

شناسایی مکان‌های صفت کمی برای صفات شیمیایی در یک جمعیت لاین‌های خویش آمیخته نوتر کیب توتون شرقی

پرویز گوردزی مکر¹، رضا درویش زاده^{2*}، بهرام ملکی زنجانی³، سید رضا علوی⁴، فرامرز هوشیار دل⁵

1- دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان

2- استاد گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

3- دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان

4- محقق مرکز تحقیقات توتون ارومیه، ارومیه

5- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

* ارومیه، صندوق پستی 165

r.darvishzadeh@urmia.ac.ir

(دریافت مقاله: 94/8/29 پذیرش مقاله: 94/11/6)

چکیده- یکی از روش‌های نوین مورد استفاده در برنامه‌های اصلاحی گیاهان مشخص نمودن مکان‌ی صفت کمی (QTL) در ژنوم به کمک نشانگرهای مولکولی است. به منظور شناسایی QTL برای صفات شیمیایی نظیر درصد تجمع نیکوتین، کلر، قند و مقدار خاکستر به جا مانده از سوزش در توتون شرقی، یک جمعیت ژنتیکی متشکل از 55 لاین خویش آمیخته نوترکیب حاصل از تلاقی SPT406 (لاین پدری) و Basma seres 31 (لاین مادری) در رابطه با صفات ذکر شده مورد ارزیابی قرار گرفت. برای شناسایی QTL از نقشه پیوستگی که با استفاده از 103 لاین خویش آمیخته نوترکیب و با 14 نشانگر SSR، 24 نشانگر ISSR و 26 نشانگر رتروترانسپوزون تهیه شده بود و شامل 7 گروه پیوستگی بود، استفاده گردید. پنج QTL برای صفات مورد مطالعه شناسایی شد. تغییرات فنوتیپی توجیه شده توسط QTL‌های شناسایی شده بین 0/07 و 0/27 متغیر بود. QTL‌های شناسایی شده پس از اعتبارسنجی می‌توانند در برنامه‌های اصلاحی و انتخاب به کمک نشانگر مورد استفاده قرار گیرند.

کلیدواژگان: تغییرات فنوتیپی، صفات کمی، مکان‌یابی QTL، نشانگرهای مولکولی.

1- مقدمه

بیش از همه گونه‌ها کشت می‌شود [1]. این گیاه دارای کاربردهای صنعتی و دارویی بوده و در بیشتر مناطق دنیا کشت می‌شود. تقسیم‌بندی‌های مختلفی بر اساس صفات مورفولوژیک، بیوشیمیایی و روش‌های فراوری برگ ارائه شده است [2]. این گیاه براساس تیپ رشدی شامل سه

توتون (*Nicotiana tabacum* L.) گیاهی یکساله و آلوترتا پلیوید ($2n=4X=48$)، به خانواده Solanaceae تعلق داشته و دارای بزرگترین ژنوم (4500 Mbp) در این خانواده است. در میان گونه‌های این جنس، *N. tabacum*

گروه توتون‌های غربی، نیمه شرقی و شرقی است. مشخصات بارز توتون‌های شرقی یا ترکیه‌ای داشتن صفاتی از قبیل برگ‌های کوچک، بافت ظریف، دود ملایم و عطر نافذ است که آنها را از دیگر تیپ متمایز می‌کند. این تیپ توتون به طریقه آفتاب خشک فراوری می‌شود و از اجزای اصلی خرمن سیگارهای بلند¹ می‌باشد [2]. توتون‌های شرقی بیشتر در ترکیه، شمال غرب ایران، مقدونیه و لبنان کشت می‌شوند. محصول با کیفیت مطلوب معمولاً در زمین‌های کوهپایه‌ای و کمتر حاصل خیز بدست می‌آید.

از عواملی که قابل استفاده بودن برگ توتون در صنعت را تعیین می‌نمایند، قابلیت سوزش، همچنین طعم و بوی آن است [3]. این عوامل متأثر از خصوصیات ریخت‌شناسی، شیمیایی و نحوه فراوری برگ توتون می‌باشد [3]. در میان عوامل شیمیایی، کلر به‌عنوان یک ریز مغذی، با اینکه مقدار بیشتر آن دارای اثرات سوء بر کیفیت توتون است، اثرات مثبتی بر کیفیت برگ توتون دارد. طوریکه مقدار کم آن (زیر 1 درصد وزن خشک برگ) باعث بهبود عملکرد و فاکتورهای کیفی از قبیل رنگ، الاستیسیته و سوزش و حفظ کیفیت برگ توتون می‌شود [4]. Lamprecht & Botha [5] با تجزیه و تحلیل دیالال بین 8 رقم توتون تیپ غربی نشان دادند که میزان تجمع کلر ماهیت چند ژنی دارد و سهم اثرات افزایشی در کنترل صفت بیشتر است. درویش زاده و همکاران [6] میزان تجمع کلر در برگ 100 ژنوتیپ توتون شرقی و نیمه شرقی را مورد ارزیابی قرار دادند و نتیجه گرفتند تنوع گسترده‌ای بین ژنوتیپ‌ها برای جذب کلر وجود دارد. درویش زاده و علوی [7] با تجزیه و تحلیل دیالال بین هشت رقم توتون شرقی نشان دادند که ترکیب‌پذیری عمومی و خصوصی برای تجمع کلر در برگ معنی‌دار می‌باشد. با وجود این سهم اثرات غالبیت در توارث تجمع کلر بیشتر از سهم

اثرات افزایشی ژن‌ها بود.

آلکالوئیدها و کربوهیدرات‌ها از عوامل دیگر تأثیرگذار بر کیفیت برگ توتون هستند. آلکالوئیدها ترکیبات ازت‌داری هستند که در برخی اعضای خانواده سولاناسه مانند گوجه‌فرنگی، بادنجان و به مقدار بسیار زیاد در توتون سنتز می‌شوند. از مهمترین آلکالوئیدها می‌توان به نیکوتین، نورنیکوتین و آنازین اشاره کرد [8]. با توجه به اثرات فیزیولوژیکی آلکالوئیدها بر بدن مصرف‌کننده، کم کردن این مواد در توتون به عنوان یکی از اهداف مهم اصلاحی مطرح است. مطالعات نشان داده است 2 مکان ژنی سنتز کلی آلکالوئیدها در برگ توتون را کنترل می‌کنند [8]. همچنین گزارش شده است که 1 مکان ژنی با کنترل تبدیل نیکوتین به آلکالوئیدهای دیگر سطح نهایی این ماده در برگ را تعیین می‌نماید. کربوهیدرات‌های موجود در برگ توتون قندهای محلول مونو و دی ساکاریدی هستند. تجمع این مواد در برگ‌ها باعث بهتر شدن طعم، بو و قابلیت سوزش می‌شود [3].

با توجه به ماهیت چندژنی صفات شیمیایی توتون و تأثیرپذیری زیاد آنها از شرایط محیطی، مطالعه ژنتیکی و اصلاح این دسته از صفات، پیچیده و مشکل می‌باشد [9]. در سال‌های اخیر با ظهور و توسعه نشانگرهای ملکولی امکان مطالعه صفات کمی با کنترل پیچیده از طریق مکان یابی QTL تسهیل شده است. در این روش تفرق هم‌زمان نواحی ژنومی دخیل در کنترل صفات کمی و نشانگرها بررسی می‌شود [10، 11]. تجزیه QTL مبتنی بر جستجوی سیستماتیک نامتعادلی پیوستگی بین مکان QTL و جایگاه نشانگرها است. اگر مکان QTL روی کروموزوم مشخص گردد و پیوستگی آن مکان با نشانگر به اثبات برسد در این صورت می‌توان از آن در گزینش به کمک نشانگرها در برنامه‌های اصلاحی استفاده کرد [12]. از جمعیت‌های مورد استفاده در مکان‌یابی QTL می‌توان به جمعیت F_2 ، تلاقی برگشتی، لاین‌های دابل‌هاپلوئید و لاین‌های خویش

¹ Blend

2- مواد و روش‌ها

2-1- مواد گیاهی و اندازه‌گیری صفات

از تلاقی دو ژنوتیپ توتون شرقی SPT406 (والد پدری) و Basma seres (والد مادری) که بر اساس مطالعات قبلی از نقطه نظر تجمع کلر در برگ و صفات زراعی در دو انتهای توزیع قرار داشتند [۶، ۱۶]، نسل F_1 تولید و با مدیریت جمعیت و انتخاب بر اساس بالک تک بذری جمعیت لاین‌های خویش آمیخته نوترکیب (F_6) تشکیل شد. تعداد 103 لاین خویش آمیخته نوترکیب برای توسعه نقشه ژنتیکی توتون شرقی با استفاده از نشانگرهای SSR، IRAP، JSSR و REMAP استفاده شد [17].

بر اساس داده‌های صفات شیمیایی گیاهان F_5 ، تعداد 55 لاین خویش آمیخته نوترکیب انتخاب و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با 3 تکرار و هر کرت شامل 3 خط 5 متری کشت شدند. بدین منظور در سال زراعی 92-93 بذر هر کدام از لاین‌ها در خزانه با تراکم 900 نشا در هر متر مربع کشت و خزانه با لایه نازکی از کود پوسیده حیوانی پوشیده شد. قبل از انتقال گیاهچه‌ها به مزرعه اصلی، زمین اصلی جهت نرم و یکنواخت شدن شخم و دیسک زده شد. ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک محل آزمایش در جدول 1 ارائه شده است. نشاها بعد رسیدن به ارتفاع 12 سانتی‌متر به زمین اصلی منتقل و با فواصل بین و درون ردیف 20×65 سانتی‌متر کشت شدند. تمام عملیات زراعی مطابق با توصیه مرکز تحقیقات توتون ارومیه در رابطه با کشت و عمل‌آوری توتون‌های شرقی انجام گرفت. آبیاری مزرعه پس از تخلیه 80 درصد از آب قابل دسترس خاک انجام می‌گرفت.

بر خلاف بیشتر توتون‌ها (ویرجینیا و بارلی) که عمل سرزنی رایج است، در توتون‌های شرقی مورد مطالعه، این عمل انجام نگرفت.

آمیخته نوترکیب (RILs) اشاره کرد. جمعیت لاین‌های خویش آمیخته نوترکیب از تلاقی دو والد خالص با خویشاوندی دور و مدیریت جمعیت در حال تفرق تا نسل F_6 با بالک تک بذری حاصل می‌شوند. گیاهان موجود در نسل ششم، به دلیل خودگشتی‌های مکرر به خلوص رسیده و از لحاظ ژنتیکی تثبیت شده هستند. جمعیت لاین‌های خویش آمیخته نوترکیب معایب جمعیت‌های F_2 از جمله مشکل تهیه تکراردار فنوتیپ و وجود پیوستگی بین QTL با نشانگرهایی که در فاصله دوری از آن قرار دارند (پیوستگی‌های دروغین)، را ندارند. تلاش‌های فراوانی در زمینه مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی در خانواده Solanaceae صورت گرفته است که می‌توان به مکان‌یابی برخی صفات کمی در سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی [13] اشاره کرد. در گیاه توتون به دلیل محدود بودن چندشکلی در بین ارقام مختلف و پیچیدگی و دشواری تهیه نقشه برای این گیاه مطالعات زیادی در زمینه مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی صورت نگرفته است.

Li و همکاران [14] با استفاده از 127 فرد F_2 و $F_{2:3}$ و 190 نشانگر SRAP، ISSR و RAPD نقشه پیوستگی توتون را تهیه و مکان‌های ژنی کنترل‌کننده شش صفت مهم زراعی را شناسایی کردند. Lin و همکاران [15] از طریق 69 نشانگر RLFP و 102 نشانگر RAPD با استفاده از جمعیت F_2 ، نقشه پیوستگی شامل 19 گروه پیوستگی را تهیه نمودند که طول آن 1385/6 سانتی‌مورگان بود. مطالعه حاضر با هدف شناسایی QTL‌های کنترل‌کننده صفات شیمیایی در جمعیت لاین‌های خویش آمیخته نوترکیب توتون شرقی انجام گرفت. مطالعه مکان‌های ژنی کنترل‌کننده صفات کمی از روش‌های نوین اصلاحی است که می‌تواند در انجام فعالیت‌های به‌نژادی در زمانی کوتاه‌تر و بصورت قابل پیش‌بینی‌تر نقش مهمی ایفا نماید.

جدول 1 خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک محل آزمایش (مرکز تحقیقات توتون ارومیه)

مقدار	ویژگی خاک	مقدار	ویژگی خاک
0/73	(%) کربن ارگانیک	7/6	pH
49/9	(%) درصد اشباع	0/6	هدایت الکتریکی ($\text{EC} \times 10^{-3} \text{ ds m}^{-1}$)
11/84	(%) کربنات کلسیم	39/3	فسفر (mg/kg)
3/57	(%) بی کربنات	565	پتاسیم (mg/kg)
16	(%) شن	0/11	(%) نیتروژن کل
44	(%) رس شنی	1/87	منگنز (milimol of charge per liter)
40	(%) رس	1/89	کلسیم (milimol of charge per liter)
		0/8	کلر (milimol of charge per liter)

صفات مورد مطالعه در نرم‌افزار مینی‌تب نسخه 14 محاسبه شد.

3- یافته‌ها و بحث

3-1- تنوع فنوتیپی و تجزیه همبستگی

با توجه به توزیع ارزش صفات لاین‌های 8 و 20 به ترتیب دارای بیشترین (1/93) و کمترین (0/38) ارزش برای صفت کلر، لاین‌های 34 و 24 به ترتیب دارای بیشترین (2/32) و کمترین (0/95) ارزش برای صفت نیکوتین، لاین‌های 50 و 3 به ترتیب دارای بیشترین (6/79) و کمترین (3/48) ارزش برای صفت قند و لاین‌های 14 و 16 نیز دارای بیشترین (19/69) و کمترین (18/40) ارزش برای صفت خاکستر می‌باشند (جدول 2). با توجه به مطلوبیت پایین بودن تجمع کلر (کمتر از 1 درصد) و نیکوتین (کمتر از 2 درصد) در برگ توتون و با بررسی ارزش اندازه‌گیری شده صفات می‌توان گفت 66 درصد لاین‌ها دارای مقدار تجمع مطلوب کلر و 77 درصد لاین‌ها دارای مقدار تجمع مطلوب نیکوتین می‌باشند. تجمع قند بیشتر از 5 درصد نیز نشان دهنده طعم و سوزش مطلوب توتون می‌باشد که با توجه به این موضوع 58 درصد لاین‌ها دارای مقدار تجمع مطلوب قند می‌باشند.

چیدن برگ‌ها در سه نوبت پس از رسیدن صنعتی انجام گرفت و سپس در مقابل آفتاب که ویژه توتون‌های شرقی است خشک گردیدند. پس از خشکاندن برگ‌های هر لاین، از برگ‌های قسمت میانی (کمبرگ) نمونه‌برداری صورت گرفت و مقدار نیکوتین، قند، خاکستر و کلر هر نمونه مطابق دستورالعمل CORESTA (<http://www.coresta.org/>) در آزمایشگاه شیمی شرکت دخانیات ایران تعیین شد.

2-2- تجزیه داده‌ها

شناسایی مکان‌های صفت کمی (QTL) برای صفات مورد مطالعه با استفاده از نقشه پیوستگی تهیه شده توسط هوشیاردل [17] و میانگین ارزش اندازه‌گیری شده صفات در افراد جمعیت به روش مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب [18، 19] در نرم‌افزار JoinMap 3.0 [20] انجام گرفت. مقدار LOD آستانه جهت آزمون معنی‌دار بودن QTL به روش جایگشت (n=1000) تعیین گردید. برای نام‌گذاری QTL به ترتیب از چپ به راست: حرف (q) برای QTL، حروف بعدی برای صفت و شماره برای گروه پیوستگی استفاده شد. اگر در یک گروه پیوستگی بیش از یک QTL وجود داشت با شماره‌های یک، دو، سه و غیره بعد از شماره گروه پیوستگی مشخص شده است. همبستگی

جدول 2 میانگین صفات مورد بررسی در افراد جمعیت لاین‌های خویش آمیخته نوترکیب حاصل از تلاقی SPT406 (لاین پدری) و Basma seres 31 (لاین مادری)

لاین	نیکوتین (%)		کلر (%)		قند (%)		خاکستر (%)	
	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD
P ₁ (Basma seres 31) (♀)	1/72	-	0/57	-	5/50	-	21/00	-
P ₂ (SPT406) (♂)	0/99	-	0/38	-	5/57	-	20/74	-
1	1/61	0/35	1/03	0/68	6/34	0/85	19/95	0/06
2	1/45	0/68	1/31	0/94	6/09	1/28	19/05	0/57
3	1/88	0/73	1/68	0/69	3/48	0/71	18/76	0/80
4	1/51	0/68	1/35	0/78	5/25	0/39	19/25	0/51
5	1/18	0/35	1/02	1/03	5/46	1/72	18/71	0/37
6	1/45	0/53	1/15	0/87	4/56	1/66	18/71	0/53
7	1/15	0/30	1/72	0/83	5/41	2/78	19/30	0/58
8	0/99	0/19	1/93	0/18	5/37	3/34	18/95	1/24
9	1/34	0/33	1/77	0/93	5/22	1/25	18/59	0/11
10	0/97	0/11	0/42	0/13	5/16	1/78	19/63	0/69
11	1/91	0/63	0/47	0/06	4/52	1/88	18/96	0/60
12	1/18	0/25	1/52	1/16	4/32	1/15	18/94	0/68
13	2/03	0/27	0/55	0/15	4/58	0/25	18/58	0/50
14	2/11	0/55	0/52	0/23	5/89	1/76	19/69	0/40
15	1/42	0/44	0/42	0/10	5/19	1/44	19/11	0/71
16	1/22	0/30	0/95	0/48	4/99	1/93	18/40	0/54
17	1/04	0/16	1/62	0/89	5/98	1/79	18/49	0/48
18	1/09	0/33	0/97	0/90	4/98	2/68	18/76	0/18
19	1/62	0/47	0/97	0/67	5/13	1/82	19/31	0/38
20	2/23	0/28	0/38	0/03	4/93	2/58	19/35	0/86
21	2/01	0/71	0/53	0/23	4/64	0/37	19/27	0/18
22	1/83	0/61	0/73	0/21	5/41	0/34	18/54	0/43
23	1/98	0/53	0/50	0/17	4/95	0/83	19/43	0/32
24	0/95	0/09	0/57	0/16	6/00	0/99	19/36	0/82
25	1/65	0/31	0/42	0/03	5/97	2/71	19/33	1/07
26	1/29	0/43	0/42	0/03	4/55	2/02	18/70	0/31
27	2/05	0/10	0/57	0/85	4/83	1/02	19/51	0/83
28	1/28	0/23	0/40	0/00	6/61	0/93	19/10	0/29
29	2/04	0/17	1/33	0/90	4/03	0/36	19/21	0/43

جدول 2 ادامه

30	1/94	0/94	1/40	1/41	4/68	1/94	18/88	0/30
31	1/16	0/34	0/57	0/39	4/94	1/74	18/79	0/41
32	1/07	0/23	1/43	0/96	5/26	1/20	19/06	0/84
33	1/81	0/00	1/57	1/10	4/92	0/00	19/12	0/00
34	2/32	0/39	1/73	0/92	5/47	2/10	19/57	0/27
35	2/03	0/57	1/35	0/80	4/82	1/25	19/47	0/75
36	1/01	0/09	0/80	0/28	4/58	1/14	19/01	0/90
37	1/33	0/25	0/50	0/00	5/90	0/97	19/10	0/54
38	1/90	0/34	0/51	0/09	6/13	0/65	19/23	0/33
39	2/15	0/30	0/50	0/17	4/46	1/03	18/79	0/35
40	1/29	0/21	0/48	0/03	5/59	0/08	18/40	0/13
41	1/10	0/30	0/65	0/13	5/68	1/36	18/97	0/56
42	1/00	0/16	1/57	0/80	5/69	1/92	18/90	0/57
43	2/07	0/45	0/48	0/03	4/67	0/51	19/14	0/67
44	2/15	0/44	0/45	0/13	4/30	1/13	19/11	1/12
45	1/32	0/38	0/43	0/06	6/14	1/23	19/63	0/08
46	1/96	0/30	0/70	0/42	5/49	1/34	18/88	0/27
47	1/37	0/23	0/73	0/65	5/34	0/49	19/33	0/69
48	1/62	0/00	0/70	0/44	5/95	0/00	18/61	0/00
49	2/03	0/00	0/45	0/46	5/77	0/00	18/98	0/00
50	1/20	0/08	0/42	0/03	6/79	0/63	19/54	0/33
51	0/99	0/15	0/80	0/44	5/74	1/61	18/71	0/62
52	1/94	0/00	0/45	0/05	4/65	0/00	19/22	0/00
53	1/83	0/34	1/06	0/67	4/10	0/08	18/82	0/31
54	2/16	0/24	0/38	0/03	5/07	0/67	19/02	0/50
55	2/12	0/03	0/45	0/21	5/72	1/21	19/55	0/32
\bar{X}_P	1/35	-	0/98	-	5/54	-	20/87	-
\bar{X}_{RIL}	1/59	-	0/87	-	5/23	-	19/07	-
$\bar{X}_{RILS} - \bar{X}_P$	0/24		-0/10		-0/31		-1/08	
$\bar{X}_{10\% \text{ of best RILs}}$	2/19		1/74		6/35		19/65	
$\bar{X}_{10\% \text{ of best RILs}} - \bar{X}_P$	0/84*		0/76*		0/81*		-1/22	
LSD	0/67		0/12		2/12		0/89	

\bar{X}_P : میانگین والدین، \bar{X}_{RIL} میانگین جمعیت لاین‌های خویش آمیخته نوترکیب. LSD: حداقل اختلاف معنی‌دار.

البته همبستگی به تنهایی نمی‌تواند روابط بین دو متغیر را توجیه نماید، به خاطر اینکه ممکن است این دو متغیر تحت تأثیر متغیرهای دیگر قرار گرفته باشند [23]. از نتایج همبستگی بین صفات می‌توان برای اصلاح صفات همبسته بطور هم‌زمان استفاده کرد.

2-3- شناسایی QTLهای کنترل کننده صفات

در مجموع برای صفات مورد بررسی، پنج QTL در گروه‌های پیوستگی 1، 2 و 3 شناسایی شد (جدول 4). دامنه LOD آستانه برای شناسایی QTL از 1/92 تا 4/78 متغیر بود (جدول 4). برای صفت نیکوتین یک QTL در گروه پیوستگی 1 شناسایی شد. علامت مثبت اثر افزایشی (0/15-) نشان می‌دهد که آلل مطلوب از والد پدری SPT406 مشارکت داشته است. برای صفت خاکستر یک QTL در گروه پیوستگی 1 شناسایی شد (جدول 4).

علامت مثبت اثر افزایشی (0/20) نشان می‌دهد که آلل مطلوب از والد پدری SPT406 مشارکت داشته است. برای صفت کلر یک QTL در پیوستگی 1 شناسایی شد. علامت مثبت اثر افزایشی (0/19) نشان می‌دهد که آلل مطلوب از والد پدری SPT406 مشارکت داشته است. برای صفت درصد تجمع قند 2 QTL در گروه‌های پیوستگی 2 و 3 شناسایی شد. علامت مثبت و منفی اثرات افزایشی نشان دهنده این است که آلل‌های مطلوب از هر 2 والد مادری و پدری مشارکت داشته اند (جدول 4). علامت منفی یا مثبت در اثرات افزایشی یک قرارداد در مطالعات مکان یابی QTL برای نشان دادن منشاء آلل در نتایج می‌باشد. علامت منفی در اثرات افزایشی نشان دهنده منشاء آلل از والد مادری و علامت مثبت در اثرات افزایشی نشان دهنده منشاء آلل از والد پدری است. از آنجا که برای صفت درصد تجمع قند در برگ در توتون‌های شرقی پدیده تفکیک متجاوز مشاهده شده است [16]، انتقال آلل‌های مطلوب از هر 2 والد مادری Basma seres 31 و پدری SPT406 دور از انتظار نیست.

مقدار خاکستر به جامانده حاصل از سوزش بین 18 تا 20 درصد نشان دهنده سوزش عالی برگ‌ها و بیش از این مقدار نشان دهنده کیفیت کم توتون است، لذا با توجه به ارزش صفت اکثر لاین‌ها دارای مقدار قابل قبول برای خاکستر به جا مانده از سوزش می‌باشند. مقدار سود ژنتیکی، اختلاف میانگین 10 درصد از بهترین لاین‌های خویش آمیخته نو ترکیب با میانگین والدین، برای تمام صفات به جز صفت خاکستر بر اساس آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال 5 درصد معنی‌دار می‌باشد (جدول 2). می‌توان مشاهده کرد که در برخی صفات حداکثر و حداقل ارزش لاین به ترتیب بالاتر و پایین‌تر از ارزش والدین بوده (جدول 2) که این موضوع نشان دهنده وجود پدیده تفکیک متجاوز در جمعیت لاین‌های خویش آمیخته نو ترکیب می‌باشد. پدیده تفکیک متجاوز نشان دهنده تأثیر آلل‌های هر دو والد در تعیین ارزش نهایی صفات در نتایج می‌باشد. نتایج همبستگی ساده صفات مورد مطالعه در جدول 3 نشان داده شده است. همبستگی مثبت و معنی‌دار در سطح احتمال 5 درصد بین صفات قند و خاکستر (0/27) و همبستگی منفی و معنی‌دار در سطح احتمال 5 درصد بین صفات نیکوتین و قند (0/33-) مشاهده شد. همبستگی معنی‌دار می‌تواند به دلیل وجود رابطه نزدیک بین ژن‌های کنترل کننده صفات یا به علت اثرات پلیوتروپی ژن‌ها باشد [21، 22].

جدول 3 همبستگی بین صفات در لاین‌های خویش آمیخته نو ترکیب توتون شرقی حاصل از تلاقی SPT406 (لاین پدری) و Basma seres 31 (لاین مادری)

	خاکستر	قند	نیکوتین
قند			-0/332*
خاکستر		0/271*	0/246 ^{ns}
کلر	-0/194 ^{ns}	-0/074 ^{ns}	-0/219 ^{ns}

ns: غیر معنی‌دار. *: معنی‌دار در سطح احتمال 5 درصد.

جدول 4 موقعیت و اثر QTL‌های شناسایی شده برای صفات شیمیایی در جمعیت لاین‌های خویش آمیخته نوترکیب توتون شرقی

حاصل از تلاقی SPT406 (لاین پدری) و Basma seres 31 (لاین مادری)

صفت	QTL	گروه پیوستگی	موقعیت	نشانهگر	LOD	اثر افزایشی	R ²
کلر	qCl1	1	2	1	2/57	0/19	0/12
نیکوتین	qNi1	1	36	1	1/92	0/15	0/07
خاکستر	qAs1	1	18	1	4/78	0/20	0/27
قند	qSu3	3	72	1	1/92	0/29	0/07
	qSu2	2	24	2	1/92	-0/39	0/07

R²: درصد واریانس فنوتیپی بیان شده بوسیله QTL‌ها. علامت منفی در اثرات افزایشی نشان دهنده نقش والد مادری (Basma seres 31) در افزایش صفت و علامت مثبت در اثرات افزایشی نشان‌دهنده نقش والد پدری (SPT406) در افزایش صفت است. eM: سانتی مورگان، محاسبه شده از طریق فرمول کوسامبی که فاصله از بالای گروه پیوستگی را نشان می‌دهد. سطح آستانه یا LOD برای شناسایی QTL‌های معنی‌دار از طریق آزمون جایگشت (n=1000) توسط نرم‌افزار تعیین شد.

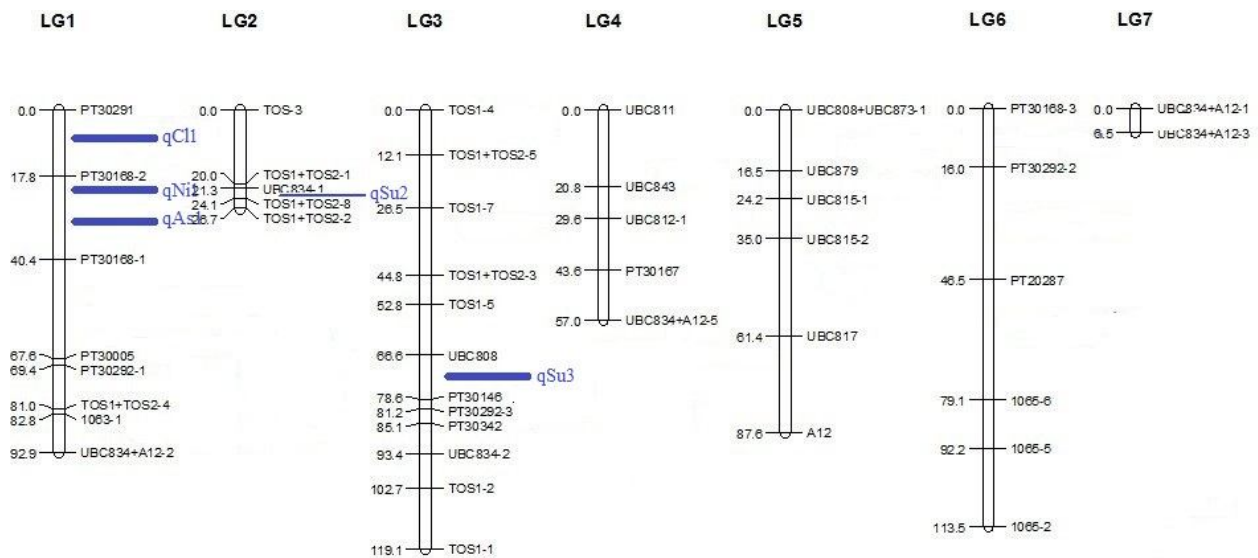
LOD: log₁₀ likelihood ratio (likelihood that the effect occurs by linkage/likelihood that the effect occurs by chance). QTL: quantitative trait loci.

در صفاتی با کنترل کمی گاهی در نسل F₂ و همچنین در نسل‌های پیشرفته، فنوتیپ‌هایی مشاهده می‌شوند که از محدوده تغییرات والدین خود متجاوزند. تولید این فنوتیپ‌های متجاوز به وقوع پدیده تفکیک متجاوز اشاره می‌کند. تفاوت پدیده تفکیک متجاوز با هتروزیس در این است که هتروزیس در اولین نسل هیبریدی آشکار می‌شود و شرایطی را نشان می‌دهد که ارزش یک صفت در جهت مطلوب برتر از والدین است، در حالی که پدیده تفکیک متجاوز در نسل دوم و دیگر نسل‌های در حال تفرق آشکار و سبب ایجاد افرادی شده است که ارزش فنوتیپی آن‌ها در هر دو جهت مثبت و منفی فراتر از والدین است. وقوع پدیده تفکیک متجاوز برای صفات در تلاقی‌ها ناشی از پلی ژنیک بودن صفات است به نحوی که والدین آلل‌های متفاوتی را به منظور بیان یک صفت به اشتراک می‌گذارند. تفکیک متجاوز توسط اصغری و همکاران [24] در مکان‌یابی ژن‌های مقاومت به سرما در کلزا نیز گزارش گردیده است.

در تحقیقی توسط Hatami Maleki و همکاران [16] به منظور شناسایی موقعیت ژنومی QTL‌های کنترل‌کننده تجمع کلر در برگ توتون‌های شرقی با استفاده از روش مکان‌یابی فاصله‌ای در جمعیت F₂ حاصل از تلاقی

Basma seres 31 × SPT406. یک QTL بر روی گروه پیوستگی 5 (LG V) و بین نشانگرهای PT30346-PT30308 شناسایی شد. اثر افزایشی QTL شناسایی شده در حدود 0/1 و LOD آن برابر با 2/3 بود. علامت اثر افزایشی QTL شناسایی شده منفی بود که نشان می‌داد آلل مطلوب از والد Basma seres 31 منتقل شده است. اخیراً بصیرنیا و همکاران [25] با استفاده از نقشه‌یابی ارتباطی مبتنی بر عدم تعادل لینکاژی² در ژنوتیپ‌های توتون شرقی، 1 نشانگر میکروساتلایت مرتبط با صفت تجمع کلر در برگ را شناسایی کردند. در این تحقیق برای صفات مورد مطالعه، تعداد کمی QTL شناسایی شد (شکل 1) که احتمالاً به دلیل عدم پوشش کامل ژنومی باشد، زیرا نقشه ژنتیکی اشباع، نقش مهمی در مطالعات نقشه‌یابی QTL دارد [26]. در مورد صفات با توارث پیچیده به ویژه صفات مرتبط با کیفیت برگ توتون گزارشات کمی وجود دارد. Julio و همکاران [27] با استفاده از نقشه ژنتیکی تهیه شده با نشانگرهای AFLP، SCAR، SSAP و ISSR در یک جمعیت لاین‌های خویش آمیخته نوترکیب توتون، 75 عدد QTL را در 12 گروه لینکاژی برای صفاتی مانند کیفیت برگ، ترکیبات شیمیایی و خواص دود شناسایی کردند.

² Linkage disequilibrium based association mapping



شکل 1 QTL های شناسایی شده برای صفات مورد بررسی بر روی نقشه پیوستگی تهیه شده با 103 لاین خویش آمیخته نوترکیب حاصل از تلاقی SPT406 (لاین پدری) و Basma seres 31 (لاین مادری).

از اثرات متقابل QTL با محیط آزمایش در محیط‌های مختلف تکرار شود. از QTL های پایدار می‌توان در برنامه‌های نوین اصلاحی نظیر گزینش به کمک نشانگر استفاده کرد. به منظور نقشه‌یابی دقیق لازم است نقشه‌ای با پوشش ژنومی مناسب تهیه شود که این مهم با انتخاب تعداد افراد بیشتر و نشانگرهای متنوع و نشانگرهایی با چندشکلی بالا محقق می‌شود. می‌توان از روش‌های جدیدی همانند نقشه‌یابی تجمیعی که از اطلاعات حاصل از چندین نقشه در یک نقشه جامع استفاده می‌کند، بهره برد.

5- منابع

- [1] Narayan RK (1987). Nuclear DNA changes, genome differentiation and evolution in *Nicotiana* (*Solanaceae*). *Plant Systematics and Evolution*, 157: 161–180.
- [2] Chaplin JF (1975). Genetic influence on chemical constituents of tobacco leaf and smoke. *Beitrag Zur Tabacforchung*, 8(4): 233–240.
- [3] Davis DL, Nielsen MT, (1999). *Tobacco: Production, chemistry and technology*. Oxford, UK: CORESTA, Blackwell Science.

Xiao و همکاران [28] با استفاده از خانواده‌های دابل‌هاپلوئید تعداد 7 عدد QTL برای مقادیر شکر، نیکوتین و پتاسیم موجود در برگ‌های توتون شناسایی کردند. در مطالعه دیگر Li و همکاران [14] با استفاده از نقشه‌یابی QTL، 2 QTL برای مقدار نیکوتین، 2 QTL برای تجمع کلر، 1 QTL برای مقادیر پتاسیم، 4 QTL برای طول برگ و 1 QTL برای مقاومت به سفیدک سطحی شناسایی کردند. یکی از دلایل مطالعات کم در زمینه مکان‌یابی صفات کمی در توتون، وجود تنوع کم در داخل گونه *N. tabacum* می‌باشد [27]. در مقابل شناسایی ژن‌های کنترل کننده مقاومت به بیماری‌های مختلف در توتون به وفور انجام شده است [29-32].

4- نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج تجزیه همبستگی، همبستگی مثبت و معنی‌دار بین صفات قند و خاکستر و همبستگی منفی و معنی‌دار بین صفات قند و نیکوتین مشاهده شد. بر اساس نتایج مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب، پنج QTL برای صفات شیمیایی مورد بررسی شناسایی شد. لازم است برای اطلاع

- [15] Lin TY, Kao YY, Lin RF, Chen CM, Huang CH, Wang CK, Lin YZ and Chen CC (2001). A genetic linkage map of *Nicotiana plumbaginifolia/Nicotiana longiflora* based on RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 103: 905–911.
- [16] Hatami Maleki H, Karimzadeh G, Darvishzadeh R, Naghavi MR and Sarrafi A (2013). Identification of QTLs associated with low chloride accumulation in oriental tobacco. *Genetika*, 45: 855–864.
- [17] هوشیاردل ف (1393). مکان‌یابی QTL‌های کنترل کننده صفات آگرومورفولوژیک در توتون‌های شرقی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه ارومیه.
- [18] Zeng ZB (1993). Theoretical basis of separation of multiple linked gene effects on mapping quantitative trait loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90: 10972–10976.
- [19] Zeng ZB (1994). Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics*, 136: 1457–1468.
- [20] Van Ooijen JW and Voorrips RE (2001). JoinMap® 3.0, software for calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen. The Netherlands.
- [21] Aastveit AH and Aastveit K (1993). Effects of genotype-environment interactions on genetic correlation. *Theoretical and Applied Genetics*, 86: 1007–1013.
- [22] Veldboom LR, Lee M and Woodman WL (1994). Molecular marker-facilitated studies of morphological traits in an elite maize population. 2. Determination of QTLs for grain yield and yield components. *Theoretical and Applied Genetics*, 89: 451–458.
- [23] Singh M, Singh H, Kumar R, Tank DS, Singh VP, Singh T and Singh SM (1988). Correlation and path coefficient analysis of some morphological and yield characters in sunflower. *Crop Research*, 16: 93–96.
- [24] Asghari A, Mohammadi SA, Moghadam M, Toorchi M and Dabagh-Mohammadi Nasab A (2005). Mapping cold resistance genes in rapeseed (*Brassica napus* L.) using microsatellite markers. *Iranian Journal of Crop Sciences*, 7: 202–211.
- [25] Basirnia A, Hatami Maleki H, Darvishzadeh R and Ghavami F (2014). Mixed linear model association mapping for low chloride
- [4] McEvoy ET (1957). The growth and mineral content of flue-cured tobacco as influenced by reaction of nutrient solutions with ionic forms of nitrogen. *Canadian Journal of Soil Science*, 37: 79–83.
- [5] Lamprecht MP, and Botha AH (1975). Genetic basis of chlorine concentration in flue cured tobacco. *Agroplanta*, 7: 25–30.
- [6] Darvishzadeh R, Alavi R and Sarrafi A (2011). Genetic variability for chlorine concentration in oriental tobacco genotypes. *Archive of Agronomy and Soil Science*, 57(2): 167–177.
- [7] Darvishzadeh R and Alavi R (2011). Genetic analysis of chlorine concentration in oriental tobacco. *Journal of Plant Nutrition*, 34: 1070–1078.
- [8] Chaplin JF and Bruk LG (1977). Genetic approaches to varying chemical constituents in tobacco and smoke. *Beitrag Zur Tabacforchunge*, 9: 102–106.
- [9] Movafegh S, Rabiee B, Zare-Feizabadi A and Taheri G (2009). Mapping QTLs controlling yield in two Iranian rice cultivars-F2 populations. *Iranian Journal of Agricultural Research*, 7: 673–683.
- [10] Liu BH (1998). *Statistical Genomics; Linkage, mapping and QTL analysis*. CRC Press. 648 Pp
- [11] Kato K, Miura H and Sawada H (2000). Mapping QTLs controlling grain yield and its components on chromosome 5A of wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 101: 1114–1121.
- [12] Collard B, Jahufer M, Brouwer J and Pang E (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*, 142: 169–196.
- [13] Tanksley SD, Ganai 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 and Young ND (1992). High-density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics*, 132: 1141–1160.
- [14] Li HL, Chen MX, Zhou DX, Chen SH, Tao AF, Li YK, Ma HB, Qi JM and Guo YC (2011). QTL analysis of six important traits in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Acta Agronomica Sinica*, 37: 1577–1584.

- Abstracts/Krakow2007-AgroPhyto.pdf).
- [29] Bai D, Reeleder R and 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.
- [30] Nishi T, Tajima T, Noguchi S, Ajisaka H and Negishi H (2003) Identification of DNA markers of tobacco linked to bacterial wilt resistance. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 765-770
- [31] 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.
- [32] Vontimitta V and Lewis R (2012). Mapping of quantitative trait loci affecting resistance to *Phytophthora nicotianae* in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) line Beinhart-1000. *Molecular Breeding*, 29: 89-98.
- accumulation rate in oriental-type tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) germplasm. *Journal of Plant Interactions*, 9(1): 666-672.
- [26] Tanksley SD, Young ND, Paterson AH and Bonierbale MW (1989). RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Nature Biotechnology*, 7: 257–264.
- [27] Julio E, Denoyes-Rothan B, Verrier JL, 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.
- [28] Xiao BG, Lu XP, Bai YF, Li YP, Sun Y, Guo Z and Jun Z (2007). A genetic linkage map of the flue-cured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) and QTL analysis of several agronomic traits using a doubled haploid population. CORESTA Meeting Agronomy-Phytopathology Groups, 2007, Krakow, Poland, Abstr. AP 10 (<http://www.coresta.org/Meetings/CORESTA->