

## شناسایی مکانهای ژنی کنترل‌کننده زمان گلدهی در توتون تیپ شرقی

فرامرز هوشیاردل<sup>۱</sup>، رضا درویش زاده<sup>۱\*</sup> و حمید حاتمی ملکی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده کشاورزی گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی

<sup>۲</sup> مراغه، دانشگاه مراغه، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

تاریخ دریافت: ۹۲/۱۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۲۳

### چکیده

به منظور شناسایی مکانهای ژنی مرتبط با گلدهی در توتون تیپ شرقی، جمعیت ژنتیکی شامل ۱۰۰ فرد  $F_2$  حاصل از تلاقی دو ژنوتیپ توتون شرقی SPT 406 (والد پدری) و Basma seres 31 (والد مادری) برای صفت روز تا شروع گلدهی مورد ارزیابی قرار گرفتند. در آزمایشات مولکولی نقشه پیوستگی جمعیت  $F_2$  با ۲۳ نشانگر SSR و ۲۹ نشانگر ISSR تهیه گردید که  $cM$  ۵۷۰/۸ از ژنوم توتون را پوشش می‌داد. با استفاده از روشهای مکان‌یابی فاصله‌ای ساده و مرکب به ترتیب ۹ و ۲ QTL برای صفت مورد مطالعه شناسایی گردید. در این مطالعه، بیشترین تعداد QTL در گروه پیوستگی شماره پنج شناسایی شد. QTL های  $qDF2-2$  و  $qDF5-3$ ، شناسایی شده با روش مکان‌یابی فاصله‌ای ساده، به ترتیب با توجیه ۰/۸ و ۳۶ درصد از تغییرات فنوتیپی صفت ( $R^2$ )، به ترتیب کوچکترین و بزرگترین QTL های شناسایی شده می‌باشند. درصد تغییرات فنوتیپی توجیه شده ( $R^2$ ) توسط QTL های شناسایی شده با روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب ( $qDF5-1$  و  $qDF5-2$ )، به ترتیب ۱/۹۵ و ۱۵/۳۴ درصد بود. نتایج نشان داد که مکان‌هایی با اثرات ژنی افزایشی و غالبیت در کنترل ژنتیکی صفت روز تا شروع گلدهی در توتون تیپ شرقی نقش دارند.

واژه‌های کلیدی: توتون، جمعیت ژنتیکی، صفات کمی، مکان‌یابی ژن، نشانگرهای مولکولی

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۴۳۲۷۷۹۵۵۸ پست الکترونیکی: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

### مقدمه

از اجزای اصلی سازنده خرمن سیگار در صنعت می‌باشند (۱۴).

در بین صفات مختلف گیاهی، گلدهی یکی از مراحل مهم در چرخه زندگی گیاه بوده (۳) و صفاتی مانند عملکرد، کیفیت محصول و مقاومت به تنشهای محیطی، وابستگی زیادی به زمان گلدهی دارند (۱۳). گلدهی نشانه انتقال گیاه از مرحله رویشی به مرحله زایشی می‌باشد (۲۶). گلدهی صفت کلیدی در سازگاری گیاه و هدف عمده در به‌نژادی گیاهان محسوب می‌گردد (۳). تاریخ گلدهی توسط محرکهای محیطی تحت تأثیر قرار می‌گیرد که فتوپریودیسم یکی از عوامل تعیین‌کننده آن است (۲۹).

جنس *Nicotiana* از خانواده Solanaceae دارای بیش از ۶۴ گونه است که دو گونه آمفی‌دیپلوئید *tabacum* و *rustica* ( $2n=48$ ) در مقایسه با سایر گونه‌های موجود در این جنس به طور گسترده‌ای کشت می‌گردند (۳۶). توتون (*Nicotiana tabacum* L.) از مهم‌ترین محصولات غیر غذایی در بخش کشاورزی در جهان و ایران بوده که در بیش از ۱۰۰ کشور جهان در سطحی بالغ بر ۴/۲ میلیون هکتار کشت می‌گردد (۲). این گیاه همچنین به عنوان یک گیاه مدل در اکثر مطالعات زیست‌گیاهی و زراعت مولکولی برای تولید مواد تجاری مهمی نظیر داروها و واکنشها استفاده می‌شود (۱۵). در میان تیپهای مختلف رشدی توتون، توتونهای شرقی به دلیل داشتن بوی مطلوب

می‌تواند باعث آریبی در نتایج شود و به همین دلیل بهتر است مکان‌یابی QTL با استفاده از خانواده های  $F_{2,3}$  صورت گیرد و برای گزینش براساس نشانگر، نشانگرهایی معرفی شوند که وابسته به نسل نباشند. با توجه به اینکه در نسل  $F_2$ ، QTLهای شناسایی شده ممکن است پایدار و از طرفی تکرارپذیر نباشند، استفاده از 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  $F_2$  در کنار اثرات افزایشی، اثرات غالبیت ژنهای کنترل‌کننده صفات نیز قابل برآورد است. تهیه نقشه پیوستگی و شناسایی QTLها در گیاهان مختلفی انجام گرفته است ولی در مورد توتون این مطالعات محدود بوده است که یکی از دلایل آن می‌تواند اندازه بزرگ ژنوم توتون در خانواده Solanaceae در مقایسه با سایر گیاهان این خانواده باشد. شناسایی QTLهای کننده صفات مختلفی از قبیل مقدار نیکوتین، پتاسیم و قند موجود در برگ توتون (۱۲ و ۲۸)، مقاومت به بیماری لکه برگی (۳۴) و مقدار تجمع کلر در برگ توتون (۲۵) انجام گرفته است. علی‌رغم این مطالعات، QTL ای برای صفت تاریخ گلدهی در توتون گزارش نگردیده است. در سایر انواع گیاهان خانواده Solanaceae از قبیل گوجه فرنگی (۱۱، ۱۷، ۱۸، ۲۳، ۲۷، ۳۱ و ۳۳) و بادمجان (۲۱) مطالعات مکان‌یابی QTL برای صفت گلدهی انجام گرفته است. به عنوان نمونه فرری و همکاران (۲۱) در مطالعه‌ای که روی بادمجان انجام دادند، هشت QTL برای صفت روز تا گلدهی شناسایی نمودند که در هفت گروه پیوستگی پراکنده بودند. این مطالعه با هدف شناسایی QTLهای کنترل کننده صفت روز تا گلدهی در یک جمعیت  $F_2$  حاصل از تلاقی دو ژنوتیپ توتون شرقی شامل Basma seres 31 (والد مادری) و SPT 406 (والد پدری) انجام گرفت.

### مواد و روشها

بیشتر گونه‌های گیاهی درجات مختلفی از فتوپریودیسم را نشان می‌دهند که کنترل کننده زمان یا تاریخ گلدهی می‌باشد (۲۹). طبق تحقیقات حاتمی ملکی و همکاران (۲۴) تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای در ژرم پلاسما توتون شرقی موجود در کشور برای صفت تاریخ گلدهی وجود داشته و این صفت همبستگی معنی‌داری با سایر صفات زراعی در توتون دارد. همچنین طبق مطالعات وایت و همکاران (۳۵) بین صفت روز تا گلدهی با صفات عرض برگ، تعداد برگ و عملکرد برگ خشک توتون همبستگی معنی‌داری وجود دارد. بنابراین می‌توان استنباط نمود که صفت روز تا گلدهی جزء صفات مهم در توتون می‌باشد. به دلیل توارث پلی‌ژنیک صفت، امکان بهبود آن به وسیله اصلاح کلاسیک دشوار می‌باشد (۳۹). پیشرفتهای اخیر در زیست‌شناسی مولکولی و روشهای آماری برای مکان‌یابی QTL امکان تشخیص فاکتورهای مؤثر بر زمان گلدهی را فراهم نموده است (۳۹). آگاهی از تعداد ژنهای کنترل کننده، جایگاه کروموزومی آنها و سهم نسبی هر یک از ژنها در تظاهر و توزیع فنوتیپی می‌تواند در کارهای به نژادی آتی مورد استفاده قرار گیرد. روشهای تجزیه QTL با شناسایی مکانهای ژنی کنترل کننده صفات می‌تواند به فهم کنترل ژنتیکی آنها و توسعه استراتژیهای گزینش به کمک نشانگر کمک نماید (۲۸). جمعیتهای مختلفی جهت مکان‌یابی QTLها 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 خودگشنی 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

**تهیه نقشه پیوستگی و شناسایی QTL های زمان گلدهی:** نقشه پیوستگی با استفاده از داده های حاصل از انگشت نگاری افراد جمعیت با نشانگرهای چند شکل، به وسیله نرم افزار CarthaGene 1.2.2 (۲۲) و با استفاده از تابع نقشه کوسامبی، حداقل LOD برابر با سه و حداکثر فاصله برابر با ۵۰ سانتی مورگان تهیه شد. شناسایی QTL های کنترل کننده صفت مورد مطالعه با استفاده از نقشه پیوستگی تهیه شده و ارزش اندازه گیری شده صفت در افراد جمعیت به روش مکان یابی فاصله ای (۳۰) و مکان یابی فاصله ای مرکب (۳۷، ۳۸) و با استفاده از نرم افزار WinQTL cartographer 2.5 (۶) انجام شد. در این مطالعه نام گذاری QTL ها به صورت (QTL + نام صفت + شماره گروه پیوستگی + شماره QTL در گروه پیوستگی) انجام گرفت. در این نام گذاری، QTL با حرف کوچک "q" مشخص شده و اگر بیش از یک QTL در یک گروه پیوستگی قرار داشته باشد به ترتیب با شماره های یک، دو و غیره نشان داده می شوند.

### نتایج و بحث

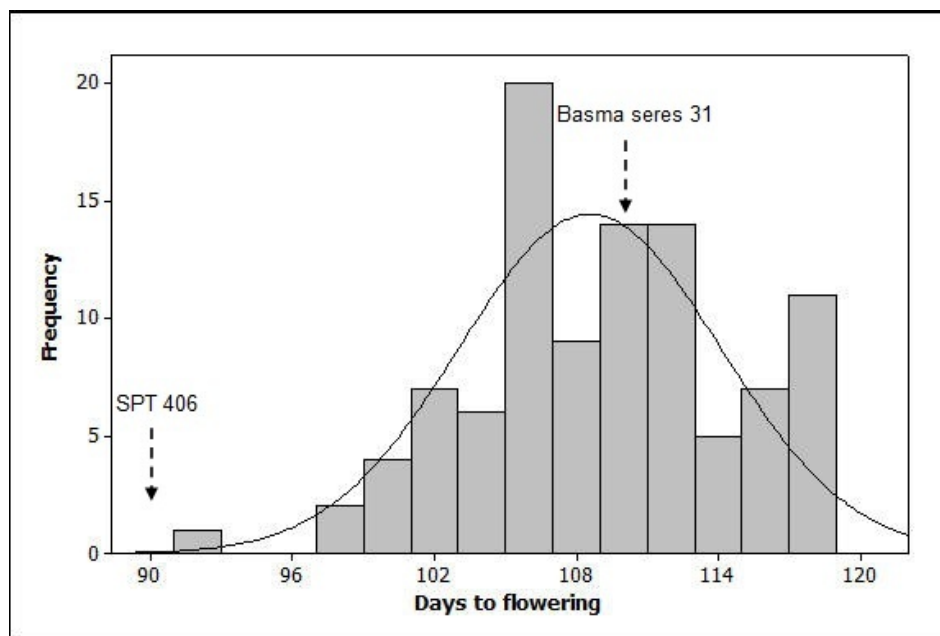
**ارزیابی زمان گلدهی در جمعیت در حال تفرق F<sub>۲</sub>:** نتایج این تحقیق نشان داد که بین والدین جمعیت در حال تفرق F<sub>۲</sub>، اختلاف معنی داری در سطح احتمال پنج درصد برای صفت روز تا شروع گلدهی وجود دارد (جدول ۱). وجود اختلاف معنی دار بین والدین امکان مکان یابی QTL های کنترل کننده صفت مزبور را فراهم می نماید. اختلاف بین میانگین والدین و میانگین افراد F<sub>۲</sub> نیز معنی دار بود (جدول ۱) که می تواند، به علت وجود تفرق در نسل F<sub>۲</sub>، اثرات افزایشی، غالبیت و اپیستازی مکانهای ژنی باشد. با توجه به توزیع فراوانی پیوسته افراد F<sub>۲</sub> و موقعیت والدین برای صفت روز تا شروع گلدهی (شکل ۱)، صفت مورد مطالعه یک صفت کمی و پلی ژنیک است. تعدادی از افراد F<sub>۲</sub> دارای ارزش فنوتیپی خارج از محدوده ارزش فنوتیپی والدین می باشند (شکل ۱) که نشان دهنده وجود پدیده

**مواد گیاهی و ارزیابی فنوتیپی:** در این مطالعه، دو ژنوتیپ توتون شرقی شامل Basma seres 31 و SPT 406 که براساس مطالعات قبلی توسط حاتمی ملکی و همکاران (۲) از نظر اکثر صفات آگرومورفولوژیک به ویژه صفت روز تا گلدهی با همدیگر متفاوت بوده و در دو انتهای توزیع صفات قرار داشتند، انتخاب گردیدند. دو ژنوتیپ SPT 406 (والد پدری و زود گل ده) و Basma seres 31 (والد مادری و دیر گل ده) با همدیگر تلاقی داده شده و از خودگشنی بوته های F<sub>۱</sub> حاصل از تلاقی این والدین، ۱۰۰ فرد F<sub>۲</sub> جهت تهیه نقشه پیوستگی مورد استفاده قرار گرفتند. اندازه جمعیت مورد استفاده در تهیه نقشه های ژنتیکی معمولاً بین ۱۰۰ تا ۳۰۰ فرد یا لاین متغییر است (۷، ۸). به هر حال هر چقدر اندازه جمعیت بیشتر، وضوح نقشه بیشتر و مکان یابی QTL با دقت بیشتری انجام می گیرد (۲۰، ۳۲). زمانی که افراد جمعیت F<sub>۲</sub> در مرحله چهار برگی بودند، نمونه برگی به منظور استخراج DNA تهیه شد. در این مطالعه، صفت زمان گلدهی به صورت تعداد روز تا شروع گلدهی ثبت گردید.

**استخراج DNA ژنومی و انجام واکنش زنجیره ایی پلیمرز با آغازگرهای SSR و ISSR:** DNA ژنومی از گیاهان والدینی و افراد F<sub>۲</sub> به روش دلاپورتا و همکاران (۱۶) استخراج گردید. ۱۶۲ جفت آغازگر SSR مربوط به نقشه ژنتیکی بیندلر و همکاران (۹) و ۸۰ نشانگر ISSR مربوط به دانشگاه برتیش کلمبیا از نظر چندشکلی در والدین جمعیت، مورد آزمون قرار گرفتند. لازم به ذکر است که واکنشهای زنجیره ای پلی مرز با استفاده از آغازگرهای SSR و ISSR به ترتیب با روش ایک و همکاران (۱۹) و یانگ و همکاران (۳۶) انجام گرفت. تعیین ژنوتیپ افراد F<sub>۲</sub> با استفاده از نشانگرهای SSR و ISSR که در والدین جمعیت چند شکلی نشان داده بودند انجام گرفت.

فنوتیپی بالاتر و یا پایین‌تر در مقایسه با والد‌ها می‌شود (۵).

تفکیک متجاوز در این صفت است. تفکیک متجاوز نشان می‌دهد که الهای هر دو والد در بروز صفت گلدهی دخالت داشته و ترکیب آنها منجر به ایجاد ارزشهای



شکل ۱- توزیع فراوانی صفت روز تا گلدهی در جمعیت در حال تفرق  $F_2$  حاصل از تلاقی بین Basma series 31 (والد مادری) و SPT 406 (والد پدری). ارزش فنوتیپی والدین با پیکان نشان داده شده‌است.

وجود تفکیک متجاوز برای صفت مقدار تجمع کلر در برگ توتونهای شرقی نیز گزارش گردیده است (۲۵). سود ژنتیکی که از اختلاف بین میانگین ۱۰ درصد از بهترین  $F_2$  ها با میانگین والدین محاسبه می‌شود معنی‌دار است (جدول ۱) که بیانگر امکان تغییر میانگین جمعیت نسل بعد از لحاظ این صفت می‌باشد.

توتون شرقی ترسیم گردید که شامل هفت گروه پیوستگی بود و ۵۷۰/۸ سانتی‌مورگان از ژنوم توتون شرقی را پوشش می‌داد (شکل ۴). در نقشه پیوستگی تهیه شده (شکل ۴)، تعداد ۳۴ (۲۰ نشانگر SSR و ۱۴ نشانگر ISSR) نشانگر در ۷ گروه پیوستگی قرار گرفتند و ۱۸ نشانگر به دلیل عدم پیوستگی با سایر نشانگرها در گروههای پیوستگی قرار نگرفتند. اشباع نقشه با تعداد نشانگرهای بیشتر باعث خواهد شد به تعداد کروموزومها در حالت هاپلوئیدی گیاه ( $n=24$ )، گروههای پیوستگی تشکیل شود. در این صورت به احتمال زیاد نشانگرهایی که در مرحله نخست وارد گروههای پیوستگی نشده‌اند وارد نقشه اشباع می‌شوند. تعداد نشانگرها در گروههای پیوستگی حداقل دو عدد و حداکثر ۱۲ عدد بوده و میانگین فاصله بین دو نشانگر ۱۷/۳ سانتی‌مورگان است (شکل ۴). نام گذاری گروههای پیوستگی براساس وجود نشانگر مشترک با گروههای

شناسایی QTL های کنترل کننده زمان گلدهی : نتایج نشان داد که ۲۳ جفت آغازگر SSR از ۱۶۲ جفت آغازگر SSR و ۲۹ آغازگر ISSR از ۸۰ آغازگر ISSR مورد مطالعه، بین والدین جمعیت  $F_2$ ، چندشکل می‌باشند. میزان چندشکلی برای نشانگر SSR، ۱۴/۲ درصد و برای نشانگر ISSR، ۳۶/۲ درصد به دست آمد. در شکل های ۲ و ۳ انگشت نگاری تعدادی از ژنوتیپهای  $F_2$  با نشانگرهای SSR و ISSR نشان داده شده است. با استفاده از ۵۲ آغازگر چند شکل (شکل ۲۳ SSR و ۲۹ ISSR)، نقشه پیوستگی

پیوستگی موجود در نقشه مرجع تهیه شده توسط بیندلر و همکاران (۹ و ۱۰) انجام شد.

جدول ۱- پارامترهای ژنتیکی صفت روز تا گلدهی در جمعیت  $F_2$  توتون شرقی حاصل از تلاقی بین Basma seres 31 (والد مادری) و SPT 406 (والد پدری) و والدین آنها

زمان گلدهی	Item
۱۱۰/۱	Basma seres 31(P1)
۹۰/۱	SPT406(P2)
۲۰	P1-P2
۱۰۰/۱	$\bar{X}_P$
۱۱۸	Max
۹۱	Min
۱۰۸/۵۶	$\bar{X}_{F_2}$
۸/۴۶	$\bar{X}_P - \bar{X}_{F_2}$
۱۱۷/۴	$\bar{X}_{10\%best F_2}$
۱۷/۳	$GG10\% = \bar{X}_{10\%best F_2} - \bar{X}_P$
۵/۵۳	STDEV
۲/۰۵	LSD0.05

$\bar{X}_P$ : میانگین والدین،  $\bar{X}_{F_2}$ : میانگین افراد  $F_2$ ،  $\bar{X}_{10\%best}$ : میانگین ۱۰ درصد از بهترین افراد  $F_2$  انتخابی برای صفت

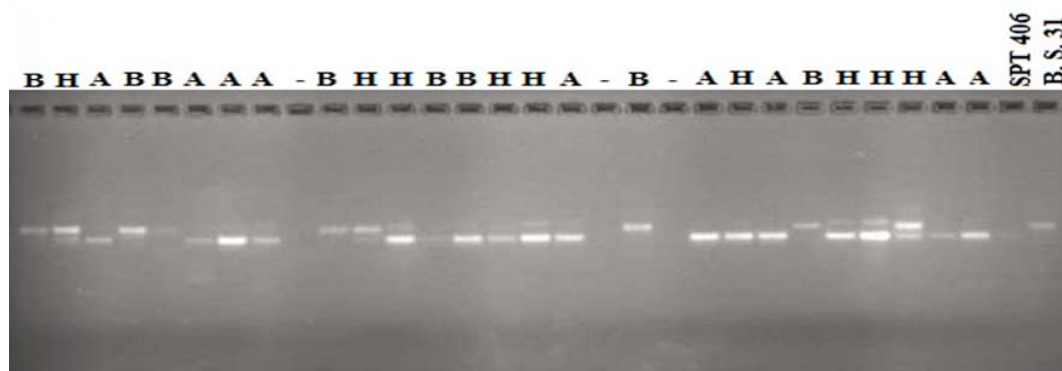
مورد مطالعه، GG10%: بازده ژنتیکی زمانی که ۱۰ درصد از بهترین افراد  $F_2$  انتخابی با میانگین والدین مقایسه شوند، STDEV: انحراف معیار.

نتایج مکان‌یابی QTL با استفاده از روش مکان‌یابی ساده نشان داد که تعداد ۱۶ QTL مرتبط با صفت مورد مطالعه در گروه‌های پیوستگی مختلف پراکنده اند و بیشترین تعداد QTLها در گروه پیوستگی ۴ شناسایی شد (نتایج منتشر نشده). با استفاده از روشهای IM و CIM به ترتیب ۹ و ۲ QTL برای صفت روز تا شروع گلدهی شناسایی شد (جدول ۲). QTLهای شناسایی شده بوسیله روش IM در گروههای پیوستگی یک، دو، سه، پنج و هفت قرار دارند (شکل ۴). با استفاده از روش IM، ناحیه کروموزومی شناسایی شده qDF5-3 و qDF2-2 با ۰٫۸ و ۳۶ درصد اثر فنوتیپی به ترتیب کوچکترین و بزرگترین QTL های شناسایی شده هستند که در گروههای پیوستگی دو و پنج قرار دارند (جدول ۲).

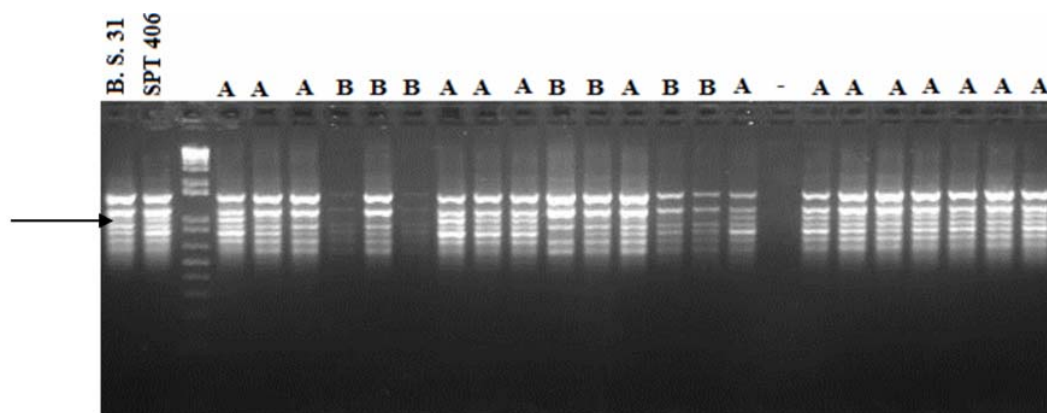
جدول ۲- موقعیت و اثر QTL های شناسایی شده برای صفت روز تا گلدهی در جمعیت  $F_2$  توتون شرقی حاصل از تلاقی بین Basma seres 31 (والد مادری) و SPT 406 (والد پدری).

روش	QTL	گروه پیوستگی	نشانهگر	موقعیت	LOD	اثر افزایشی	اثر غالبیت	$R^2$
IM	qDF1-1	۱	۲	۱۷	۲٫۶۴	-۲٫۱۹	۲٫۴۲	۱۲٫۷۰
	qDF7-1	۷	۱	۳	۳٫۷۳	-۲٫۹۷	-۶۱٫۲۰	۱۶٫۹۰
	qDF2-1	۲	۱	۷	۴٫۸۶	-۲٫۲۸	-۲٫۳۴	۱۴٫۶۰
	qDF2-2	۲	۲	۳۸٫۹	۴٫۵۴	-۴٫۵۱	۲٫۷۸	۳۶
	qDF5-1	۵	۱	۲۰	۴٫۲۱	۲٫۴۵	۱٫۸۱	۱۷٫۱۰
	qDF5-2	۵	۴	۴۳٫۹	۳٫۸۸	-۳٫۰۶	۰٫۹۹	۲۳٫۶
	qDF5-3	۵	۶	۸۳٫۷	۴٫۹۰	-۰٫۷۰	-۵٫۸۸	۰٫۸۰
	qDF5-4	۵	۱۰	۱۷۱٫۱	۳٫۲۷	۳٫۶۳	-۲٫۶۶	۲۳٫۰۶
CIM	qDF3-1	۳	۱	۲۶	۳٫۴۸	۳٫۱۴	۰٫۵۵	۱۸٫۰۳
	qDF5-1	۵	۷	۹۰٫۴	۴٫۰۹	-۱٫۷۳	-۳٫۸۶	۱٫۹۵
	qDF5-2	۵	۸	۱۲۷٫۱	۳٫۲۳	-۳٫۵۴	-۱٫۰۶	۱۵٫۳۴

QTL: quantitative trait loci, LOD:  $\log_{10}$  likelihood ratio (likelihood that the effect occurs by linkage/likelihood that the effect occurs by chance),  $R^2$ : percentage of phenotypic variance explained by the individual QTLs. IM: interval mapping, CIM: composite interval mapping.



شکل ۲- الگوی بانندی مربوط به آغازگر PT30346 از نشانگرهای SSR در تعدادی از افراد جمعیت F<sub>2</sub> توتون شرقی حاصل از تلاقی [Basma seres 31 (♀) × SPT 406 (♂)]



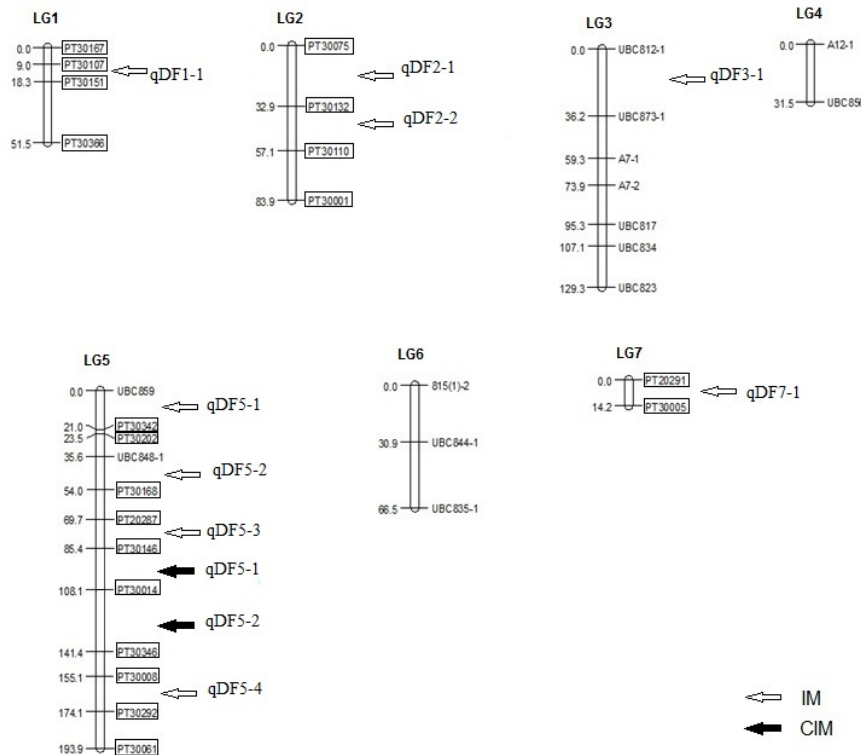
شکل ۳- الگوی بانندی مربوط به آغازگر UBC810 از نشانگرهای ISSR در تعدادی از افراد جمعیت F<sub>2</sub> توتون شرقی حاصل از تلاقی [Basma seres 31 (♀) × SPT 406 (♂)]

والد مادری Basma Seres 31 به نتاج منتقل گردیده است. با توجه به جدول ۲، از میان QTL های شناسایی شده، qDF5-3 و qDF1-1 با مقدار ۴/۹ و ۲/۶ بیشترین و کمترین مقدار LOD را دارند. در این مطالعه، بیشترین تعداد QTL شناسایی شده در گروه پیوستگی شماره پنج قرار دارد (شکل ۴). در این تحقیق QTL هایی با اثرات کوچک شناسایی شدند که در کنترل صفت نقش داشتند که تأییدی بر وجود سیستم کنترل چندزنی است. در نقشه تهیه شده با توجه به تعداد پایین نشانگرها و فاصله زیاد آنها از یکدیگر این احتمال وجود دارد که در نسلهای بعد به دلیل کراسینگ اور ارتباط بین QTL با نشانگر شکسته شود. در

مقدار اثرات افزایشی و غالبیت برای QTL qDF5-3 به ترتیب ۰/۷(-) و ۵/۷(-) و برای QTL qDF2-2 به ترتیب ۴/۵(-) و ۲/۷ می باشد (جدول ۲). QTL های شناسایی شده با استفاده از روش CIM، در گروه پیوستگی شماره پنج قرار دارند که ۱/۹۵ و ۱۵/۳ درصد از تغییرات فنوتیپی صفت روز تا شروع گلدهی در توتون های شرقی را توجیه می نمایند (جدول ۲). مقدار اثرات افزایشی و غالبیت QTL های شناسایی شده از طریق CIM، به ترتیب ۱/۷(-) و ۳/۸(-) برای qDF5-1 و ۳/۵(-) و ۱/۰۶(-) برای qDF5-2 می باشد (جدول ۲). علامت منفی برای اثرات افزایشی و غالبیت نشان دهنده این است که این اثرات از

نشانگر بیشتر) و تهیه فنوتیپی که میانگین چندین تکرار است انجام شود. در نسل‌های پیشرفته به دلیل وقوع نوترکیب‌های بیشتر و تثبیت آلله‌ها احتمال شکستگی ارتباط بین نشانگر و QTL کمتر است. QTL‌های شناسایی شده در چنین شرایطی از اعتبار بیشتری برخوردار خواهند بود و پتانسیل استفاده در گزینش به کمک نشانگر را دارند.

حقیقت تعدادی از QTL‌های شناسایی شده وابسته به نسل باشند. همچنین در این نسل به دلیل نداشتن تکرار در اندازه‌گیری فنوتیپ و اثرات شدید محیطی، احتمال دارد در شناسایی QTL ارباب وارد شده و نشانگرهای کاذب شناسایی شوند. بنابراین پیشنهاد می‌شود مکان‌یابی QTL در نسل‌های پیشرفته‌تر با تهیه نقشه اشباع (نقشه با تراکم



شکل ۴- نقشه پیوستگی حاصل از نشانگرهای SSR و ISSR در جمعیت  $F_2$  توتون شرقی حاصل از تلاقی بین 31 Basma seres (والد مادری) و SPT 406 (والد پدری) تهیه شده با استفاده از نرم‌افزار CarthaGene 1.2.2.

صفت روز تا گلدهی در گوجه فرنگی شناسایی کردند که این QTL ها در مجموع ۵۵/۳ درصد از تنوعات فنوتیپی را توجیه می نمودند. در مطالعه ایی که فرری و همکاران (۲۱) در گیاه بادمجان انجام دادند، تعداد هشت QTL شناسایی گردید که از ۲۰ الی ۲۸ درصد از تغییرات فنوتیپی صفت گلدهی را توجیه می نمودند و بیشترین تعداد این QTL ها در گروه پیوستگی پنج قرار داشتند. طبق تحقیقات فرری و همکاران (۲۱) دو عدد از این QTL ها با مکانهایی

مطالعات مربوط به مکان‌یابی QTL در گیاهان مختلف و توسط افراد مختلف انجام شده است در مطالعه ای، سوموقات و همکاران (۳۳) روی گوجه فرنگی دو QTL برای صفت تاریخ گلدهی گزارش نمودند که در گروه‌های پیوستگی چهار و یک قرار داشتند و به ترتیب ۳/۵ و ۶/۶ درصد از تغییرات فنوتیپی را توجیه می نمودند. میزان اثر افزایشی این QTL ها به ترتیب ۱/۲ و ۲/۰۵ بودند (۳۳). همچنین، جمینز-گومز و همکاران (۲۷) دو QTL برای

سودمندی بالایی در گروه بندی گونه های *Crocus* و تحلیل روابط ژنتیکی آنها دارند. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که صفت روز تا شروع گلدهی در توتونهای شرقی، یک صفت کمی می باشد که توسط ژنهای با اثرات افزایشی و غالبیت کنترل می شود. با استفاده از نشانگرهای مولکولی SSR و ISSR می توان مکانهای ژنی کنترل کننده صفاتی نظیر گلدهی را در توتونهای شرقی شناسایی نمود. در صورتی که پایداری مکانهای ژنی شناسایی شده در این تحقیق توسط مطالعات بعدی نیز اثبات شود، می توان از این نشانگرهای همبسته در گزینش به کمک نشانگر در توتون استفاده نمود.

که صفت گلدهی را در گوجه فرنگی کنترل می نمودند هم مکان بودند یعنی دو QTL در گروه پیوستگی پنج به طور مشترک تاریخ گلدهی را در گوجه فرنگی و بادمجان کنترل می نمایند به طوری که در گیاه بادمجان ۴۱ درصد و در گیاه گوجه فرنگی ۱۸ درصد از تغییرات فنوتیپی را توجیه می نمایند. در مطالعه ای، عبدالهی مندولکانی و عزیز (۴) از طریق تجزیه ارتباط، نشانگرهای ISSR پیوسته با صفات مورفولوژیک در یونجه را شناسایی کردند. بیکی و همکاران (۱) از نشانگرهای ISSR برای بررسی تنوع وراثتی ارقام زراعی و گونه‌های خودروی جنس *Crocus* استفاده کردند و گزارش نمودند که نشانگرهای ISSR

## منابع

- ۱- بیکی، ا.ح، عباسپور، ن. و مظفری، ج. (۱۳۹۲). بررسی تنوع وراثتی ارقام زراعی و گونه‌های خودروی جنس *Crocus* با استفاده از نشانگر ISSR در ایران. پژوهش‌های سلولی و مولکولی. ۲۶: ۱۶۴-۱۷۳.
- ۲- حاتمی ملکی، ح.، کریم زاده، ق.، درویش زاده، ر. و علوی، ر. (۱۳۹۱). تنوع ژنتیکی توتون‌های شرقی با استفاده از روش‌های آماری چند متغیره. پژوهش‌های زراعی ایران. ۱۰: ۱۰۶-۱۰۰.
- ۳- شعفر، س. (۱۳۹۰). نقشه‌یابی ارتباطی ژن‌های زمان گلدهی در جو. رساله دکتری. دانشگاه تهران.
- ۴- عبدالهی مندولکانی، ب. و عزیز، ح. (۱۳۹۳). شناسایی نشانگرهای ISSR پیوسته با صفات مورفولوژیک در جمعیت‌های یونجه زراعی (*Medicago sativa* L.). پژوهش‌های سلولی و مولکولی. ۲۷: ۲۶۰-۲۶۸.
- ۵- محمدی، و.، قنادها، م. ر.، زالی، ع.، یزدی صمدی، ب. و برن، پ. (۱۳۸۴). نقشه یابی QTL‌های صفات مورفولوژیک گندم. علوم کشاورزی ایران. ۳۶: ۱۵۷-۱۴۵.
- 6- Basten, C.J., Weir, B.S. and Zeng, Z.B. (2001). QTL Cartographer: a Reference Manual and Tutorial for QTL Mapping. Department of Statistics, North Carolina State University, USA. 395 Pp.
- 7- Beavis, W.D. (1994). The power and deceit of QTL experiments: lessons from comparative QTL studies. Proc. 49th Annu. Corn and Sorghum Industry Res. Conf., Chicago, 49:250-266.
- 8- Beavis, W.D. (1998). QTL analysis: Power, precision, and accuracy. In A.H. Paterson (ed.) Molecular dissection of complex traits. CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 145-161.
- 9- Bindler, G., Hoeven, R., Gunduz, I., Plieske, J., Ganal, L., Rossi, L., Gadani, F. and Donini, P. (2007). A microsatellite marker based linkage map of tobacco. Theoretical and Applied Genetics. 114: 341-349.
- 10- Bindler, G., Plieske, J., Bakaher, N., Gunduz, I., Ivanov, N., Vander Hoeven, R., Ganal, M. and Donini, P. (2011). A high density genetic map of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) obtained from large scale microsatellite marker development. Theoretical and Applied Genetics. 123: 219-230.
- 11- Cagas, C.C., Lee, O.N., Nemoto, K. and Sugiyama, N. (2008). QTL analysis of flowering time and related traits in an interspecies cross of tomato (*Solanum lycopersicum* × *Solanum pimpinellifolium*). Scientia Horticulturae. 116: 144-151.
- 12- Chai, C.C., Chai, L.G., Cai, C.C., Lin, G.P., Wang, Y. and Xu, F.S. (2009). Construction of genetic linkage map of burley tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) and genetic dissection of partial traits. Acta Agronomica Sinica. 35: 1646-1654.
- 13- Cheng, L., Wang, Y., Zhang, C., Wu, C., Xu, J., Zhu, H., Leng, J., Bai, Y., Guan, R., Hou, W., Zhang, L. and Han, T. (2011). Genetic analysis



- and QTL detection of reproductive period and post-flowering photoperiod responses in soybean. *Theoretical and Applied Genetics*. 123: 421-429.
- 14- Darvishzadeh, R., alavi, S.R. and Sarafi, A. (2009). Genetic variability for chlorine concentration in oriental tobacco genotypes. *Archives of Agronomy and Soil Science*. 57: 167-177.
- 15- Davaliev, K., Maleva, L., Filiposki, K., Spiroski, O. and Efremov, G.d. (2010). Genetic variability of Macedonian tobacco varieties determined by microsatellite marker analysis. *Diversity*. 2: 439-449.
- 16- Dellaporta, S.L., Wood, J. and Hicks, J.B. (1983). A plant DNA mini-preparation: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1: 19-21.
- 17- De vicente, M.C. and Tanksley, S.D. (1993). QTL analysis of transgressive segregation in an interspecific tomato cross. *Genetics*. 134: 585-596.
- 18- Doganlar, S., Frary, A., Ku, H.M. and Tanksley, S.D. (2002). Mapping quantitative trait loci in inbred backcross lines of *Lycopersicon pimpinellifolium* (LA1589). *Genome*. 45: 1189-1202.
- 19- Ek, M., Eklund, R., Ven Post, R., Dayteg, C., Henriksson, T., Weibull, P., Ceplitis, A., Isaak, P. and Tuvesson, S. (2005). Microsatellite markers for powdery mildew resistance in pea (*Pisum sativum* L.). *Hereditas*. 142: 86-91.
- 20- Ferreira A, da Silva MF, da Costa e Silva L, Cruz CD (2006). Estimating the effects of population size and type on the accuracy of genetic maps. *Genetics and Molecular Biology*. 29: 182-192.
- 21- Frary, A., Doganlar, S., Daunay, M.C. and Tanksley, S.D. (2003). QTL analysis of morphological traits in eggplant and implications for conservation of gene function during evolution of Solanaceous species. *Theoretical and Applied Genetics*. 107: 359-370.
- 22- Givry, S.D., Bouchez, M., Chabrier, P., Milan, D. and Schiex, T. (2005). Carthagene: multipopulation integrated genetic and radiation hybrid mapping. *Bioinformatics*. 21: 1703-1704.
- 23- Grandillo, S. and Tanksley, S.D. (1996). QTL analysis of horticultural traits differentiating the cultivated tomato from the closely related species *Lycopersicon pimpinellifolium*. *Theoretical and Applied Genetics*. 92: 935-951.
- 24- Hatami Maleki, H., Karimzadeh, G., Darvishzadeh, R. and Sarrafi, A. (2011). Correlation and sequential path analysis of some agronomic traits in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) to improve dry leaf yield. *Australian Journal of Crop Science*. 5: 1644-1648.
- 25- Hatami Maleki, H., Karimzadeh, G., Darvishzadeh, R. Naghavi, M.R. and Sarrafi, A. (2013). Identification of QTLs associated with low chloride accumulation in oriental tobacco. *Genetika*. 45: 855-864.
- 26- Jarillo, A.J., del Olmo, I., Gómez-Zambrano, A., Lázaro, A., López-González, L., Miguel, E., Narro-Diego, L., Sáez, D. and Piñero, M. (2008). Review. Photoperiodic control of flowering time. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 6: 221-244.
- 27- Jimenez-Gomez, J.M., Alonso-Blanco, C., Borja, A., Anastasio, G., Angosto, T., Lozano, R. and Martinez-Zapater, J.M. (2007). Quantitative genetic analysis of flowering time in tomato. *Genome*. 50: 303-315.
- 28- Julio, E., Denoyes-Rothan, B., Verrier, J.L. and 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.
- 29- Kikuchi, R. and Handa, H. (2009). Photoperiodic control of flowering in barley. *Breeding Science*. 59: 546-552.
- 30- Lander, E.S. and Botstein, D. (1989). Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*. 121: 185-199.
- 31- Lindhout, P., van Heusden, S., Pet, G., van Ooijen, J.W., Sandbrink, H., Verkerk, R., Vrieling, R. and Zabel, P. (1994). Perspectives of molecular marker assisted breeding for earliness in tomato. *Euphytica*. 79: 279-286.
- 32- Semagn K., Bjørnstad Å. and Ndjiondjop M. N. (2006). Principles, requirements and prospects of genetic mapping in plants. *African Journal of Biotechnology* 5(25): 2569-2587.
- 33- Sumugat, M.R., Mayumi, M., Kyoko, A. and Sugiyama, N. (2010). Quantitative trait loci controlling flowering properties in tomato. *ISSAAS Journal*. 16: 1-9.
- 34- Tong, Z., Jiao, T., Wang, F., Li, M., Leng, X., Gao, Y., Li, Y., Xiao, B. and 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.

- 35- White, F.H., Pandeya, R.S. and Dirks, V.A. (1979). Correlation studies among and between agronomic, chemical, physical and smoke characteristics in flue-cured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Canadian Journal of Plant Science. 59: 111-120.
- 36- Yang, B.C., Xiao, B.G., Chen, X.J. and Shi, C.H. (2007). Assessing the genetic diversity of tobacco germplasm using inter simple sequence repeat and inter-retrotransposon amplification polymorphism markers. Annals of Applied Biology. 150: 393-401.
- 37- Zeng, Z.B. (1993). Theoretical basis of separation of multiple linked gene effects on mapping quantitative trait loci. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 90: 10972-10976.
- 38- Zeng, Z.B. (1994). Precision mapping of quantitative trait loci. Genetics. 136: 1457-1468.
- 39- Zhang, D., Cheng, H., Hu, Z., wang, H., Kan, G. and Liu, C. (2013). Fine mapping of a major flowering time QTL on soybean chromosome 6 combining linkage and association analysis. Euphytica. 191: 23-33.

## Identification of genetic loci controlling flowering time in oriental-type tobacco

Hoshyardel F.<sup>1</sup>, Darvishzadeh R.<sup>1</sup> and Hatami Maleki H.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Plant Breeding and Biotechnology Dept., Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran

<sup>2</sup> Agronomy and Plant Breeding Dept., Faculty of Agriculture, University of Maragheh, Maragheh, I.R. of Iran

### Abstract

In order to identify genetic loci associated with flowering time in oriental-type tobacco, the genetic population comprising 100 F<sub>2</sub> individuals from the cross between two oriental-type genotypes Basma seres 31 (maternal) × SPT 406 (paternal) were evaluated for days to flowering character. In molecular experiment, linkage map with 23 SSR and 29 ISSR markers were prepared which covered 570.8 cM of tobacco genome. Using interval and composite interval mapping procedures, 9 and 2 QTLs were identified for studied character, respectively. In this study, the most of identified QTLs were located on linkage group 5. Genetic loci qDF5-3 and qDF2-27, identified via interval mapping, with 0.8 and 36 percent of R<sup>2</sup> were the minor and major QTLs, respectively. According to results, the percentage of phenotypic variance (R<sup>2</sup>) explained by identified QTLs through composite interval mapping (qDF5-1 and qDF5-2), ranged from 1.95 to 15.34. Results revealed the role of both additive and dominance effects in genetic control of days to flowering in oriental-type tobacco.

**Key words:** Gene mapping, genetic population, molecular markers, quantitative traits, tobacco.