

شناسایی QTL‌های مرتبط با برخی از صفات مورفولوژیکی در توتون شرقی

Identification of QTLs Associated with some Morphological Traits in Oriental Tobacco

فرامرز هوشیاردل^۱، رضا درویش‌زاده^{۲*} و حمید حاتمی‌ملکی^۳

تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۶/۱۵

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۹/۱۸

چکیده

به منظور شناسایی مکان‌های ژنی مرتبط با صفات مورفولوژیک شامل تعداد برگ، طول برگ، عرض برگ، سطح برگ، وزن تر برگ، وزن خشک برگ، ارتفاع گیاه و قطر ساقه در توتون شرقی، یک جمعیت ژنتیکی متشکل از ۱۰۰ بونه F_۲ حاصل از تلاقی دو ژنوتیپ توتون شرقی SPT ۴۰۶ (والد پدری) و ۳۱ Basma seres (والد مادری)، مورد ارزیابی قرار گرفت. برای شناسایی QTL‌ها، نقشه پیوستگی با ۲۳ نشانگر SSR و ۲۹ نشانگر ISSR تهیه گردید که ۵۷۰/۸ سانتی‌مورگان از ژنوم توتون را پوشش می‌دهد. نتایج مکان‌یابی ژنی نشان داد که ۱۱ QTL در کنترل صفات مورد مطالعه نقش دارند. حداکثر تغییرات فنوتیپی توجیه شده توسط QTL‌ها ۲۵/۲ درصد بود. در این بررسی، برای صفت تعداد برگ هیچ QTLی شناسایی نگردید. نتایج نشان داد که برخی QTL‌های شناسایی شده برای صفات ارتفاع گیاه، طول برگ، قطر ساقه، وزن خشک و تر برگ هم مکان هستند که می‌توانند باعث افزایش کارایی انتخاب به کمک نشانگر و پیشبرد برنامه‌های به‌نژادی گیاهی در توتون شوند.

واژه‌های کلیدی: صفات کمی، تفکیک متجاوز، مکان‌یابی ژن، نشانگر SSR، نشانگر ISSR

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ارومیه

۲. دانشیار گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ارومیه

۳. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه مراغه، مراغه

Email: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

*: نویسنده مسوول

توتون (*Nicotiana tabacum* L.) یکی از مهم‌ترین محصولات اقتصادی در جهان است که از هزاران سال قبل کشت شده (Arslan and Okumus, 2006) و به‌عنوان یک گیاه دارویی و زراعی در فرهنگ‌های مختلف به خدمت گرفته شده است (Zhang et al., 2007). سطح زیر کشت توتون در دنیا ۴/۷۷ میلیون هکتار، تولید سالانه آن ۷/۱ میلیون تن، عملکرد آن در کشورهای در حال توسعه حدود ۱/۶ تن در هکتار و در کشورهای توسعه یافته حدود ۲/۲ تن در هکتار می‌باشد (Nagarajan and Prasadrao, 2004). این گیاه از جنس *Nicotiana* بوده و به خانواده *Solanaceae* تعلق دارد که در میان گونه‌های این جنس، گونه *N. tabacum* بیش از همه گونه‌ها کشت می‌گردد (Narayan, 1987). گونه *N. tabacum* یک گونه آلپلی‌پلوئید ($2n=48$) با عدد پایه کروموزومی $x=12$ بوده و دارای بزرگ‌ترین اندازه ژنوم (۴۵۰۰ mbp) در خانواده *Solanaceae* است (Narayan, 1987). انواع مختلفی از توتون براساس معیارهای مختلفی از قبیل نوع استفاده، روش‌های خشک نمودن برگ و مشخصه‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی وجود دارد (Chaplin, 1975). براساس تیپ رشدی گیاه توتون، سه گروه شامل: توتون شرقی، توتون نیمه شرقی و توتون غربی وجود دارند (زمانی، ۱۳۸۹). در این میان، توتون‌های شرقی یا ترکیه‌ای یکی از تیپ‌های آفتاب خشک توتون می‌باشند که به دلیل داشتن صفاتی از قبیل برگ‌های کوچک یا بافت ظریف، دود ملایم و عطر نافذ از دیگر گروه‌های توتون مجزا بوده و از اجزای اصلی سازنده خرمن سیگارها می‌باشند (چپلین، ۱۹۷۵).

به دلیل کمی بودن اکثر صفات مهم توتون و کنترل آن‌ها به وسیله چندین ژن و تأثیر شدید عوامل محیطی روی آنها، مطالعه ژنتیکی این صفات نسبتاً مشکل است (موافق و همکاران، ۱۳۸۸). مطالعات چن (Chen, 1972) نشان‌دهنده تأثیر اثرات افزایشی، غالبیت و اپیستازی در رابطه با توارث عملکرد برگ توتون می‌باشد. طبق تحقیقاتی که توسط هنرنژاد و شعاعی دیلمی (Honarnejad and Shoaai Deilami, 2004) با استفاده از تلاقی‌های دی‌آلل در توتون انجام گرفته است، تعداد برگ، ارتفاع گیاه و عملکرد برگ خشک توسط ژن‌های با اثرات افزایشی و غیرافزایشی کنترل می‌گردند. از طرف دیگر، صفات مختلف گیاهی به صورت مستقل کنترل نمی‌شوند، بلکه بسیاری از ژن‌ها همزمان روی چندین صفت تأثیر دارند که این امر بررسی ژنتیکی صفات را پیچیده‌تر می‌سازد برای مثال،

هنرنژاد و شعاعی دیلمی (2004) نشان دادند که همبستگی معنی‌داری بین عملکرد برگ خشک توتون با اجزای آن از قبیل شاخص سطح برگ، زمان گلدهی و درصد ماده خشک برگ‌ها وجود دارد درحالی‌که صفاتی از قبیل تعداد برگ، ارتفاع گیاه اثر چندانی بر عملکرد برگ خشک نداشتند. در مطالعات انجام شده توسط حاتمی‌ملکی و همکاران (Hatami Maleki et al., 2011)، بین صفت وزن خشک برگ با سایر صفات مورفولوژیکی توتون از قبیل وزن تر برگ، تعداد برگ، طول برگ، عرض برگ، ارتفاع گیاه و قطر ساقه همبستگی مثبت و معنی‌داری مشاهده شد.

با توسعه نشانگرهای مولکولی DNA از قبیل RAPD و الیمز و همکاران (Williams et al., 1990)، SSR مورگان و اولیوری (Morgante and Olivieri, 1993)، AFLP و همکاران (Vos et al., 1995) و ISSR زیت کیویس و همکاران (Zietkiewicz et al., 1994) این امکان فراهم شده است که مکان‌های ژنی کنترل‌کننده صفات کمی را شناسایی نموده (QTL mapping) و در برنامه‌های اصلاحی از آنها استفاده نمود. در این روش، تفرق همزمان صفات کمی و نشانگرهای مولکولی بررسی شده و تعداد ژن‌ها، نوع عمل ژن‌ها و میزان اثر هر یک برآورد شده و مکان QTL ها روی ژنوم مشخص می‌شود (لیو، کاتو و همکاران (Liu, 1998; Kato et al., 2000)). شناسایی QTL های کنترل‌کننده صفات کمی می‌تواند به فهم کنترل ژنتیکی آن‌ها و توسعه استراتژی‌های گزینش به کمک نشانگر کمک نماید (Julio et al., 2006a). جمعیت‌های مختلفی جهت مکان‌یابی QTL ها مورد استفاده قرار می‌گیرند که هر یک دارای مزایا و معایبی می‌باشند. از جمله جمعیت‌های مورد استفاده در تهیه نقشه‌های ژنتیکی جمعیت F_2 بوده که از خودگشتی نسل F_1 حاصل از تلاقی دو والد منتخب حاصل می‌شود. از معایب نسل F_2 ، وجود تعداد میوز کمتر نسبت به نسل‌های پیشرفته می‌باشد، فلذا ممکن است نشانگرهایی که در فاصله دور از QTL قرار گرفته‌اند به صورت پیوسته با آن باقی بمانند که این، ممکن است باعث اختلال در مکان‌یابی QTL شود. از دیگر معایب این جمعیت‌ها، اندازه‌گیری صفات بر مبنای تک بوته است که در رابطه با صفات کمی که به شدت تحت تأثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرند می‌تواند باعث اربیی در نتایج شود و به همین دلیل بهتر است مکان‌یابی QTL با جمعیت $F_{2,3}$ صورت گیرد و برای گزینش براساس نشانگر، مارکرهایی معرفی شوند که وابسته به نسل نباشد. با توجه به این که در نسل F_2 ، QTL های شناسایی شده ممکن است پایدار و از طرفی تکرارپذیر نباشند، استفاده از

فنونتیپی را توجیه می‌کردند. لین و همکاران (Lin *et al.*, 2001) از طریق ۶۹ نشانگر RFLP و ۱۰۲ نشانگر RAPD با استفاده از جمعیت F_۲، نقشه پیوستگی توتون شامل ۱۹ گروه پیوستگی را تهیه نمودند که طول آن ۱۳۸۵/۶ سانتی‌مورگان بود. چین و همکاران (Chen *et al.*, 2009) با استفاده از نشانگرهای AFLP و SRAP، ۷ QTL مرتبط با مقاومت به بیماری ساقه سیاه در توتون را شناسایی کردند که در چهار گروه پیوستگی قرار داشتند. در مطالعه‌ای که توسط زایو و همکاران (2006) انجام گرفت، با استفاده از جمعیت دابل هاپلوئید، ۷ QTL مرتبط با صفات محتوای شکر، نیکوتین و پتاسیم در توتون شناسایی شد. با توجه به مطالب ذکر شده، تهیه نقشه‌های ژنتیکی و مکان‌یابی جایگاه‌های ژنومی دخیل در کنترل صفات اهمیت اساسی در علم به‌نژادی گیاهی دارد زیرا علاوه‌بر تسهیل درک نحوه کنترل ژنتیکی صفات و گزینش در جمعیت‌های در حال تفرق، در جداسازی و کلونینگ مکان‌های ژنی موردنظر به محققین کمک می‌کند. هدف از این مطالعه، تهیه نقشه پیوستگی توتون شرقی با استفاده از نشانگرهای SSR و ISSR در یک جمعیت F_۲ حاصل از تلاقی دو ژنوتیپ توتون شرقی شامل ۴۰۶ SPT (والد پدری) و ۳۱ Basma seres (والد مادری) و مکان‌یابی QTL‌های کنترل‌کننده صفات مورفولوژیکی با استفاده از نقشه پیوستگی تهیه شده می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و ارزیابی صفات مورفولوژیکی

در این مطالعه، دو ژنوتیپ توتون شرقی شامل Basma seres 31 (والد مادری) و SPT 406 (والد پدری) که براساس مطالعه قبلی حاتمی‌ملکی و همکاران (Hatami Maleki *et al.*, 2012) از نظر اکثر صفات آگرومورفولوژیکی از قبیل عملکرد برگ خشک، عملکرد برگ تر، عرض برگ، طول برگ، تعداد برگ، ارتفاع گیاه، فاصله میان‌گره، قطر ساقه و سطح برگ با همدیگر متفاوت بوده و در دو انتهای توزیع صفات قرار داشتند، انتخاب گردیدند. دو ژنوتیپ مذکور با همدیگر تلاقی داده شده و از ۱۰۰ فرد F_۲ حاصل از خودگشنی بوته‌های F_۱، جهت تهیه نقشه پیوستگی استفاده شد. بدین منظور در سال زراعی ۹۰-۸۹ بذور جمعیت به همراه والدین در خزانه با تراکم ۵ گرم بر مترمربع کشت و سپس سطح خزانه با لایه نازکی از کود حیوانی پوسیده پوشیده شد. قبل از انتقال گیاهچه‌ها به زمین اصلی، زمین محل آزمایش شخم و دیسک زده شد تا خاک آن کاملاً نرم شود. گیاهچه‌ها بعد از رسیدن به ارتفاع ۱۲ سانتی‌متر، به زمین اصلی انتقال یافتند. نشاءها با فواصل بین و

این جمعیت‌ها برای انجام مطالعات پایه‌ای در گیاهانی که گزارشات کمی در مورد شناسایی QTL‌ها و نحوه اثرات آن‌ها وجود دارد مناسب است. در مکان‌یابی QTL با استفاده از نسل F_۲ در کنار اثرات افزایشی، اثرات غالبیت ژن‌های کنترل‌کننده صفات نیز قابل برآورد است.

مکان‌یابی جایگاه‌های ژنی کنترل‌کننده صفات کمی (QTL mapping) در دهه‌های اخیر برای مطالعه ژنتیکی صفات کمی در گیاهان مختلف خانواده *Solanaceae* شامل سیب‌زمینی تنکسلی و همکاران (Tanksley *et al.*, 1992)، گوجه‌فرنگی تنکسلی و همکاران (1992) مورد استفاده قرار گرفته است. با این حال در مورد توتون مطالعات نقشه‌یابی QTL محدود است که دلیل اصلی آن دشوار بودن تهیه نقشه ژنتیکی برای توتون است، زیرا میزان چندشکلی در ارقام توتون بسیار محدود است دلپیانو و همکاران؛ رن و تیمکو؛ روسی و همکاران؛ آرسلان و اوکوموس؛ جلیو و همکاران؛ راجو و همکاران؛ مون و همکاران (Del Piano *et al.*, 2000; Ren and Timko, 2001; Rossi *et al.*, 2001; Arslan and Okumus, 2006; Julio *et al.*, 2006b; Raju *et al.*, 2008; Moon *et al.*, 2008, 2009a,b) در مطالعه‌ای، لی و همکاران (Li *et al.*, 2011) با استفاده از ۱۲۷ فرد F_۲ و خانواده F_{۲:۳} و ۱۹۰ نشانگر SRAP، ISSR و RAPD نقشه پیوستگی توتون را تهیه و یازده QTL مرتبط با شش صفت مهم را شناسایی کردند. زایو و همکاران (Xiao *et al.*, 2006) در یک جمعیت دابل هاپلوئید حاصل از تلاقی Speight G-28 و NC 2328 با استفاده از ۱۶۹ نشانگر ISSR و RAPD نقشه پیوستگی برای توتون تهیه کردند که شامل ۲۷ گروه پیوستگی بود و ۲۰۹۴/۶ سانتی‌مورگان طول داشت. ایشان با استفاده از این نقشه پیوستگی ۱۵ QTL با اثر افزایشی را برای صفات مختلف شناسایی کردند. چایی و همکاران (Chai *et al.*, 2009) با استفاده از نشانگرهای SRAP و AFLP، ۲ QTL مرتبط با محتوای نیکوتین و نیتروژن، یک QTL برای محتوای شکر و یک QTL برای هر یک از صفات ارتفاع گیاه، قطر ساقه، فاصله میان‌گره و طول برگ‌های میانی گزارش نمودند. در تحقیقی دیگر با استفاده از روش مکان‌یابی فاصله‌یابی مرکب (CIM)، چهار QTL مرتبط با صفت شاخص زردی برگ در توتون‌های گرمخانه‌ای شناسایی شد که در گروه‌های پیوستگی ۱، ۸ و ۹ قرار داشتند و ۷/۵۷ الی ۹/۲۶ درصد از تغییرات فنوتیپی صفت را توجیه می‌نمودند *Tan* و همکاران (Tan *et al.*, 2012). تونگ و همکاران (Tong *et al.*, 2012) ۳ QTL مرتبط با مقاومت به بیماری لکه قهوه‌ای در توتون گرمخانه‌ای را شناسایی نمودند که بر روی گروه‌های پیوستگی LG2a، LG3a و LG5 قرار داشتند و ۳۱/۱۴ درصد از تنوعات

درون بوته‌ای به ترتیب 20×65 سانتی متر کشت شدند. کلیه عملیات زراعی مطابق با توصیه‌های مرکز تحقیقات توتون ارومیه در رابطه با کشت و عمل‌آوری توتون‌های شرقی انجام گرفت. آبیاری مزرعه زمانی انجام می‌گرفت که ۸۰ درصد رطوبت خاک تخلیه می‌شد. چیدن برگ‌ها در سه نوبت بعد از رسیدگی صنعتی انجام شد و سپس در مقابل آفتاب که ویژه توتون‌های شرقی است خشک گردیدند. در این مطالعه، در مرحله چهارم برگ‌های نمونه‌برداری به منظور استخراج DNA تهیه شد و صفات طول برگ (LL) (از نوک برگ تا انتهای برگ بر حسب سانتی متر در بزرگ‌ترین برگ چین دوم)، عرض برگ (LW) (پهن‌ترین قسمت برگ بر حسب سانتی متر در بزرگ‌ترین برگ چین دوم)، وزن خشک برگ‌های بوته (LDW total)، وزن تر برگ‌های بوته (LFW total)، تعداد برگ (NL) (شامل تعداد برگ‌های قابل برداشت هر گیاه در مجموع چین‌ها)، ارتفاع ساقه (HS) (بر حسب سانتی متر از سطح خاک تا ابتدای گل آذین)، قطر ساقه (میلی متر) (SS) و سطح برگ (LA) (بر حسب سانتی متر مربع) در تک بوته‌ها و پس از گلدهی گیاهان ارزیابی شدند. کلیه عملیات زراعی در مزرعه تحقیقاتی مرکز تحقیقات توتون ارومیه انجام گرفت.

استخراج DNA ژنومی و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با نشانگرهای SSR و ISSR

DNA ژنومی از گیاهان والدینی و افراد F_2 با روش دلاپورتا و همکاران (Dellaporta *et al.*, 1983) استخراج شد. در این مطالعه، ۱۶۲ نشانگر SSR مربوط به نقشه ژنتیکی بیندلر و همکاران (Bindler *et al.*, 2007) و ۸۰ نشانگر ISSR مربوط به دانشگاه بریتیش کلمبیا از نظر چندشکلی در دو ژنوتیپ ۴۰۶ SPT (والد پدری) و ۳۱ Basma seres (والد مادری)، مورد آزمون قرار گرفتند. لازم به ذکر است که واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای SSR و ISSR به ترتیب با روش /یک و همکاران (Ek *et al.*, 2005) و یانگ و همکاران (Yang *et al.*, 2007) انجام گرفت. تعیین ژنوتیپ افراد F_2 با استفاده از نشانگرهای چندشکل SSR و ISSR انجام شد.

تهیه نقشه پیوستگی و شناسایی QTL

نقشه پیوستگی با استفاده از داده‌های حاصل از انگشت‌نگاری افراد جمعیت از طریق نشانگرهای چندشکل در بین والدین جمعیت و به وسیله نرم‌افزار Carthagene گیوری و همکاران (Givry *et al.*, 2005) با استفاده از تابع کوسامبی و حداقل LOD برابر با سه و ماکزیمم فاصله برابر با ۵۰ سانتی مورگان

تهیه شد. شناسایی QTL های کنترل کننده صفات مورد مطالعه از طریق نقشه پیوستگی تهیه شده و ارزش اندازه‌گیری شده در افراد جمعیت و با استفاده از روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب زنگ (Zeng, 1993, 1994) انجام گرفت. تجزیه QTL به روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب با استفاده از نرم‌افزار Win QTL Cartographer باستن و همکاران (Basten *et al.*, 2001) انجام شد. برای تعیین مقدار LOD آستانه برای شناسایی QTL های معنی‌دار از آزمون جایگشت ($n=1000$) استفاده شد و مقدار LOD آستانه برای صفات مختلف متفاوت بود. در این مطالعه، نام‌گذاری QTL ها به صورت (QTL + صفت + گروه پیوستگی + تعداد QTL) انجام گرفت: که در این نام‌گذاری QTL با حرف کوچک "q" مشخص شد و اگر بیش از یک QTL در یک گروه پیوستگی قرار داشت به ترتیب با شماره‌های یک، دو و غیره نشان داده شدند.

نتایج و بحث

ارزیابی صفات مورفولوژیک در جمعیت در حال تفرق

طبق مطالعات حاتمی‌ملکی و همکاران (2012) که روی ۱۰۰ ژنوتیپ توتون شرقی انجام گرفته بود، مشخص شد دو ژنوتیپ ۴۰۶ SPT و ۳۱ Basma seres از نظر ژنتیکی تفاوت معنی‌داری با هم دارند و با توجه به این نتایج انتظار می‌رود تنوع بین افراد نسل F_2 حاصل از تلاقی دو والد ذکر شده نیز ژنتیکی باشد. عملکرد فنوتیپی جمعیت F_2 و والدین آنها برای صفات مورد مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است. از نظر صفات ارتفاع گیاه، تعداد برگ، سطح برگ، وزن خشک و وزن تر برگ بین والدین جمعیت اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد (جدول ۱) که در توافق با نتایج مطالعات قبلی است. برای صفات ارتفاع گیاه، وزن تر و خشک برگ مقادیر حداکثر و حداقل ارزش F_2 ، بالاتر و پایین‌تر از ارزش والدین می‌باشد که نشان‌دهنده وجود تفکیک متجاوز برای صفات ذکر شده در جمعیت F_2 است (جدول ۱). وجود تفکیک متجاوز نشان‌دهنده آن است که والدین از نظر ژن‌های کنترل‌کننده صفات مزبور متفاوت هستند. علاوه بر این، تفکیک متجاوز مبین ماهیت کمی صفات بوده و به معنای آن است که آلل‌های افزایش‌دهنده و کاهش‌دهنده مقدار صفات همزمان در هر کدام از دو والد حضور دارند و در برخی از نتایج، تعداد بیشتری آلل افزایش‌دهنده یا کاهش‌دهنده نسبت به والدین جمع شده و ترکیب آن‌ها منتج به مقادیر بالاتر و پایین‌تر از والدها شده است محمدی و همکاران (Mohammadi *et al.*, 2008).

همکاران (2006a) تغییرات فنوتیپی زیادی بین افراد جمعیت RIL (لینه‌های خالص نوترکیب) در توتون مشاهده نمودند. با توجه به نتایج جولینو و همکاران (2006a) از ۵۹ صفت مورفولوژیکی و شیمیایی مورد مطالعه در توتون، ۳۷ صفت بین والدین تفاوت معنی‌داری داشتند که وجود این تفاوت معنی‌دار بین والدین، مکان‌یابی QTL‌های مرتبط با آن‌ها را امکان‌پذیر می‌سازد.

در این مطالعه، سود ژنتیکی؛ حاصل اختلاف میانگین ۱۰ درصد از بهترین F_۲ها با میانگین والدین برای صفات ارتفاع گیاه، قطر ساقه، تعداد برگ، وزن تر و خشک برگ معنی‌دار است (جدول ۱) که نشان‌دهنده تنوع و امکان بهبود ارزش صفات در نسل‌های بعدی است. با توجه به نتایج، اختلاف بین میانگین افراد F_۲ و والدین در صفات قطر ساقه و تعداد برگ معنی‌دار می‌باشد (جدول ۱). در مطالعات قبلی، جولینو و

جدول ۱: پارامترهای ژنتیکی صفات مورد مطالعه در جمعیت در حال تفرق F_۲ و والدین آن‌ها

Table 1: Genetic parameters of studied traits in F₂ population and their parents

وزن خشک برگ	وزن تر برگ	سطح برگ	عرض برگ	طول برگ	تعداد برگ	قطر ساقه	ارتفاع گیاه	
Dry leaf weight per plant (g)	Fresh leaf weight per plant (g)	Leaf surface (cm ²)	Leaf width (cm)	Leaf length (cm)	Leaf number	Stem diameter (mm)	Plant height (cm)	
69.2	344.0	1833.0	13.4	26.3	32.0	5.7	136.7	والد مادری Female parent [Basma seres 31: P1]
60.0	211.2	1046.5	21.7	36.5	16.8	4.9	88.6	والد پدری Male parent [SPT406: P2]
9.2*	132.8*	786.5*	-8.3	-10.1	15.1*	0.7	48.1*	P1-P2
64.6	277.6	1439.7	17.5	31.4	24.4	5.3	112.6	میانگین والدین Mean of parents [X _P]
102.0	588.0	1667.0	19.9	35.6	59.0	25.9	177.1	حداکثر Maximum
2.0	8.17	151.7	4.6	14.0	18.0	6.6	52.1	حداقل Minimum
41.3	207.3	681.3	11.3	24.3	32.1	13.5	115.9	میانگین افراد F ₂ [X _{F2}]
-23.3	-0.3	-758.5	-6.2	-7.0	7.7*	8.2*	3.2	X _{F2} - X _P
84.8	495.2	1338.0	17.7	31.9	42.5	21.7	165.6	میانگین ۱۰٪ از بهترین افراد F ₂ [X _{10%best F2}]
20.2*	217.6*	-101.7	0.2	0.5	18.0*	15.9*	53.0*	سود ژنتیکی Genetic gain [GG10% = X _{10%best F2} - X _P]
24.0	136.8	327.4	3.5	4.7	5.8	4.0	4.0	انحراف معیار Standard deviation

* Significant at 0.05 probability level

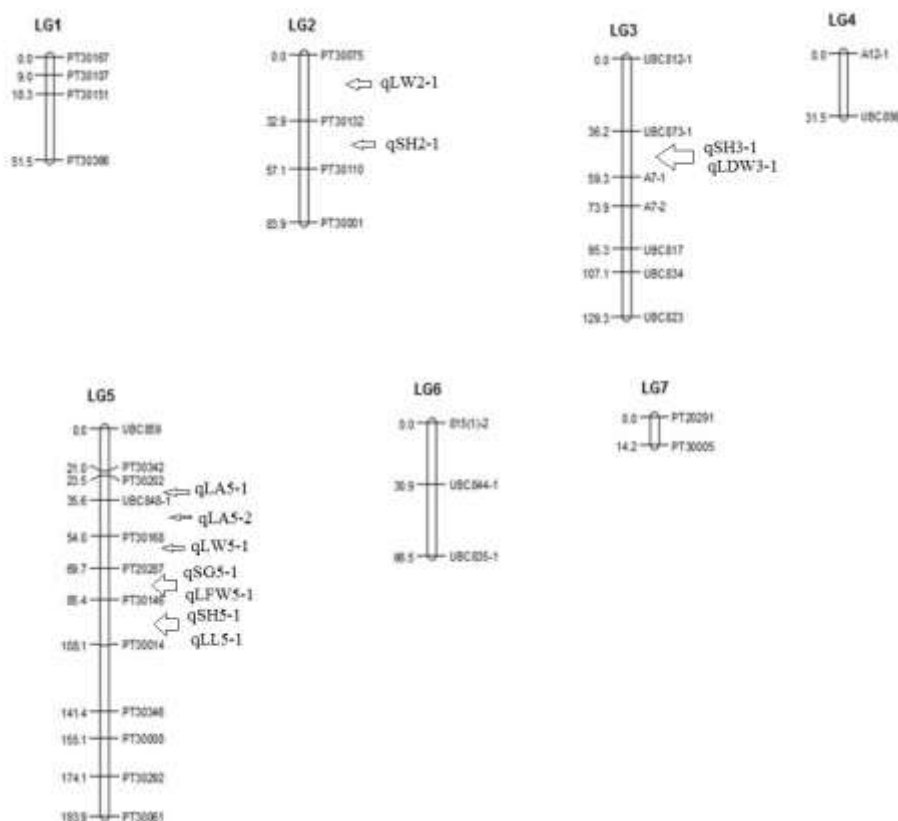
* معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد

معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۲) حال آن‌که در تحقیقی که توسط حاتمی‌ملکی و همکاران (2011) انجام شد، همبستگی معنی‌داری بین این صفات گزارش شده است. از آنجایی که در مطالعه حاتمی‌ملکی و همکاران (2011) مقدار وزن خشک برگ، میانگین عملکرد بوته‌های موجود در کرت می‌باشد، حال آنکه در مطالعه حاضر، همبستگی ساده بین وزن خشک تک بوته‌ها با ارتفاع گیاه و تعداد برگ تک بوته‌ها محاسبه گردیده است مشاهده چنین اختلافاتی دور از ذهن نیست. ولی در مجموع همانند مطالعه قبلی حاتمی‌ملکی و همکاران (2011) اکثر همبستگی‌های بین صفات، معنی‌دار است. همچنین صفات طول برگ و عرض برگ همبستگی بالایی با صفت سطح برگ نشان دادند (جدول ۲) که این نتیجه قابل پیش‌بینی است چون

نتایج همبستگی‌های ساده بین صفات مورد مطالعه در جدول ۲ نشان داده شده است. بالاترین همبستگی مثبت بین صفت وزن تر برگ با صفت سطح برگ مشاهده شد (جدول ۲) که این همبستگی در تطابق با نتایج محسن‌زاده گلفزانی و همکاران (Mohsenzadeh-Golfazani et al., 2012) می‌باشد. بین وزن تر برگ با صفات طول برگ و ارتفاع بوته نیز همبستگی مثبت و معنی‌دار مشاهده شد (جدول ۲) که با نتایج تورسیلا و همکاران (Torrecilla et al., 2002) و حاتمی‌ملکی و همکاران (2011) مطابقت دارد. بین وزن خشک برگ با صفات طول برگ، عرض برگ و سطح برگ در سطح احتمال پنج درصد همبستگی مثبت و معنی‌دار مشاهده شد ولی بین وزن خشک برگ با صفات ارتفاع بوته و تعداد برگ همبستگی

بین وزن تر برگ و وزن خشک آن باعث می‌شود هرگونه تلاش در جهت اصلاح هر کدام از صفات مورفولوژیکی باعث افزایش مقدار عملکرد خشک برگ شود. انتظار می‌رود صفاتی که با هم همبستگی دارند، QTL‌های کنترل‌کننده آنها روی گروه‌های پیوستگی هم مکان باشند (شکل ۱).

با افزایش طول و عرض برگ به‌طور طبیعی سطح برگ نیز افزایش می‌یابد. با توجه به جدول ۲، قطر ساقه با صفات دیگر به غیر از وزن خشک برگ، همبستگی بالایی نشان داد. وجود همبستگی مثبت بین عملکرد تر برگ با سایر صفات مورفولوژیکی به‌خصوص با صفات طول، عرض و سطح برگ و



شکل ۱: نقشه پیوستگی حاصل از نشانگرهای SSR و ISSR در جمعیت F_2 توتون حاصل از تلاقی بین SPT ۴۰۶ و ۳۱ Basma seres
 Fig. 1: Linkage map produced by SSR and ISSR markers on tobacco F_2 individuals derived from the cross between 'Basma seres 31' × 'SPT 406'.

توتون شرقی را پوشش می‌دهد و ۱۸ نشانگر غیرمرتبط بودند. گروه‌های پیوستگی به‌ترتیب از یک تا هفت بودند. در نقشه پیوستگی تهیه شده، تعداد نشانگرها در گروه‌های پیوستگی حداقل دو عدد و حداکثر ۱۲ عدد بوده و میانگین فاصله بین دو نشانگر ۱۷/۳ سانتی‌مورگان است (شکل ۱). اولین بار بیندلر و همکاران (2007) با استفاده از ۲۸۲ نشانگر SSR نقشه پیوستگی در توتون را تهیه کردند که شامل ۲۴ گروه پیوستگی بود. با توجه به شکل ۲ از هفت گروه پیوستگی شناسایی شده در مطالعه حاضر سه گروه از نظر وجود نشانگرهای مشترک با گروه‌های پیوستگی موجود در نقشه ژنتیکی تهیه شده توسط بیندلر و همکاران (2007) مشترک بودند. تهیه نقشه با استفاده از نشانگرهای SSR توسط محققین دیگری نیز صورت گرفته است بیندلر و همکاران، ونتیمیتا و لوئیس، تونگ و همکاران

نقشه پیوستگی ژنتیکی

نتایج این تحقیق نشان داد که ۲۳ جفت آغازگر SSR از ۱۶۲ جفت آغازگر SSR و ۲۹ آغازگر ISSR از ۸۰ آغازگر ISSR مورد مطالعه، بین والدین تشکیل‌دهنده جمعیت F_2 ، چندشکل می‌باشند. به‌منظور بررسی وجود یا عدم‌وجود انحراف فراوانی‌های آلی و ژنوتیپی نشانگرهای شناسایی شده از نسبت‌های مورد انتظار مندلی (نسبت ۳:۱ برای نشانگر ISSR و نسبت ۱:۲:۱ برای نشانگر SSR) از آزمون کای‌اسکور استفاده شد و مشخص شد که ۵۲ نشانگر مورد مطالعه دارای توزیع مندلی می‌باشند. میزان چندشکلی برای نشانگر SSR ۱۴/۲ درصد و برای نشانگر ISSR ۳۶/۲۵ درصد به‌دست آمد. از ۵۲ آغازگر چندشکل (SSR ۲۳ و ISSR ۲۹)، ۳۴ نشانگر در ۷ گروه پیوستگی قرار گرفتند که ۵۷۰/۸ سانتی‌مورگان از ژنوم

سانتی مورگان و کوچک ترین گروه آن، گروه پیوستگی ۲۱ با طول ۸۵ سانتی مورگان می باشد. نقشه پیوستگی تهیه شده توسط تونگ و همکاران (2012) شامل ۲۴ گروه پیوستگی بود که از ۱۹۶ نشانگر SSR برای تهیه آن استفاده شده بود و طول گروه های پیوستگی تهیه شده از ۴/۱ الی ۲۱۵/۹ سانتی مورگان متغیر بودند. همچنین، ونتیمیتا و لوتیس (2010)، با استفاده از ۲۰۶ نشانگر SSR، نقشه پیوستگی توتون شامل ۲۴ گروه پیوستگی را تهیه نمودند که بزرگ ترین گروه پیوستگی (گروه پیوستگی ۹) ۱۱۰/۳ سانتی مورگان طول داشت.

(Bindler et al., 2011; Vontimitta and Lewis, 2010; Tong et al., 2012)، حال آن که گزارشات کمی در مورد استفاده از نشانگر ISSR برای تهیه نقشه پیوستگی در توتون وجود داشته و این نشانگر در ترکیب با سایر انواع نشانگرها در توتون به کار گرفته شده است (Xiao et al., 2008; Ma et al., 2008). بیندلر و همکاران (2011) نقشه پیوستگی مترامکی از توتون گرمخانه ای را با استفاده از ۲۳۱۸ نشانگر SSR تهیه کردند که ۳۲۷۰ سانتی مورگان طول داشت که بزرگ ترین گروه آن، گروه پیوستگی ۲۲ با طول ۱۹۹

جدول ۲: ضرایب همبستگی ساده بین صفات مورد مطالعه در توتون شرقی

Table 2: Simple correlation coefficients between the studied traits in oriental tobacco

وزن تر برگ Fresh leaf weight per plant	سطح برگ Leaf surface	عرض برگ Leaf width	طول برگ Leaf length	تعداد برگ Leaf number	قطر ساقه Stem diameter	ارتفاع گیاه Plant height	صفات Characters
					1.00	0.84**	قطر ساقه Stem diameter
				1.00	0.38**	0.40**	تعداد برگ Leaf number
			1.00	0.44**	0.85**	0.87**	طول برگ Leaf length
		1.00	0.85**	0.35**	0.89**	0.82**	عرض برگ Leaf width
	1.00	0.98**	0.92**	0.37**	0.91**	0.83**	سطح برگ Leaf surface
1.00	0.93**	0.89**	0.89**	0.39**	0.91**	0.83**	وزن تر برگ Fresh leaf weight per plant
0.27**	0.24*	0.21*	0.24*	0.13 ^{ns}	0.27**	0.12 ^{ns}	وزن خشک برگ Dry leaf weight per plant

ns, * و ** به ترتیب اختلاف غیرمعنی دار در سطح احتمال ۵٪، اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪ می باشد
ns, * and ** are non significant at 0.05 and significant at 0.05 and 0.01 probability levels, respectively

از تغییرات مربوط به فنوتیپ را کنترل نموده و در گروه های دو، سه و پنج قرار دارند (جدول ۳). همچنین، دو QTL برای صفت عرض برگ شناسایی شد که در مجموع ۳۳/۱ درصد از تغییرات فنوتیپی را توجیه نموده و QTL، qLW5-1 بیشترین نقش را در کنترل این صفت دارا می باشد (جدول ۳).

برای صفت سطح برگ، دو QTL در گروه پیوستگی ۵ شناسایی شد که در مجموع ۳۶/۵ درصد از تغییرات این صفت را کنترل می کردند (جدول ۳). برای هر یک از صفات وزن خشک برگ و وزن تر برگ، یک QTL در گروه های پیوستگی سه و پنج شناسایی گردید که به ترتیب ۱۷/۱ و ۱۵ درصد از تغییرات فنوتیپی مربوط به هر کدام از صفات را کنترل می نمودند (جدول ۳). با توجه به جدول ۳، یک QTL برای صفت طول برگ شناسایی شد که در گروه پیوستگی ۵ و در فاصله ۹۵/۴ cM قرار داشته و مقدار اثر فنوتیپی این QTL، ۱۷/۲ درصد و مقدار اثر افزایشی آن ۲/۱۴- درصد می باشد و

شناسایی QTL های کنترل کننده صفات مورفولوژیک

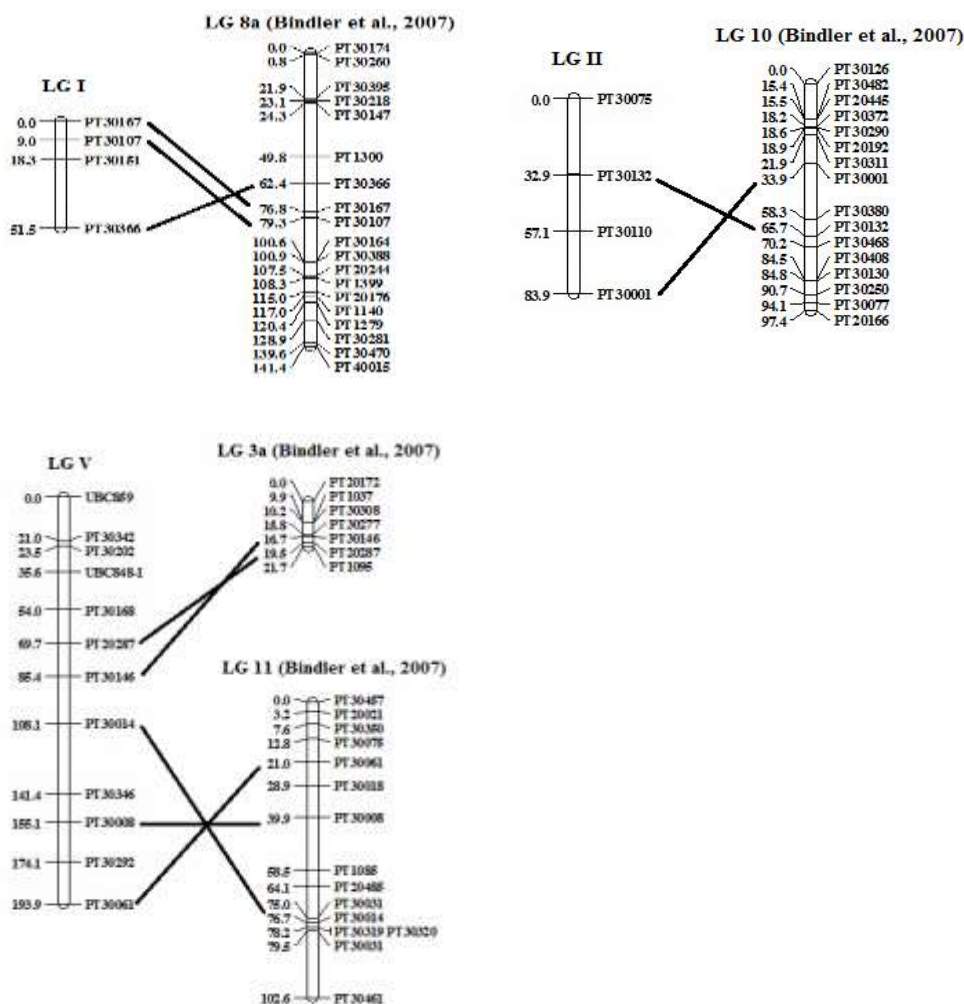
به منظور شناسایی QTL های کنترل کننده صفات مورد بررسی از روش مکان یابی فاصله ای مرکب (CIM) استفاده گردید. مقدار LOD آستانه محاسبه شده برای شناسایی QTL های کنترل کننده صفات مختلف در جدول ۳ آورده شده است. از بین هشت صفت مورد مطالعه، برای هفت صفت، تعداد ۱۱ QTL شناسایی گردید که در گروه های پیوستگی دو، سه و پنج پراکنده بودند (جدول ۳ و شکل ۱). در مجموع از تعداد ۱۱ QTL، بیشترین تعداد QTL در گروه پیوستگی پنج شناسایی شد.

در این مطالعه، برای صفت قطر ساقه، یک QTL در گروه پیوستگی پنج شناسایی شد که ۱۳ درصد از تغییرات فنوتیپی صفت را کنترل می نمود (جدول ۳) آلل افزایش دهنده این QTL از والد ۳۱ Basma seres منتقل شده است. برای صفت ارتفاع گیاه، سه QTL شناسایی شد که در مجموع ۳۵/۵ درصد

جولیو و همکاران (2006a) ۵۹ صفت زراعی و شیمیایی توتون را مورد بررسی قرار دادند و در مجموع ۱۰۲ QTL شناسایی کردند که در گروه‌های مختلف پراکنده بودند. ونتیمتا و *Phytophthora* (2010)، شش QTL مرتبط با مقاومت به قارچ *nicotianae* را در توتون شناسایی کردند که ۶۴/۳ درصد از تغییرات فنوتیپی را کنترل می‌نمودند. همان‌طور که در شکل یک مشاهده می‌شود تعدادی از QTL های مربوط به صفات در گروه‌های پیوستگی با هم تداخل دارند که ممکن است بیانگر وجود اثر پلپتروپی یا پیوستگی شدید ژن‌ها باشد. این مسأله از نظر اصلاح ژنتیکی حائز اهمیت است، زیرا می‌توان چندین صفت را به‌طور هم‌زمان اصلاح نمود.

علامت منفی نشان‌دهنده توارث این اثر از والد مادری است. در این مطالعه برای صفت تعداد برگ هیچ QTL شناسایی نگردید که می‌تواند به علت کافی نبودن تعداد نشانگرهای مورد مطالعه و عدم پوشش ژنومی کامل باشد زیرا نقشه ژنتیکی اشباع شده با تعداد زیاد نشانگر، نقش مهمی در مطالعات نقشه‌یابی ژنتیکی دارد تنکسلی و همکاران (Tanksley *et al.*, 1989).

با توجه به نتایج تحقیقات قبلی در توتون، زایو و همکاران (2008) برای صفت ارتفاع گیاه و فاصله میان‌گره به‌ترتیب دو و چهار QTL در گروه‌های پیوستگی ۲، ۸، ۱۸ و ۲۶ شناسایی نمودند. همچنین زایو و همکاران (2008) برای صفات طول برگ، عرض برگ و تعداد برگ به‌ترتیب دو، سه و دو QTL در گروه‌های پیوستگی ۱، ۳، ۵، ۷، ۱۲ و ۲۶ گزارش نمودند.



شکل ۲: مقایسه نقشه ژنتیکی تهیه شده با نقشه ژنتیکی تهیه شده در توتون‌های گرمخانه‌ای (Bindler *et al.*, 2007)

Fig. 2: Comparison of the constructed linkage map with the map of flue-cured tobacco (Bindler *et al.*, 2007)

جدول ۳: موقعیت و اثر QTL های شناسایی شده برای صفات مورفولوژیکی مورد مطالعه در جمعیت F_۲ توتون شرقی

Table 3: Position and effect of detected QTLs for the studied morphological traits in F₂ population of oriental tobacco

R ² %	اثر افزایشی Additive effect	LOD	موقعیت Position (cM)	نشانهگر Marker	گروه پیوستگی Linkage group (LG)	QTL	صفت
13.0	-2.5	4.3	85.4	7	5	qSG5-1	قطر ساقه Stem diameter
12.9	-14.6	2.7	36.9	2	2	qSH2-1	
11.6	-17.1	3.7	91.4	7	5	qSH5-1	ارتفاع گیاه Plant height
11.0	-12.4	2.8	36.2	2	3	qSH3-1	
10.3	-1.9	4.2	0.0	1	2	qLW2-1	عرض برگ Leaf width
22.8	-2.7	15.7	56.6	4	5	qLW5-1	
11.3	-206.7	4.3	32.5	3	5	qLA5-1	سطح برگ Leaf surface
25.2	-229.5	10.9	46.6	4	5	qLA5-2	
17.1	8.6	2.6	49.2	2	3	qLDW3-1	وزن خشک برگ Dry leaf weight per plant
15.0	-77.4	3.7	85.4	7	5	qLFW5-1	وزن تر برگ Fresh leaf weight per plant
17.2	-2.1	2.2	95.4	7	5	qLL5-1	طول برگ Leaf length

R²: درصد واریانس فنوتیپی بیان شده به وسیله QTLها. علامت منفی در اثرات افزایشی نشان دهنده نقش والد مادری (Basma seres

31) در افزایش صفت و علامت مثبت در اثرات افزایشی نشان دهنده نقش والد پدری (SPT 406) در افزایش صفت است

R²: percentage of phenotypic variance explained by the individual QTL. Negative sign in additive effect indicates that the positive allele comes from the maternal line (Basma seres 31); a positive sign indicates that the resistant allele is from the paternal line (SPT 406). Position: expressed in Kosambi cM, from the top of linkage group (LG). LOD: log10 likelihood ratio (likelihood that the effect occurs by linkage/likelihood that the effect occurs by chance). QTL: quantitative trait loci

نتیجه گیری کلی

با توجه به این که سطح چندشکلی در بین ارقام توتون پایین است و این مورد در مطالعات قبلی گزارش شده است رن و تیمکو؛ جولینو و همکاران (Ren and Timko, 2001; Julio *et al.*, 2006a) بهتر است به منظور گسترش نقشه و افزایش تعداد گروه های پیوستگی از نشانگرهای با قابلیت چندشکلی بالا مانند رتروترنسپوزون و SNP برای مطالعات بعدی استفاده گردد که در این صورت مکان یابی QTL با دقت بیشتر صورت خواهد گرفت.

منابع:

جهت مطالعه منابع به صفحه های ۵-۳ متن انگلیسی مراجعه شود.

اکثر صفات مهم در توتون کمی بوده و توسط یک سیستم چندژنی کنترل می شوند. چندین QTL اختصاصی و غیراختصاصی (هم مکان) برای صفات مورد بررسی شناسایی شد. QTLهایی با اثرات کوچک شناسایی شد که در کنترل صفات نقش داشتند که تأییدی بر وجود سیستم کنترل چندژنی است. شناسایی QTLهایی که هم زمان چندین صفت را کنترل می کنند، اهمیت زیادی در به نژادی گیاهی دارند، زیرا گزینش هم زمان چندین صفت را امکان پذیر می سازند و بدین ترتیب کارآیی انتخاب در برنامه های اصلاحی را افزایش می دهند.