مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره 5، شماره 2، تابستان 1392)

بررسی تنوع ژنتیکی ارقام توتون دسته بارلی و ویرجینیا با استفاده از چند شکلی طولی قطعات تکثیری

احمدرضا دادرس[1]، حسین صبوری[2]، قاسم محمدی‌نژاد*[3]، عاطفه صبوری[4]، مرداویج شعاعی دیلمی[5]

1- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، بخش زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان.
2- عضو هیات علمی گروه تولیدات گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس.
3- عضو هیات علمی بخش زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید باهنر کرمان.
4- عضو هیات علمی گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان.
5- پژوهشگر بخش اصلاح نباتات مرکز تحقیقات توتون رشت.

تاریخ دریافت: 1391/5/5، تاریخ پذیرش: 1391/7/18

چکیده

با توجه به اهمیت توتون از نظر اقتصادی و نقش آن به عنوان یک گیاه مدل در پژوهش‌های مولکولی در پژوهش حاضر به بررسی میزان شباهت ژنتیکی 50 ژنوتیپ توتون از دو دسته بارلی و ویرجینیا پرداخته شد. به منظور تعیین ژنوتیپ از 21 ترکیب آغازگری نشانگر AFLP استفاده شد. از تعداد کل 480 نوار ایجاد شده، با تعداد متوسط 17/76 نوار در هر ترکیب، 373 نوار چندشکل بودند. با توجه به میانگین درصد چندشکلی بالا (77/45 درصد) می‌توان انتظار داشت بتوان برای شناسایی تنوع ژنتیکی موجود در ارقام از این نشانگر به عنوان ابزاری قدرتمند در برنامه‌های اصلاحی توتون استفاده نمود. بررسی ضرایب ژنتیکی جاکارد نشان داد ژنوتیپ-های Badisher Burley E، Pennbel69، R9 و Coker 176 واجد بالاترین فاصله ژنتیکی از بقیه ژنوتیپ‌ها هستند. لذا، به نظر می‌رسد بتوانند در برنامه‌های اصلاحی از جمله هیبریداسیون و تشکیل جمعیت‌های در حال تفرق برای مکان‌یابی QTL ارزشمند باشند. نتایج تجزیه واریانس مولکولی نیز 4 درصد از کل تنوع ژنتیکی موجود در بین ژنوتیپ‌ها را تنوع بین دو دسته بارلی و ویرجینیای گرمخانه‌ای برآورد نمود و 96 درصد از تنوع موجود را در درون دسته‌ها نشان داد. همچنین بررسی آماره‌های تنوع ژنتیکی نشان داد ترکیبات آغازگری E060-M160، E070-M140، E070-M150 و E070-M160، E080-M160، E080-M150، E100-M140 و E100-M150 درکل به عنوان قدرتمندترین نشانگرها از بین کل ترکیبات آغازگری در ارزیابی و تشخیص روابط بین ژنوتیپ‌های توتون مورد مطالعه هستند و می‌توانند در سایر پژوهش‌های توتون مورد توجه قرار گیرند.

کلمات کلیدی: *تجزیه واریانس مولکولی، تنوع ژنتیکی، توتون، AFLP.*

*نویسنده مسئول: قاسم محمدی نژاد تلفن: 09133415937 Email: Mohammadinejad@uk.ac.ir

مقدمه

توتون (*Nicotiana tabacum* L.) از تیره سولاناسه (Solanaceae) گیاهی است یکساله و علفی که به منظور برداشت برگ‌هایش کشت می‌شود. در ایران کشت توتون برای اولین بار در سال 1292 در گیلان انجام گردید. توتون از نظر اقتصادی یکی از مهمترین گیاهان غیرخوراکی در دنیاست به‌طوری‌که طبق آخرین گزارش فائو عملکرد توتون به طور متوسط در کل دنیا به 17838 هکتوگرم در هکتار رسیده است (FAO, 2010). توتون نقش بسیار مهمی در اقتصاد کشاورزی کشورهای تولید کننده دارد به‌طوری‌که درآمد حاصل از فرآورده‌های مختلف آن، میزان قابل توجهی از درآمد این کشورها را تشکیل می‌دهد. بنابرگزارش شرکت جهانی توتون، در سال 2007، تقریباً 4916 میلیون کیلوگرم توتون در سراسر جهان تولید شده است (ULTCI, 2008). گیاه توتون از جنبه‌های بسیاری یک گیاه مهم ژنتیکی به حساب می‌آید و در چند دهه گذشته به عنوان یکی از مهمترین سیستم‌های مدل در بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک بوده و در بیان ژن‌های انتقال یافته یک گیاه استراتژیک محسوب می‌شود. به دلیل اهمیت اقتصادی و ارزش توتون در پژوهش‌های بیولوژیکی، مطالعات متعددی جهت آگاهی از منشأ تکاملی، تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی ژنتیکی آن صورت گرفته است (Ren and Timko, 2001). بنابراین، بالابردن کمی و کیفی این محصول از جایگاه ویژه‌ای برای به‌نژادگران برخوردار است.

در اصلاح نباتات تنوع ژنتیکی از ملزومات اصلاح گیاه است که از تکامل طبیعی نشات گرفته و مهمترین جزء در پایداری نظام‌های بیولوژیکی است. به طور حتم اطلاع از محتوی و سطح تنوع ژنتیکی منابع گیاهی هر محصول مهمترین گام در جهت برآورد اهداف اصلاحی می‌باشد (Abd Mishahni and Shahnejat Bushehri, 1997). بر این اساس امروزه توجه به تنوع ژنتیکی باقیمانده در خزانه های ژنتیکی ژرم پلاسم گونه‌های زراعی که در برنامه‌های اصلاحی مورد استفاده قرار می‌گیرند همچنان رو به افزایش است. به طور کلی می‌توان اذعان داشت شناخت خویشاوندی‌های ژنتیکی به منظور مدیریت ژرم‌پلاسم، حفظ و نگهداری آن، انگشت نگاری‌های ژنتیکی،گزینش ژنوتیپ‌ها، تهیه نقشه‌های ژنتیکی، تعیین مکان و جداسازی ژن‌ها و همچنین شناسایی والدین مطلوب جهت تولید واریته‌های هیبرید و در نهایت تدوین برنامه‌های به-نژادی از اهمیت به سزایی برخوردار است (Fufa, *et al.*, 2005). از سوی دیگر افزایش تقاضا و نیازمندی‌های مصرف کننده بعلاوه تأکید بر روی تولید سریع ارقام جدید، اصلاح‌گران را ناگزیر به استفاده از راهکارهای مولکولی به همراه روش‌های اصلاح سنتی، به عنوان مکمل این روش‌ها می‌نماید (Moon *et al.* ,2009). در طول دو دهه اخیر پیشرفت‌های چشم‌گیر در زمینه اصلاح‌نباتات

مولکولی مخصوصاً فناوری نشانگرهای DNA، ابزارهای جدیدی را برای بالا بردن کارایی روش‌های اصلاحی فراهم نموده‌اند. ارزیابی تنوع ژنتیکی در ارقام توتون نیز به‌ویژه با استفاده از نشانگرهای مولکولی همانند سایر گیاهان در بهبود و اصلاح طولانی مدت این گیاه بسیار حائز اهمیت می‌باشد. تنوع ژنتیکی را می‌توان با فناوری نشانگرهای DNA، که بررسی مستقیم ژنوم بدون متأثر شدن از محیط را امکان پذیر می‌سازد بررسی کرد (Doveri *et al.*, 2008). از مرسوم‌ترین نشانگرهای DNA می‌توان RFLP، RAPD، AFLP، ریزماهواره‌ها و ISSR را نام برد (Muthusamy *et al.*, 2008).

نشانگر AFLP (Amplified fragment length polymorphism) یا چندشکلی طولی قطعات تکثیری از جمله مهمترین نشانگرهای DNA است که با استفاده از این روش به طور همزمان حدود 50-10 ناحیه ژنومی با اندازه تقریبی 500-80 جفت باز تکثیر می‌شود و دارای تکرار پذیری بالایی است (Guo *et al.*, 2005). این نشانگر یکی از انواع نشانگرهای مبتنی بر PCR است که ترکیبی از RFLP و RAPD بوده و شامل هضم DNA ژنومی با آنزیم های برشی خاص و اتصال سازگارسازهای چند نوکلئوتیدی کوتاه به انتهای قطعات برش یافته و سپس تکثیر قطعات ایجاد شده با کمک PCR می‌باشد. این روش تفاوت در مکان های برشی را آشکار می‌کند و حساسیت بسیار زیادی در آشکار سازی چند شکلی در سراسر ژنوم دارد و بدلیل قابلیت تکرار پذیری بالا بر RAPD برتری دارد. همچنین بدلیل عدم نیاز به اطلاعات اولیه در مورد ژنوم مورد مطالعه و نیز سرعت و درجه اطمینان بالا، امروزه بطور وسیعی برای تهیه نشانگرهای چند شکل استفاده می شود (Farsi and Zolala, 2003). در مطالعه‌ای که با استفاده از نشانگرهای RAPD و AFLP برای بررسی تنوع ژنتیکی بین 28 رقم توتون گرمخانه‌ای در مرکز پرورش و اصلاح نژاد توتون درجنوب چین صورت گرفت، تعداد 78 نوار RAPD و 154 نوار AFLP از ارزیابی به دست آمد. تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA ارقام را به سه خوشه اصلی گروه‌بندی کرد که ارقام هر خوشه از لحاظ شجره مشابه بودند (Zhang *et al.*, 2008).

در پژوهش دیگری تنوع ژنتیکی 19 رقم توتون در تایلند با استفاده از نشانگر AFLP، مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه مذکور سه ترکیب آغازگری از بین 32 ترکیب برای بررسی درجمعیت مذکور انتخاب شدند که از بین 139 نوار قابل امتیاز دهی، 103 نوار (74/1%) چند شکل بودند. در مطالعه آنها مطابقت قابل توجهی بین منشاء ارقام و گروه‌بندی حاصل از ارزیابی ژنتیکی AFLP وجود داشت به طوری‌که ارقام بومی شباهت ژنتیکی بالایی نشان دادند (Denduangboripant *et al.*, 2010). همچنین تنوع ژنتیکی 28 رقم توتون با استفاده از نشانگر AFLP، در مرکز پرورش و اصلاح نژاد توتون، در استان یونان در جنوب غربی

چین مورد مطالعه قرار گرفت. در این پژوهش با استفاده از 10 ترکیب آغازگری، 154 نوار چند شکل از 561 نوار شناسایی شد و متوسط تعداد نوار چند شکل برای هر جفت آغازگر، 15/4برآورد شد. در این بررسی گروه‌بندی ارقام و شناسایی ارقام از لحاظ خویشاوندی به عنوان یکی ابزارهای مؤثر برای حفاظت از ژرم پلاسم عنوان شد (Liu *et al.*, 2009). با توجه به اهمیت توتون به عنوان یک محصول اقتصادی مهم و نقش نشانگرهای مولکولی به‌ویژه AFLP در بررسی تنوع ژنتیکی، پژوهش حاضر با هدف تعیین میزان شباهت و تنوع موجود بین ژنوتیپ‌های توتون طراحی گردید تا بدین‌وسیله قدرتمندترین ترکیبات آغازگری در تعیین میزان تمایز بین ژنوتیپ‌ها مشخص گردند.

مواد و روشها

مواد گیاهی

اسامی و منشاء 50 ژنوتیپ توتون که در این پژوهش مورد مطالعه قرار گرفتند در جدول 1 آورده شده است. تعداد 17 ژنوتیپ از دسته بارلی و تعداد 33 ژنوتیپ از دسته ویرجینیای گرمخانه‌ای انتخاب شد. بذور ژنوتیپ‌های مذکور از مرکز تحقیقات توتون رشت تهیه شد و سپس در آزمایشگاه ژنتیک دانشگاه گنبد کاووس به صورت خزانه شناور کشت گردید. خزانه شناور از دو بخش اصلی بستر آبی[1] و بستر شناور[2] تشکیل یافته است. بستر آبی شامل محلول غذایی حاوی قارچ‌کش بوده که در داخل حوضچه‌ای به ارتفاع حدود 20 سانتی‌متر و ابعاد دلخواه قرار داشت. بستر شناور شامل سینی‌های استیروفومی حفره دار حاوی بستر کشت و بذر بود. در این پژوهش از نسبت 70% پرلیت و 30% کود دامی پوسیده شده به عنوان بستر کشت استفاده شد (Hartley *et al.*, 2001). پس از رشد کافی گیاهچه‌ها (درمرحله 4 تا 5 برگی)، نمونه‌های برگی تهیه شد و بدنبال آن استخراج DNA به روش CTAB (Saghai Maroof *et al.*, 1994)تغییر یافته (Sabouri *et al.*, 2009) انجام شد. سپس DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز 0/8 درصد به همراه فاژ لامبدا جهت تعیین کمیت و کیفیت برده شد.

تجزیه AFLP

روشAFLP مطابق روش وس و همکاران (Vos *et al.* , 1995) انجام شد. پانصد نانوگرم از DNAژنومی با پنج واحد از آنزیم های محدودگر *Eco*RI و *Mse*I به مدت سه ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد مورد هضم قرار گرفتند. در ادامه سازگارسازهای *Eco*RI و *Mse*I به مدت دوساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد و یک ساعت در دمای 20 درجه سانتیگراد به انتهای DNA برش یافته

[1]. Water bed
[2]. Float bed

متصل شدند. سپس در مرحله بعد نمونه‌های حاصل از مرحله قبل به نسبت 5:1 رقیق شدند و با آغازگرهای *Eco*RI و *Mse*I واجد یک نوکلئوتید انتخابی در انتهای '3 با توالی‌های زیر مورد تکثیر پیش انتخابی قرار گرفتند.

آغازگر *Mse*1 :

5'-GATGAGTCCTGAGTAA**A**-3'

آغازگر *Eco*R1:

5'-GACTGCGTACCAATTC**A**- 3'

چرخه‌های حرارتی در این مرحله به تعداد 30 بار و با برنامه 94 درجه سانتیگراد به مدت 30 ثانیه، 60 درجه سانتیگراد به مدت 30 ثانیه، 72 درجه سانتیگراد به مدت 60 ثانیه بود. سپس محصولات حاصل از تکثیر پیش انتخابی به نسبت 5:1 رقیق شده و با 21 ترکیب آغازگری دارای 2 نوکلئوتید انتخابی علاوه بر یک نوکلئوتید اضافه شده در مرحله پیش تکثیر در انتهای '3، تحت چرخه حرارتی Touch down شامل سه مرحله دمایی مختلف تکثیر شدند. فراورده‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از الکتروفورز ژل پلی‌اکریل‌آمید واسرشته‌ساز شش درصد تفکیک و با روش نیترات نقره رنگ آمیزی شدند. امتیازدهی نوارها به صورت صفر و یک به ترتیب برای عدم حضور و حضور نوار باندی انجام گرفت.

تجزیه‌های آماری

پس از تشکیل ماتریس صفر و یک و انتقال آن به نرم‌افزار GGT، تشکیل ماتریس فاصله ژنتیکی جاکارد، تجزیه خوشه‌ای امکان‌پذیر شد. با در نظر گرفتن دو دسته توتون بارلی و ویرجینیای گرمخانه‌ای به عنوان دو جمعیت، تجزیه واریانس مولکولی با استفاده از برنامه GenAlEx 6.41 انجام شد و سرانجام برای برآورد آماره‌های تنوع ژنتیکی نیز از نرم‌افزار PopGene 32 و Excel استفاده شد. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) نیز مطابق رابطه PICi= 2 fi(1-fi) برآورد شد. در این رابطه PICi، PIC نشانگر iام، fi فراوانی قطعه نشانگر iام هنگام وجود و (1-fi) فراوانی قطعه نشانگر iام در حالت عدم وجود نوار است این رابطه برای نشانگرهای غالب مثل AFLP پیشنهاد شده است (Roldain-Ruiz, 2000). سایر آماره‌ها شامل درصد چندشکلی، ضریب تنوع ژنتیکی نی، تعداد الل مؤثر و آماره تنوع ژنتیکی برای تمایز جمعیت‌ها (G_{ST}) با استفاده از نرم‌افزار PopGene 32 محاسبه شد. در این نرم‌افزار آماره G_{ST}[1] بر اساس رابطه زیر محاسبه گردید.

$$G_{ST}=\frac{H_T-H_S}{H_T}=\frac{D_{ST}}{H_T}$$

در این رابطه، H_T، H_S و D_{ST} بترتیب تنوع ژنتیکی کل، میانگین وزنی تنوع ژنتیکی درون جمعیت و تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها می‌باشد (Nei, 1973).

[1]. Genetic diversity statistics

جدول 1- اسامی ژنوتیپ‌ها همراه با منشاء آنها بر طبق Sisson (2002). هفده ژنوتیپ اول از دسته بارلی و بقیه از دسته ویرجینیای گرمخانه‌ای می‌باشند.

Table 1- The genotypes names and their origin according to Sisson (2002). The first 17 genotypes belonged to Barley group and rest to Virginia flue-cured group.

ردیف No.	ژنوتیپ Genotype	منشاء Origin	ردیف No.	ژنوتیپ Genotype	منشاء Origin
1	Burley whites	آلمان (Germany)	26	MC.I	کانادا (Canada)
2	Burley b.5	آلمان (Germany)	27	Deliot	بلژیک(Belgium)
3	Burley pr-144	آمریکا (USA)	28	Virginia American	آمریکا (USA)
4	Burley Ree103	آمریکا (USA)	29	Virgin RP37	سوییس (Switzerland)
5	Burley semparant	آمریکا (USA)	30	Hicks 55	آمریکا (USA)
6	Burlina	آمریکا (USA)	31	Hicks Broad Leaf	برزیل (Brazil)
7	Badisher Burley E	زیمباوه (Zimbabwe)	32	Virgina Bright 88	آمریکا (USA)
8	Banket A1	فرانسه (France)	33	Virginia Ree 488	آفریقای‌جنوبی(South Africa)
9	BB16A	آمریکا (USA)	34	NOD 8	آفریقای‌جنوبی(South Africa)
10	Burley 151	برزیل (Brazil)	35	TL 33	آفریقای‌جنوبی(South Africa)
11	Burley7	برزیل (Brazil)	36	NR 23	آفریقای‌جنوبی(South Africa)
12	Burley 7022	آمریکا (USA)	37	Virginia RP.37	آلمان (Germany)
13	Burley A1	آمریکا (USA)	38	Pereg R.2-228	آلمان (Germany)
14	Burley BB163	آمریکا (USA)	39	Holandisher	سوییس (Switzerland)
15	Burley Barsoma	آمریکا (USA)	40	Montcalm Brum	آمریکا (USA)
16	Burley Bursanica	آلمان (Germany)	41	Pfatzer	آمریکا (USA)
17	Burley Kreuzing	آلمان (Germany)	42	Pennbel69	کانادا (Canada)
18	Pereg234	آلمان (Germany)	43	Parfum-ditalie	کانادا (Canada)
19	Perega	آفریقای-جنوبی(SouthAfrica)	44	Rosecan Nela	ایتالیا (Italy)
20	Coker411	آمریکا (USA)	45	TRUMPF	لهستان (Poland)
21	Bel 71-501	آمریکا (USA)	46	RXT	آمریکا (USA)
22	Bel 61-12	آمریکا (USA)	47	GA.955	آمریکا (USA)
23	Bel 61-9	آلمان (Germany)	48	Coker176	بریتانیا (Great Britain)
24	K.E1	آفریقای-جنوبی(SouthAfrica)	49	Golden gift	آمریکا (USA)
25	R9	ژاپن (Japan)	50	Tite1(R30.N2)	ایران (Iran)

جدول 2- ترکیبات آغازگری استفاده شده در تجزیه AFLP.

Table 2- Primer combinations used for AFLP analysis

آغازگرهای *Mse*I *Mse*I Primers		آغازگرهای *Eco*RI *Eco*RI Primers	
نام Name	توالی DNA DNA Sequence	نام Name	توالی DNA DNA Sequence
M140	GATGAGTCCTGAGTAAAAC	E060	GACTGCGTACCAATTCAAG
M150	GATGAGTCCTGAGTAAAGA	E070	GACTGCGTACCAATTCAAT
M160	GATGAGTCCTGAGTAAAGT	E080	GACTGCGTACCAATTCACG
		E090	GACTGCGTACCAATTCACT
		E100	GACTGCGTACCAATTCAGT
		E110	GACTGCGTACCAATTCATC
		E120	GACTGCGTACCAATTCATT

نتایج و بحث

بررسی آماره‌های تنوع ژنتیکی

ترکیبات آغازگری بکار رفته در جمعیت با 50 ژنوتیپ توتون در کل با 21 ترکیب آغازگری بکاررفته 480 نوار ایجاد نمود که تعداد 373 نوار چندشکل بودند. دامنه اندازه نوارها بین 100 تا 700bp بود. تعداد نوارهای چندشکل در ترکیبات آغازگری از 10 نوار در E120-M140 و E070-M140 تا 27 نوار چند شکل در E080-M150 متغیر بودند و متوسط تعداد نوارهای چندشکل 17/76 تخمین زده شد. نرخ چندشکلی در بین ترکیبات در پژوهش حاضر از 52/63 تا 92/59 درصد متغیر بود و میانگین درصد چندشکلی حدود 77/45 درصد برآورد گردید و می‌توان اینگونه نتیجه‌گیری نمود که روش AFLP یک ابزار قدرتمند و ارزشمند در برنامه‌های اصلاحی توتون می‌باشد چون دسترسی به نرخ بالایی از چندشکلی، ارزیابی کارا و سودمندی را در بررسی‌های مربوط به تنوع ژنتیکی به دست می‌دهد (Zhang *et al.*, 2006).

در سایر مطالعات مربوط به توتون با استفاده از نشانگر AFLP برآوردهای مختلفی حاصل گردید. در پژوهشی که بر روی 46 رقم با استفاده از نشانگر AFLP صورت گرفت 92 نوار چندشکل به ازای هر ترکیب آغازگری شناسایی شد (Ren & Timko, 2001) و مطالعه‌ای دیگر بر روی 19 رقم توتون به طور متوسط 34 نوار چندشکل به ازای هر ترکیب آغازگری مشاهده شد (Denduangboripant *et al.*, 2010). همچنین درصد پایین‌تری از چندشکلی در پژوهشی دیگر

گزارش شد که به طور میانگین 15/4 نوار و 27/45 درصد چندشکلی و در بررسی بر روی 28 ژنوتیپ توتون بود (Zhang *et al*., 2008).

برآورد ضریب تنوع ژنتیکی نی، شاخص محتوای اطلاعات چند شکلی، تعداد الل مؤثر برای هر ترکیب آغازگری در جمعیت اول، دوم و کل جمعیت به تفکیک، در جدول 3 ارائه شده است. همچنین بالاترین مقادیر ضریب تنوع ژنتیکی نئی و تعداد الل مؤثر در کل جمعیت به ترکیبات آغازگری E060-M160، E070-M140، E070-M150، E070-M160، E080-M160 و E100-M140 و در دسته ویرجینیای گرمخانه‌ای به ترکیبات E070-M140، E070-M150، E070-M160، E080-M150، E080-M160 و E100-M150 اختصاص داشتند. در دسته بارلی نیز ترکیبات E060-M160 و E070-M160، E090-M140 و E100-M140 بالاترین مقادیر ضریب تنوع ژنتیکی نی و تعداد الل مؤثر را به خود اختصاص دادند. از لحاظ درصد چندشکلی نیز بالاترین مقدار 92/59 درصد بود که به ترکیب آغازگری E070-M150 اختصاص داشت.

تجزیه خوشه‌ای

تجزیه خوشه‌ای بر اساس روش UPGMA و فاصله ژنتیکی جاکارد انجام شد و درخت حاصل در شکل 1 نشان داده شده است. در این شکل فاصله ژنوتیپ‌ها نیز درج شده‌اند. همچنین زیر نام ژنوتیپ‌های دسته بارلی خط کشیده است. نتایج این تجزیه گویای این واقعیت است که با استفاده از اطلاعات حاصل از ترکیب‌های آغازگری AFLP بکار رفته در این تحقیق، اگرچه بسیاری از ژنوتیپ‌های بارلی یا ویرجینیای گرمخانه‌ای در گروه‌های کوچک نزدیک بهم قرار گرفتند اما ژنوتیپ‌های دسته بارلی به طور کامل و شفاف از ژنوتیپ‌های دسته ویرجینیای گرمخانه‌ای تفکیک نشدند. البته از آنجایی‌که ژنوتیپ‌های دسته بارلی و دسته ژنوتیپ‌های ویرجینیای گرمخانه‌ای هر دو از توتون‌های تیپ غربی می‌باشد و از لحاظ پاره‌ای از خصوصیات مشابه هم می‌باشند، چنین نتیجه‌ای دور از انتظار نیست. البته باید خاطر نشان نمود در برخی از مطالعات مربوط به بررسی میزان کارایی نشانگرها و گروهبندی و تفکیک دسته‌های مختلف توتون، نشانگرهایی مانند AFLP و RAPD قادر بودند تا حدی این تفکیک را عملی سازد (Denduangboripant *et al*., 2010; Siva Raju *et al*., 2008; Sarala & Rao, 2008). به نظر می‌رسد اندازه نمونه و نوع نمونه‌های مورد بررسی به طوری‌که نمونه‌ها بتوانند نماینده خالص (بدون اختلاط) و واقعی از هر دسته یا گروه باشند می‌تواند نقش مهمی در تفکیک دسته‌ها داشته باشد. بهرحال بررسی‌های بیشتری با تعداد بیشتری ژنوتیپ نیاز است تا بتوان به یک نتیجه‌گیری نهایی رسید.

جدول ۳– آماره‌های تنوع ژنتیکی برای 21 ترکیب آغازگری بررسی شده بر روی دو جمعیت توتون بارلی و ویرجینیای گرمخانه‌ای.

Table 3- Diversity statistic for evaluated 21 AFLP primer combinations on two population of Barley and Virginia flue cured.

کل جمعیت (Total population)								دسته بارلی (Barley group)			دسته ویرجینیای گرمخانه‌ای Virginia flue cured group		
ترکیب آغازگری primer combinations	نوارهای چندشکل Poly.Bands	کل نوارها Total Bands	درصد چند شکلی Poly. Percentage	محتوای اطلاعات چندشکلی PIC	تعداد الل مؤثر Effective Allele number	ضریب تنوع نی Nei's gene diversity	آماره تنوع ژنتیکی G_{ST}	محتوای اطلاعات چندشکلی PIC	ضریب تنوع نی Nei's gene diversity	تعداد الل مؤثر Effective Allele number	محتوای اطلاعات چندشکلی PIC	ضریب تنوع نی Nei's gene diversity	تعداد الل مؤثر Effective Allele number
E060-M140	17	22	77.27	0.20	1.75	0.41	0.024	0.15	0.40	1.68	0.24	0.40	1.75
E060-M150	16	22	72.73	0.09	1.71	0.40	0.023	0.15	0.35	1.66	0.07	0.41	1.74
E060-M160	13	18	72.22	0.21	1.90	0.46	0.012	0.22	0.47	1.89	0.21	0.45	1.88
E070-M140	10	12	83.33	0.44	1.90	0.47	0.064	0.50	0.42	1.74	0.39	0.47	1.90
E070-M150	25	27	92.59	0.40	1.89	0.47	0.046	0.34	0.43	1.78	0.21	0.47	1.88
E070-M160	17	22	77.27	0.22	1.93	0.48	0.041	0.38	0.47	1.89	0.40	0.46	1.85
E080-M140	24	28	85.71	0.30	1.77	0.42	0.024	0.39	0.44	1.81	0.25	0.39	1.72
E080-M150	27	36	75.00	0.27	1.86	0.46	0.013	0.26	0.44	1.82	0.28	0.46	1.87
E080-M160	21	25	84.00	0.23	1.89	0.47	0.039	0.27	0.43	1.78	0.20	0.47	1.90
E090-M140	14	20	70.00	0.36	1.84	0.45	0.023	0.39	0.47	1.89	0.30	0.43	1.78
E090-M150	17	25	68.00	0.37	1.70	0.39	0.017	0.41	0.43	1.77	0.34	0.36	1.65
E090-M160	16	19	84.21	0.20	1.66	0.38	0.030	0.14	0.33	1.57	0.22	0.38	1.67
E100-M140	17	21	80.95	0.34	1.86	0.46	0.031	0.40	0.46	1.88	0.30	0.44	1.81
E100-M150	23	28	82.14	0.22	1.84	0.45	0.042	0.29	0.38	1.70	0.19	0.46	1.88
E100-M160	14	17	82.35	0.29	1.80	0.44	0.028	0.26	0.37	1.67	0.35	0.45	1.83
E110-M140	21	23	91.30	0.21	1.67	0.38	0.018	0.21	0.34	1.58	0.22	0.39	1.70
E110-M150	18	21	85.71	0.11	1.80	0.44	0.026	0.20	0.40	1.71	0.08	0.44	1.84
E110-M160	24	28	85.71	0.16	1.48	0.31	0.024	0.19	0.29	1.49	0.15	0.30	1.48
E120-M140	10	19	52.63	0.31	1.65	0.37	0.013	0.35	0.41	1.73	0.28	0.34	1.60
E120-M150	14	23	60.87	0.29	1.71	0.40	0.041	0.23	0.31	1.55	0.32	0.42	1.73
E120-M160	15	24	62.50	0.19	1.72	0.40	0.022	0.15	0.40	1.70	0.21	0.39	1.71
کل Total	373	480	1626.53	5.43	37.33	8.92	0.032	5.85	8.43	36.28	5.20	8.77	37.16
میانگین	17.76	22.86	77.45	0.26	1.78	0.42	0.63	0.28	0.40	1.73	0.25	0.42	1.77

با توجه به تجزیه خوشه‌ای انجام شده، از دسته بارلی ژنوتیپ‌های Barley b.5 و 103 Barley Ree در فاصله ادغام 0/01، Burlina، Barley BB163 و Barley Barsoma در فاصله ادغام 0/03، Barley semparent، Barley7 و Banket A1 در فاصله 0/02 ادغام شده و به یک خوشه تعلق یافتند. در حقیقت ژنوتیپ‌های هر کدام از این گروه‌های کوچک بیشترین شباهت را به یکدیگر داشتند. از دسته ویرجینیای گرمخانه‌ای نیز ژنوتیپ‌های Virginia American، TRUMPF و RXT در فاصله ادغام 0/01، Perega، Hicks Broad Leaf، K.E1 و Pfatzer در فاصله ادغام 0/03، GA.955، Virginia RP-37، MC.I، Virginia Bright 88، Parfum-ditalie و Montealm Brum در فاصله ادغام 0/02، Virginia Ree 488 و NOD 8 در فاصله ادغام 0/05 ، R9، NR 23، Rosecan Nela، Hicks 55 و Virginia RP37 در فاصله ادغام 0/04، Golden gift، Pennbel 69 و Coker 176 در فاصله ادغام 0/04 و TL 33 ، Holandisher و Pereg R.2-288 در گروهک‌هایی قرار گرفتند که از لحاظ ژنتیکی شباهت قابل توجهی به هم داشتند. بر اساس این تجزیه ژنوتیپ‌های Badisher Burley E، Pennbel69، R9 و Coker 176 ژنوتیپ‌های بودند که بالاترین فاصله ژنتیکی را از بقیه ژنوتیپ‌ها نشان دادند (شکل 1). از سوی دیگر ماتریس فاصله ژنتیکی جاکارد نیز نتایج مفیدی را در بر داشت. این ماتریس نشان داد بالاترین مقادیر فاصله ژنتیکی بین جفت ژنوتیپ‌ها به فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مذکور با سایر ژنوتیپ‌ها اختصاص دارد. شناسایی ژنوتیپ‌هایی که از لحاظ ژنتیکی و فنوتیپی بیشترین فاصله را از هم داشته باشند در برنامه‌های اصلاحی از جمله هیبریداسیون و مکان‌یابی QTLهای کنترل کننده صفات کمی نقش اساسی دارد. با استفاده از این ژنوتیپ‌هایی می‌توان جمعیت‌های مکان‌یابی با تفرق بالا در افراد را توسعه داد که امکان مکان‌یابی QTLهای کوچک اثر نیز امکان‌پذیر گردد (Collard *et al.*, 2005).

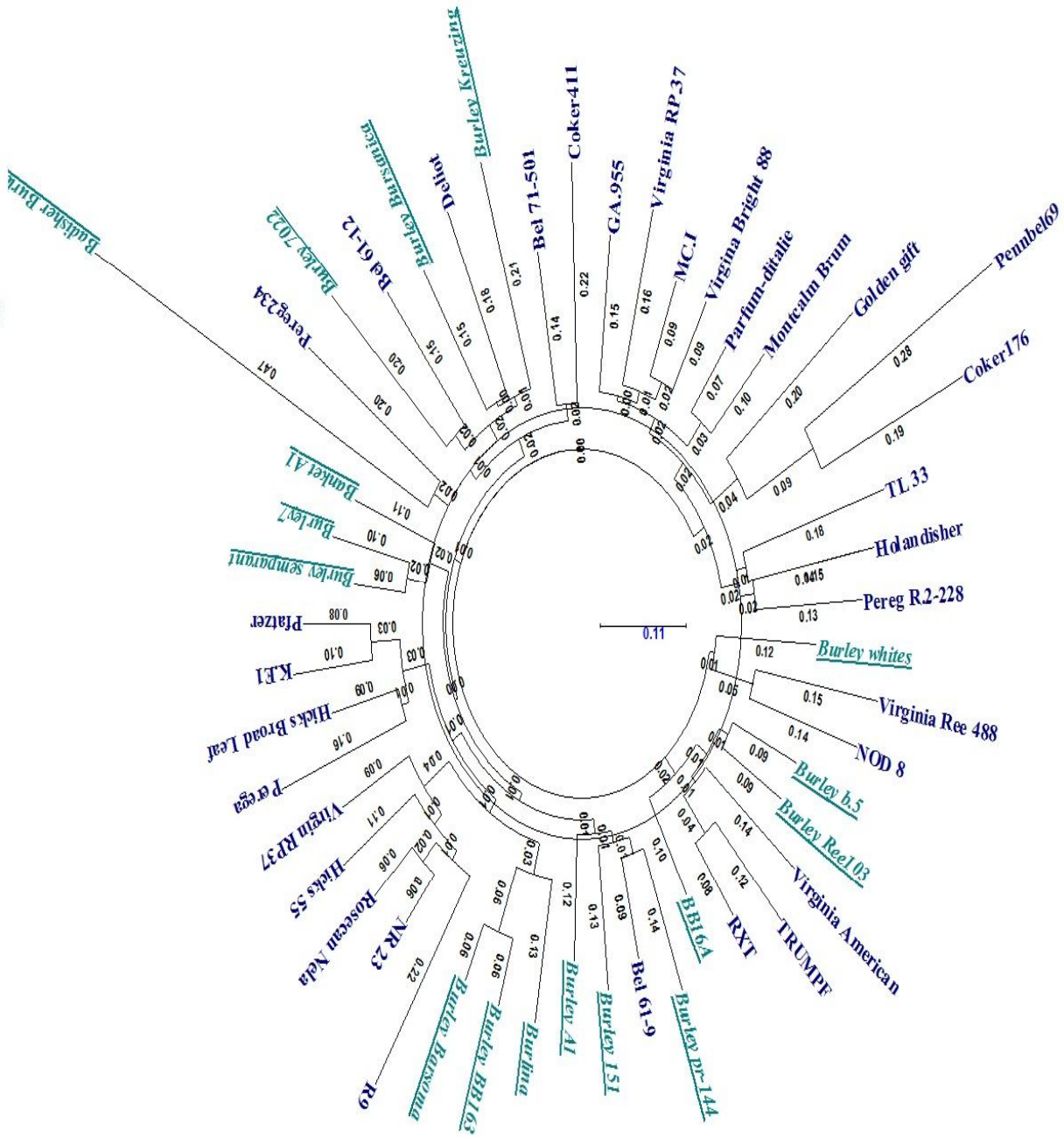
تجزیه واریانس مولکولی و بررسی تنوع ژنتیکی بین و درون دو جمعیت

با در نظر گرفتن دو جمعیت بترتیب شامل دسته توتون‌های بارلی با 17 ژنوتیپ و دسته توتون‌های ویرجینیای گرمخانه‌ای با 33 ژنوتیپ، تجزیه واریانس مولکولی انجام گرفت. درصد تنوع ژنتیکی موجود در بین دو جمعیت تنها 4 درصد از کل تنوع ژنتیکی را به خود اختصاص داد و 96 درصد مربوط به تنوع درون جمعیتی بود (جدول 4). وجود تنوع ژنتیکی زیاد در درون جمعیت نشان‌دهنده وجود تفاوت‌های ژنتیکی زیاد افراد درون جمعیت از لحاظ مکان‌های ژنی تکثیر یافته است و این گـویای ناهمـگنی درون جمعیـت می‌باشد. به طور کلی ناهمگنی زیاد در درون جمعیت می‌تواند دلایل زیادی ازجمله ماهیت چند

پلوئیدی، دگرگشنی، تلاقی‌های مختلف بین ارقام، اختلاط فیزیکی بذور و غیره داشته باشد. در اینجا می‌توان دلیل بالا بودن تنوع در درون جمعیت بارلی و ویرجینیای گرمخانه‌ی را احتمالاً به انجام تلاقی بین ارقام از گروه‌های مختلف، اختلاط بذور هنگام تکثیر، یا اندازه کوچک جمعیت‌های مورد مطالعه و یا بزرگ بودن ژنوم توتون و کافی نبودن ترکیبات آغازگری برای پوشش کامل ژنوم و در نتیجه عدم ارزیابی کامل ژنوتیپ‌ها از لحاظ تنوع ژنتیکی در کل ژنوم نسبت داد. میزان شباهت ژنتیکی جاکارد در بین ژنوتیپ‌ها از 0/16 تا 0/64 متغیر بود که نشاندهنده شباهت پایین ژنوتیپ‌ها در داخل هر کدام از گروه‌ها بود (ماتریس اعداد نشان داده نشده است).

همچنین شاخص G_{ST} نیز به عنوان شاخص تمایز جمعیت‌ها در مجموع مکان‌های ژنی مورد ارزیابی، محاسبه شد (جدول 3). این شاخص نشان می‌دهد که دو جمعیت از لحاظ مکان‌های تکثیر شده توسط ترکیب‌های آغازگری AFLP مورد بررسی، پایین است. از بین 21 ترکیب آغازگری بکاررفته بالاترین تمایز در ترکیب E070-M140 مشاهده شد که برابر با 0/06 بود. در واقع از کل تنوع ژنتیکی موجود از لحاظ این ترکیب آغازگری، 6 درصد مربوط به تنوع بین دو جمعیت و 94 درصد مربوط به تنوع درون جمعیت می‌شود. از لحاظ سایر ترکیبات آغازگری، تنوع ژنتیکی برآورد شده بین دو جمعیت کمتر بودند. لذا این ترکیب آغازگری نسبت به سایر ترکیبات تنوع بین دو جمعیت را بهتر نشان داد. مقدار متوسط Gst برابر با 0/032 برآورد گردید که نشاندهنده مقدار تنوع ژنتیکی بسیار بالایی است که در درون ژنوتیپ‌های هر دسته وجود دارد. در پژوهشی وسیع در دانشگاه کارولینای شمالی، 702 ژنوتیپ توتون با منشاء کشورهای مختلف دنیا با استفاده از 72 نشانگر ریزماهواره مورد بررسی قرار گرفتند. در کل 1031 الل با میانگین 14/7 الل برای هر نشانگر شناسایی شد. بسیاری از ژنوتیپ‌هایی که منشاء جغرافیایی یکسانی داشتند در گروه‌های یکسانی قرار گرفتند با این حال تنوع درون جمعیتی در تجزیه واریانس مولکولی 92/18 درصد برآورد گردید که به نوبه خود مقدار تنوع قابل توجهی است (Moon *et al.*, 2009). در پژوهش دیگری 51 ژنوتیپ توتون از دسته ویرجینیای گرمخانه‌ای با استفاده از AFLP به دو گروه اصلی با منشاء آمریکایی و چینی تفکیک شدند. و تجزیه واریانس مولکولی داده‌های آنها ضمن برآورد شاخص تثبیت[1] برابر با 0/167، نشان داد 55/76 درصد از کل واریانس ژنتیکی موجود به تنوع بین دو منشاء و 44/24 درصد به تنوع درون ژنوتیپ‌های هر منطقه جغرافیایی بر می‌گردد (Zhang *et al.*, 2006).

[1]. Fixation index (Fst)



شکل 1- درخت دایره‌ای حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA با استفاده از ضریب جاکارد. زیر نام ژنوتیپ‌های بارلی خط کشیده شده است.

Figure 1- Circular tree of cluster analysis using Compelete linkage method and Jaccard's coefficient. The name of Barley genotypes has been underlined.

جدول 4- نتایج تجزیه واریانس مولکولی بر روی دو جمعیت بارلی و ویرجینیای گرمخانه‌ای

Table – Result of AMOVA for two population of Barley and Virginia flue cured.

درصد تنوع Percentage of variation	اجزاء واریانس Variance component	مجموع مربعات Sum of squares	درجه آزادی df	منابع تغییر S.V
4	2.62	128.97	1	بین جمعیت‌ها Between populations
96	70.17	3368.21	48	درون جمعیت‌ها Within population
	72.79	3497.18	49	کل Total

منابع

Abd Mishahni C, Shahnejat Bushehri AA (1997). Advanced plant breeding (Conventional), Vol. 1.Tehran university publications. Iran.

Collard BCY, Jahufer MZZ, Brouwer JB, Pang ECK (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. Euphytica. 142: 169-196.

Denduangboripant J, Piteekan T, Nantharat M (2010). Genetic polymorphism between tobacco cultivar-groups revealed by amplified fragment length polymorphism analysis. Journal of Agricultural Science. 2(2): 41-48.

Doveri S, Sabino Gil F, Diaz A, Reale S, Busconi M, da Camara Machado A, Martin A, Fogher C, Donini P, Lee D (2008). Standardization of a set of microsatellite markers for use in cultivar identification studies in olive (*Olea europaea* L.). Science Horticulture. (Amsterdam) 116: 367-373.

FAO (2010). Food Agriculture Organization statistics on line. Available at: http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor.

Farsi M, Zolala J (2003). Introduction to plant biotechnology. (Translated). Mashhad Ferdowsi university press.

Fufa HP, Baenizger S, Beecher BS, Dweikat I, Graybosch RA and Eskridge KM (2005). Comparison of phenotypic and molecular marker-based classifications of hard red winter wheat cultivars. Euphytica. 145: 133-146.

Guo YP, Saukel, J Mittermayr R, Ehrendorfer F (2005). AFLP analysis demonstrates genetic divergence hybridization, and multiple polyploidizations in the evolution of Achilla (*Asteraceae-Anthemideae*). New Phytol. 166: 273-290.

Hartley MD, Smith WD, Spears JF, Fisher LR. Schultheis. JR (2001). Response of flue-cured cultivars NC 71 and NC 72 to seed priming: II. Influence on transplant production under variable float system environments. Tobacco Science. 45: 11-14.

Liu XZ, He, CH, Yang YM, Zhang, HY (2009). Genetic Diversity among Flue-cured Tobacco Cultivars on the Basis of AFLP Markers. Czech J. Genet. Plant Breeding 45(4): 155-159.

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.

Muthusamy S, Kanagarajan S, Ponnusamy S (2008). Efficiency of RAPD and ISSR markers system in accessing genetic variation of rice bean (*Vigna umbellata*) landraces. Electronic Journal of Biotechnology 11(3): 1-10.

Nei M (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 70*:* 3321-*3323*.

Ren N, Timko MP (2001). AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and wild Nicotiana species. Genome 44: 559-571.

Roldain-Ruiz I, Calsyn E, Gilliand TJ, Coll R, van Eijk MJT, De Loose M (2000). Estimating genetic conformity between related ryegrass (Lolium) varieties, 2. AFLP characterization. Molecular Breeding, 6: 593-602.

Sabouri H, Rezai A, Moumeni A, Kavousi M, Katuzi M, Sabouri A **(**2009). QTLs Mapping of Physiological Traits Related to Salt Tolerance at Young Seedling Rice (*Oryza sativa* L.). Biologia Plantarum 53(4): 657-662.

Saghai Maroof, MA, Biyashev RM, Yang, GP, Zhang Q, Allard RW (1994). Extraordinarily polymorphic microsatillate DNA in barely species diversity, choromosomal location, and population dynamics, Proceeding of the National Academy of Sciences. USA. 91: 5466-5570.

Sarala K, Rao RVS (2008). Genetic diversity in Indian FCV and Burley tobacco cultivars. Journal of Genetics. 87: 159-163.

Siva Raju K, 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.

Universal Leaf Tobacco Company, Inc. (2008). Supply & demand report. Available at http://www.universalcorp.com/Reports/ReportFrameset.asp?ID=31201&Menu=Tob (verified 13 Oct. 2008). Universal Leaf Tobacco Co., Richmond, VA.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Lee TVD, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research. 23: 4407-4414.

Zhang HY, Liu XZ, He CS, Yang YM (2008). Genetic Diversity among Flue-cured Tobacco Cultivars Based on RAPD and AFLP Markers. Brazilian Archives of Biology and Technology. 51: 1097-1101.

Zhang HY, Liu XZ, Li TS, Yang YM (2006). Genetic diversity among flue-cured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) revealed by amplified fragment length polymorphism. Botanical Studies 47: 223-229.

Investigation of genetic diversity of Barley and Virginia tobacco varieties using Amplified Fragment Length Polymorphism

Dadras A.R.[1], Sabouri H.[2], Mohammadi-Nejad G.[3], Sabouri A.[4], Shoaei Deilami M.[5]

1. MSc Student Dep. Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman.
2. Assist. Prof. Department of Plant Production, Collage of Agriculture Sciences and Natural Resources, Gonbad Kavous University.
3. Assist. Prof. Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Shahid Bahonar University of Kerman.
4. Assist. Prof. Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan.
5. Researcher Dep of Plant Breeding Tobacco Research Center, Rasht.

Abstract

Considering the economic importance of tobacco and its role as a model plant in molecular researches, in the present study, 50 tobacco genotypes from Barley and Virginia group were evaluated. In order to determine of genotype, 21 primer combinations of AFLP were used. According to the results, out of 480 total numbers of bands with average of 17.76 bands for each combination, 373 bands showed polymorphic pattern. Due to high polymorphic percentage of used marker (77.45%), it can be expected to consider, this marker as a powerful tool for assessment of genetic diversity in tobacco breeding programs. Investigation of Jaccard's genetic coefficients revealed Badisher Burley E, Pennbel69, R9 and Coker 176 had the highest genetic distances than the others. Therefore, it seems the genotypes to be useful for breeding programs including hybridization and developing of segregating mapping population. The results of AMOVA showed 4% of the total genetic variation was estimated between two groups of Barley and Virginia flu-cured and 96% was related to within groups. Also diversity statistic revealed primer combinations of E060-M160, E070-M140, E070-M150, E070-M160, E080-M150, E080-M160, E100-M140 and E100-M150 were the most powerful markers in the evaluation and identifying of relationships among tobacco genotypes that can be considered in the other related studies.

Keywords: *AFLP, AMOVA, Genetic diversity, Tobacco.*