# به نام یزدان پاک

دانشکده علوم کشاورزی

گروه زراعت و اصلاح نباتات

(اصلاح نباتات)

عنوان:

# بررسی تنوع ژنتیکی انواع مختلف توتون (*Nicotiana tabacum* L.) از طریق نشانگرهای مولکولی

از

**مصطفی مهدی زاده**

استاد راهنما:

**دکتر حبیب الله سمیع‌زاده لاهیجی**

استادان مشاور:

**مهندس مرداویج شعاعی دیلمی**

**مهندس محمد محسن زاده گلفزانی**

اردیبهشت ۹۲

*Pêshkesh be Hawsari*

*xweshewîsim*

اگر در خور تقدیم باشد

# تقدیم به همسر مهربانم

**سپاسگزاری**

با سپاس فراوان به درگاه ایزد منان که با لطف و عنایت بیکران خود، توفیق انجام این پژوهش را به من عطا نمود. اینک، بر خود واجب می‌دانم تا از تمامی دوستان و عزیزانی که مرا در انجام این پژوهش یاری نمدند، تشکر و قدردانی نمایم.

**ابتدا از خانواده‌ی عزیزم که من را همواره مورد لطف‌خودشان قرار داده و در همه حال پشتیبانم هستند کمال تشکر را دارم.**

از استاد راهنمای محترم آقای دکتر حبیب الله سمیع زاده لاهیجی به پاس زحمات بی‌دریغشان سپاسگزارم.

از استادان محترم مشاور آقای مهندس مرداویج شعاعی دیلمی و آقای مهندس محمد محسن‌زاده کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از اساتید محترم داور آقایان دکتر دکتر بابک ربیعی و دکتر علی اعلمی که زحمت بازخوانی پایان‌نامه را بر عهده داشتند تشکر می‌کنم.

از مسئولین محترم آزمایشگاه های ژنومیکس و بیوتکنولوژی آقایان مهندس حسام‌الدین حسینی و مهندس محمد حسین رضادوست کمال تشکر را دارم.

از دوستان و همکلاسی‌های خوبم خانم‌ها و آقایان:

ابراهیم شیرزادی، سمیه طایفه، رضا خیام، چیمن محمدی، حسن هدایتی، محبوبه الوانچی، علی عمیدفر، راویه حیدری، رقیه تولی، پیمان منبری، سجاد رشیدی، میلاد ضیغمی، مصطفی دادخواه، فرید زندی، آرش ذولفقاری

تشکرمی‌کنم و برای همه‌ی عزیزان آرزوی موفقیت دارم.

## فهرست مطالب

**عنوان** **صفحه**

چکیده فارسی ..... چ
چکیده انگلیسی ..... ح
مقدمه ..... ۲

### فصل اول- کلیات و مرور منابع

۱-۱- کلیاتی در مورد گیاه توتون ..... ۶
۱-۲- انواع نشانگرها ..... ۷
۱-۳- ویژگی‌های یک نشانگر مناسب ..... ۷
۱-۴- توالی‌های تکراری ساده یا ریزماهواره‌ها (SSR) ..... ۸
۱-۵- نواحی بین توالی‌های تکراری ساده یا ISSR ..... ۱۱
۱-۶- رتروترانسپوزون‌ها (Retrotransposones) و نشانگرهای IRAP ..... ۱۳
۱-۷- مروری بر تحقیقات انجام شده ..... ۱۵

### فصل دوم- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد گیاهی ..... ۱۹
۲-۲- نمونه‌برداری از برگ برای استخراج DNA ..... ۲۰
۲-۳- استخراج DNA ..... ۲۰
۲-۴- تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده ..... ۲۱
۲-۵- تعیین غلظت و رقیق‌سازی DNA ژنومی استخراج شده ..... ۲۲
۲-۶- واکنش PCR و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ..... ۲۲
۲-۷- آشکارسازی DNA تکثیرشده ..... ۲۴
۲-۸- تجزیه و تحلیل داده‌ها ..... ۲۴
۲-۸-۱- امتیازدهی باندها ..... ۲۴
۲-۸-۲- برآورد فاصله ژنتیکی ..... ۲۵
۲-۸-۳- تجزیه خوشه‌ای ..... ۲۵
۲-۸-۴- صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای ..... ۲۵
۲-۸-۵- تجزیه به مختصات اصلی ..... ۲۵
۲-۸-۶- معیارهای تنوع ..... ۲۶
۲-۸-۶-۱- محاسبه درصد جایگاه‌های چندشکل در هر آغازگر ..... ۲۶
۲-۸-۶-۲- محتوای اطلاعات چندشکل ..... ۲۶
۲-۸-۶-۳- شاخص شانون ..... ۲۶
۲-۸-۶-۴- تنوع ژنتیکی نی ..... ۲۶
۲-۸-۶-۵- تعداد آلل موثر ..... ۲۶

**فصل سوم- نتایج و بحث**

۳-۱- تعداد باند مشاهده شده و درصد چندشکلی آغازگرهای مورد مطالعه ..... ۲۸
۳-۲- محتوای اطلاعات چندشکل (PIC)، تعداد آلل مؤثر، تنوع ژنی نی و شاخص شانون ..... ۳۱
۳-۳- تجزیه خوشه‌ای ..... ۳۴
۳-۴- تجزیه تابع تشخیص ..... ۳۷
۳-۵- صحت گروهبندی براساس تیپ به عمل‌آوری ..... ۳۹
۳-۶- تجزیه به مختصات اصلی ..... ۴۱
۳-۷- نتیجه‌گیری کلی ..... ۴۴
پیشنهادها ..... ۴۴
منابع ..... ۴۵

## فهرست جدول‌ها

**عنوان** **صفحه**

جدول ۲-۱- اسامی ژنوتیپهای توتون مورد استفاده ..... ۱۹
جدول ۲-۲- ترکیب بافرهای مورد استفاده در استخراج DNA ..... ۲۱
جدول ۲-۳- مقادیر مواد تشکیل دهنده بافر TAE ..... ۲۲
جدول ۲-۴- مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش PCR ..... ۲۲
جدول ۲-۵- مشخصات آغازگرهای ISSR و IRAP مورد استفاده ..... ۲۳
جدول ۲-۶- مشخصات آغازگرهای SSR مورد استفاده در این مطالعه ..... ۲۴
جدول ۲-۷- اجزای تشکیل دهنده بافر بارگذاری 6X ..... ۲۴
جدول ۳-۱- آغازگرهای مورد استفاده، درصد چندشکلی و تعداد نوارهای آنها ..... ۳۱
جدول ۳-۲- تعداد آلل موثر، تنوع ژنی نی و شاخص شانون ..... ۳۳
جدول ۳-۳- تشابه و فاصله ژنتیکی بین تیپ‌های توتون مورد بررسی ..... ۳۷
جدول ۳-۴- توابع تشخیص کانونی حاصل از تجزیه تابع تشخیص ..... ۳۸
جدول ۳-۵- نسبت موفقیت افراد درون گروهها با تابع تشخیص ..... ۳۸
جدول ۳-۶- صحت گروهبندی براساس تیپ به عمل آوری برای کل نشانگرها ..... ۳۹
جدول ۳-۷- صحت گروهبندی براساس تیپ به عمل آوری برای نشانگرهای ISSR ..... ۴۰
جدول ۳-۸- صحت گروهبندی براساس تیپ به عمل آوری برای نشانگرهای IRAP ..... ۴۰
جدول ۳-۹- صحت گروهبندی براساس تیپ به عمل آوری برای نشانگرهای SSR ..... ۴۱
جدول ۳-۱۰- درصد واریانس و درصد واریانس تجمعی برای ۱۴ مولفه اول ..... ۴۲

## فهرست شکل‌ها

**عنوان** **صفحه**

شکل ۱-۱- گیاه توتون ..... ۲
شکل ۱-۲- جایگاه SSR در ژنوم یوکاریوتها ..... ۹
شکل ۱-۳- تکرارهای مختلف دینوکلوتید SSR و الگوی باندی مختلف آنها..... ۱۰
شکل ۱-۴- طراحی پرایمرهای مختلف ISSR برای ایجاد چندشکلی ..... ۱۱
شکل ۱-۵- تصویری از یک پرایمر ISSR و نحوه‌های مختلف چسبیدن آن به DNA الگو ..... ۱۲
شکل ۱-۶- روش‌های مختلف طراحی آغازگرهای رتروترانسپوزون ..... ۱۴
شکل ۳-۱- الگوی نواری حاصل از تکثیر تعدادی ژنوتیپ توتون با استفاده از نشانگر PT30044..... ۲۸
شکل ۳-۲- الگوی نواری حاصل از تکثیر تعدادی ژنوتیپ توتون با استفاده از نشانگر UBC812 ..... ۲۹
شکل ۳-۳- الگوی نواری حاصل از تکثیر تعدادی ژنوتیپ توتون با استفاده از نشانگر RTR-7 ..... ۳۰
شکل ۳-۴- دندروگرام ترسیم شده براساس روش UPGMA ..... ۳۶
شکل ۳-۵- گروهبندی ارقام بر اساس تابع تشخیص ..... ۳۹

# چکیده

**بررسی تنوع ژنتیکی انواع مختلف توتون (*Nicotiana tabacum* L.) از طریق نشانگرهای مولکولی**

**مصطفی مهدی‌زاده**

اطلاعات مربوط به‌مقدار تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاسم و ارتباطات ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها برای بررسی و طراحی برنامه‌های به‌نژادی مهم می‌باشد و می‌تواند برای کمک به شناسایی و توسعه ژرم‌پلاسم به‌کار رود و موجودیت ارقام را تعریف کند. بنابراین جهت مدیریت و کاربرد موثر منابع ژرم‌پلاسم، درک کامل دامنه و ساختار تنوع ژنتیکی جمعیت موردنظر ضروری است. با توجه به اهمیت شناسایی و گروه‌بندی ژرم‌پلاسم‌ها، در این تحقیق، تنوع ژنتیکی ۴۸ ژنوتیپ از توتون تیپ‌های گرمخانه‌ای، بارلی و شرقی از طریق ۱۲ نشانگر مولکولی ISSR، ۱۰ نشانگر SSR و ۵ نشانگر IRAP بررسی شد. آغازگرهای UBC825، RTR-10 و آغازگر ترکیبی UBC826 +UBC817 با تعداد ۱۷ باند و بعد از آن، آغازگر UBC817 با تعداد ۱۶ باند و RTR-8 با ۱۵ باند، بیشترین تعداد باند و آغازگر UBC824 با ۱۰ و UBC823 با تعداد ۱۱ باند، کمترین تعداد باند را در بین آغازگرهای ISSR و IRAP داشتند. همچنین آغازگرهای PT30044 و PT30046 در بین آغازگرهای SSR، با ۲ باند، کمترین تعداد باند را داشتند. درصد چندشکلی بدست آمده در ارقام از ۷۶/۹۲ درصد برای RTR-1 و RTR-7 تا ۹۴/۱۱ درصد برای RTR-10 در آغازگرهای ISSR و IRAP متغییر بود و درصد چندشکلی در آغازگرهای SSR، ۱۰۰ درصد بدست آمد. میانگین درصد چندشکلی به‌دست آمده در این تحقیق ۹۰/۷ درصد، تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌ها را توجیه می‌کند. محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) در این تحقیق بین ۰/۳۱ تا ۰/۵ و میانگین آن ۰/۴۲ بود. میانگین تنوع ژنی نی و شاخص شانون نیز به‌ترتیب ۰/۳۹ و ۰/۵۸ بدست آمد. تجزیه خوشه ای به روش UPGMA و با استفاده از معیار تشابه تطابق ساده، ۴۸ ژنوتیپ مورد بررسی را در پنج گروه قرار داد. صحت گروهبندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای توسط تجزیه تابع تشخیص کانونی به روش خطی فیشر با ۸۷/۵ درصد تأیید شد. تجزیه به بردارهای اصلی نیز نشان داد که بردارهای اصلی اول و دوم با ۶/۱ و ۴/۹۴ درصد و ۱۴ بردار اول در مجموع ۵۱/۴۹ درصد از تنوع کل را توجیه کردند.

**واژه‌های کلیدی:** بارلی، شرقی، گرمخانه‌ای، SSR، IRAP

**Abstract**

**Assessment of genetic diversity in different types of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) using molecular markers**

**Mostafa Mehdizadeh**

Information about amount of genetic diversity in germpelasm and genetic relations for genotypes are essential for analyzing and desingning breeding programs and can be used for assisting in genetic identification and improvement of germpelasms. Therefore, in order to manage an apply germpelasm sources effectively, it is essential to release domain and structure genetic diversity completely. According to importance of identification and classification of germpelasms, in this study, genetic diversity of 48 genotype from flue-cured, burley and oriental type of tobacco, was inspectedby 12 molecular ISSR markers, 10 SSR markers and 5 IRAP markers. UBC825, RTR-10 primers and mixed primer UBC817+UBC826 with 17 bands and after than, UBC817 primers with 16 band and RTR-8 with 15 bands had maximum number of bands and UBC824 with 10 and UBC823 with 11 bands had minimum numbers of bands among ISSR and IRAP primers. And also PT30044 and PT30046 primers with 2 bands had minimum number of band among SSR primers. Obtained percentage of polymorphism in cultivars was was varied from 46/92 percent for RTR-1 and RTR-7 to 94/11 percent for RTR-10 in ISSR and IRAP and percentage of polymorphism in SSR perimers was obtained 100 percent. Average polymorphism percentage in this study 90/7 percent, validates genotypes genetic diversity. In this study polymorphism information content (PIC) was varied from 0/31 to 0/5 and average PIC was 0/42. average diversity of Ney index and Shannon index obtained 0/39 and 0/58 respectively. Cluster analysis by UPGMA method analysed 0/48 genotype in 5 gorup. Discriminate Function via Fisher's linear (87.5 percent) conformed the validity of clustering analysis result. Principal component analysis showed that 14 first components validated 51/49 percent of total variance.

**Keywords**: Burley, Flue-cured, IRAP, Oriental, SSR

# مقدمه

توتون از خانواده بادمجانیان و از جنس نیکوتیانا با نام علمی نیکوتیانا تاباکم (*Nicotianatabacum*) و با 2n= 48 کروموزوم، گیاهی خودگشن است که میزان دگرگشنی آن تا ۱۱/۳ درصد برآورد گردیده است. و معمولا به صورت یک ساله کشت می‌شود. از نظر نحوه خشکانیدن توتونها را به ۴ دسته تقسیم می‌کنند. الف- گرمخانه‌ای مانند ویرجینیا ب- هواخشک مانند بارلی ج - آفتاب خشک مانند باسما د- آتش خشک مانند کنتاکی. ولی متداول‌ترین و مرسوم‌ترین نوع طبقه بندی توتون در ایران، دسته‌بندی بر اساس تیپ بوده که بر اساس آن توتونها را بطور کلی به تیپ‌های غربی ، شرقی و نیمه‌شرقی تقسیم‌بندی می‌نمایند : الف - نمونه بارز توتونهای تیپ غربی شامل دسته‌های : ویرجینیا، بارلی، مریلند و کنتاکی می‌باشد. که در حال حاضر دو نوع ویرجینیا و بارلی در کشور کشت می‌شود. ب- مهمترین توتون تیپ شرقی که در ایران کشت می‌شود نوع باسما می‌باشد که آفتاب خشک می‌باشد. ج- توتونهای نیمه‌شرقی که از مهمترین نوع آن می‌توان تربوزان را نام برد. در حال حاظر در کشور کشت نمی‌شود این دسته از توتونها معمولا در نتیجه دورگ‌گیری بین انواع غربی و شرقی بوجود آمده‌اند و معمولاً به عنوان فیلر یا پر کننده در ساخت سیگارت مصرف می شوند. انواع ارقام تجاری توتون جهت تولید فرآورده‌های دخانی در ایران کشت می‌شود و مناطق کشت توتون سیگار عبارتند از استان مازندران ۳۵ درصد ، گلستان ۲۵ درصد ، گیلان ۲۰ درصد آذربایجان غربی ۱۵ درصد و کردستان ۵ درصد[آمارنامه کشاورزی محصولات زراعی و باغی. ۱۳۸۰].

شکل ۱-۱-گیاه توتون

توتون هزاران سال است که به عنوان گیاه دارویی، محصول تجاری و گیاه زراعی در بسیاری از مناطق مختلف جهان کشت می‌شود و در چندین دهه گذشته ازآن به عنوان سیستم نمونه در زمینه کشت سلولی و مهندسی ژنتیک استفاده شده است [Flavell et al., 1992]. اطلاعات مربوط به‌مقدار تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاسم و ارتباطات ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها برای بررسی و طراحی برنامه‌های به‌نژادی مهم می‌باشد و می‌تواند برای کمک به شناسایی و توسعه ژنتیکی ژرم‌پلاسم به‌کار رود و

موجودیت ارقام را تعریف کند. بنابراین جهت مدیریت و کاربرد موثر منابع ژرم‌پلاسم، درک کامل دامنه و ساختار تنوع ژنتیکی جمعیت موردنظر ضروری است [گیاروکو و همکاران[1]، ۲۰۰۷].

آگاهی دقیق از تنوع ژنتیکی مجموعه‌های ژنتیکی گیاهی ضمن حفظ ذخایر ژنتیکی گیاهی، قابلیت استفاده از آن‌ها را در برنامه‌های اصلاحی تامین می‌کند. همچنین کسب اطلاع از فاصله ژنتیکی نسبی بین افراد و روابط خویشاوندی بین آن‌ها، امکان سازماندهی ژرم‌پلاسم و تهیه جمعیت‌های مناسب برای ترسیم نقشه ژنتیکی و مکان‌یابی ژن‌ها را فراهم می‌سازد [عبدالهی‌مندولکانی و همکاران، ۱۳۸۲].

تعیین تنوع ژنتیکی و طبقه‌بندی ارقام و تعیین فاصله ژنتیکی بین آنها و متعاقب آن گزینش و انتخاب برترین والد به منظور استفاده در برنامه‌های به‌نژادی از اهداف این تحقیق می‌باشد. تنوع ژنتیکی نقش بسیار مهمی را در اصلاح نباتات ایفا می‌کند، که می‌توان از آن‌ها به منظور مدیریت ژرم‌پلاسم، حفظ واریته و اصلاح توتون استفاده کرد [Virk et al., 1995].

امروزه از نشانگرهای DNA که علاوه بر تفاوت‌های توالی‌های کدکننده، اختلافات بین توالی‌های غیرکدکننده ژنوم را نیز آشکار می‌سازند استفاده می‌شود، از طرفی چون نشانگرهای مورفولوژیکی و پروتئینی به علت دارا بودن چندشکلی قابل دسترس پایین، کمتر در طبقه‌بندی به کار می‌روند [Cho et al., 1999].

نشانگرهای مولکولی بر پایه PCR بر اساس استفاده از آغازگر تصادفی یا اختصاصی دسته‌بندی می‌شوند. از جمله آغازگرهای تصادفی می‌توان به نشانگرهای DAF، RAPD و AFLP اشاره کرد، و از آغازگرهای اختصاصی، آغازگرهای ریزماهواره (SSR) در حال تبدیل به ابزار مهمی شده که در محدوده وسیعی از کاربردها نظیر مطالعات نقشه ژنوم و بررسی تنوع ژنتیکی و همچنین بررسی پیوستگی نشانگرهای مولکولی با ژن‌های صفات اقتصادی بکار می‌روند [Jewell, 2006]. بررسی نواحی ISSR روش مهمی است که به سرعت تنوع ژنتیکی میان جدایه‌های یک گونه را نشان می‌دهد. در این روش برای انگشت‌نگاری DNA از آغازگرهای SSR تغییر یافته براساس توالی‌های مجاور ریزماهواره‌ای که در سراسر ژنوم پراکنده‌اند استفاده می‌شود، نشانگر ISSR به DNA الگوی کمی نیاز داشته و به‌علت طول زیاد آغازگر، سرعت و سادگی فنی و رفتار مندلی ممکن است به‌سرعت ابزاری با ارزش برای بررسی تنوع ژنتیکی محسوب شود [Ammiraju et al., 2001].

رتروترانسپوزون‌ها فراوانترین و گسترده‌ترین عناصر جابه‌جا شونده در ژنوم یوکاریوت‌ها هستند که بر خلاف ترانسپوزون‌ها از طریق رونویسی پی‌درپی، رونویسی معکوس و نهایتا تولید cDNAی جدید، کپی‌های خود را در نواحی جدید ژنومی درج می‌کنند و کپی‌های قبلی در جای خود پایدار باقی می‌مانند [Wicker et al., 2007].

با توجه به اهمیت شناسایی و گروه‌بندی ژرم‌پلاسم‌ها، در این تحقیق، تنوع ژنتیکی ۴۸ ژنوتیپ از توتون تیپ گرمخانه‌ای، بارلی و شرقی بررسی شد تا با گروه‌بندی آن‌ها بتوان به والدین مناسب جهت استفاده در برنامه‌های دورگ‌گیری

1. Giarrocco *et al.*

توتون دست یافت. همچنین نظر به بررسی‌های زیادی که در رابطه با تنوع ژنتیکی در دنیا صورت گرفته و با توجه به اینکه هنوز ژرم‌پلاسم‌های داخل کشور از نظر تنوع عمل‌آوری با استفاده از نشانگر مولکولی بررسی نشده‌اند، لذا در این تحقیق از آغازگرهای ISSR، IRAP و SSR استفاده شد تا از نقطه نظر این نشانگرها نیز وضعیت تنوع ژنتیکی بین و درون تیپ‌های مختلف بررسی شود.

# فصل اول

# کلیات و مرور منابع

## ۱-۱- کلیاتی در مورد گیاه توتون

توتون گیاهی است متعلق به دنیای جدید، زیرا در سال ۱۴۹۲ میلادی پس از کشف قاره آمریکا توسط کریستف کلمب و پیاده شدن وی در جزیره گواناهانی از مجمع الجزایر باهاما در قاره آمریکا شناخته شد و پس از آن بـه سـایر کشـورها راه یافتـه است.

احتمالات زیادی در رابطه با انتشار توتون در جهان وجود دارد، پروفسور گومز معتقد است اولین بار برگ توتـون در سـال ۱۹۱۵ توسط شخصی نام هرناندز وارد اسپانیا و در سال۱۵۶۰ بذر آن به این کشور وارد و در سال ۱۵۷۳ میلادی کشت گردیـد البته به احتمال زیاد اولین کشور اروپائی که این گیاه را از قاره آمریکا دریافت نمود کشور پرتغال بوده است که بذر این گیاه در سال ۱۵۶۰ میلادی توسط سفیر فرانسه در پرتغال بنام ژان نیکوت به فرانسه فرسـتاده شـد کـه بـه افتخـار ایـن شـخص ژانـر بوتانیکی توتون بنام نیکوتیانا وآلکالوئید آن به اسم نیکوتین نامیده شده است [حسین نظام کیا . ۱۳۷۶]. گیاه توتون طـی قـرن ۱۶میلادی از طریق پرتغالیها به آسیای شرقی (هند و ژاپن) رسید. با حمله پرتغالیها به جنوب ایران در سـال ۱۵۱۴ مـیلادی و در خلال اشغال یک صد ساله جزیره هرمز بدست آنان ایرانیان نیز به تدریج با توتون آشنا شدند.

توتون یکی از گیاهان زراعی است که در اقتصاد کشورهای تولیدکننده از جمله چین، یونان، ترکیه، ژاپن و آمریکـا نقـش مهمی ایفا می‌کند و درآمد حاصل از فرآورده های مختلف این گیاه رقم قابل توجهی از درآمـد ملـی کشـورهای تولیدکننـده را تشکیل می‌دهد. میلیونها نفر از مردم جهان به طور مستقیم به زراعت، صنعت تولید و فروش فـرآورده‌هـای مختلـف ایـن گیـاه اشتغال دارند. [وزارت جهاد کشاورزی. ۱۳۸۰].

توتون یکی از گیاهان زراعی مهم صنعتی در ایران و جهان است. توتون دارای ژرم‌پلاسم نسبتا بزرگـی متشـکل از تعـداد زیادی رقم و لاین است. بدیهی است شناسایی و ردیابی هر ژنوتیپ در بانک بذر و برنامه‌های اصلاحی کمک شایانی به پیشرفت امور مربوط به اصلاح ارقام و به‌کارگیری آنها در برنامه‌هـای اصـلاحی خواهـد کـرد. از ابتـدای پیـدایش اصـلاح نباتـات مـدرن نشانگرهای مولکولی به عنوان وسیله‌ای برای انتخاب صفات مفید، تاکسنومی، مطالعات فیلوژنی و بررسـی تنـوع تنـوع ژنتیکـی استفاده شده‌اند [ ناصر خدابنده. ۱۳۶۶ ].

توتون هزاران سال است که به عنوان گیاه دارویی، محصول تجاری و گیاه زراعی در بسیاری از مناطق مختلف جهان کشت می‌شود. در چند دهه گذشته از این گیاه، به عنوان سیستم نمونه در زمینه کشت سلولی و مهندسی ژنتیک بهره گرفته شده است. 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 [رن و تیمکو[1]، ۲۰۰۱].

1. Ren and Timko

## ۱-۲- انواع نشانگرها

نشانگرها را می‌توان به چهار دسته کلی تقسیم نمود: ریخت شناسی، نشانگرهای سیتولوژیکی، نشانگرهای فیزیولوژیک و نشانگرهای مولکولی [نقوی و همکاران، ۱۳۸۴].

۱- ریخت شناسی: به علائمی گویند که بطور مستقیم در فنوتیپ فرد قابل تشخیص هستند و توارث‌پذیرند. از نمونه این نوع نشانگرها،رنگ بدن گاو، رنگ گل لاله عباسی و... را می‌توان نام برد.

۲- نشانگرهای سیتولوژیکی: تفاوت‌های کروموزومی موجود در بسیاری از موجودات می‌تواند به عنوان نشانگر به کار رود. ایزوکروموزوم‌ها یا تلوسنتریک‌ها جابجایی و الگوهای نواربندی از جمله این نشانگرها می‌باشند و بصورت همبارز توارث می‌یابند.

۳- نشانگرهای فیزیولوژیک: مطالعات مربوط به تولید شیر نشان می‌دهدکه افزایش تولید شیر با افزایش سطح برخی از هورمون‌ها در پلاسما همراه است. پس میزان این هورمون‌ها به عنوان یک نشانگر فیزیولوژیک است و اغلب دارای توارث غالبیت هستند.

۴- نشانگرهای مولکولی: این گروه از نشانگرها خود به دو دسته تقسیم می‌شوند: نشانگرهای مولکولی در سطح پروتئین و نشانگرهای مولکولی در سطح DNA

۴-۱- نشانگرهای مولکولی در سطح پروتئین

رایج‌ترین مارکرهای پروتئینی آلوزایم‌ها و ایزوزایم‌ها هستند

۴-۲- نشانگرهای مولکولی در سطح DNA:

این دسته از نشانگرها خود به دو دسته تقسیم می‌شوند: الف)مارکرهای غیر مبتنی بر PCR: به آنها نشانگرها مبتنی بر هیبریداسیون نیز می‌گویند بازرترین نوع این نشانگرها، RFLP می باشد.

ب)مارکرهای مبتنی بر PCR: نشانگرهای مولکولی بر پایه PCR بر اساس استفاده از آغازگر تصادفی یا اختصاصی دسته‌بندی می‌شوند. از جمله آغازگرهای تصادفی می‌توان به نشانگرهای DAF، RAPD و AFLP اشاره کرد، و از آغازگرهای اختصاصی، آغازگرهای ریزماهواره (SSR) را می‌توان نام برد [Jewell, 2006].

## ۱-۳- ویژگی‌های یک نشانگر مناسب

یک نشانگر مولکولی مطلوب باید چند ویژگی داشته باشد که مهمترین آنها عبارتند از: چندشکل باشد، به صورت همبارز قابل امتیازدهی باشد تا بتوان افراد هموزیگوت را از هتروزیگوت تفکیک کرد. دارای توزیع تصادفی در ژنوم باشد، آشکار سازی، تجزیه و آنالیز داده های حاصل از آن آسان باشد، سادگی روش کار و سرعت عمل بالا، سریع و تکرارپذیر باشد. نشانگرهای مولکولی بر اساس ویژگی هایی نظیر نوع وراثت پذیری، نحوه عمل ژن ( نشانگرهای همبارز یا غالب) و روش آنالیز

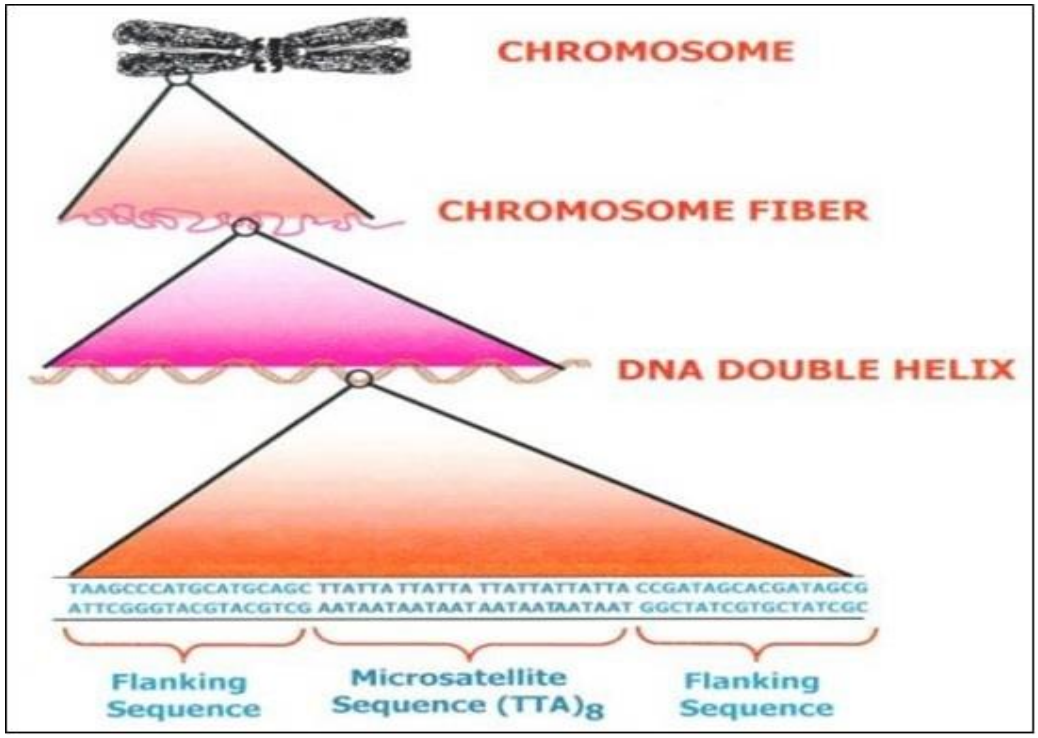
(نشانگرهای مبتنی بر هیبریداسیون یا مبتنی بر PCR) در گروه های مختلف قرار می گیرند [نقوی و همکاران، ۱۳۸۴].

نشانگرهای DNA تفاوت افراد را در سطح مولکول DNA نشان می‌دهند و دارای چندشکلی بالا، توزیع تصادفی در ژنوم، عدم تأثیرپذیری از عوامل محیطی، خنثی بودن از نظر فنوتیپی، فراوانی زیاد، غیر وابسته بودن به مرحله رشد، بافت و ارگان و قابل ارزیابی بودن در هر مرحله و در آزمایشگاه می‌باشند. امروزه طیف وسیعی از نشانگرهای DNA در دسترس هستند که در انتخاب آنها باید معیارهایی مانند محل ژنومی آنها (رمزکننده، غیررمزکننده)، توزیع نسبی آنها در ژنوم (در مورد نشانگرهایی با محل ژنومی معینی) در نظر گرفته شوند [Godwin et al., 1997].

## ۱-۴- توالی های تکراری ساده یا ریزماهواره ها (SSR)

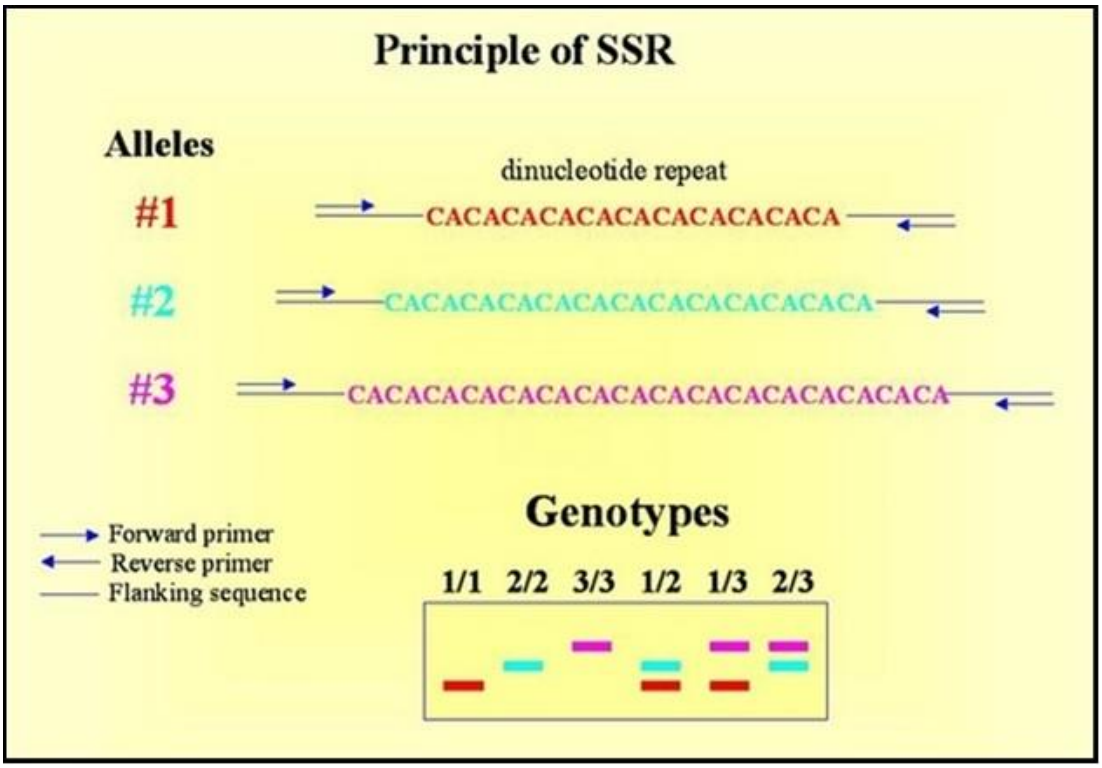
در یوکاریوت‌ها توالی‌های رمز شونده تنها بخش محدودی از DNA را شامل می‌شوند و در حقیقت بخش عمده DNA را توالی‌های غیررمزشونده تشکیل می‌دهند. توالی‌های غیر رمز شونده حاوی نواحی با DNA تکرارشونده هستند که متشکل از ترکیبات مختلفی از اسیدهای نوکلوئیک هستند. ردیف‌های تکرارشونده براساس اندازه واحد تکرار به، ماهوارک‌ها[1] و ریزماهواره-ها[2] تقسیم می‌شوند. هر یک از این DNAهای تکراری می‌تواند مقدار زیادی از چندشکلی را نشان دهد. ماهوارک واحدهای ۱۰ تا ۶۰ جفت بازی هستند که ممکن است صدها بار تکرار شده باشند (شکل ۱-۲). ماهوارک‌ها بیشتر در نواحی یوکروماتین ژنوم پستانداران، قارچ‌ها و گیاهان متمرکزند. ریزماهواره‌ها شامل واحدهای یک تا شش‌تایی تکرار شونده‌اند که در ژنوم یوکاریوت‌ها پراکنده‌اند، به‌طوریکه در هر ۱۰ کیلو باز از ردیف DNA دست کم یک ردیف ریزماهواره‌ای دیده می‌شود. ردیف‌های ریزماهواره‌ای غیرپایدارند و با کاهش یا افزایش واحدهای تکرارشونده دچار تغییرات فراوان در طول می‌شوند. تنوع در تعداد تکرار ریزماهواره‌ها که به کمک PCR و الکتروفورز قابل آشکارسازی‌اند، موجب شده‌است که از ریزماهواره‌ها به‌عنوان ابزار مولکولی با پتانسیل زیاد برای تشخیص‌های ژنومی در آزمایشگاه‌ها استفاده شود. این ریزماهواره‌ها با روش‌های پیچیده زیست-شناسی مولکولی و با هزینه زیاد شناسایی و ردیف‌های مجاور آن‌ها تعیین می‌شوند. سپس براساس ردیف احاطه‌کننده هر ریزماهواره آغازگرها طراحی و ساخته می‌شود. از طریق واکنش زنجیره‌ای PCR و با استفاده از این گونه آغازگرها می‌توان DNA ژنومی نمونه‌های مختلف گیاهی را برای تکثیر ریزماهواره‌های مذکور مورد استفاده قرار داد [نقوی و همکاران، ۱۳۸۴].

1. Minisatellite
2. Microsatellite




شکل ۱-۲-جایگاه SSR در ژنوم یوکاریوت‌ها

توالی‌های تکراری ساده SSRها (Simple Sequence Repeat) یا ریز ماهواره‌ها از تکرارهای پشت سرهم از ۲، ۳، ۴ و ۵ نوکلوتیدی بوجود آمده‌اند و در سراسر ژنوم یوکاریوتی موجودند. این تکرارها را می‌توان بصورت پراکنده در ترکیبات متنوع از دو یا بیشتر از دو SSR (ترکیب SSRها) بخوبی با تک کپی‌های دیگر توالی‌های چند کپی (چند نسخه‌ای) یافت می‌شوند. اغلب کپی های تکی خارج از توالی های دیگر مورد علاقه اند بخاطر اینکه آنها با میزان بالایی از پلی‌مورفیسم همبستگی دارند. در بیشتر مطالعات تکرارهای $(GT)_n$، $(GA)_n$، $(GATA)_n$ و $(GACA)_n$ دیده شده‌اند و تعداد کپی‌های $(GT)_n$ در ژنوم هاپلویید از ۱۰۰ نسخه در مخمر تا ۱۰۰۰۰۰نسخه در ژنوم موش متنوع است. در ژنوم انسان بطور میانگین در هر ۱۰کیلو باز از DNA یک SSR با توزیع تصادفی مناسب واقع شده است. چند شکلی بالا مربوط به SSR را می‌توان هم در گیاهان و هم در جانوران مشاهده کرد. اما این رویکرد تا حدودی طاقت فرسا و سنگین است وبه اطلاعات دو سر تکرار موتیف برای طراحی پرایمرها نیاز دارد. همینطور نمی تواند در گونه های جدید علمی و کاربردی باشد [Gupta et al., 2002].




شکل ۱-۳-تکرارهای مختلف دی‌نوکلوتید و الگوی باندی مختلف آنها در ژنوتیپ‌های مختلف

گرایش به استفاده از ریزماهواره ها در سال های اخیر بطور قابل ملاحظه ای رو به افزایش می باشد بطـوری کـه فقـط در فاصله سال های ۲۰۰۰- ۱۹۹۵، بالغ بر ۸۰۰۰ ریزماهواره شناسایی و جداسازی شدند. پلـی مورفیسـم بـالا و آسـانی نسـبی در اسکوربندی و تجزیه داده های حاصل، از ویژگی های مهم نشانگرهای ریزماهواره است که موجب توسعه مطالعات آن شده است [Zane, 2002]. گذشته از این ریزماهواره ها درجه بالایی از انتقال پذیری میـان گونـه هـا را نشـان داده انـد. همبـارز بـودن و پراکنش ریزماهواره ها در تمام ژنوم از دیگر مزایای مهم این نشـانگرها مـی‌باشـد. از آنجـا کـه بـرای یـک جایگـاه کـه آغـازگر ریزماهواره بر اساس آن طراحی می شود، آلل های متعددی یافت می‌شود، این نشانگر برای بررسی تنوع ژنتیکی قابلیـت بـالایی دارد [Jewell, 2006] .

نشانگرهای مولکولی SSR بددلیل مزایای ویژه نسبت به دیگر نشانگرهای مولکولی بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. از جمله محاسن آن می‌توان به کاربرد ساده و تفسیر نتایج آسان، میزان بالای پلی‌مورفیسم حتی در سطح ارقام و ژنوتیپ‌های یک گونه، فراوانی و تنوع زیاد آلل‌های SSR در سطح ژنوم یوکاریوت‌ها، وجود الگوی تظـاهر همبـارز، تکرارپـذیر بـودن نتـایج و در نهایت قابل انتقال بودن آن در سطح جنس یا دیگر گونه‌های نزدیک اشاره کرد. از جمله معایب این مارکر پیچیدگی، هزینه‌بر و وقت‌گیر بودن فرایند شناسایی توالی‌های تکراری ساده و تعیین ردیف بازی آنها که مقدمه کار با این نشانگر است را می‌توان نام برد [نقوی و همکاران ۱۳۸۴].