Archive of SID

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال پنجم، شماره چهاردهم، تابستان ۱۳۹۵ (۷۲-۶۱)

Crop Biotech.
Summer (2016) 14: 61-72.

تهیه نقشه پیوستگی و مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده تعدادی از صفات زراعی و شیمیایی در توتون تیپ شرقی

فرامرز هوشیاردل[۱]، رضا درویش‌زاده[۲*]، حمید حاتمی ملکی[۳]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۲. استاد گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران
۳. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه مراغه، مراغه، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/٤/۵- تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/٦/۳۰)

Developing genetic linkage map and identification of quantitative trait loci controlling agro-chemical traits in oriental type tobacco

Faramarz Hoshyardel[1], Reza Darvishzadeh[2*] and Hamid Hatami Maleki[3]

1. M.Sc. in Agricultural Biotechnology, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.
2. Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
3. Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, Iran.

(Received: Jun. 25, 2016 - Accepted: Sep. 20, 2016)

چکیده

توتون (*Nicotiana tabacum* L.) از جمله گیاهان صنعتی است که در اقتصاد بسیاری از کشورها اهمیت اساسی دارد. توتون شرقی متشکل از واریته-های با برگ‌های کوچک، آفتاب‌خشک و ترکیبات آروماتیک فراوان می‌باشد که اطلاعات کمی در مورد صفات مختلف زراعی و شیمیایی و نحوه کنترل ژنتیکی آن‌ها وجود دارد. این پژوهش با هدف تهیه نقشه پیوستگی توتون شرقی در یک جمعیت لاین های اینبرد نوترکیب (۱۰۳ لاین) حاصل از تلاقی Basma seres 31 (♀) و SPT406 (♂) و شناسایی مکان‌های ژنی کنترل کننده تعدادی از صفات زراعی و محتوی کلر برگ در شرایط مزرعه‌ای انجام گرفت. برای تهیه نقشه پیوستگی، از نشانگرهای SSR، ISSR، IRAP و REMAP استفاده گردید. نقشه پیوستگی با استفاده از ٤٦ نشانگر تهیه گردید که ۵۸٦/۱ cM از ژنوم توتون را پوشش داده و متوسط فاصله بین دو نشانگر مجاور در این نقشه ژنتیکی ۱۲/۷٤ cM می‌باشد. تعداد نشانگرها در گروه‌های پیوستگی ایجاد شده بین ۲ الی ۱۳ عدد متغیر بود. با استفاده از روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب تعداد ۱۹ QTL با ضریب تبیین فنوتیپی ۱۳/۲ الی ٤۰/۱ درصد برای صفات طول برگ، تعداد برگ، روز تا گلدهی، مقدار کلروفیل، عرض برگ، ارتفاع گیاه، فاصله میانگره‌ها، قطر ساقه، عملکرد برگ خشک، مقدار فتوسنتز و محتوای کلر برگ شناسایی گردید. در این مطالعه، QTLهای هم مکان در گروه‌های پیوستگی ۱، ۳ و ۵ شناسایی گردید. مقادیر بالای عددی ضرایب تبیین فنوتیپی بدست آمده در تحقیق حاضر، بیانگر پتانسیل استفاده از نشانگرهای مبتنی بر رتروترنسپوزون‌ها (IRAP و REMAP) و نشانگرهای ریزماهواره‌ای شناسایی شده در برنامه‌های گزینش به کمک نشانگر در توتون شرقی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: توتون، فتوسنتز خالص، گروه پیوستگی، نشانگرهای مولکولی، مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب.

Abstract

Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) is an industrial plant that play important role in economy of most countries. Oriental tobacco is a sun-cured, small-leafed, highly aromatic type of tobacco with limited information about its agronomic and chemical characteristics and their genetic control. This research was conducted to prepare the genetic linkage map of oriental type tobacco in a recombinant inbred line population (103 lines) produced from the cross between SPT406 (male parent) and Basma seres 31 (female parent) and identification of genomic locations controlling some agronomic characteristics accompanied with chlorine content under field conditions. Markers including SSR, ISSR, REMAP and IRAP were utilized in construction of genetic linkage map. Linkage map comprising 46 markers was developed which covered 586.1 cM of tobacco genome and the average distance between two markers was 12.74 cM. Number of markers per linkage groups varied between 2 to 13. In this study, 19 QTLs with phenotypic variation between 13.2 to 40.1 were identified for characteristics including leaf length, leaf width, leaf number, plant height, internode distance, stem girth, dry leaf yield, photosynthesis value and leaf chlorine content using composite interval mapping. Co-localized QTLs were recognized in linkage groups 1, 3 and 5. Highest values of phenotypic variation achieved in the present study manifest the possibility for using identified retrotransposon and microsatellite markers in marker assisted selection programs of oriental type tobacco.

Keywords: Composite interval mapping, linkage group, molecular markers, net photosynthesis, tobacco.

* نویسنده مسئول: رضا درویش‌زاده

E-mail: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

گیاه توتون (*Nicotiana tabacum* L.) جزو خانواده سولاناسه (Solanaceae) می‌باشد. خانواده سولاناسه بیش از ۶۴ گونه داشته که در میان آن‌ها دو گونه *N. tabacum* و *N. rustica* بیشتر از سایر گونه‌ها مورد توجه بوده و به طور گسترده کشت می‌گردند. گونه *N. tabacum* یک گونه آلوپلی‌پلوئید (۲n=۴۸) با عدد پایه کروموزومی x=۱۲ می‌باشد. این گیاه از محصولات با ارزش کشاورزی و صنعتی بوده که در شرایط مختلف آب و هوایی در بیش از یکصد کشور دنیا کشت می‌شود. توتون از نظر اقتصادی، یکی از مهم‌ترین محصولات در جهان بوده و به‌عنوان یک ماده خام در صنعت استفاده می‌شود (Arslan and Okunus, 2006). از اهداف مهم به‌نژادی توتون افزایش تولید در واحد سطح، افزایش کیفیت، مقاومت به آفات و بیماری‌ها و تنش‌های محیطی است. از آنجا که اکثر صفات زراعی و شیمیایی در گیاهان کمی بوده؛ به دلیل پلی‌ژنیک بودن و تأثیرپذیری زیاد این صفات از عوامل محیطی، تجزیه این‌گونه صفات همواره با چالش روبرو بوده است (Van Eeuwijk *et al.,* 2004)، بنابراین با استفاده از روش‌های کلاسیک موفقیت زیادی نمی‌توان در جهت به نژادی چنین صفاتی متصور بود. در این میان، به‌نژادی گیاهی مبتنی بر ابزارهای مولکولی نظیر تکنولوژی نشانگرهای مولکولی می‌تواند مفید واقع شود به طوری که با استفاده از روش‌های ژنتیکی و آماری مناسب، می‌توان نشانگرهای مولکولی مرتبط با صفات کمی را شناسایی نموده و در پروژه‌های اصلاحی به جای گزینش افراد بر مبنای فنوتیپ از جمعیت‌های در حال تفرق، گزینش را با کمک نشانگرها انجام داد. از جمله روش‌های مورد استفاده جهت شناسایی نشانگرهای مولکولی مرتبط با صفات، نقشه‌یابی QTL[1] مبتنی بر تجزیه پیوستگی است. در این روش، هدف شناسایی نشانگرهای پیوسته با یک صفت کمی در یک جمعیت خواهر-برادری است. مکان‌یابی جایگاه‌های ژنی کنترل‌کننده صفات کمّی در دهه‌های اخیر برای مطالعه ژنتیکی صفات کمّی در گیاهان مختلف خانواده Solanaceae شامل سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی (Tanksley *et al.,* 1992) مورد استفاده قرار گرفته است. با این حال در مورد توتون مطالعات نقشه‌یابی QTL محدود بوده که دلیل اصلی آن دشوار بودن تهیه نقشه ژنتیکی برای توتون است، زیرا میزان چندشکلی در ارقام توتون بسیار پایین است (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، Li و همکاران (۲۰۱۱) با استفاده از ۱۲۷ فرد F_2 و $F_{2:3}$ و ۱۹۰ نشانگر SRAP، ISSR و RAPD نقشه پیوستگی برای توتون تهیه کرده و یازده QTL مرتبط با شش صفت مهم را شناسایی کردند. همچنین Xiao و همکاران (۲۰۰۶) در یک جمعیت دابل هاپلوئید (Doubled haploid: DH) حاصل از تلاقی Speight G-۲۲۸ و NC۲۳۲۸ 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. آن‌ها با استفاده از این نقشه پیوستگی، تعداد ۱۵ QTL با اثر افزایشی برای صفات مختلف شناسایی نمودند. در مطالعه دیگری Chai و همکاران (۲۰۰۹) با استفاده از نشانگرهای SRAP و AFLP تعداد دو QTL مرتبط با محتوای نیکوتین و نیتروژن، یک QTL برای محتوای شکر و یک QTL برای هر یک از

1. QTL mapping

www.SID.ir

Archive of SID

صفات ارتفاع گیاه، قطر ساقه، فاصله میانگره و طول برگ‌های میانی گزارش نمودند. در تحقیقی دیگر با استفاده از روش مکان‌یابی فاصله‌ای 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 *et al.*, 2012). در مطالعات دیگری که توسط Tong و همکاران (۲۰۱۲) به‌منظور مکان‌یابی ژن‌های کنترل کننده مقاومت به بیماری در توتون گرمخانه‌ای انجام گرفت، تعداد سه QTL مرتبط با مقاومت به بیماری لکه قهوه‌ای در توتون گرم‌خانه‌ای شناسایی گردید که بر روی گروه‌های پیوستگی LG2a، LG3a و LG5 قرار داشتند و ۳۱/۱۴ درصد از تنوعات فنوتیپی را توجیه می‌کردند. در زمینه مقاومت به بیماری ساقه سیاه نیز Chen و همکاران (۲۰۰۹) با استفاده از نشانگرهای SRAP و AFLP، تعداد هفت QTL مرتبط با مقاومت به بیماری ساقه-سیاه را شناسایی کردند که در چهار گروه پیوستگی قرار داشتند. مرور منابع مختلف بیانگر عدم وجود گزارشات وسیع در مورد تجزیه ژنتیکی صفات مختلف در توتون‌های شرقی بویژه با استفاده از نشانگرهای رتروترنسپوزونی می‌باشد. در این راستا این تحقیق با اهداف الف) تهیه نقشه پیوستگی در توتون تیپ شرقی با استفاده از یک جمعیت لاین‌های اینبرد نوترکیب F_6 و از طریق ترکیبی از نشانگرهای ریزماهواره، بین ریزماهواره و نشانگرهای رتروترنسپوزونی و همچنین ب) مکان‌یابی QTLهای کنترل کننده صفات زراعی و صفت شیمیایی محتوی کلر برگ (تاثیرگذار در سوزش برگ توتون) انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

به منظور تهیه نقشه ژنتیکی و شناسایی مکان‌های ژنی کنترل‌کننده صفات زراعی در توتون تیپ شرقی از ۱۰۳ لاین F_6 حاصل از تلاقی دو ژنوتیپ توتون شرقی شامل (♀) Basma seres 31 و SPT406 (♂) استفاده گردید. جمعیت F_6 از خودگشنی نسل F_1 و مدیریت جمعیت در حال تفرق با روش بالک تک بذری حاصل شده است. در سال زراعی ۹۳-۹۲ بذور هر کدام از لاین‌ها به همراه والدین در خزانه با تراکم ۹۰۰ نشاء در هر متر مربع کشت و خزانه با لایه نازکی از کود پوسیده حیوانی پوشیده شد. زمین اصلی جهت نرم و یکنواخت شدن، شخم و دیسک زده شد. ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک محل آزمایش در جدول ۱ ارائه شده است. نشاها در مرحله ارتفاع ۱۲ سانتی متری از خزانه به زمین اصلی منتقل و با فواصل بین بوته‌ای ۲۰ سانتی متر و بین ردیفی ۶۵ سانتی‌متر کشت شدند. آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار و هر کرت شامل ۳ خط ۵ متری در مزرعه تحقیقاتی مرکز تحقیقات توتون ارومیه (طول جغرافیایی ۴۴/۵۸، عرض جغرافیایی ۳۷/۳۴ و ارتفاع ۱۳۰۰ متر از سطح دریای آزاد) انجام گرفت. کلیه عملیات زراعی مطابق با توصیه CORESTA (مرکز همکاری‌های بین المللی مرتبط با تحقیقات توتون) (http://www.coresta.org/) در رابطه با کشت و عمل‌آوری توتون‌های شرقی انجام گرفت. آبیاری مزرعه پس از تخلیه ۸۰ درصد از آب قابل دسترس خاک انجام می‌گرفت. بر خلاف اکثر توتون‌ها (ویرجینیا و بارلی) که عمل سرزنی رایج است، در توتون‌های شرقی مورد مطالعه، این عمل انجام نگرفت. چیدن برگ‌ها در سه نوبت پس از رسیدن صنعتی انجام گرفت و سپس در مقابل آفتاب (که در توتون‌های شرقی مرسوم است) خشک گردیدند. یادداشت‌برداری صفات زراعی مختلف شامل روز تا گلدهی، تعداد برگ، مقدار کلروفیل، طول برگ، عرض برگ، ارتفاع گیاه، فاصله میانگره‌ها، قطر ساقه، عملکرد برگ خشک به همراه متغیرهای مقدار فتوسنتز و مقدار

www.SID.ir

Archive of SID

عنصر کلر موجود در برگ با انتخاب ۵ بوته تصادفی از هر کرت انجام گرفت و میانگین داده‌ها برای تجزیه و تحلیل‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

اندازه‌گیری فتوسنتز خالص با استفاده از دستگاه HSM-21000 ساخت شرکت ولز آلمان انجام گرفت. برای اندازه‌گیری درصد کلروفیل از دستگاه کلروفیل‌سنج استفاده شد و کار قرائت از سه نقطه از هر برگ در هنگام صبح انجام گردید. مقدار کلر هر نمونه مطابق دستورالعمل CORESTA در آزمایشگاه شیمی مرکز تحقیقات توتون ارومیه تعیین شد.

جدول ۱. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک محل آزمایش (مرکز تحقیقات توتون ارومیه)

مقدار	ویژگی خاک	مقدار	ویژگی خاک
۰/۷۳	(%) کربن ارگانیک	۷/۶	pH
۴۹/۹	(%) درصد اشباع	۰/۶	هدایت الکتریکی ($EC\times10^{-3}$ (ds m^{-1})
۱۱/۸۴	(%) کربنات کلسیم	۳۹/۳	فسفر (mg/kg)
۳/۵۷	(%) بی کربنات	۵۶۵	پتاسیم (mg/kg)
۱۶	(%) شن	۰/۱۱	(%) نیتروژن کل
۴۴	(%) رس شنی	۱/۸۷	منگنز (milimol of charge per liter)
۴۰	(%) رس	۱/۸۹	کلسیم (milimol of charge per liter)
		۰/۸	کلر (milimol of charge per liter)

جدول ۲. موقعیت و اثر QTL های شناسایی شده برای صفات مورفولوژیکی مورد مطالعه در جمعیت F۶

صفت	QTL	گروه پیوستگی	موقعیت	LOD	اثر افزایشی	R^2
کلر	qCL1	۱	۹۲	۳/۰۳	۲۰/۷	۲۲/۴
	qCL4	۴	۲۰	۳/۸۹	۳/۵	۲۷/۸
فاصله میانگره	qIN1	۱	۷۰	۶/۳۹	-۱۷/۲	۲۴/۹
	qIN3	۳	۸۰	۹/۶۷	۴۴/۶	۳۵/۱
عرض برگ	qLW1	۱	۷۰	۱۱/۴۶	-۹۶/۳	۴۰/۱
	qLW3	۳	۷۲	۷/۱۱	-۴۰/۴	۲۷/۲
تعداد برگ	qTB1	۱	۸۴	۴/۵۱	۲۵۸/۲	۱۸/۳
	qTB3	۳	۱۲	۳/۵۱	۱۹۹/۲	۱۴/۵
	qTB6	۶	۱۶	۳/۴۴	-۳۹/۱	۱۴/۳
طول برگ	qLL1	۱	۷۰	۱۰/۴	۱۲۶/۹	۳۷/۲
	qLL3	۳	۷۶	۷/۵۷	-۲۳۳/۵	۲۸/۷
فتوسنتز	qP1	۱	۷۴	۹/۱۹	۱۸۵/۵	۳۳/۷
	qP2	۲	۲۶	۵/۲۴	-۴۶/۸	۲۰/۹
ارتفاع گیاه	qPH1	۱	۶۶	۴/۱۱	۲۹۹/۱	۱۶/۸
	qPH3	۳	۸۰	۷/۸۱	۱۴۶۳/۱	۲۹/۵
قطر ساقه	qGS3	۳	۶۸	۷/۱۵	-۶/۹	۲۷/۴
روز تا گلدهی	qC505	۵	۴	۷/۶۶	۵۵/۸	۲۹
عملکرد برگ	qY1	۱	۱۸	۳/۰۵	-۲/۴	۱۳/۲
کلروفیل	qCOL5	۵	۸	۳/۷۵	۵۴/۳	۱۵/۵

qSG: QTL مربوط به قطر ساقه، qPH: QTL مربوط به ارتفاع گیاه، qLW: QTL مربوط به عرض برگ، qLL: QTL مربوط به طول برگ، qLN: QTL مربوط به تعداد برگ، qIN: QTL مربوط به فاصله میانگره، qCL: QTL مربوط به کلر، qP: QTL مربوط به فتوسنتز، qY: QTL مربوط به عملکرد کرت.

www.SID.ir

Archive of SID

تهیه نقشه پیوستگی و شناسایی مکان‌های ژنی کنترل‌کننده صفات مورد مطالعه

بعد از استقرار بوته‌های لاین‌های اینبرد نوترکیب (Recombinant inbred lines: RILs) مورد مطالعه در مزرعه و قبل از گلدهی، نمونه‌بردای از برگ‌های میانی انجام شد و بعد از فریز کردن در ازت مایع (۱۹۶°C-)، به فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد انتقال یافت. DNA ژنومی به روش CTAB از نمونه‌های برگی استخراج گردید. کیفیت DNA استخراج شده از نظر شکستگی، وجود یا نبود RNA، آلودگی به پروتئین‌ها و پلی‌ساکاریدها توسط اسپکتروفتومتر و ژل آگارز ۰/۸ درصد مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا آزمون چندشکلی به منظور شناسایی نشانگرهای چندشکل در والدین با استفاده از ۱۶۵ جفت آغازگر SSR گزارش شده توسط Bindler و همکاران (۲۰۰۷ و ۲۰۱۱)، ۵۵ آغازگر ISSR، ۶ آغازگر IRAP[1] و ۲۰ آغازگر REMAP[2] انجام گرفت. به عبارت دیگر ابتدا نوارهای چند شکل در بین دو والد مشخص شده و سپس الگوی همان نوارها در افراد RIL ردیابی شدند. امتیازدهی افراد RIL بر اساس نوارهای چندشکل انجام شد.

گروه‌های پیوستگی با استفاده از نرم‌افزار JoinMap 4.1 (Van Ooijen and Voorrips, 2001) با حداقل LOD برابر با ۳ ایجاد شدند؛ و برای تبدیل نسبت‌های نوترکیبی بین نشانگرها به واحد نقشه (cM) از تابع نقشه کوسامبی (Kosambi, 1994) استفاده گردید. در نهایت نقشه به‌دست‌آمده با نقشه ژنتیکی ارائه شده توسط Bindler و همکاران (۲۰۱۱) مقایسه و گروه‌های پیوستگی مختلف نام گذاری شدند. شناسایی QTLهای کنترل‌کننده صفات مورد مطالعه با استفاده از روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب (Zeng, 1994) و از طریق نرم افزار QGene (Nelson, 1997) انجام شد.

1. Inter-retrotransposon amplified polymorphism
2. Retrotransposon-microsatellite amplified polymorphism

نتایج و بحث

نقشه پیوستگی ژنتیکی

تهیه نقشه ژنتیکی با استفاده از اطلاعات حاصل از سه نوع سیستم نشانگری شامل SSR، ISSR و نشانگرهای مبتنی بر رتروترنسپوزون (IRAP, REMAP) انجام گرفت. نمونه‌هایی از الکتروفورز محصول PCR آغازگرهای SSR، ISSR، IRAP و REMAP در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج آزمون چندشکلی نشانگرهای مورد بررسی در ژنوتیپ-های والدینی نشان داد که مطابق با گزارش‌های قبلی در توتون (Ren and Timko, 2001; Julio *et al.*, 2006)، در این مطالعه نیز سطح چندشکلی پایینی برای گروه‌های نشانگری وجود دارد. در این پژوهش، تعداد ۱۰ نشانگر SSR، ۱۳ نشانگر ISSR و در مجموع ۶ IRAP و REMAP بین والدین چند شکل بودند. آغازگرهای چند شکل شناسایی شده در زمینه ژنتیکی ۱۰۳ لاین F_6 مورد مطالعه بررسی شدند. بر خلاف نشانگرهای SSR، با توجه به چند مکان بودن نشانگرهای ISSR، IRAP و REMAP، در مجموع ۵۰ نشانگر چندشکل توسط آن‌ها شناسایی گردید. همچنین ۲ نشانگر از ۱۰ نشانگر ریزماهواره شناسایی شده در بین والدین، دارای سه نوع آلل بودند که هر کدام به صورت نشانگر غالب امتیازدهی شدند. با استفاده از داده‌های مولکولی شامل ۶۴ نشانگر مولکولی (نشانگرهای SSR، ISSR، IRAP و REMAP) روی ۱۰۳ فرد F_6، نقشه ژنتیکی توتون شرقی با ۷ گروه پیوستگی (شکل ۲) توسعه یافت. در نقشه پیوستگی تهیه شده ۴۶ نشانگر مورد نظر در ۷ گروه پیوستگی قرار گرفتند و ۱۸ نشانگر به صورت ناپیوسته بودند و به هیچ یک از گروه‌های پیوستگی منتسب نشدند (شکل ۲). نقشه پیوستگی ارائه شده در تحقیق حاضر، اولین نقشه پیوستگی در توتون تیپ شرقی است که در آن نشانگرهای مبتنی بر رتروترنسپوزون‌ها نیز وجود دارد. نشانگرهای SSR دارای موقعیت مشخصی بوده و

www.SID.ir

Archive of SID

مقایسه موقعیت آنها با نقشه پیوستگی مرجع در توتون (Bindler *et al.,* 2011) نشان می‌دهد که ۵ نشانگر SSR مشترک بین آنها وجود دارد (شکل ۳). با توجه به شکل ۳، گروه‌های پیوستگی حاوی نشانگرهای مشترک، مشابه گروه‌های پیوستگی LG3، LG4، LG9، LG7 و LG13 در نقشه پیوستگی گزارش شده توسط Bindler و همکاران (۲۰۱۱) می‌باشد. طول نقشه پیوستگی بدست آمده در جمعیت توتون شرقی مورد بررسی، ۵۸۶/۱ cM بوده که در آن متوسط فاصله بین دو نشانگر مجاور ۱۲/۷۴ cM می‌باشد. در گروه‌های پیوستگی شناسایی شده، تعداد نشانگرها بین ۲ الی ۱۳ عدد متغیر بود (شکل ۲). در توتون وجود گروه‌های پیوستگی با تعداد کم نشانگر توسط محققین مختلف (Julio *et al.,* 2006; Hong-Bo *et al.,* 2008) نیز گزارش شده است. در مطالعه حاضر گروه پیوستگی LG1 با ۸ نشانگر بزرگترین گروه پیوستگی به طول ۲۰۰/۷ سانتی‌مورگان بود. در نقشه تهیه شده توسط Bindler و همکاران (۲۰۱۱)، طول بزرگترین گروه پیوستگی ۱۹۹ سانتی‌مورگان می‌باشد. همچنین بزرگترین گروه پیوستگی در نقشه ژنتیکی تهیه شده توسط Hong-Bo و همکاران (۲۰۰۸)، ۲۹۱ سانتی‌مورگان با تعداد ۲۰ نشانگر بود. در شکل ۴ نمای گرافیکی از نقشه تهیه شده در جمعیت لاین‌های F_6 به تفکیک گروه‌های پیوستگی و لاین‌های مورد استفاده، ارایه شده و در آن جایگاه آلل‌های A با رنگ قرمز، جایگاه آلل‌های B با آبی تند، جایگاه آلل‌های C با رنگ آبی روشن، جایگاه آلل‌های D با رنگ قهوه‌ای، جایگاه آلل‌های هم بارز با رنگ خاکستری و جایگاه آلل‌های گمشده با رنگ سبز نشان داده شده است.

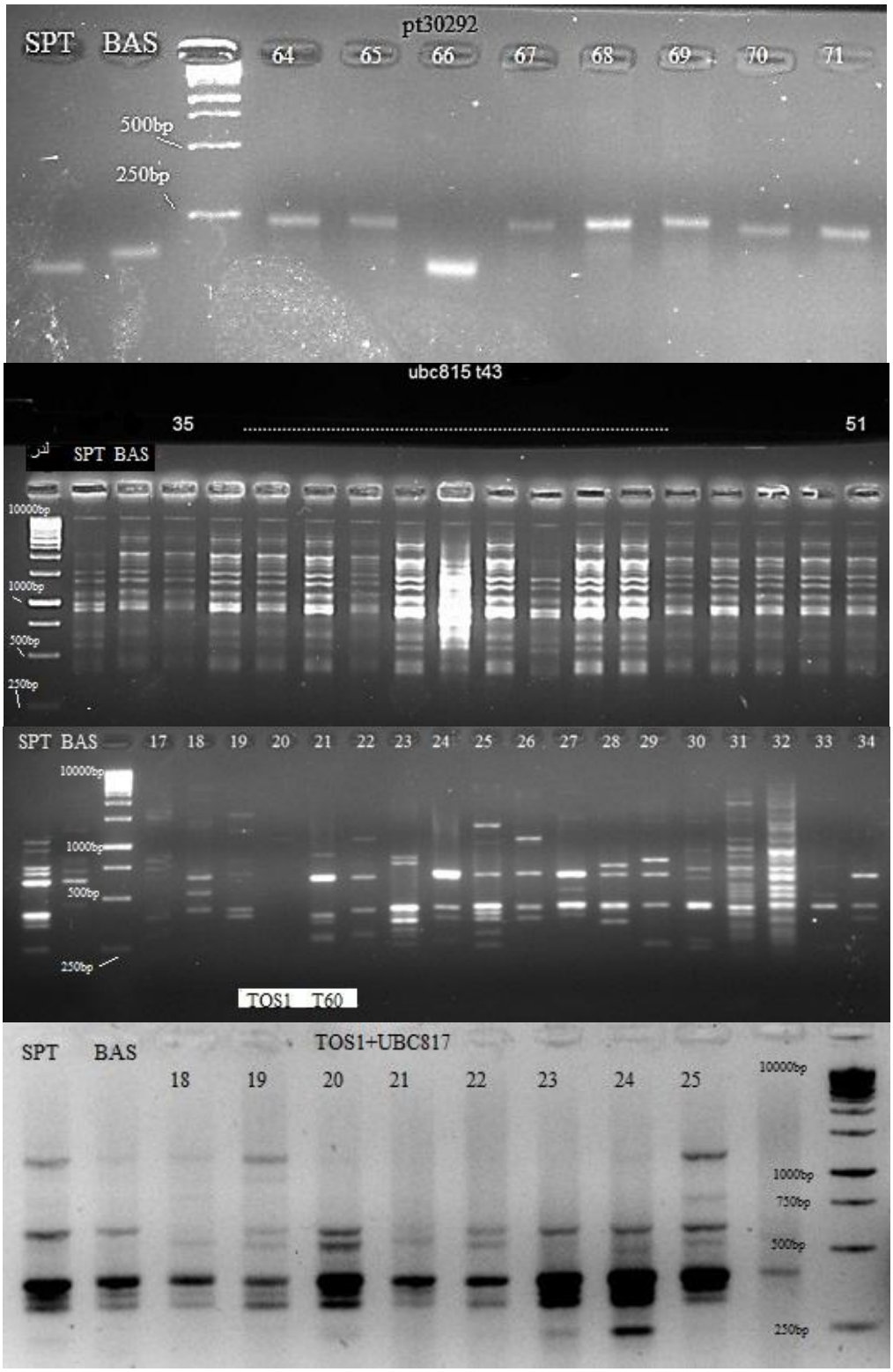
شناسایی نواحی ژنومی کنترل‌کننده صفات مورد مطالعه

اگرچه شناسایی ژن‌های کنترل‌کننده صفاتی نظیر مقاومت به بیماری‌های مختلف در توتون به وفور انجام شده است (Bai *et al.*, 1995; Nishi *et al.*, 2003; Tong *et al.*, 2012; Vontimitta and Lewis, 2012) ولی در مورد صفات با توارث پیچیده نظیر عملکرد و به ویژه صفات مرتبط با کیفیت برگ توتون گزارشات محدودی وجود دارد. یکی از دلایل مطالعات کم در زمینه مکان‌یابی اینگونه صفات کمی در توتون، وجود تنوع کم در داخل گونه *N. tabacum* می‌باشد (Julio *et al.,* 2006). این در حالی است که شناسایی QTLهای کنترل کننده صفات کمی می‌تواند به فهم کنترل ژنتیکی آنها و توسعه استراتژی‌های گزینش به کمک نشانگر کمک نماید (Julio *et al.,* 2006).

نتایج مکان‌یابی نواحی ژنومی دخیل در کنترل متغیرهای مختلف مورد ارزیابی در این مطالعه در جدول ۲ ارایه شده است. در این جمعیت ژنتیکی و با استفاده از نقشه پیوستگی تهیه شده، برای تمامی صفات مورد مطالعه QTL شناسایی گردید (جدول ۲). با توجه به جدول ۲، تعداد ۱۹ QTL برای صفات طول برگ، عرض برگ، ارتفاع گیاه، فاصله میانگره ها، قطر ساقه، عملکرد برگ خشک به همراه متغیرهای مقدار فتوسنتز خالص، مقدار عنصر کلر، روز تا گلدهی، مقدار کلروفیل و تعداد برگ شناسایی گردید. دامنه LOD برای QTLهای شناسایی شده از ۳/۰۳ تا ۱۱/۴۶ متغیر است (جدول ۲). برای هر یک از صفات قطر ساقه، روز تا گلدهی، عملکرد برگ و مقدار کلروفیل یک QTL، برای هریک از صفات کلر، فاصله میانگره، عرض برگ، طول برگ، مقدار فتوسنتز و ارتفاع گیاه دو QTL و برای تعداد برگ توتون سه QTL شناسایی شد. درصد تغییرات فنوتیپی توجیه شده توسط QTL های شناسایی شده از ۱۳/۲ الی ۴۰/۱ متغیر است (جدول ۲ و شکل ۲). در مطالعه‌ای، Li و همکاران (۲۰۱۱) چهار QTL در گروه‌های پیوستگی ۱، ۱۱ و ۱۹ برای صفت طول برگ در توتون شناسایی نمودند. همچنین، در تحقیقی دیگر Xiao و همکاران (۲۰۰۶) برای صفات ارتفاع گیاه، فاصله میانگره، تعداد برگ، طول برگ و عرض برگ به ترتیب ۲، ۴، ۲، ۲ و ۳ QTL شناسایی نمودند.

www.SID.ir

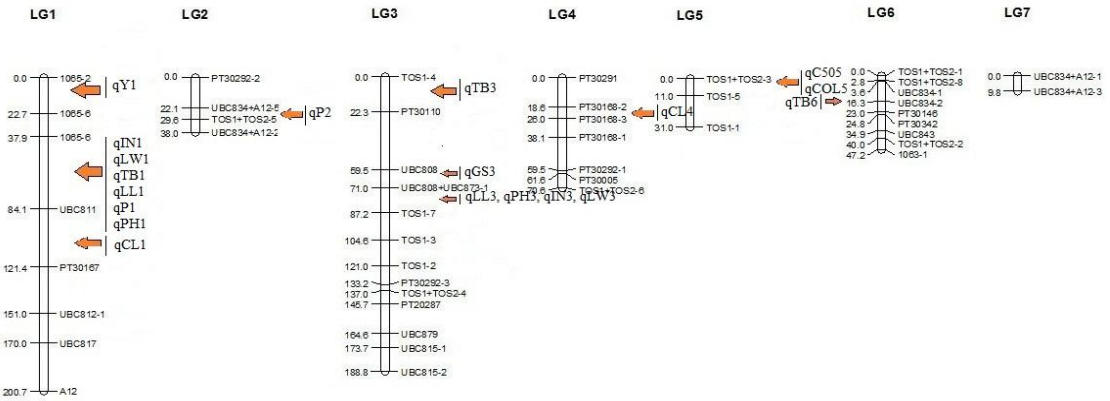
Archive of SID



شکل ۱. الگوی الکتروفورز تعدادی از افراد جمعیت F_6 توتون شرقی با نشانگرهای SSR (PT30292)، ISSR (UBC815)، IRAP (TOS1) و REMAP (TOS1+UBC817)

www.SID.ir

Archive of SID



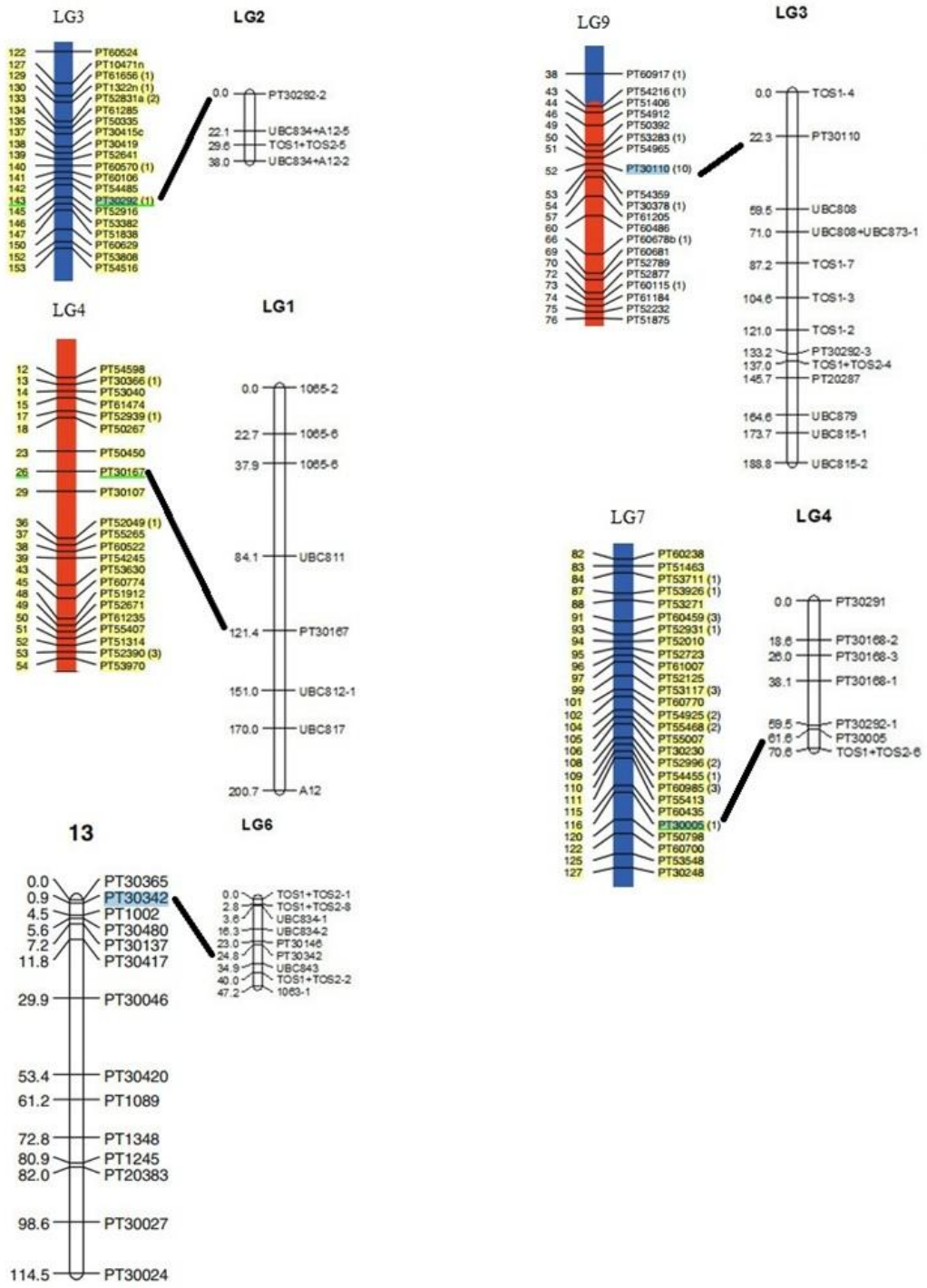
شکل ۲. نقشه ژنتیکی تهیه شده در نسل F_9 حاصل از تلاقی SPT406 و Basma Seres 31 با استفاده از نشانگرهای SSR، ISSR، IRAP و REMAP. موقعیت QTLهای شناسایی شده برای صفات مورد مطالعه در نسل F_9 توتون‌های شرقی روی گروه های پیوستگی به صورت زیر نشان داده شده است: qSG: QTL مربوط به قطر ساقه، qPH: QTL مربوط به ارتفاع گیاه، qLW: QTL مربوط به عرض برگ، qLL: QTL مربوط به طول برگ، qLN: QTL مربوط به تعداد برگ، qIN: QTL مربوط به فاصله میانگره، qCL: QTL مربوط به کلر، qC504: QTL مربوط به روز تا گلدهی، qTB: QTL مربوط به تعداد بوته، qP: QTL مربوط به فتوسنتز، qCOL: QTL مربوط به کلروفیل.

از جمله صفات شیمیایی مهم که در پروژه‌های مکان‌یابی ژنی توتون مورد مطالعه قرار گرفته‌اند می‌توان به مطالعه تنوع تجمع آلکالوئیدها، نیکوتین، نیتروژن، اسید سیتریک، پلی‌فنول ها، اسید مالیک، پرولین و کلر اشاره کرد که در بین آنها تاکنون هیچ QTL برای صفت مقدار کلر در برگ گزارش نشده است (Julio *et al.,* 2006). در این تحقیق برای صفت کیفی محتوی کلر در برگ توتون تعداد دو QTL بزرگ اثر شناسایی شدند که در گروه‌های پیوستگی ۱ و ۴ قرار دارند (جدول ۲ و شکل ۲). در این تحقیق برخلاف نتایج تحقیقات محققان قبلی که با استفاده از نشانگرهای RAPD (Del Piano *et al.,* 2000)، AFLP (Ren and Timko, 2001) و ISSR (Yang *et al.,* 2007; Julio *et al.,* 2006) بدست آورده‌اند، با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره‌ای و رتروترنسپوزونی تنوع ژنتیکی قابل قبولی در توتون شناسایی گردید که باعث می‌گردد پروژه‌های مربوط به مکان‌یابی‌های ژنی در توتون پیشرفت مناسبی داشته باشند.

در تحقیق حاضر، QTL غیراختصاصی (هم مکان) برای صفات مورد بررسی و نیز QTLهایی با اثرات کوچک که در واقع تاییدی بر وجود سیستم کنترل چندژنی است شناسایی شدند (جدول ۲ و شکل۲). در گروه‌های پیوستگی ۱، ۳ و ۵ QTLهای هم مکان وجود دارد (شکل ۲). با توجه به شکل ۲، QTLهای کنترل کننده فاصله میانگره، عرض برگ، تعداد برگ، طول برگ، فتوسنتز و ارتفاع گیاه با همدیگر هم‌مکان بوده و در گروه پیوستگی ۱ قرار دارند. همچنین QTLهای کنترل‌کننده روز تا گلدهی و کلروفیل در گروه پیوستگی ۵ هم‌مکان می‌باشند. شناسایی QTLهای مربوط به صفات که در گروه‌های پیوستگی با هم تداخل دارند بیانگر وجود اثر پلیوتروپی یا پیوستگی شدید ژن‌ها می‌باشد و اهمیت زیادی در به‌نژادی گیاهی دارد، زیرا گزینش همزمان چندین صفت را امکان‌پذیر می‌سازد و بدین ترتیب کارایی انتخاب (اصلاح چند صفت به‌طور همزمان) را در برنامه‌های اصلاحی افزایش می‌دهد. QTLهای شناسایی شده در صورت تایید می‌توانند در توسعه استراتژی گزینش به کمک نشانگر کمک نمایند.

www.SID.ir

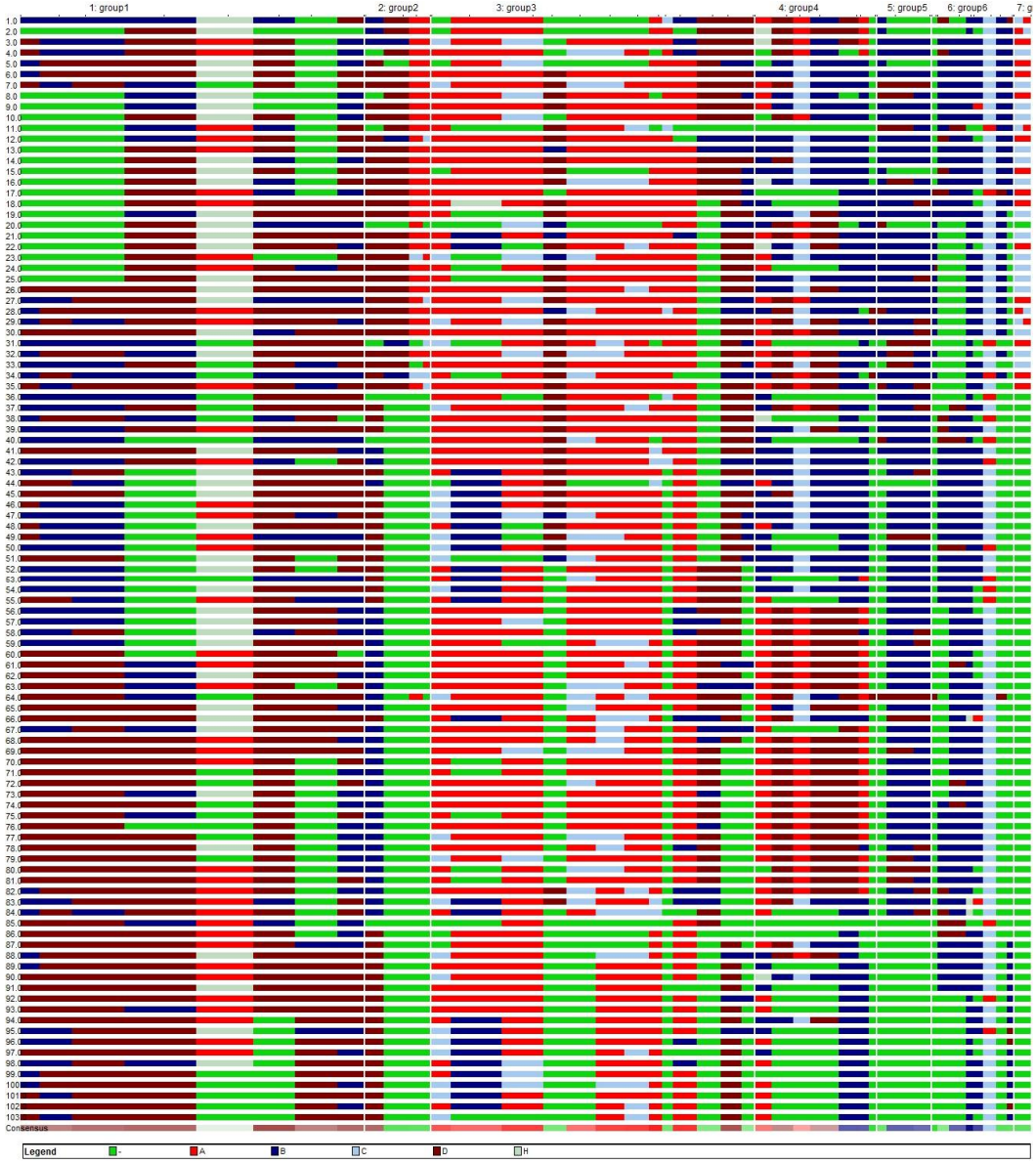
Archive of SID



شکل ۳. مقایسه نقشه پیوستگی تهیه شده در نسل F_6 حاصل از تلاقی SPT406 و Basma Seres 31 توتون شرقی با نقشه مرجع (Bindler *et al.*, 2011) براساس موقعیت نشانگرهای SSR. گروه‌های پیوستگی مشخص شده در سمت چپ مربوط به نقشه مرجع می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴. نمای گرافیکی از نقشه ژنتیکی تهیه شده در نسل F_6 حاصل از تلاقی SPT406 و Basma Seres 31 رنگ قرمز نشان‌دهنده آلل A، رنگ آبی تیره نشان‌دهنده آلل B، رنگ آبی روشن نشان‌دهنده آلل C، رنگ قهوه‌ایی نشان‌دهنده آلل D، رنگ سبز نشان‌دهنده آلل گمشده و رنگ خاکستری نشان‌دهنده آلل H.

REFERENCES

Arslan B, Okunus A (2006) Genetic and geographic polymorphism of cultivated tobaccos (*Nicotiana tabacum*) in Turkey. Russian Journal of Genetics. 42: 667-671.

Bai D, Reeleder R, Brandle JE (1995) Identification of two RAPD markers tightly linked with the *Nicotiana debneyi* for resistance to black root rot of tobacco. Theoretical and Applied Genetics. 91(8): 1184-1189.

Bindler G, Plieske J, Bakaher N, Gunduz I, Ivanov N, Van der Hoeven R, Ganal M, Donini P (2011) A high density

www.SID.ir

Archive of SID

genetic map of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) obtained from large scale microsatellite marker development. Theoretical and Applied Genetics. 123: 219-230.

Bindler G, Van der Hoeven R, Gunduz I, Plieske J, Ganal M, Rossi L, Gadani F, Donini P (2007) A microsatellite marker based linkage map of tobacco. Theoretical and Applied Genetics. 114: 341-349.

Chai CC, Chai LG, Cai CC, Lin GP, Wang Y, Xu FS (2009) Construction of genetic linkage map of burley tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) and genetic dissection of partial traits. Acta Agronomica Sinica. 35: 1646-1654.

Chen DW, Chai LG, Cai CC, Lin GP, Wang Y, Xu FS (2009) Construction of genetic linkage map of burley tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) and the QTL analysis of black shank disease. Ziran Kexue Jinzhan (Progress in Natural Science). 19(8): 852-858.

Del Piano L, Abet M, Sorrentino C, Acanfora F, Cozzolino E, Dimuro A (2000) Genetic variability in *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana* species as revealed by RAPD procedure. International Tobacco Control Research. 19: 1–15.

Hong-Bo MA, Jian-Min QI, Yan-Kun LI, Jing-Xia L, Tao L, Shun-Hui C, Ai-Fen T, Li-Hui L, Jian-Mei W (2008) Construction of A molecular genetic linkage map of tobacco based on SRAP and ISSR markers. Acta Agronomica Sinica. 34: 1958-1963.

Julio E, Denoyes-Rothan B, Verrier JL, Dorlhac de borne F (2006) Detection of QTLs linked to leaf and smoke properties in *Nicotiana tabacum* based on a study of 114 recombinant inbred lines. Molecular Breeding. 18: 69-91.

Kosambi DD (1994) The estimation of map distances from recombination values. Annals of Eugenics. 12:172-175.

Li HL, Chen MX, Zhou DX, Chen SH, Tao AF, Li YK, Ma HB, Qi JM, Guo YC (2011) QTL analysis of six important traits in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Acta Agronomica Sinica. 37: 1577–1584.

Moon HS, Nicholson JS, Heineman A, Lion K, Der Hoeven, RV, Hayes AJ, Lewis RS (2009a) Changes in genetic diversity of US. flue-cured tobacco germplasm over seven decades of cultivar development. Crop Science. 49: 498-506.

Moon HS, Nifong JM, Nicholson JS, Heineman A, Lion K, Der Hoeven RV, Hayes AJ, Lewis RS (2009b) Microsatellite based analysis of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) genetic resources. Crop Science. 49: 2149–2157.

Nelson J (1997) QGENE: software for marker-based genomic analysis and breeding. Molecular Breeding. 3: 239-245.

Nishi T, Tajima T, Noguchi S, Ajisaka H, Negishi H (2003) Identification of DNA markers of tobacco linked to bacterial wilt resistance. Theoretical and Applied Genetics. 106: 765-770.

Raju KS, 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: 633–638.

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

Rossi L, Bindler G, Pijnenburg H, Isaac PG, Henri IG, Mahe M, Orvain C, Gadani F (2001) Potential of molecular marker analysis for variety identification in processed tobacco. Plant Varieties and Seeds. 14: 89–101.

Tan X, Xu X, Wang N, Zhang X, Ren J, Xiao B, Xu J, Wang W, Wang C, Hao X, Zhang Z (2012) QTLs related to the

www.SID.ir

Archive of SID

easy curing potential mapped in flue-cured tobacco. Molecular Plant Breeding. 10(2): 89-94.

Tanksley SD, Ganal MW, Prince JP, Vicente MC, Bonierbale MW, Broun P, Fulton TM, Giovannoni JJ, Grandillo S, Martin GB, Messeguer R, Miller JC, Miller L, Paterson AH, Pineda O, Roder MS, Wing RA, Wu W, Young ND (1992). High-density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. Genetics. 132: 1141–1160.

Tong Z, Jiao T, Wang F, Li M, Leng X, Gao Y, Li Y, Xiao B, Wu W (2012) Mapping of quantitative trait loci conferring resistance to brown spot in flue-cured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Plant Breeding. 131: 335–339.

Van Eeuwijk F, Kraakman, ATW, Niks RE, Van den Berg PMMM, Stam P (2004) Linkage disequilibrium mapping of yield and yield stability in modern spring barley cultivars. Genetics. 168: 435-446.

Van Ooijen JW, Voorrips RE (2001) JoinMap® 3.0, software for calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen. The Netherlands.

Vontimitta V, Lewis RS (2012) Mapping of quantitative trait loci affecting resistance to *Phytophthora nicotianaein* tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) line Beinhart-1000. Molecular Breeding. 29: 89-98.

Xiao BG, Xu ZL, Chen XJ, Shen AR., Li YP, Zhu J (2006) Genetic linkage map constructed by using a HD population for the flue-cured tobacco. Acta Tabacaria Sinica. 12: 35-40.

Yang BC, Xiao BG, Chen XJ, Shi CH (2007) Assessing the genetic diversity of tobacco germplasm using intersimple sequence repeat and inter-retrotransposon amplification polymorphism markers. Annals of Applied Biology. 150: 393-401.

Zeng ZB (1994) Precision mapping of quantitative trait loci. Genetics. 136: 1457-1468.

www.SID.ir