیت گل جالیز که از لحاظ خصوصیات موفولوژیکی قابل تمایز نبودند ولی قدرت بیماری زایی متفاوتی روی تیپ های مختلف توتون داشتند را تشخیص دهند. با توجه به مطالعات محدود در زمینه

[1]. Inter simple sequence repeat
[2]. Polymerase chain reaction

بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت های گل جالیز ایران، مطالعه‌ی حاضر جهت بررسی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌های گل جالیز **مزارع توتون شمال غرب ایران** با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR انجام شد.

مواد و روش ها

در این مطالعه، 51 نمونه متعلق به جمعیت-های مختلف از 3 گونه گل جالیز، از مزارع توتون آلوده به این پارازیت در مناطق مختلف شمال غرب کشور جمع آوری شد. تعداد نمونه-های هر جمعیت بسته به دسترسی به گیاهان گل-جالیز متفاوت بود (جدول 1). استخراج DNA طبق روش CTAB (Doyle and Doyle, 1990) با اندکی تغییرات از گل های تازه ی گیاهان نمونه برداری شده در پژوهشکده‌ی زیست فناوری دانشگاه ارومیه انجام گرفت. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از طریق الکتروفورز ژل آگارز 1٪ و دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی شد. واکنش زنجیره ای پلی مراز با استفاده از 34 آغازگر ISSR (Vancouver, British Columbia, Canada) انجام گرفت (جدول 2). واکنش زنجیره ای پلیمراز در حجم 20 میکرولیتر شامل30 نانوگرم DNA، بافر PCR یک برابر (Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM; pH=8.3) ، 1/5 میلی‌مول $MgCl_2$، 0/2 میکرومول از هر dNTP، 0/5 واحد آنزیم تک پلیمراز و 10 پیکومول از هر آغازگر در ترموسایکلر PerkinElmer–Applied Biosystems انجام شد. برنامه دمایی PCR بصورت: 4 دقیقه واسرشت سازی اولیه در 94 درجه سانتی گراد، 35 چرخه شامل 60 ثانیه در 94 درجه سانتی گراد (جهت واسرشت سازی)، 45 ثانیه در دمای اتصال (بسته به توالی آغازگرها) و 2 دقیقه در 72 درجه سانتی گراد (جهت بسط) و بسط نهایی در 72 درجه سانتی گراد به مدت 10 دقیقه بود. تفکیک محصولات تکثیری با استفاده از ژل آگارز 1/6 Resolute line (Biozyme) درصد و بافر TBE نیم برابر با ولتاژ 70 ولت و رنگ آمیزی توسط اتیدیوم بروماید صورت گرفت.

تجزیه داده ها

وجود یا عدم وجود باند در روی ژل به ترتیب با یک و صفر مشخص گردید و ماتریس داده های نشانگری تشکیل شد. پارامترهای تخمین تنوع ژنتیکی در سطح افراد و جمعیت ها، با نرم افزار GenAlEx6 (Peakall and Smouse, 2006) محاسبه گردید. جهت محاسبه‌ی ضرایب تشابه و تشکیل دندروگرام‌ها روش‌های مختلفی مورد بررسی قرارگرفت.

جدول 1- اطلاعات مربوط به 3 جمعیت (گونه) گل‌جالیز.

Table 1- Informations on 3 *Orobanche* populations.

گونه Species	محل جمع آوری Collecting site	تعداد نمونه Number of sample
Orobanche aegyptiaca (P1)	ارومیه (Urmia)	1-19 (19)
	بوکان (Bukan)	20-26(7)
	مریوان (Marivan)	27-40(14)
	خوی(Khoy)	41-42(2)
Orobanche ramosa (P2)	نقده (Naghadeh)	43-45(3)
	اشنویه (Oshnavieh)	46-48(3)
Orobanche cernua (P3)	نقده (Naghadeh)	49-51(3)
		مجموع 51 Sum 51

کارایی الگوریتم‌های خوشه‌بندی و مناسب بودن آنها بر اساس ضریب همبستگی کوفنتیک تعیین گردید. دندروگرام افراد با استفاده از برنامه‌ی SAHN [1] در نرم‌افزار NTSYS-pc [2] (Rohlf, 1998) رسم گردید. جهت تائید نتایج تجزیه‌ی خوشه‌ای، تجزیه به مختصات اصلی [۳] (Kovach, 1999) انجام شد.

نتایج و بحث

برآورد تنوع ژنتیکی

نمونه های گل جالیز جمع آوری شده از مزارع توتون شمال غرب ایران، متعلق به گونه های *O. aegyptiaca*، *O. ramosa* و *O. cernua* بودند. تحقیقات نشان داده است که گونه های *O. aegyptiaca* Pers.، *O. ramosa* L. و *O. cernua* Loefl. خسارت قابل توجهی به محصولات زراعی در نقاط مختلف کشور وارد می‌نمایند (Minbashi Moini, 2003). به عنوان پیش نیاز برنامه های اصلاح مقاومت میزبان در برابر انگل گل جالیز، تنوع ژنتیکی درون و بین گونه‌ای پارازیت بوسیله‌ی نشانگر های ISSR، مورد بررسی قرار گرفت. از 34 آغازگر ISSR مورد مطالعه، 20 آغازگر چندشکلی نشان دادند (جدول 2). 14 آغازگر باقی مانده، یا اصلاً محصولی تولید نکردند و یا اینکه الگوی باندی واضحی ایجاد ننمودند. تکثیر تمامی 51 نمونه گل جالیز توسط آغازگر A12 دو بار تکرار شد و

[1] Sequential Agglomerative Hierarchical Nesting (SAHN) algorithm

[2]. Numerical Taxonomy SYStem for personal computer

[3]. Principal coordinates analysis

الگوهای باندی بدست آمده تکرارپذیری بالایی (بیش از 95 درصد) نشان دادند.

جدول 2- آغازگرها، دمای اتصال، تعداد کل باند و درصد چندشکلی نشانگرهای ISSR در نمونه‌های گل‌جالیز مطالعه شده

Table 2- Primers, annealing temperature, total number of bands and percentage of polymorphic bands detected by ISSR markers on studied *Orobanche* individuals

درصد چندشکلی Percentage of polymorphism	تعداد کل باند Total number of bands	دمای اتصال (درجه سانتی گراد) Annealing temperature (°C)	توالی (5'→3') Sequence (5'→3')	نام آغازگر Primer name
80	5	44	$(AG)_8T$	UBC807
78.57	14	46	$(AG)_8C$	UBC808
83.33	12	43	$(GA)_8T$	UBC810
100	14	51	$(GA)_8C$	UBC811
86.67	15	49	$(GA)_8A$	UBC812
100	14	50	$(CA)_8T$	UBC816
83.33	12	45	$(CA)_8G$	UBC818
90.91	11	56	$(AC)_8T$	UBC825
89.47	19	47	$(AC)_8G$	UBC827
100	16	40	$(AG)_8YT$	UBC834
100	9	35	(TC)8RG	UBC854
100	13	49	$(AC)_8YG$	UBC857
100	14	51	(ATG)6	UBC864
100	16	42	(G(GA)2)3	UBC880
90.1	11	49	$(AG)_{10}T$	A7
100	9	30	$(GA)_6CC$	A12
85.71	1	52	$(GT)_6CC$	A13
100	14	41	$(CA)_6AC$	CA&AC
100	16	48	$(CA)_6RG$	CA6Rg
100	13	60	$(CAG)_5$	CAg5

در پژوهشی Buschmann *et al.* (2005) برای آزمایش تکرارپذیری نشانگر ISSR فرآیند تکثیر را 5 بار تکرار کردند و نتایج مشابهی را گزارش نمودند. تکرار پذیری بالا به استفاده از آغازگرهای بزرگتر (16-25 واحدی) در ISSR، در مقایسه با آغازگرهای کوتاه مثلا در نشانگر RAPD (10 واحدی) بر می‌گردد که به محقق اجازه‌ی استفاده از دمای اتصال بالاتر (45-60 درجه‌ی سانتی گراد) را داده و باعث بالا رفتن سختگیری در اتصال می‌گردد. بررسی‌ها در مورد تکرارپذیری نشان می‌دهد که تنها ضعیف ترین باندها، قابل تکرار نیستند (Pradeep Reddy *et al.*, 2002). با استفاده از 20 آغازگر مذکور، 261 باند قابل تشخیص ایجاد شد که 254 عدد

از آنها (معادل 94٪) چند شکلی نشان دادند (جدول2). تعداد کل باندهای تولید شده توسط هر آغازگر، بین 19 باند توسط آغازگر (AC)8 G تا 5 باند توسط آغازگر (AG)8T با میانگین 13 بود. تعداد باند چندشکل به ازاء هر آغازگر بین 4 الی 17 با میانگین 12 متغیر بود (جدول 2). میزان چندشکلی بالا در نمونه‌های گل جالیز، نشان دهنده‌ی وجود تنوع ژنتیکی در گونه های گل جالیز و از طرفی کارایی بالای نشانگر ISSR در شناسایی جمعیت‌های مختلف گل جالیز است. توانایی نشانگر ISSR در ارائه‌ی اطلاعات ژنتیکی، به فراوانی ریزماهواره‌ها و توزیع آنها در مقیاس وسیعی از ژنوم گونه‌ها بر می‌گردد (Morgante *et al*., 1993).

در این بررسی عمدتاً از آغازگرهای قلابدار در انتهای '3 استفاده شد. قلابدار کردن آغازگر با 1–4 نوکلئوتید هرز در انتهای '3 یا '5، اطمینان اتصال در انتهای یک ریزماهواره در DNA ی الگو را تضمین می کند. در نتیجه، مشکل اسمیر و اتصال داخلی رفع می‌شود. بر اساس نتایج Pradeep Reddy *et al.* (2002) آغازگر های قلاب‌شده در انتهای '3، در مقایسه با آغازگرهایی که در انتهای '5 قلابدار شده اند، الگوهای باندی واضح‌تری ایجاد می نمایند. در بررسی های Benharrat *et al.* (2002) آغازگرهای بدون قلاب تنها یک یا دو نشانگر چندشکل تولید کردند در حالیکه آغازگرهای قلابدار چند شکلی بیشتری نشان دادند. معمولا تکرارهای دی نوکلئوتیدی قلاب شده در انتهای '3 یا '5 در مقایسه با تکرارهای چند نوکلئوتیدی دیگر، چند شکلی بالایی نشان می‌دهند. در میان گونه های مورد مطالعه 2 باند اختصاصی در P1 (*O. aegyptiaca*) مشاهده شد. Roman *et al.* (2007) در بررسی تنوع ژنتیکی دو نمونه ی *O. gracilis* از نواحی مختلف اسپانیا، با استفاده از نشانگر RAPD، هیچ باند اختصاصی مشاهده نکردند. مقادیر هتروزیگوسیتی نشان می‌دهد که در جمعیت "*O. aegyptiaca*" تنوع ژنتیکی بیشتری وجود دارد (جدول3). دیگر مشخصات مکان‌های ISSR تکثیر شده در گونه های مختلف گل‌جالیز در جدول 3 آمده است. بررسی تنوع ژنتیکی درون و بین گونه های پارازیت، پیش نیاز شناسایی منابع مقاومت در برنامه‌های گزینش و تعیین استراتژی لازم برای اصلاح گیاهان میزبان مقاوم در مقابل پارازیت است (Roman *et al*., 2004; Satovic *et al*., 2009). از آنجا که نشانگرهای ISSR سطوح بسیار پایین تنوع ژنتیکی را بخوبی نمایان می کنند، می‌توانند در مطالعات ژنتیک جمعیت گونه‌های گیاهی بکار - روند. اولین گزارش بکارگیری نشانگر ISSR در بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گل‌جالیز، توسط Benharrat *et al.* (2002) ارائه شد. در این مطالعه بخوبی کارایی این نشانگر در این زمینه نشان داده شد. بطوریکه علیرغم پیچیدگی زیردسته‌ی Minores، نشانگر ISSR توانست تمایز خوبی بین گونه‌های آن نشان دهد، حال‌آنکه مطالعه توسط نشانگر RFLP یا توالی rbcL نتوانست دو گونه‌ی *O. hederae* و *O.*

amethystea را به خوبی تفکیک نماید (Benharrat *et al*., 2000).

جدول 3- مشخصات مکان های ISSR تکثیر شده در جمعیت‌های گل‌جالیز.

Table 3- Characteristics of amplified ISSR loci on studied *Orobanche* populations.

Populations	P1 (*Orobanche aegyptiaca*)	P2 (*Orobanche ramosa*)	P3 (*Orobanche cernua*)
No. Bands[a]	261	255	221
No. Bands Freq. >= 5%[b]	261	255	221
No. Private Bands[c]	1	0	0
No. LComm Bands (<=25%)[d]	0	0	0
No. LComm Bands (<=50%)[e]	0	0	0
Mean He[f]	0.38	0.33	0.23
Standard error of Mean He	0.01	0.01	0.01
%P[g]	93.87	85.44	55.56

[a] No. Bands = Number of bands.
[b] No. Bands Freq. >= 5% = Number of bands with a frequency >= 5%.
[c] No. Private Bands = Number of bands unique to a single population.
[d] No. LComm Bands (<=25%) = Number of locally common bands (Freq. >= 5%) found in 25% or fewer populations.
[e] No. LComm Bands (<=50%) = Number of locally common bands (Freq. >= 5%) found in 50% or fewer populations.
[f] He = Expected heterozygosity = $2 \times p \times q$. (p_{ij} is the frequency of jth band at i^{th} locus).
[g] %P = Percentage of polymorphic loci.

بررسی روابط افراد و جمعیت ها

جهت محاسبه‌ی ضریب تشابه و تشکیل دندروگرام روش‌های مختلفی مورد بررسی قرار گرفت. کارایی الگوریتم‌های خوشه بندی و مناسب بودن آنها بر اساس ضریب همبستگی کوفنتیک تعیین گردید. این ضریب، معیاری برای سنجش میزان همبستگی بین تشابهات نشان داده شده بر روی دندروگرام و مقدار واقعی تشابه است. از بین روش‌های مورد بررسی بیشترین مقدار (0/69) مربوط به الگوریتم UPGMA بر اساس ضریب تشابه جاکارد بود؛ بنابراین دندروگرام با استفاده از این روش، جهت نمایش روابط خویشاوندی افراد مورد مطالعه تشکیل شد. کمترین میزان تشابه ژنتیکی (0/33) بین نمونه-های "19" و "30" به ترتیب از ارومیه و مریوان مشاهده شد. این دو نمونه هر دو متعلق به گونه‌ی *O. aegyptiaca* بودند. بیشترین تشابه ژنتیکی (0/68) بین نمونه‌های "41" و "44" به ترتیب متعلق به دو منطقه خوی و نقده مشاهده شد. نمونه‌ی خوی از گونه‌ی *O. aegyptiaca* و نمونه‌ی نقده از گونه‌ی *O. ramoas* بود. این دو گونه هر دو متعلق به دسته‌ی Trionychon بوده و از لحاظ مورفولوژی بسیار شبیه به هم و هر دو

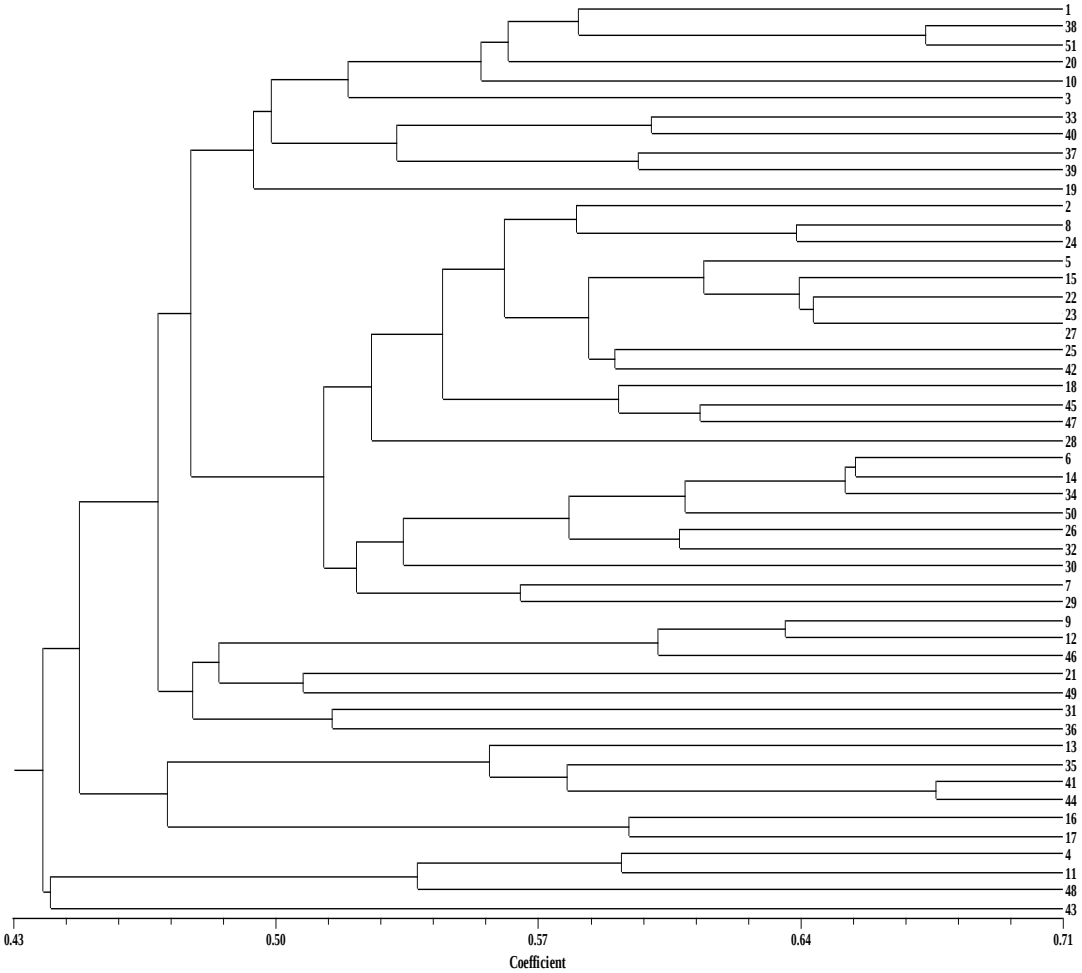
دارای ساقه‌ی شاخه دار می باشند. همچنین دارای دامنه‌ی میزبانی و تعداد کروموزوم یکسان هستند (Paran *et al*., 1997). بر اساس دندروگرام بدست آمده بر مبنای الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه جاکارد، افراد مورد مطالعه در 6 گروه اصلی قرار گرفتند (شکل 1). بطور کلی، نمونه‌ها از گونه های مختلف در سرتاسر دندروگرام پراکنده بودند که این مساله تنوع درون‌جمعیتی بالا را نشان می‌دهد. برای مثال، نمونه‌های 49، 50 و 51 متعلق به گونه‌ی *O. cernua* که هر سه از یک منطقه جمع‌آوری شده بودند، در گروه‌های مجزا قرار گرفتند. این نشان-دهنده ی‌آنست که دو فرد، که از نظر محل جمع-آوری بسیار به هم نزدیک بودند، الگوهای باندی متفاوتی ایجاد کردند. این نتیجه از سویی مؤید کارایی نشانگر مورد استفاده در تمایز جمعیت‌های گل‌جالیز بوده و از سوی دیگر اعلان یک هشدار جدی در مورد خطر تنوع بالای گل جالیز در منطقه و مشکل مبارزه با آنهاست. نتایج مشابهی توسط Benharrat *et al.* (2002) در مورد گونه‌ها و جمعیت‌های گل‌جالیز با استفاده از نشانگر ISSR بدست آمد.

فاصله‌ی ژنتیکی جمعیت ها از 0/062 بین جمعیت های "*O. aegyptiaca*" و "*O. ramosa*" تا 0/194 بین جمعیت های "*O. ramosa*" و "*O. cernua*" متغیر بود. گونه‌ی *O. cernua* متعلق به دسته‌ی Osproleon است که بوسیله‌ی ساقه‌ی غیر منشعب خود شناخته می-شود (Paran *et al*., 1997) در حالی که دو گونه *O. aegyptiaca* و *O. ramosa* هر دو متعلق به دسته‌ی Trionychon بوده و از لحاظ مورفولوژی بسیار شبیه به هم و هر دو دارای ساقه‌ی شاخه دار می باشند. در اصلاح گیاهان زراعی، یکی از معیارهای انتخاب والدین برای تلاقی و بهره مندی از پدیده‌ی هتروزیس، فاصله‌ی ژنتیکی می-باشد. معمولا هر چه والدین از لحاظ صفات مختلف فاصله‌ی بیشتری داشته باشند تنوع و هتروزیس بیشتری در نتاج مشاهده خواهد شد (Falconer and Mackay, 1997). هر چند این مساله در گیاهان زراعی پدیده‌ای مطلوب محسوب می‌شود، اما در مورد علف‌های هرز یک پدیده‌ی خطرناک است که ممکن است منجر به ایجاد پارازیت‌های قدرتمندتر و یا توسعه دامنه میزبانی پارازیت (انتقال به گونه‌های جدید میزبان) برای تامین بهتر مواد مورد نیاز شود.

تجزیه واریانس مولکولی

نتایج تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA[1]) (Excoffier *et al*., 1992) حاکی از تنوع بالای درون گونه ای بود (جدول 4). Roman *et al.* (2007) در بررسی جمعیت‌های *O. gracilis* var. gracilis جمع‌آوری شده از شمال اسپانیا توسط نشانگر RAPD، درصد بالایی از تنوع (80/09) در درون جمعیت‌ها مشاهده کردند.

[1]. Analysis of molecular variance



شکل 1- دندروگرام حاصل از تجزیه‌ی خوشه‌ای به روش UPGMA مبتنی بر ضریب تشابه جاکارد در 51 نمونه گل‌جالیز.

Figure 2- Dendrogram of 51 *Orobanche* individuals based on UPGMA algorithm and Jaccard's similarity coefficient using ISSR data

جدول 4- تجزیه واریانس مولکولی روی جمعیت های (گونه های) گل جالیز.

Table 5- Analysis of molecular variance (AMOVA) on *Orobanche* populations.

Source of variation	df	SS	MS	Est Var	%	Stat	Value	P(rand >= data)
Among populations	2	117.34	58.67	0.00	0%	PhiPT	0.019	0.023
Within populations	48	2980.01	62.09	62.01	100%			
Total	50	3097.43		62.01	100%			

df = degrees of freedom; SS: sum of square; MS = mean of squares; Est Var = estimated variance; PhiPT is an analogue of F_{st}.

همچنین Vaz Patto *et al.* (2008) با بکار بردن نشانگر AFLP بیشترین تنوع ژنتیکی (86/3) را در بین افراد درون جمعیت‌های *O. foetida* گزارش کردند. مطالعات در رابطه با سطح تنوع و سیستم تلاقی، نشان داده اند که در گیاهان دگرگشن، درصد تنوع ژنتیکی درون جمعیتی بالاتر از بین جمعیتی است. در حالیکه الگوی تنوع در گیاهان خودگشن، بر خلاف این است. گونه‌های خودگرده‌افشان تنوع بین‌جمعیتی بالایی نشان می‌دهند (Nybom and Bartish, 2000; Satovic *et al*. 2009). بر این اساس هر چند در اینجا گواهی بر نوع سیستم تلاقی همه‌ی جمعیت‌های مورد مطالعه وجود ندارد، سطح بسیار پایین تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های مورد مطالعه، مشابه نتیجه‌ای است که در مورد گونه-های دگرگرده‌افشان مانند *O. crenata* در مطالعات قبلی بدست آمده است (Roman *et al*., 2001; Roman *et al*., 2002). در پژوهشی Roman *et al*. (2007) دو نتیجه‌ی متفاوت در مورد یک گونه، از دو منطقه ی جغرافیایی مختلف گزارش کردند؛ بطوری که هر کدام از آنها الگوی تنوعی شبیه گونه‌های خودگرده‌افشان و یا دگرگرده‌افشان نشان دادند. البته انتقال بذر از یک مکان به مکان دیگر توسط انسان یا ادوات کشاورزی نیز می‌تواند نقش اساسی در سطح بالای تنوع درون‌جمعیتی داشته باشد.

نتیجه گیری کلی

از آنجا که روش‌های متداول کنترل گونه-های گل‌جالیز در مزارع توتون موثر نیستند، نیاز به ایجاد روش‌های جدید مبارزه وجود دارد. ایجاد گیاه میزبان مقاوم می‌تواند به عنوان یکی از مؤثرترین روش های کنترل به حساب آید. با این حال، مکانیزم‌ها و یا منابع طبیعی مقاومت در توتون تاکنون شناسایی نشده است (Buschmann *et al*., 2005). بررسی تنوع درون و بین جمعیت‌های پارازیت، جهت شناسایی منابع مقاومت در برنامه‌های گزینش امری ضروری است. از سوی دیگر، وجود تنوع ژنتیکی یکی از محدودیت‌های کنترل مؤثر پارازیت بوده و تهدیدی برای میزبان‌های متفاوت و راهبردهای کنترل محسوب می‌شود. نتایج این بررسی نشان داد که نشانگر ISSR ابزاری مناسب جهت مطالعه‌ی تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گل جالیز است و توانایی تمایز افراد با منطقه‌ی جغرافیایی نزدیک به هم را دارا می‌باشد. نتایج نشان داد که روابط ژنتیکی بین افراد مورد مطالعه با منطقه‌ی جغرافیایی آنها دارای ارتباط مشخصی نیست. به عبارت دیگر منطقه‌ی جغرافیایی نتوانست در گروه‌بندی افراد تاثیر واضحی بگذارد. ولی تفکیک بر اساس جایگاه رده بندی نمونه ها در دندروگرام جمعیت قابل ملاحظه است. آنچه به نظر می‌رسد این است که، بر اساس نتایج حاصل و با توجه به سطح بالای تنوع ژنتیکی در درون جمعیت‌های مورد مطالعه، گل‌جالیز از تهدیدات جدی کشاورزی در منطقه‌ی شمال غرب ایران

محسوب می‌شود. همچنین این گونه‌ها توانایی انتقال از یک گونه‌ی میزبان و آلوده کردن میزبان جدید را دارند. بنابراین اصلاح برای مقاومت باید در برنامه‌های آتی اصلاح توتون در منطقه مورد توجه قرار گیرد.

منابع

Minbashi Moini M (2003). Broomrape (Botany, Biology, Ecology and Methods of control). Research Institute of Pests and Plant Diseases, Iran, P. 24.

Benharrat H, Delavault P, Theodet C, Figureau C, Thalouarn P (2000). rbcL plastid pseudogene as a tool for *Orobanche* (subsection Minores) identification. Plant Biology 2: 34–39.

Benharrat H, Veronesi C, Theodet C, Thalouarn P (2002). *Orobanche* species and population discrimination using inter-simple sequence repeat (ISSR). Weed Research 42: 470–475.

Bornet B, Branchard M (2001). Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. Plant Molecular Biology Reporter 19: 209-215.

Buschmann H, Gonsior G, Sauerborn J (2005). Pathogenicity of branched broomrape (*Orobanche ramosa*) populations on tobacco cultivars. Plant Pathology 54: 650–656.

Doyle J, Doyle J, (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19: 11–15.

Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitocondrial DNA restriction sites. Genetics 131: 479–491.

Falconer DS, Mackay TFC (1997). Introduction to quantitative genetics. Longman Press, Essex. P. 180.

Kovach W (1999). MVSP-A Multivariate Statistical Package for Windows, ver. 3.1. Kovach Computing Services, Pentraeth, Wales, UK.

Morgante M, Olivieri AM (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. Plant Journal 3: 175–182.

Nybom H, Bartish IV, (2000). Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics 3: 93–114.

Paran I, Gidoni D, Jacobsohn R (1997). Variation between and within broomrape (*Orobanche*) species revealed by RAPD markers. Heredity 78: 68–74.

Peakall R, PE Smouse (2006). GENALEX 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes 6: 288–295.

Pradeep Reddy M, Sarla N, Siddiq E (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euphytica 128: 9–17.

Rispail N, Dita MA, Gonzalez-Verdejo C, Pérez-de-Luque A, Castillejo MA, Prats E, Roman B, Jorrin,J, Rubiales D (2007). Plant resistance to parasitic plants: molecular approaches to an old foe. New Phytologist 173: 703–712.

Rohlf FJ (1998). NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.02. Exter Software, Setauket, New York, NY, USA.

Roman B, Hernandez R, Pujadas-Salva AJ, Cubero JI, Rubiales D, Satovic Z (2007). Genetic diversity in two variants of *Orobanche gracilis* Sm. [var. gracilis and var. deludens

(Beck) A. Pujadas] (*Orobanchaceae*) from different regions of Spain. Electronic Journal of Biotechnology 10: 221-229.

Roman B, Rubiales D, Torres AM, Cubero JI, Satovic Z (2001). Genetic diversity in *Orobanche crenata* populations from southern Spain. Theoretical and Applied Genetics 103: 1108–1114.

Roman B, Satovic Z, Rubiales D, Joel DM, Cubero JI (2004). Biodiversity in *Orobanche crenata* in the Mediterranean region. a review. Proc of 8th International Parasitic Weeds Symposium, June. 24-25, 2004. Durban, South Africa. p. 15.

Roman B, Satovic Z, Rubiales D, Torres AM, Cubero JI, Katzir N, Joel DM (2002). Variation among and within populations of the parasitic weed *Orobanche crenata* from Spain and Israel revealed by inter simple sequence repeat markers. Phytopathology 92: 1262-1266.

Rubiales D (2003). Parasitic plants, wild relatives and the nature of resistance. New Phytologist 160: 459–461.

Saeidi Mehrvarz Sh, Torabi A, Aghabeigi F (2010). Notes on the genus *Orobanche* (Orobanchaceae) in Iran. Iranian Journal of Botany 16: 107-113.

Satovic Z, Joel DM, Rubiales D, Cubero JI, Roman B (2009). Population genetics in weedy species of *Orobanche*. Australasian Plant Pathology 38: 228-234.

Schneeweiss GM, Palomeque T, Colwell AE, Weiss Schneeweiss H (2004). Chromosome numbers and karyotype evolution in holoparasitic *Orobanche* (*Orobanchaceae*) and related genera. American Journal of Botany 91: 439–448.

Vaz-Patto MC, Diaz-Ruiz R, Satovic Z, Roman B, Pujadas-Salva AJ, Rubiales D (2008). Genetic diversity of Moroccan populations of *Orobanche foetida*: evolving from parasitising wild hosts to crop plants. Weed Research 48: 179–186.

Verkleij JAC, Janssen J, Pieterse AH (1986). A preliminary study on *Orobanche crenata* and *aegyptiaca* from Syria. In: Proceeding of Biology and Control on *Orobanche*. Wageningen, The Netherlands, pp. 154–159.

Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification. Genomics 20: 176-183.

Study on genetic variability of *Orobanche* populations infecting tobacco in northwest Iran

Abedi S.[1], Darvishzadeh R.*[2], Bernousi I.[3], Abdollahi Mandoulakani B.[4]

[1]MSc, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Iran.
[2]Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Iran.
[3]Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Iran.
[4]Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Iran.

Abstract

Orobanche spp. is holoparasitic plant, parasitising roots of different crops. Genetic polymorphism was investigated among and within 3 *Orobanche* species collected from different regions of northwest Iran, using ISSR markers. Out of 34 ISSR primers tested, 20 were found to be polymorphic and produced clear bands. 261 discernible bands were generated with 254 (94%) being polymorphic. Among studied species, *"O. aegyptiaca"* showed 2 unique bands. Clustering algorithm was divided collected *Orobanche* specimens into 6 main groups. It was obvious that genetic relationships among studied landraces did not have force tendency to associate with their geographic origins. According to AMOVA, 100% of the total variation was partitioned within species. Such variability is important for any attempt to develop resistant host crops against parasite.

Keywords: *AMOVA, broomrape, cluster analysis, genetic diversity, ISSR markers.*

* Corresponding Author: Darvishzadeh R. Tel: 04412972785 Email: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir