



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

سمانه عابدی<sup>۱</sup>، رضا درویش زاده<sup>۲\*</sup>، ایرج برنوسی<sup>۳</sup>، بابک عبدالمهدی مندولکانی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> دانش آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه.

<sup>۲</sup> دانشیار گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

<sup>۳</sup> دانشیار گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

<sup>۴</sup> دانشیار گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۹/۱۵، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۳/۰۲

### چکیده

گل جالیز (*Orobanche spp.*) پارازیت اجباری ریشه‌ی گیاهان زراعی مختلفی است. جهت بررسی تنوع ژنتیکی ۵۱ نمونه متعلق به جمعیت‌های مختلف از ۳ گونه گل جالیز منطقه‌ی شمال غرب ایران، ۳۴ آغازگر ISSR استفاده شد. از بین آغازگرهای مورد مطالعه، ۲۰ آغازگر باندهای چند شکل تولید نمودند. از مجموع ۲۶۱ باند تولید شده توسط آغازگرها، ۲۵۴ باند (۹۴٪) چندشکل بودند. در بین گونه‌های مورد مطالعه، گونه "*O. aegyptiaca Pers.*" دارای دو باند اختصاصی بود. تجزیه خوشه‌ای، نمونه‌های گل جالیز جمع آوری شده را در ۶ گروه اصلی قرار داد، بطوریکه تفاوت منطقه‌ی جغرافیایی تاثیر چندانی بر تنوع ژنتیکی نمونه‌ها نداشت. براساس نتایج تجزیه واریانس مولکولی، تنوع ژنتیکی درون گونه‌ها ۱۰۰٪ بود. سطح بالای تنوع ژنتیکی درون گونه‌ها، ضرورت توجه به تنوع پارازیت در طراحی پروژه‌های اصلاحی، جهت ایجاد مقاومت در گیاهان میزبان را نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، تجزیه خوشه‌ای، تجزیه واریانس مولکولی، گل جالیز، نشانگر ISSR

## مقدمه

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 ژنوتیپ ها در طیف گسترده ای 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.*, 2002) 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<sup>۱</sup>، یک تکنیک مبتنی بر PCR<sup>۲</sup> است که توسط Zietkiewicz *et al.* (1994) معرفی شد. در این تکنیک با استفاده از موتیف های SSR به عنوان آغازگر و بدون نیاز به داشتن اطلاعات در مورد توالی های مجاور، سطح بالایی از تکرار پذیری و چندشکلی طی فرآیند واکنش زنجیره ای پلی مرز بدست می آید (Borner *et al.*, 2001). به عنوان مثال، Buschman *et al.* (2005) با استفاده از نشانگرهای ISSR توانستند دو جمعیت گل جالیز که از لحاظ خصوصیات مورفولوژیکی قابل تمایز نبودند ولی قدرت بیماری زایی متفاوتی روی تیپ های مختلف توتون داشتند را تشخیص

خانواده *Orobanchaceae* از بزرگترین خانواده های گیاهی در میان پارازیت های اجباری است. جنس *Orobanche* دارای ۱۷۰ گونه پارازیت می باشد که از این تعداد، ۳۹ گونه در ایران گزارش شده و ۹ گونه انحصاری منطقه ای "فلور ایرانیکا" می باشند (Saeidi Mehrvarz *et al.*, 2010; Schneeweiss *et al.*, 2004). پراکندگی طبیعی گل جالیز (*Orobanche spp.*) منطقه ای 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.) می شوند (Rispaill *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 می تواند به عنوان یکی از مؤثرترین روش های کنترل آن به حساب آید. در این راستا بررسی تنوع ژنتیکی پارازیت پیش نیاز برنامه های اصلاحی است (Buschmann *et al.*, 2005; Roman *et al.*, 2004; Rubiales, 2003). به دلیل تعداد اندک ویژگی های در دسترس پارازیت های اجباری،

<sup>1</sup>. Inter simple sequence repeat

<sup>2</sup>. Polymerase chain reaction

۱/۵ میلی مول  $MgCl_2$ ، ۰/۲ میکرومول از هر dNTP، ۰/۵ واحد آنزیم تک پلیمراز و ۱۰ پیکومول از هر آغازگر در ترموسایکلر PerkinElmer–Applied Biosystems انجام شد. برنامه دمایی PCR بصورت: ۴ دقیقه واسرشت سازی اولیه در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۵ چرخه شامل ۶۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی گراد (جهت واسرشت سازی)، ۴۵ ثانیه در دمای اتصال (بسته به توالی آغازگرها) و ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد (جهت بسط) و بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. تفکیک محصولات تکثیر با استفاده از ژل آگارز Resolute line (Biozyme) ۱/۶ درصد و بافر TBE نیم برابر با ولتاژ ۷۰ 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 GenAIEx6 (Peakall and Smouse, 2006) محاسبه گردید. جهت محاسبه ی ضرایب تشابه و تشکیل دندروگرامها روشهای مختلفی مورد بررسی قرار گرفت.

دهند. با توجه به مطالعات محدود در زمینه بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت های گل جالیز ایران، مطالعه ی حاضر جهت بررسی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت های گل جالیز مزارع توتون شمال غرب ایران با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR انجام شد.

#### مواد و روش ها

در این مطالعه، ۵۱ نمونه متعلق به جمعیت های مختلف از ۳ 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 ۱). استخراج DNA طبق روش CTAB (Doyle and Doyle, 1990) با اندکی تغییرات از گل های تازه ی گیاهان نمونه برداری شده در پژوهشکده ی زیست فناوری دانشگاه ارومیه انجام گرفت. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از طریق الکتروفورز ژل آگارز ۱٪ و دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی شد. واکنش زنجیره ای پلی مرز با استفاده از ۳۴ آغازگر (Vancouver, British ISSR Columbia, Canada) انجام گرفت (جدول ۲). واکنش زنجیره ای پلیمرز در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۳۰ نانوگرم DNA، بافر PCR یک برابر (Tris-HCl 10 mM, KCl 50 mM; pH=8.3)

## جدول ۱- اطلاعات مربوط به ۳ جمعیت (گونه) گل جالیز.

Table 1- Informations on 3 *Orobanche* populations.

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

های *O. cernua* و *O. ramosa*، *O. aegyptiaca* بودند. تحقیقات نشان داده است که گونه های *O. aegyptiaca* Pers. و *O. ramosa* L. خسارت قابل توجهی به محصولات زراعی در نقاط مختلف کشور وارد می نمایند (Minbashi Moini, 2003). به عنوان پیش نیاز برنامه های اصلاح مقاومت میزبان در برابر انگل گل جالیز، تنوع ژنتیکی درون و بین گونه ای پارازیت بوسیله ی نشانگر های ISSR مورد بررسی قرار گرفت. از ۳۴ آغازگر ISSR مورد مطالعه، ۲۰ آغازگر چندشکلی نشان دادند (جدول ۲). ۱۴ آغازگر باقی مانده، یا اصلاً محصولی تولید نکردند و یا اینکه الگوی بانندی واضحی ایجاد ننمودند. تکثیر تمامی ۵۱ نمونه گل جالیز توسط آغازگر A12 دو بار تکرار شد و

کارایی الگوریتم های خوشه بندی و مناسب بودن آنها بر اساس ضریب همبستگی کوفتیک تعیین گردید. دندروگرام افراد با استفاده از برنامه-ی<sup>۱</sup> SAHN در نرم افزار<sup>۲</sup> NTSYS-pc (Rohlf, 1998) رسم گردید. جهت تائید نتایج تجزیه ی خوشه ای، تجزیه به مختصات اصلی<sup>۳</sup> (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

<sup>1</sup> Sequential Agglomerative Hierarchical Nesting (SAHN) algorithm

<sup>2</sup> Numerical Taxonomy SYStem for personal computer

<sup>3</sup> Principal coordinates analysis

الگوهای بانندی بدست آمده تکرارپذیری بالایی  
(بیش از ۹۵ درصد) نشان دادند.

جدول ۲- آغازگرها، دمای اتصال، تعداد کل باند و درصد چندشکلی نشانگرهای ISSR در نمونه‌های گل جالیز 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<br>Percentage of<br>polymorphism | تعداد کل باند<br>Total number of<br>bands | دمای اتصال (درجه<br>سانتی گراد)<br>Annealing<br>temperature (°C) | توالی (۵'→۳')<br>Sequence<br>(5'→3') | نام آغازگر<br>Primer name |
|---|---|--|--------------------------------------|---------------------------|
| 80  | 5   | 44   | (AG) <sub>8</sub> T                  | UBC807                    |
| 78.57   | 14  | 46   | (AG) <sub>8</sub> C                  | UBC808                    |
| 83.33   | 12  | 43   | (GA) <sub>8</sub> T                  | UBC810                    |
| 100   | 14  | 51   | (GA) <sub>8</sub> C                  | UBC811                    |
| 86.67   | 15  | 49   | (GA) <sub>8</sub> A                  | UBC812                    |
| 100   | 14  | 50   | (CA) <sub>8</sub> T                  | UBC816                    |
| 83.33   | 12  | 45   | (CA) <sub>8</sub> G                  | UBC818                    |
| 90.91   | 11  | 56   | (AC) <sub>8</sub> T                  | UBC825                    |
| 89.47   | 19  | 47   | (AC) <sub>8</sub> G                  | UBC827                    |
| 100   | 16  | 40   | (AG) <sub>8</sub> YT                 | UBC834                    |
| 100   | 9   | 35   | (TC) <sub>8</sub> RG                 | UBC854                    |
| 100   | 13  | 49   | (AC) <sub>8</sub> YG                 | UBC857                    |
| 100   | 14  | 51   | (ATG) <sub>6</sub>                   | UBC864                    |
| 100   | 16  | 42   | (G(GA) <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>   | UBC880                    |
| 90.1  | 11  | 49   | (AG) <sub>10</sub> T                 | A7                        |
| 100   | 9   | 30   | (GA) <sub>6</sub> CC                 | A12                       |
| 85.71   | 1   | 52   | (GT) <sub>6</sub> CC                 | A13                       |
| 100   | 14  | 41   | (CA) <sub>6</sub> AC                 | CA&AC                     |
| 100   | 16  | 48   | (CA) <sub>6</sub> RG                 | CA6Rg                     |
| 100   | 13  | 60   | (CAG) <sub>5</sub>                   | CAg5                      |

اجازه‌ی استفاده از دمای اتصال بالاتر (۴۵-۶۰ درجه‌ی سانتی گراد) را داده و باعث بالا رفتن سختگیری در اتصال می‌گردد. بررسی‌ها در مورد تکرارپذیری نشان می‌دهد که تنها ضعیف‌ترین باندها، قابل تکرار نیستند (Pradeep Reddy *et al.*, 2002). با استفاده از ۲۰ آغازگر مذکور، ۲۶۱ باند قابل تشخیص ایجاد شد که ۲۵۴ عدد از آنها

در پژوهشی Buschmann *et al.* (2005) برای آزمایش تکرارپذیری نشانگر ISSR فرآیند تکثیر را ۵ بار تکرار کردند و نتایج مشابهی را گزارش نمودند. تکرار پذیری بالا به استفاده از آغازگرهای بزرگتر (۱۶-۲۵ واحدی) در ISSR، در مقایسه با آغازگرهای کوتاه مثلا در نشانگر RAPD (۱۰ واحدی) بر می‌گردد که به محقق

مقایسه با تکرارهای چند نوکلئوتیدی دیگر، چند شکلی بالایی نشان می‌دهند. در میان گونه های مورد مطالعه ۲ بانده اختصاصی در *O. 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 بانده اختصاصی مشاهده نکردند. مقادیر هتروزیگوسیتی نشان می‌دهد که در جمعیت "*O. aegyptiaca*" تنوع ژنتیکی بیشتری وجود دارد (جدول ۳). دیگر مشخصات مکان‌های ISSR تکثیر شده در گونه های مختلف گل‌جالیز در جدول ۳ 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.*, 2009; *Satovic et al.*, 2004). از آنجا که نشانگرهای ISSR سطوح بسیار پایین تنوع ژنتیکی را بخوبی نمایان می‌کنند، 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 زبردستی *Minores*، نشانگر ISSR توانست تمایز خوبی بین گونه‌های آن نشان دهد، حال آنکه مطالعه توسط نشانگر RFLP یا توالی *rbcL* نتوانست دو گونه ی *O. hederæ* و *O.*

(معادل ۹۴٪) چند شکلی نشان دادند (جدول ۲). تعداد کل باندهای تولید شده توسط هر آغازگر، بین ۱۹ بانده توسط آغازگر 8 G (AC) تا ۵ بانده توسط آغازگر 8T (AG) با میانگین ۱۳ بود. تعداد باندها چندشکل به ازاء هر آغازگر بین ۴ الی ۱۷ با میانگین ۱۲ متغیر بود (جدول ۲). میزان چندشکلی بالا در نمونه‌های گل‌جالیز، نشان دهنده وجود تنوع ژنتیکی در گونه های گل‌جالیز و از طرفی کارایی بالای نشانگر ISSR در شناسایی جمعیت‌های مختلف گل‌جالیز است. توانایی نشانگر ISSR در ارائه اطلاعات ژنتیکی، به فراوانی ریزماهوره‌ها و توزیع آنها در مقیاس وسیعی از ژنوم گونه‌ها بر می‌گردد (*Morgante et al.*, 1993).

در این بررسی عمدتاً از آغازگرهای قلابدار در انتهای ۳' استفاده شد. قلابدار کردن آغازگر با ۱-۴ نوکلئوتید هرز در انتهای ۳' یا ۵'، اطمینان اتصال در انتهای یک ریزماهوره در DNA ی الگورا تضمین می‌کند. در نتیجه، مشکل اسمیر و اتصال داخلی رفع می‌شود. بر اساس نتایج *Pradeep Reddy et al.* (2002) آغازگرهای قلاب‌شده در انتهای ۳'، در مقایسه با آغازگرهایی که در انتهای ۵' قلابدار شده‌اند، الگوهای باندهای واضح‌تری ایجاد می‌نمایند. 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. معمولاً تکرارهای دی نوکلئوتیدی قلاب‌شده در انتهای ۳' یا ۵' در

جدول ۳- مشخصات مکان های ISSR تکثیر شده در جمعیت های گل جالیز.

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

| Populations                                     | P1<br>( <i>Orobanche aegyptiaca</i> ) | P2<br>( <i>Orobanche ramosa</i> ) | P3<br>( <i>Orobanche cernua</i> ) |
|---|---------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| No. Bands <sup>a</sup>                          | 261                                   | 255                               | 221                               |
| No. Bands Freq. $\geq 5\%$ <sup>b</sup>         | 261                                   | 255                               | 221                               |
| No. Private Bands <sup>c</sup>                  | 1                                     | 0                                 | 0                                 |
| No. LComm Bands<br>( $\leq 25\%$ ) <sup>d</sup> | 0                                     | 0                                 | 0                                 |
| No. LComm Bands<br>( $\leq 50\%$ ) <sup>e</sup> | 0                                     | 0                                 | 0                                 |
| Mean He <sup>f</sup>                            | 0.38                                  | 0.33                              | 0.23                              |
| Standard error of Mean<br>He                    | 0.01                                  | 0.01                              | 0.01                              |
| %P <sup>g</sup>                                 | 93.87                                 | 85.44                             | 55.56                             |

<sup>a</sup> No. Bands = Number of bands.

<sup>b</sup> No. Bands Freq.  $\geq 5\%$  = Number of bands with a frequency  $\geq 5\%$ .

<sup>c</sup> No. Private Bands = Number of bands unique to a single population.

<sup>d</sup> No. LComm Bands ( $\leq 25\%$ ) = Number of locally common bands (Freq.  $\geq 5\%$ ) found in 25% or fewer populations.

<sup>e</sup> No. LComm Bands ( $\leq 50\%$ ) = Number of locally common bands (Freq.  $\geq 5\%$ ) found in 50% or fewer populations.

<sup>f</sup> He = Expected heterozygosity =  $2 \times p \times q$ . ( $p_{ij}$  is the frequency of  $j^{\text{th}}$  band at  $i^{\text{th}}$  locus).

<sup>g</sup> %P = Percentage of polymorphic loci.

دندروگرام با استفاده از این روش، جهت نمایش روابط خویشاوندی افراد مورد مطالعه تشکیل شد. کمترین میزان تشابه ژنتیکی (۰/۳۳) بین نمونه های "۱۹" و "۳۰" به ترتیب از ارومیه و مریوان مشاهده شد. این دو نمونه هر دو متعلق به گونه ی *O. aegyptiaca* بودند. بیشترین تشابه ژنتیکی (۰/۶۸) بین نمونه های "۴۱" و "۴۴" به ترتیب متعلق به دو منطقه خوی و نقده مشاهده شد. نمونه ی خوی از گونه ی *O. aegyptiaca* و نمونه ی نقده از گونه ی *O. ramoas* بود. این دو گونه هر دو متعلق به دسته ی *Trionychon* بوده و از لحاظ مورفولوژی بسیار شبیه به هم و هر دو

### بررسی روابط افراد و جمعیت ها

جهت محاسبه ی ضریب تشابه و تشکیل دندروگرام روش های مختلفی مورد بررسی قرار گرفت. کارایی الگوریتم های 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 روش های مورد بررسی بیشترین مقدار (۰/۶۹) مربوط به الگوریتم UPGMA بر اساس ضریب تشابه جاکارد بود؛ بنابراین

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 ۶ گروه اصلی قرار گرفتند (شکل ۱). بطور کلی، نمونه‌ها از گونه‌های مختلف در سرتاسر دندروگرام پراکنده بودند که این مساله تنوع درون جمعیتی بالا را نشان می‌دهد. برای مثال، نمونه‌های ۴۹، ۵۰ و ۵۱ متعلق به گونه‌ی *O. cernua* که هر سه از یک منطقه جمع‌آوری شده بودند، در گروه‌های مجزا قرار گرفتند. این نشان‌دهنده‌ی آنست که دو فرد، که از نظر محل جمع‌آوری بسیار به هم نزدیک بودند، الگوهای بانندی 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 گل‌جالیز 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.

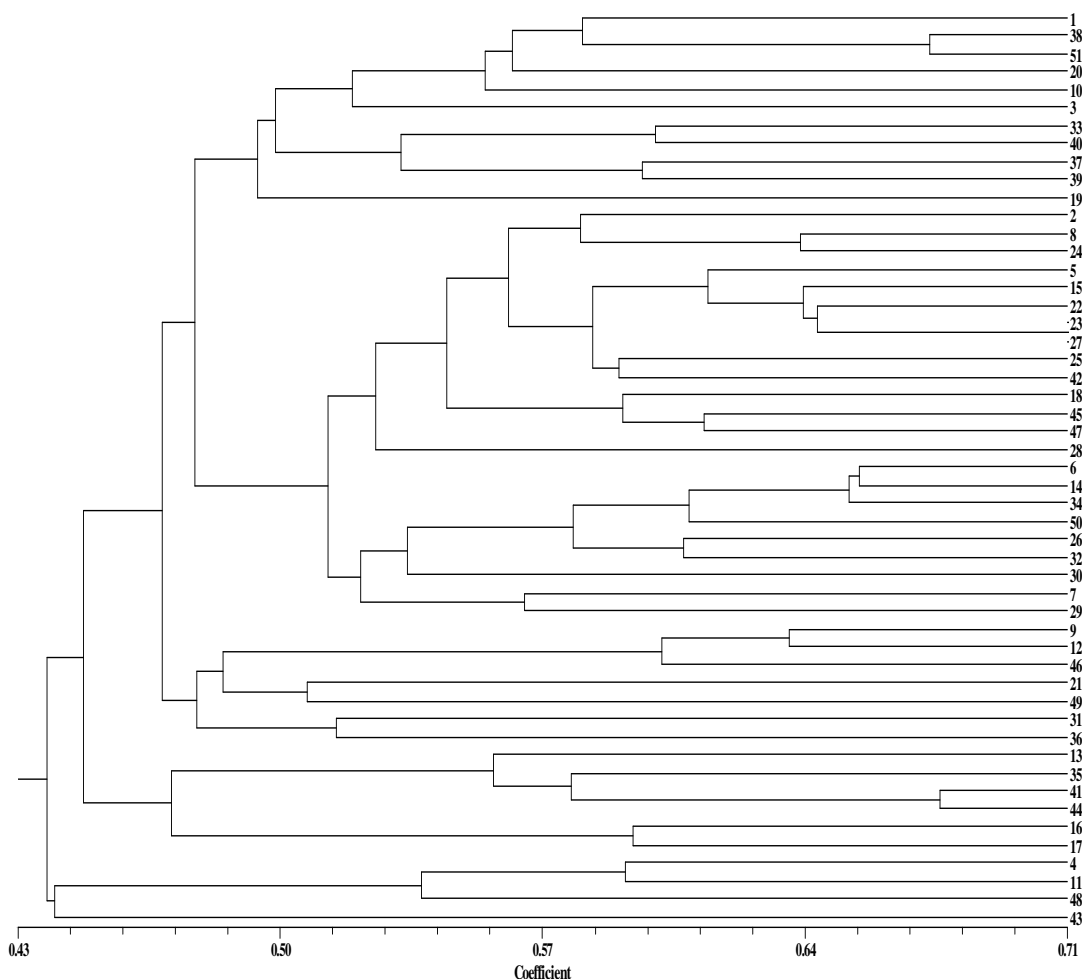
فاصله‌ی ژنتیکی جمعیت‌ها از ۰/۰۶۲ بین جمعیت‌های "*O. aegyptiaca*" و "*O. ramosa*" تا ۰/۱۹۴ بین جمعیت‌های "*O. ramosa*" و "*O. cernua*" متغیر بود. گونه‌ی *O. cernua* متعلق به دسته‌ی *Osproleon* است که بوسیله‌ی ساقه‌ی غیر منشعب خود شناخته می‌شود (Paran *et al.*, 1997) در حالی که دو گونه

### تجزیه واریانس مولکولی

نتایج تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) حاکی از تنوع بالای درون گونه‌ی ای بود (جدول ۴). Roman *al.* (2007) در بررسی جمعیت‌های *O. gracilis* var. *gracilis* جمع‌آوری شده از شمال اسپانیا توسط نشانگر RAPD، درصد بالایی از تنوع (۸۰/۰۹) در درون جمعیت‌ها مشاهده کردند.

<sup>1</sup>. Analysis of molecular variance





شکل ۱- دندروگرام حاصل از تجزیه‌ی خوشه‌ای به روش UPGMA مبتنی بر ضریب تشابه جاکارد در ۵۱ نمونه گل جالیز.

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

جدول ۴- 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  $F_{st}$ .

## نتیجه گیری کلی

از آنجا که روش‌های متداول کنترل گونه‌های گل‌جالیز در مزارع توتون موثر نیستند، نیاز به ایجاد روش‌های جدید مبارزه وجود دارد. ایجاد گیاه میزبان مقاوم می‌تواند به عنوان یکی از مؤثرترین روش‌های 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 مطالعه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های گل‌جالیز 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 نمونه‌ها 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

همچنین Vaz Patto *et al.* (2008) با بکار بردن نشانگر AFLP بیشترین تنوع ژنتیکی (۸۶/۳) 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 گونه‌های دگرگرده‌افشان مانند *O. crenata* در مطالعات قبلی بدست آمده است (Roman *et al.*, 2002; Roman *et al.*, 2001). در پژوهشی Roman *et al.* (2007) دو نتیجه‌ی متفاوت در مورد یک گونه، از دو منطقه‌ی 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.

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 mitochondrial 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, Jacobssohn 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.<sup>1</sup>, Darvishzadeh R.\*<sup>2</sup>, Bernousi I.<sup>3</sup>, Abdollahi Mandoulakani B.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>MSc, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Iran.

<sup>2</sup>Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Iran.

<sup>3</sup>Associate Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Iran.

<sup>4</sup>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

