

تجزیه ارتباطی صفات مورفو-فنولوژیک در توتونهای شرقی (*Nicotiana tabacum L.*) با

## نشانگرهای SSR تحت شرایط حضور و عدم حضور گل‌جالیز

مریم طهماسب عالی<sup>۱</sup>، رضا درویش‌زاده<sup>۱،۲\*</sup> و امیر فیاض مقدم<sup>۱</sup><sup>۱</sup> ایران، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه تولید و ژنتیک گیاهی.<sup>۲</sup> ایران، ارومیه، دانشگاه ارومیه، پژوهشکده زیست‌فناوری.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۳۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۲۴

## چکیده

شناسایی مکانهای ژنی کنترل‌کننده صفات کمی به ویژه در وضعیت تنش از موضوعهای مهم حوزه ژنتیک و به‌نژادی است. گل‌جالیز علف‌هرز هلوپارازیت (انگل اجباری) تضعیف‌کننده توتون (*Nicotiana tabacum L.*) با اثرات مخرب روی تولید آن است. در این مطالعه واکنش فنوتیپی ۸۹ ژنوتیپ توتون شرقی در برابر انگل گل‌جالیز در قالب طرح پایه بلوکهای کامل تصادفی با سه تکرار در طول دو سال متوالی در آزمایشات گلدانی ارزیابی شدند. در هر سال، ژنوتیپها در دو آزمایش جداگانه؛ یکی در شرایط نرمال (عدم حضور انگل گل‌جالیز) و دیگری در شرایط حضور انگل گل‌جالیز که در آن خاک گلدانها با ۰/۰۶ گرم بذر گل‌جالیز مخلوط شد کشت شدند. در آزمایش مولکولی از ۲۶ جفت آغازگر SSR برای تهیه پروفیل مولکولی افراد استفاده شد. مطالعه ساختار جمعیت به عنوان پیش‌نیازی برای انجام تجزیه ارتباط به روش بی‌زین، نشان داد که دو زیر گروه احتمالی ( $K=2$ ) در جمعیت مورد مطالعه وجود دارد. بر اساس آماره  $D'$  ۴/۳۱ درصد از جفت مکانهای SSR به طور معنی‌داری ( $P < 0.01$ ) در عدم تعادل پیوستگی بودند. در تجزیه ارتباط به روش مدل خطی مخلوط بر اساس میانگین تکرارها در دو سال برای هر ژنوتیپ در هر یک از شرایط در رابطه با هر صفت، در مجموع ۱۶ مکان ژنی مرتبط با صفات مورد ارزیابی در سطح احتمال پنج درصد ( $P < 0.05$ ) شناسایی شد. تعدادی از نشانگرها مشترکاً برای یک صفت در محیطهایی با سطوح مختلف تنش (نرمال و تنش گل‌جالیز) شناسایی شدند. این نشانگرها دارای اثر متقابل کمتری با شرایط محیطی می‌باشند (نشانگرهای پایدار)؛ بنابراین گزینش با آنها برای صفتی در شرایط نرمال، باعث بهبود صفت در شرایط تنش نیز خواهد شد. نتایج به دست آمده از این مطالعه، اطلاعات ارزشمندی در زمینه گزینش به کمک نشانگر و مبنای ژنتیکی صفات مورد مطالعه ارائه می‌دهد که می‌توان از این اطلاعات در گزینش افراد طی برنامه‌های به‌نژادی و تولید ارقام جدید با میزان عملکرد بالا بهره برد.

**واژه های کلیدی:** توتون، گل‌جالیز، عدم تعادل پیوستگی، نشانگرهای مولکولی، مکان‌یابی ارتباطی، مقاومت به تنشهای غیرزیستی.

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۳۱۹۴۲۷۸۵ (۴۴) +۹۸، پست الکترونیکی: [r.darvishzadeh@urmia.ac.ir](mailto:r.darvishzadeh@urmia.ac.ir)

## مقدمه

دوره زمانی طولانی مدت (۲۰-۱۵ سال) در خاک زنده مانده و در حضور گیاه میزبان جوانه می‌زنند (۴۶). روشهای مختلف از جمله زراعی، شیمیایی جهت مبارزه با انگل گل‌جالیز بکار برده می‌شود اما هیچ کدام از این روشها به طور کامل مؤثر نیست (۴۱). در چند دهه اخیر

توتون یکی از محصولات با ارزش کشاورزی و صنعتی است. در میان تنشهای زنده و غیرزنده، علف‌هرز گل‌جالیز مهم ترین عامل در کاهش عملکرد توتون می‌باشد (۲۱). این گیاه انگلی در بسیاری از کشورهایی که توتون در آن کشت می‌شود گزارش شده است. بذرهای گل‌جالیز برای

و فنوتیپ گیاه مستقیماً برای شناسایی نواحی کروموزومی دخیل در کنترل صفت با استفاده از نامتعادلی پیوستگی موجود در جمعیت‌های طبیعی و مجموعه‌های ژرم‌پلاسم بررسی می‌شود (۷). مکان‌یابی جایگاه‌های ژنی کنترل‌کننده صفات کمی در دهه‌های اخیر در گیاهان مختلف خانواده بادنجانیان شامل سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی مورد استفاده قرار گرفته است (۴۷). 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 چند شکلی در ارقام توتون بسیار پایین است (۸ و ۳۰). در پژوهشی با استفاده از نشانگرهای AFLP در ۹۲ ژنوتیپ توتون نشانگرهای مرتبط با سه بیماری معمول (بیماریهای پوسیدگی سیاه ریشه و کپک آبی و بیماری ناشی از ویروس Y سیب‌زمینی) شناسایی شدند. در این بررسی محققان موفق به شناسایی هفت نشانگر به ترتیب دو، سه و دو نشانگر مرتبط با مقاومت به بیماری پوسیدگی سیاه ریشه، کپک آبی و بیماری ناشی از ویروس Y سیب‌زمینی شدند (۳۱). در مطالعه‌ای Cai و همکاران (۱۴) با استفاده از نشانگرهای SRAP و AFLP یک QTL برای هر یک از صفات ارتفاع گیاه، قطر ساقه، طول میانگره و طول برگ‌های میانی در توتونهای هواخشک (تیپ بارلی) گزارش نمودند. در مطالعه دیگری که توسط Tong و همکاران (۴۸) به منظور مکان‌یابی ژنهای کنترل‌کننده مقاومت به بیماری لکه قهوه‌ای در توتون گرمخانه‌ای انجام گرفت، سه QTL مرتبط با مقاومت به بیماری شناسایی گردید که بر روی گروه‌های پیوستگی LG2a، LG3a و LG5 قرار داشتند و ۳۱/۱۴ درصد از تنوعات فنوتیپی را توجیه می‌کردند. زمانبر بودن تولید جمعیت‌های مصنوعی و محدود شدن اطلاعات ژنتیکی به جمعیت‌های در حال تفکیک در مقایسه با اطلاعات جامع-تر و متنوع‌تر موجود در جمعیت‌های طبیعی سبب شده است. در سال‌های اخیر تجزیه ارتباط جایگاه ویژه‌ای در تحقیقات به‌نژادی به خود اختصاص دهد (۵). تجزیه ارتباط در چند سال اخیر در دنیا به عنوان یکی از روش‌های نوین در

سناریوی تولید و توسعه ارقام مقاوم به عنوان یکی از مؤثرترین روش‌های کنترل مطرح شده است (۴۱). تولید ارقام مقاوم به گل‌جالیز اقتصادی، عملی و یک روش محیط زیست‌دوستانه می‌باشد (۲۰ و ۲۹).

بهبود ژنتیکی اکثر صفات مهم در گیاهان از جمله توتون به دلیل ماهیت کمی و تأثیرپذیری زیاد از عوامل محیطی دشوار است. یافتن نشانگرهای مولکولی مناسب در شرایطی که گیاه با شرایط تنش (تنش زیستی مثلاً انگل گل‌جالیز یا تنش غیرزیستی مثلاً خشکی یا شوری) مواجه است می‌تواند جهت اعمال گزینش برای بهبود عملکرد (عملکرد دانه در گیاهانی مثل آفتابگردان یا برگ خشک در گیاهانی مثل توتون) نقش به‌سزایی داشته باشد. استفاده از نشانگرهای مولکولی، سبب کاهش مدت زمان اصلاح و هزینه پروژه‌های اصلاحی می‌شود (۴۴). اولین نشانگر مولکولی معرفی شده برای گیاهان، پلی‌مورفیسم طولی قطعات برش‌یافته (RFLP) بود. با ظهور واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)، چندین سیستم نشانگری DNA دیگر مانند پلی‌مورفیسم DNA تکثیر شده تصادفی (RAPD)، پلی-مورفیسم طولی قطعات تکثیر شده (AFLP)، توالی تکراری ساده (SSR) معرفی شد (۱۹) که در بررسی تنوع ژنتیکی و تجزیه ساختار ژنتیک صفات در گیاهان استفاده می‌شوند (۵۰، ۳۴، ۲۷). نشانگرهای SSR یا ریزماهواره‌ها، به دلیل چند آلی بودن، پلی‌مورفیسم بالا، توزیع تصادفی در ژنوم، توارث هم‌بارز و مکان اختصاصی بودن یکی از قابل اعتمادترین نشانگرها برای مطالعات ژنتیکی می‌باشند (۳۳) و در مقایسه با سایر نشانگرها به طور گسترده در مطالعات تنوع ژنتیکی و مطالعات نقشه‌یابی گیاهان از جمله توتون استفاده می‌شوند (۱۲ و ۱۶). از جمله روش‌های مورد استفاده جهت شناسایی نشانگرهای مولکولی مرتبط با صفات، نقشه‌یابی QTL مبتنی بر تجزیه پیوستگی و تجزیه ارتباطی است. در روش تجزیه پیوستگی، هدف شناسایی نشانگرهای پیوسته با یک صفت کمی در یک جمعیت خواهر-برادری است. در تجزیه ارتباط، رابطه بین ژنوتیپ

نمود. تکرار آزمایش در چند سال نیز به محقق در کنترل اثر متقابل ژنوتیپ در محیط کمک می‌نماید. بنابراین در آزمایشات چندساله در مقایسه آزمایشات یک‌ساله میانگین ژنوتیپها دقیق‌تر (بدون اریب) برآورد می‌شوند.

برای ارزیابی واکنش ژنوتیپها، گلدانهای سفالی به حجم ۱۰ لیتر انتخاب و با خاکی که از مزرعه یونجه تهیه شده بود پُر شدند. دلیل استفاده از خاک مزرعه یونجه، میزبان گل‌جالیز نبودن این گیاه و استقرار طولانی مدت گیاه در زمین (معمولاً در شرایط ایده‌آل ۶ سال) می‌باشد. در آزمایش تنش گل‌جالیز، خاک گلدانها قبل از پر شدن، با ۰/۰۶ گرم بذر گل‌جالیز (*Orobanche cernua*) قاطی شد. گیاهچه‌های هر یک از ژنوتیپهای توتون در خزانه تهیه شد و وقتی گیاهچه‌ها از لحاظ ارتفاع به حدود ۱۲ سانتیمتر رسیدند، به گلدانها انتقال یافتند. تمامی عملیات زراعی در طول دوره رشد توتون با توجه به استانداردهای موجود برای توتونهای شرقی انجام گرفت. برگهای ژنوتیپهای توتون در زمان رسیدگی صنعتی برداشت و در مقابل آفتاب خشک شدند. در هر یک از شرایط حضور و عدم حضور انگل گل‌جالیز صفات ارتفاع بوته (سانتیمتر)، تاریخ گلدهی (روز)، تعداد برگ، سطح برگ (سانتیمتر مربع)، وزن تر برگ (گرم)، وزن خشک برگ (عملکرد) (گرم)، وزن تر ریشه (گرم)، وزن خشک ریشه (گرم) و وزن تر و خشک اندام هوایی (گرم) اندازه‌گیری شدند.

شناسایی مکانهای ژنومی کنترل‌کننده صفات کمی مطرح است. با عنایت به اهمیت بسیار زیاد تحقیقات مرتبط با تنش گل‌جالیز و اینکه برای گیاهی مانند توتون که هنوز اطلاعات ژنتیکی چندانی درباره بسیاری از صفات آن وجود ندارد، شناسایی نشانگرهای پیوسته با مکانهای کنترل‌کننده صفات مهم تحت تنش می‌تواند اطلاعات بسیار مفیدی در اختیار محققان ژنتیک و به‌نژادی قرار دهد. در این پژوهش ضمن بررسی ساختار جمعیت بخشی از ژرم-پلاسم توتون شرقی ایران با استفاده از نشانگرهای SSR، نشانگرهای مرتبط با نواحی ژنومی کنترل‌کننده صفات مورفو-فنولوژیک تحت شرایط حضور و عدم حضور انگل گل‌جالیز شناسایی شده است. نشانگرهای شناسایی شده در این تحقیق در صورت تأیید می‌توانند در برنامه به‌نژادی توتون از طریق انتخاب به کمک نشانگر به کار گرفته شوند.

## مواد و روشها

**مواد گیاهی و ارزیابی صفات مورفو- فنولوژیک:** واکنش فنوتیپی ۸۹ ژنوتیپ توتون شرقی (جدول ۱) در دو محیط حضور و عدم حضور انگل گل‌جالیز در قالب طرح پایه بلوکهای کامل تصادفی با سه تکرار طی دو سال متوالی (۱۳۸۶ و ۱۳۸۷) در مرکز تحقیقات توتون ارومیه در شرایط گلدانی ارزیابی شد. فنوتیپ حاصل ژنوتیپ، محیط و اثر متقابل ژنوتیپ در محیط است. با کاربرد طرح آزمایشی و تعداد تکرار مناسب می‌توان اثر محیط را کنترل

جدول ۱- اسامی ژنوتیپهای توتون شرقی مورد استفاده در آزمایش به همراه احتمال تعلق آنها به زیرجمعیت‌های حاصل از تجزیه ساختار جمعیت در نرم

افزار Structure

شماره	نام ژنوتیپ	ماتریس Q		نام ژنوتیپ	شماره	تیپ	ماتریس Q		نام ژنوتیپ	شماره
		زیرجمعیت اول	زیرجمعیت دوم				زیرجمعیت اول	زیرجمعیت دوم		
1	Kharmanli 163	0.83	0.17	Basma 104-1	46	-	0.88	0.12	قرمز	باسما
2	Nevrokop	0.04	0.96	Basma 181-8	47	-	0.38	0.62	سبز	مختلط
3	Trabozan	0.02	0.98	Zichna	48	-	0.98	0.03	سبز	قرمز
4	Krumovgraid	0.28	0.72	Izmir	49	-	0.97	0.04	سبز	قرمز
5	Basma.S.31	0.93	0.07	P.D.324	50	-	0.23	0.77	سبز	RIL

RIL	قرمز	0.02	0.98	P.D.325	51	-	سبز	0.86	0.14	Triumph	6
RIL	مختلط	0.61	0.39	P.D.406	52	-	قرمز	0.15	0.85	Xanthi	7
RIL	قرمز	0.03	0.97	P.D.328	53	باسما	سبز	0.80	0.21	Matianus	8
RIL	قرمز	0.05	0.95	P.D.329	54	-	قرمز	0.28	0.72	Immni 3000	9
RIL	قرمز	0.03	0.97	P.D.336	55	-	مختلط	0.47	0.53	Melkin 261	10
RIL	قرمز	0.03	0.98	P.D.345	56	-	قرمز	0.13	0.87	Tyk-Kula	11
RIL	قرمز	0.02	0.98	P.D.364	57	-	سبز	0.99	0.01	Ss-289-2	12
RIL	قرمز	0.09	0.91	P.D.365	58	-	سبز	0.96	0.04	Ohdaruma	13
RIL	قرمز	0.02	0.98	P.D.371	59	-	مختلط	0.32	0.68	Ploudive 58	14
RIL	قرمز	0.09	0.91	P.D.381	60	-	مختلط	0.53	0.47	Line 20	15
	مختلط چیتی	0.54	0.46	SPT 403	61	-	مختلط	0.58	0.42	T-B-22	16
	مختلط چیتی	0.58	0.42	SPT 405	62	-	سبز	0.76	0.25	Ts 8	17
	سبز چیتی	0.94	0.06	SPT 406	63	-	قرمز	0.29	0.71	Alborz23	18
	قرمز چیتی	0.07	0.93	SPT 408	64	-	مختلط	0.67	0.33	F.K.40-1	19
	مختلط چیتی	0.43	0.57	SPT 409	65	-	مختلط	0.49	0.51	Pz17	20
	سبز چیتی	0.82	0.18	SPT 410	66	-	سبز	0.86	0.14	K.P.Ha	21
	سبز چیتی	0.71	0.29	SPT 412	67	-	سبز	0.92	0.08	K.B	22
	قرمز تنباکو	0.23	0.77	Esfahan5	68	-	سبز	0.70	0.30	G.D.165	23
	سبز چیتی	0.73	0.27	SPT 420	69	-	قرمز	0.06	0.94	H.T.I	24
	مختلط چیتی	0.67	0.33	SPT 430	70	-	قرمز	0.23	0.77	Kramograd N.H.H. 659	25
	مختلط چیتی	0.36	0.64	SPT 432	71	-	مختلط	0.58	0.42	T.K.23	26
	قرمز چیتی	0.20	0.80	SPT 433	72	-	قرمز	0.04	0.96	L 16a	27
	قرمز چیتی	0.10	0.90	SPT 434	73	-	مختلط	0.31	0.69	Izmir 7	28
	قرمز چیتی	0.14	0.86	SPT 436	74	-	مختلط	0.35	0.65	Mutant 3	29
	قرمز چیتی	0.18	0.82	SPT 439	75	-	قرمز	0.11	0.89	Mutant 4	30
	قرمز چیتی	0.13	0.87	SPT 441	76	-	قرمز	0.20	0.80	Pobeda 1	31
	قرمز تنباکو	0.03	0.97	Esfahan2	77	-	مختلط	0.36	0.64	Pobeda 2	32
	مختلط تنباکو	0.33	0.67	SPT 413	78	تنباکو	سبز	0.90	0.10	Rustica	33
	قرمز تنباکو	0.05	0.96	Esfahani	79	سامسون	مختلط	0.37	0.64	Samsun 959	34
	قرمز تنباکو	0.09	0.92	Jahrom14	80	سامسون	قرمز	0.05	0.95	Samsun dere	35
	قرمز تنباکو	0.29	0.71	Borazjan	81	RIL	قرمز	0.06	0.94	OR-205	36
	قرمز	0.03	0.98	L 16b	82	RIL	قرمز	0.03	0.97	OR-345	37
	قرمز تنباکو	0.18	0.82	Balouch	83	RIL	مختلط	0.33	0.67	OR-379	38
	قرمز تنباکو	0.05	0.95	Lengeh	84	تیکلاک	سبز	0.98	0.02	C.H.T.209.12e	39
	قرمز تنباکو	0.04	0.96	Saderati	85	تیکلاک	سبز	0.98	0.02	C.H.T.209.12e×F.K.40-1	40
	قرمز تنباکو	0.08	0.92	Eraghi	86	تیکلاک	سبز	0.95	0.05	C.H.T.266-6	41
	قرمز تنباکو	0.06	0.94	Shahroudi	87	تیکلاک	سبز	0.91	0.09	C.H.T.283-8	42
	سبز	0.82	0.18	T.K.L	88	تیکلاک	سبز	0.94	0.06	C.H.T.273-38	43
	سبز	0.98	0.02	L 17	89	باسما	سبز	0.93	0.07	Basma 12-2	44
						باسما	مختلط	0.46	0.54	Basma 16-10	45

RIL: Recombinant inbred line

توالی و اطلاعات آغازگرها در فایل تکمیلی ۱ ارائه شده است. آغازگرها از بین ۲۷۸ جفت آغازگر SSR موجود در

ارزیابیهای مولکولی: ارزیابی پروفیل مولکولی ژنوتیپهای توتون با ۲۶ جفت آغازگر ریزماهواره (SSR) انجام گرفت.

نقشه پیوستگی توتون (۱۲)، بر مبنای ایجاد پوشش ژنومی مناسب (داشتن نماینده از کروموزوم‌های مختلف) و کیفیت باندهای تکثیر شده در پروسه PCR (باندهای چندشکل با وضوح بالا در روی ژل الکتروفورز)، برای انگشت‌نگاری ژنوم توتونهای شرقی مورد مطالعه انتخاب شدند. نحوه توارث هم‌باز، سطح پلی‌مورفیسم بالا و سادگی کار از دلایل انتخاب این نشانگر برای تهیه پروفیل مولکولی افراد بود (۳۳). جزئیات پروسه استخراج DNA و انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در مقاله Vaghari Azar و همکاران (۴۹) ارایه شده است. یکی از مشکلات نشانگرهای ریزماهواره وجود آلل خنثی در برخی جایگاهها هست. بدین ترتیب که گاهاً در برخی از جایگاهها در یک یا چند فرد تکثیر انجام نمی‌گیرد. مشکل اصلی وجود آلل خنثی در افراد هتروزیگوت هست که به علت عدم تکثیر یکی از آللهای فرد به اشتباه به صورت هوموزیگوت امتیازدهی می‌شود. از آنجا که توتون یک گیاه خودگشن هست و ژنوتیپهای مورد مطالعه لاین خالص هستند چنین مشکلی در مطالعه حاضر دور از انتظار است. همچنین در صورتی که شرایط تکثیر در PCR بهینه نباشد احتمال تکثیر نوارهای غیراختصاصی وجود دارد. با بهینه کردن شرایط تکثیر خصوصاً دما و زمان مرحله اتصال و بسط می‌توان نوارهای غیراختصاصی را حذف کرد که در این کار قبل از شروع کار اصلی تهیه پروفیل مولکولی افراد، اپتیمایز کردن پروتکل PCR انجام گرفت (۴۹).

جمعیت‌های فرضی متناسب می‌شود که در هر زیرجمعیت میزان همگنی (یکنواختی) بیشتر شود (۴۰). مقادیر اولیه K (زیرجمعیت‌های فرضی اولیه) بین یک تا ۱۰ در نظر گرفته شد و جهت افزایش دقت برای هر کدام از زیرجمعیتها پنج تکرار منظور گردید. طول دوره گرم‌کردن (Burn-in) و تعداد تکرار MCMC، ۱۰۰۰۰ در نظر گرفته شد تا نمودار حداکثر درست‌نمایی حاصل شود. نرم‌افزار Structure برای هر مقدار K (تعداد واقعی زیرجمعیتها) یک ماتریس بنام Qst محاسبه می‌کند که شامل ضرایب احتمال عضویت هر ژنوتیپ به هر یک از زیرجمعیتهاست. برای تعیین تعداد بهینه K یا تعداد زیرجمعیتها، از روش Evanno و همکاران (۱۸) استفاده شد. این روش بر پایه آماره  $\Delta K$  است که شیب تابع احتمال را در نقطه‌ای می‌شکند که تعداد K فرضی در آن نقطه دارای حداکثر احتمال باشد. ماتریس روابط خویشاوندی بر اساس داده‌های ریزماهواره و میزان عدم تعادل پیوستگی بین جفت نشانگرهای ریزماهواره با استفاده از نرم‌افزار TASSEL 2.1 محاسبه شد (۱۳). شناسایی ارتباط نشانگر-صفت با مدل خطی مخلوط (MLM) و با در نظر گرفتن ماتریس Q+K (ماتریس ضرایب ساختارجمعیت + ماتریس روابط خویشاوندی؛ جهت جلوگیری از ارتباط کاذب بین نشانگر-صفت) به عنوان کواریت در مدل با نرم‌افزار TASSEL 2.1 انجام گرفت.

## نتایج و بحث

تجزیه‌های آماری: آماره‌های توصیفی شامل مقدار کمینه، بیشینه، میانگین، انحراف معیار و ضریب تغییرات فنوتیپی برای داده‌های حاصل از ارزیابی واکنش ژنوتیپها تحت شرایط حضور و عدم حضور گل‌جالیز در نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ محاسبه شد. بمنظور انجام تجزیه ارتباطی صفات، ابتدا تجزیه ساختار جمعیت و دسته‌بندی دقیق ژنوتیپها به زیرجمعیت‌های مناسب با روش بی‌زین (Bayesian) در نرم‌افزار Structure 3.3.2 انجام گرفت (۳۷). در این روش هر یک از ژنوتیپها با یک احتمال و طوری به زیر

بررسی تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت: مقادیر حداقل، حداکثر، میانگین، انحراف معیار و ضریب تغییرات فنوتیپی صفات مورد مطالعه در ژنوتیپهای توتون تحت شرایط حضور و عدم حضور گل‌جالیز در جدول ۲ ارایه شده است. پارامتر ضریب تغییرات یکی از مهم‌ترین و با ارزش‌ترین شاخصهای برآورد تنوع بوده و مقدار عددی آن معمولاً بین ۰ تا ۱۰۰ درصد تغییر می‌کند. هرچقدر مقدار عددی آن در رابطه با صفتی به ۱۰۰ نزدیکتر باشد نشان می‌دهد جمعیت از لحاظ آن صفت متنوع‌تر هست. حُسن

تغییرات فنوتیپی در دو شرایط حضور و عدم حضور گل-جالیز در وزن خشک برگ و در مرحله بعد در صفات وزن تر برگ و وزن خشک بوته مشاهده شد. اصولاً تنوع زیاد برای یک صفت در مواد اصلاحی موفقیت پروژه‌های اصلاحی را تضمین می‌کند. صفات با ضریب تغییرات پایین از شانس کمتری جهت انتخاب برخوردار هستند (۲۸). با توجه به اینکه برگ خشک در گیاه توتون عملکرد گیاه محسوب می‌شود وجود تنوع گسترده در این صفت حائز اهمیت بوده و می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی مورد استفاده قرار گیرد (۲۴ و ۲۶).

استفاده از این معیار شاخص پراکندگی نسبت به دیگر معیارها این است که با توجه به فرمول آن  $CV = \frac{\sqrt{V_{ph}}}{\bar{X}} \times 100$  این معیار تحت تأثیر واحد اندازه‌گیری صفت و یا دامنه تغییرات آن قرار نمی‌گیرد، بنابراین براحتی می‌توان از آن برای مقایسه میزان تنوع صفات با واحدهای مختلف در یک جمعیت استفاده کرد. در فرمول ضریب تغییرات  $V_{ph}$  واریانس فنوتیپی و  $\bar{X}$  میانگین صفت می‌باشد. با توجه به جدول ۲ مشاهده می‌شود که ژرم‌پلاسم توتون شرقی مورد مطالعه از لحاظ اکثر صفات مورد بررسی از تنوع خوبی برخوردار هستند. بالاترین ضریب

جدول ۲- آماره‌های توصیفی صفات مورد ارزیابی در ژنوتیپهای توتون شرقی تحت شرایط نرمال و تنش گل‌جالیز

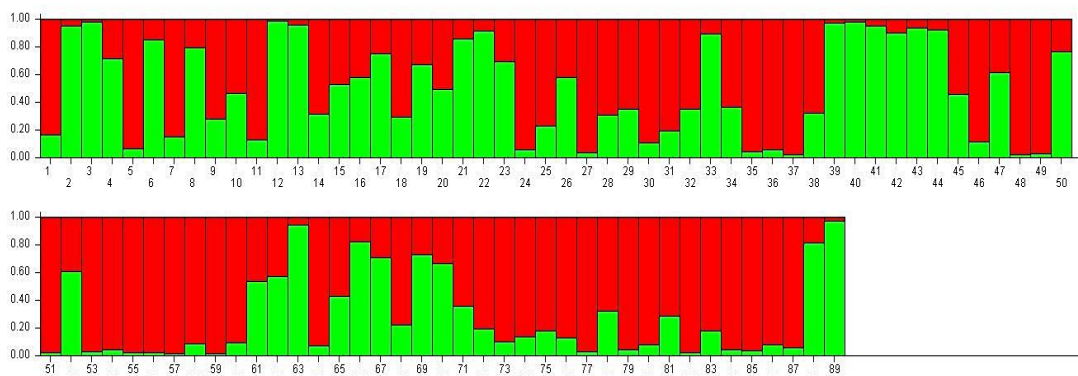
صفت	کمینه		بیشینه		میانگین		انحراف معیار		ضریب تغییرات	
	نرمال	تنش	نرمال	تنش	نرمال	تنش	نرمال	تنش	نرمال	تنش
	گل جالیز	گل جالیز	گل جالیز	گل جالیز	گل جالیز	گل جالیز	گل جالیز	گل جالیز	گل جالیز	گل جالیز
روز تا گلدهی (روز)	40.75	42.33	80.75	78.33	61.21	61.11	8.45	6.96	13.86	11.95
ارتفاع بوته (سانتی‌متر)	25.5	27	112.75	95.67	64.14	57.27	20.26	18.79	31.54	39.98
تعداد برگ	9.5	9	40.75	33	22.54	21.08	7.88	7.37	34.80	34.96
سطح برگ (سانتی‌متر مربع)	148.5	229	4950	4276.17	1810.73	1402.88	1262.44	959.47	69.40	48.29
وزن تر برگ (گرم)	12.08	11.83	180.625	105.75	56.40	45.29	41.69	30.66	72.05	59.32
وزن خشک برگ (گرم)	2.3	3.43	47.48	38.83	14.11	11.47	11.29	9.77	78.53	83.83
وزن تر ریشه (گرم)	9.43	2.07	58.55	48.82	29.54	23.94	13.99	11.68	46.75	48.33
وزن خشک ریشه (گرم)	2.30	1.37	22.93	17.57	9.69	7.41	5.93	4.68	60.40	62.34
وزن تر اندام هوایی (گرم)	17.30	14.07	179.23	118.55	70.08	50.07	40.63	29.68	57.31	42.95
وزن خشک اندام هوایی (گرم)	5.33	4.52	43.85	33.73	17.34	12.48	9.52	8.38	54.09	66.03

و با احتمال بیش از "۷۰ درصد عضویت" ۲۴ فرد متعلق به زیر ساختار دوم (سبز) می‌باشد. در مجموع ۷۵/۲۸ درصد از افراد مورد مطالعه دارای درصد عضویت بیشتر و یا مساوی ۷۰ و حدود ۲۴/۷۲ درصد افراد باقیمانده دارای سهم عضویت کمتر از ۷۰ می‌باشند (شکل ۲). اکثر افراد متعلق به زیر ساختار اول (قرمز) از جمعیت‌های رگه‌های خویش آمیخته‌ی نوترکیب (RILs)، تنباکو و چپق هستند. جمعیت رگه‌های خویش آمیخته از تلاقی دو لاین باسما سرس ۳۱ و Dubec 566 در مرکز تحقیقات توتون ارومیه تولید شده‌اند (مکاتبات شخصی، مرکز تحقیقات توتون

با آغازگرهای SSR مورد مطالعه در مجموع ۶۶ آلل تکثیر شدند. میانگین تعداد آلل تکثیر شده به ازای هر جفت آغازگر ۲/۵۴ بود. در تجزیه ساختار جمعیت مورد مطالعه بر اساس داده‌های حاصل از ۲۶ جفت آغازگر SSR (فایل تکمیلی ۲) با روش بی‌زین دو زیر جمعیت احتمالی ( $K=2$ ) در ژرم‌پلاسم توتون شرقی مورد مطالعه شناسایی شد و  $K=2$  به عنوان  $K$  بهینه در برآورد ماتریس سهم عضویت افراد در هر کلاستر (ماتریس  $Q$ ) تعیین شد. براساس نتایج ارئه شده در باریلات (شکل ۱) با احتمال بیش از "۷۰ درصد عضویت" ۴۳ فرد متعلق به زیر ساختار اول (قرمز)

توتون ارومیه). در پژوهشی که توسط Dadras و همکاران (۱۵) بر روی ۵۰ ژنوتیپ توتون هوا خشک انجام شد جمعیت مورد مطالعه ایشان همچون جمعیت توتونهای شرقی مورد استفاده در مطالعه حاضر، همگن نبوده و ژنوتیپهای هوا خشک در طی تجزیه کلاستر و تجزیه ساختار جمعیت در هشت گروه و سه زیر جمعیت طبقه بندی شدند.

ارومیه). جمعیت چُتُق از توده‌های بومی توتون استان آذربایجان غربی توسط روش گزینش لاین خالص در مرکز تحقیقات توتون ارومیه معرفی شده‌اند (مکاتبات شخصی، مرکز تحقیقات توتون ارومیه). اکثر افراد متعلق به زیر ساختار دوم (سبز) از تیپ تیکلاک هستند. مشخصه بارز تیپ تیکلاک نسبت به بقیه توتونهای شرقی داشتن برگ دمبرگ دار هست (مشاهدات مزرعه‌ای، مرکز تحقیقات



شکل ۱- تجزیه کلاستر مبتنی بر مدل Bayesian ژنوتیپهای توتون شرقی مورد مطالعه براساس نشانگرهای SSR ( $K=2$ ). هر رنگ یک زیرجمعیت یا کلاستر را نشان می‌دهد. اعداد روی محور افقی و عمودی به ترتیب شماره افراد و ضریب تعلق هر فرد به یک کلاستر را نشان می‌دهد.

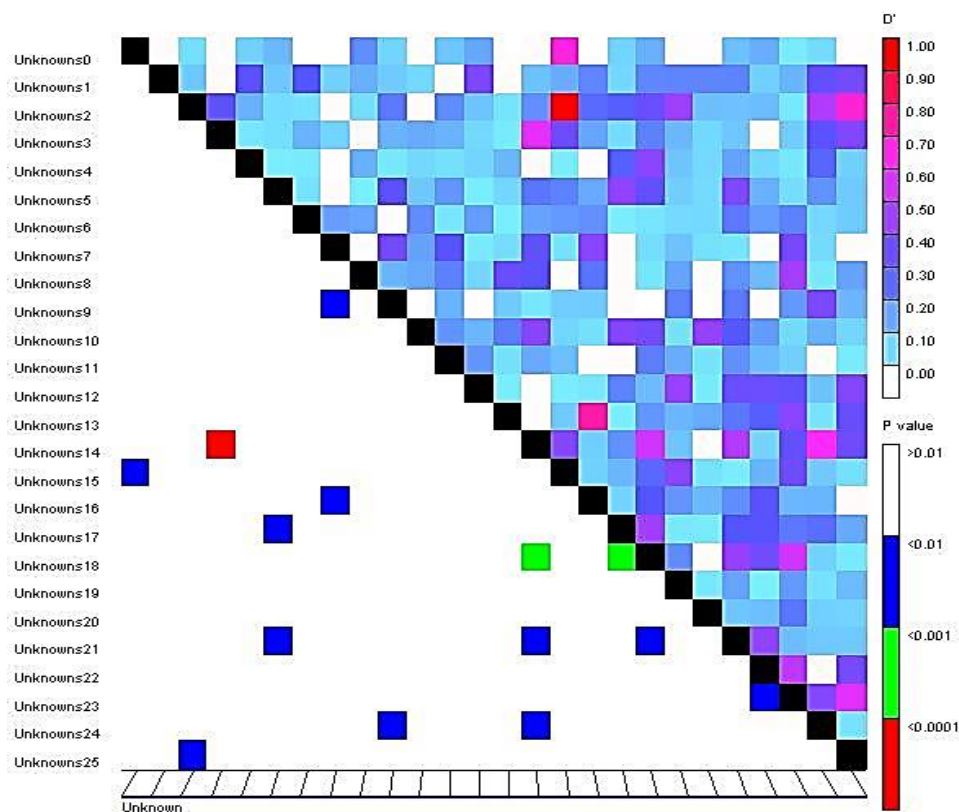
طبیعی، عدم تعادل پیوستگی می‌تواند توسط عوامل دیگری غیر از پیوستگی ژنی مانند ساختار و خویشاوندی افراد در جمعیت، جهش، مهاجرت، گزینش و رانده شدگی ژنتیکی طی دوره تکامل یک جمعیت به وجود آید (۳۶). پیوستگی زیاد بین دو ژن (آلل) باعث ایجاد سطح بالایی از عدم تعادل پیوستگی می‌شود. عواملی مانند جهش جدید، خودگشنی، ساختار جمعیت، روابط خویشاوندی افراد، رانش ژنتیکی و انتخاب (طبیعی، مصنوعی و متعادل کننده) باعث افزایش و عواملی مانند نوترکیبی بالا، نرخ جهش، جهشهای تکراری و دگرگشنی باعث کاهش میزان عدم تعادل پیوستگی می‌شوند (۳۶). انتخاب همزمان بین جایگاههای ژنی در طول برنامه‌های به‌نژادی برای چندین صفت بطور معمول باعث ایجاد عدم تعادل پیوستگی بین جفت نشانگرهای مستقل می‌شود. از نقطه نظر تئوریک، روابط خویشاوندی در جمعیت‌ها باعث ایجاد عدم تعادل پیوستگی بین مکانهای ژنی پیوسته می‌شود. با این حال

**عدم تعادل پیوستگی (LD):** در ژنوتیپهای مورد بررسی مقدار  $D'$  (شاخصی برای سنجش نبود تعادل پیوستگی) بین ۰/۰۱۴ الی یک و مقدار میانگین برابر با ۰/۱۸۸۹ بود. ۹۲/۶۴ درصد از مقادیر  $D'$  بزرگتر از ۰/۱ بود ( $D' \geq 0.1, P \leq 0.01$ ) (شکل ۲). بنابراین تعدادی از جفت مکانها در عدم تعادل پیوستگی هستند. عدم تعادل پیوستگی نشان‌دهنده همبستگی غیرتصادفی آلل‌ها در مکانهای ژنی مختلف روی یک کروموزوم (گروه پیوستگی) یا کروموزومهای مختلف است. عدم تعادل پیوستگی یک پیش نیاز اساسی در تجزیه ارتباطی صفات می‌باشد (۶). درجه و قدرت و وضوح نقشه-یابی به دامنه LD بستگی دارد (۳۹). گستره عدم تعادل پیوستگی در گیاهان، بسته به گونه و نوع جمعیت مورد بررسی، از صدها جفت باز تا صدها جفت کیلو باز مشاهده شده است. در جمعیت‌های مصنوعی اصلاحی، تنها عامل ایجادکننده عدم تعادل، پیوستگی ژنی به علت نزدیکی فیزیکی ژنها بر روی کروموزومها است، ولی در جمعیت‌های



رانش ژنتیکی، نیروهایی هستند که باعث ایجاد عدم تعادل پیوستگی در بین نشانگرهای غیر پیوسته در جمعیت می‌شوند (۳).

وجود یک والد غالب در جمعیت (به طوری که بسیاری از افراد جمعیت به نحوی از این والد مشتق شده‌اند)، ممکن است باعث ایجاد عدم تعادل پیوستگی بین نشانگرهای غیر پیوسته شود. علاوه بر این عوامل، ساختار جمعیت و



شکل ۲- پلات عدم تعادل پیوستگی (LD Plot) بین جفت مکانهای SSR در ژنوتیپهای توتون شرقی با استفاده از نرم‌افزار TASSEL. قسمت بالای قطر نشان‌دهنده عدم تعادل پیوستگی با استفاده از آماره  $D'$  و قسمت پایین قطر P-value برای عدم تعادل پیوستگی بین جفت مکانها را نشان می‌دهد.

تجزیه ارتباطی تحمل به شوری در ژرم پلاسما پنبه گزارش کردند که استفاده از مدل MLM باعث کاهش ارتباطات کاذب نشانگر- صفت می‌شود. همچنین Yu و Buckler (۵۱) در شناسایی نشانگرهای پیوسته با تغییرات فنوتیپی در صفات آگروموفولوژیک ذرت از مدل MLM به منظور بهبود نتایج و کاهش نتایج مثبت دروغین استفاده نمودند و بر اساس اظهار محققین نتایج دقیق‌تری در مقایسه با

تجزیه ارتباط نشانگر-صفات: به طور کلی برای مکان‌یابی ارتباطی دو روش GLM (مدل خطی عمومی) و MLM (مدل خطی مخلوط) پیشنهاد شده است. امروزه روش آماری MLM به دلیل امکان گنجاندن ماتریس ساختار جمعیت و ماتریس خویشاوندی به عنوان کوواریت در مدل جهت جلوگیری از ارتباطات مثبت و دروغین بین نشانگرها و صفات به طور گسترده‌ای برای تجزیه ارتباط در گیاهان استفاده می‌شود (۷). در مطالعه‌ای (۴۳) در



مجموع ۱۶ مکان ژنی مرتبط با صفات مورد ارزیابی شناسایی شد (جدول ۳). از کل مکانهای مرتبط با صفات مورد بررسی (۱۶ مکان)، ۶ و ۱۰ مکان ارتباط معنی‌داری با صفات مورد بررسی به ترتیب تحت شرایط نرمال (عدم حضور گل‌جالیز) و حضور گل‌جالیز نشان دادند. از ۶ مکان مرتبط با صفات تحت شرایط نرمال (عدم حضور گل‌جالیز)، ۱ مکان با صفت تاریخ گلدهی، ۱ مکان با ارتفاع بوته، ۱ مکان با تعداد برگ، ۲ مکان با سطح برگ و ۱ مکان با وزن خشک بوته پیوسته بود (جدول ۳). از ۱۰ مکان مرتبط با صفات تحت شرایط حضور گل‌جالیز، ۱ مکان با ارتفاع بوته، ۱ مکان با تعداد برگ، ۱ مکان با سطح برگ، ۲ مکان با وزن تر ریشه، ۲ مکان با وزن خشک ریشه، ۲ مکان با وزن تر بوته و ۱ مکان با وزن خشک بوته پیوسته بود (جدول ۳).

وجود ارتباط معنی‌دار چند نشانگر با یک صفت مانند ارتباط نشانگرهای Pt30067، Pt30126، Pt30250 با تاریخ گلدهی در شرایط عدم حضور گل‌جالیز در سال اول، ماهیت کمی و چندژنی این صفت را نشان می‌دهد (۹). تعدادی نشانگر مشترک برای صفات مورد مطالعه در این تحقیق شناسایی شدند. به عنوان نمونه ارتباط و پیوستگی نشانگر PT30126 در سال اول و تحت شرایط عدم حضور گل‌جالیز با صفات تاریخ گلدهی و تعداد برگ، نشانگر PT30134 در سال اول و تحت شرایط تنش با صفات وزن تر برگ و تعداد برگ، نشانگر PT30126 در سال دوم و تحت شرایط عدم حضور گل‌جالیز با صفات ارتفاع بوته و وزن تر برگ، نشانگر PT30205 در سال دوم و تحت شرایط عدم حضور گل‌جالیز با صفات وزن تر و خشک بوته، نشانگر PT30134 در سال دوم و تحت شرایط تنش با صفات وزن خشک بوته و تعداد برگ، نشانگر PT30285 در سال دوم و تحت شرایط تنش با صفات وزن تر و خشک برگ، نشانگر PT30061 در مرکب دو سال و تحت شرایط عدم حضور گل‌جالیز با صفات وزن خشک بوته و تعداد برگ، نشانگر PT30046 در مرکب دو سال و تحت

مدل GLM به دست آمد. به نظر می‌رسد مدل MLM برای مکان‌یابی ارتباطی مدل قابل اطمینانی باشد.

در تجزیه ارتباط بر اساس مدل MLM در سال اول در سطح احتمال پنج درصد ( $P < 0.05$ ) در مجموع ۱۲ نشانگر (مکان SSR) مرتبط با صفات مورد ارزیابی شناسایی شد (جدول ۳). از کل مکانهای SSR مرتبط با صفات مورد بررسی، بر اساس مدل MLM (۱۲ مکان)، ۶ و ۶ مکان به ترتیب تحت شرایط نرمال (عدم حضور گل‌جالیز) و حضور گل‌جالیز ارتباط معنی‌داری با صفات مورد بررسی نشان دادند. از ۶ مکان مرتبط با صفات تحت شرایط نرمال (عدم حضور گل‌جالیز) ۳ مکان با صفت تاریخ گلدهی، ۱ مکان با ارتفاع بوته، ۲ مکان با تعداد برگ مرتبط بود. از ۶ مکان مرتبط با صفات تحت شرایط حضور گل‌جالیز، ۱ مکان با تعداد برگ، ۲ مکان با سطح برگ، ۱ مکان با وزن تر برگ، ۱ مکان با وزن تر ریشه و ۱ مکان با وزن خشک بوته پیوسته بود (جدول ۲). در تجزیه ارتباط بر اساس مدل MLM در سال دوم در سطح احتمال پنج درصد ( $P < 0.05$ ) در مجموع ۱۴ نشانگر مرتبط با صفات مورد ارزیابی شناسایی شد (جدول ۳). از ۱۴ مکان، ۷ و ۷ مکان ارتباط معنی‌داری با صفات مورد بررسی به ترتیب تحت شرایط نرمال (عدم حضور گل‌جالیز) و حضور گل‌جالیز نشان دادند. از ۷ مکان مرتبط با صفات تحت شرایط نرمال (عدم حضور گل‌جالیز)، ۲ مکان با ارتفاع بوته، ۲ مکان با سطح برگ، ۱ مکان با وزن تر برگ، ۱ مکان با وزن تر بوته و ۱ مکان با وزن خشک بوته پیوسته بود (جدول ۲). از ۷ مکان مرتبط با صفات تحت شرایط حضور گل‌جالیز، ۱ مکان با صفت تعداد برگ، ۱ مکان با سطح برگ، ۲ مکان با وزن تر برگ، ۱ مکان با وزن خشک برگ و ۲ مکان با وزن خشک بوته پیوسته بود (جدول ۳).

در تجزیه ارتباط بر اساس مدل MLM بر اساس میانگین تکرارها در دو سال برای هر ژنوتیپ در هر یک از شرایط در رابطه با هر صفت در سطح احتمال پنج درصد ( $P < 0.05$ ) در

کمی می‌تواند به فهم کنترل ژنتیکی آنها و توسعه استراتژیهای گزینش به کمک نشانگر کمک نماید (۳۱،۳۰). Dadras و همکاران (۱۵) با استفاده از تجزیه ارتباطی مبتنی بر نبود تعادل پیوستگی در ۵۰ ژنوتیپ توتون هوا خشک، ۹ نشانگر AFLP مرتبط با صفات سطح برگ، ارتفاع گیاه، تعداد برگ، طول و عرض برگ شناسایی کردند. Basirnia و همکاران (۱۱) با ۲۶ نشانگر SSR تجزیه ارتباط به روش MLM برای تجمع کلر در برگ ۷۰ ژنوتیپ توتون شرقی انجام دادند و یک مکان SSR از گروه لینکازی ۱۳ شناسایی کردند که با ژنهای کنترل کننده تجمع پایین کلر در برگ ژنوتیپهای توتون شرقی مرتبط بود. در پژوهشی Hoshyardel و همکاران (۲۶) نقشه پیوستگی برای توتون شرقی با استفاده از جمعیت رگه‌های خویش آمیخته نوترکیب (۱۰۳ لاین) حاصل از تلاقی Basma 31 seres (♀) و SPT406 (♂) و نشانگرهای SSR، JSSR، IRAP و REMAP تهیه کردند و با استفاده از مکان‌یابی فاصله‌ای مکانهای ژنی کنترل کننده تعدادی از صفات زراعی را شناسایی نمودند. در پژوهش دیگری Hoshyardel و همکاران (۲۵) به منظور شناسایی مکانهای ژنی مرتبط با گلدهی در توتون تیپ شرقی، جمعیت ژنتیکی شامل ۱۰۰ فرد F2 حاصل از تلاقی دو ژنوتیپ توتون شرقی SPT 406 (والد پدری) و Basma seres 31 (والد مادری) را برای صفت روز تا شروع گلدهی مورد ارزیابی قرار دادند. در آزمایشات مولکولی نقشه پیوستگی جمعیت F2 با ۲۳ نشانگر SSR و ۲۹ نشانگر ISSR تهیه گردید که ۵۷۰/۸ سانتی‌مورگان 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. تعیین نشانگرهای مرتبط با صفات مهم از طریق تجزیه ارتباط در گونه‌های گیاهی مختلفی از جمله برنج (۴۵)، پنبه (۴)، کتان (۱)، سورگوم (۱۷)، آفتابگردان (۵)، گیاه دارویی گرچک (۲۲)، نخود (۴۲)، یونجه (۲) و انگور (۳۸) نیز انجام شده است. با کاهش هزینه‌های ارزیابی ژنوتیپی با

شرایط تنش با صفات سطح برگ وزن خشک ریشه و وزن تر بوته، نشانگر PT30134 در مرکب دو سال و تحت شرایط تنش با صفات ارتفاع بوته وزن تر ریشه و تعداد برگ، نشانگر PT30061 در مرکب دو سال و تحت شرایط تنش با صفات وزن تر و خشک بوته مشاهده شد.

وجود نشانگرهای مشترک می‌تواند ناشی از اثرات پلیوتروپی و یا پیوستگی نواحی ژنومی دخیل در کنترل مقاومت باشد (۳۲). شناسایی نشانگرهای مشترک اهمیت زیادی در به‌نژادی گیاهان دارد، زیرا گزینش همزمان چند صفت را امکان‌پذیر می‌سازد (۲۳ و ۳۶). وجود چنین حالتی کارایی گزینش براساس نشانگر را بالا برده و موجب می‌شود به دنبال اصلاح یک صفت در یک گیاه، تغییر ارزش در صفات همبسته نیز مشاهده شود (۲۴) و (۲۶).

تعدادی از نشانگرها مشترکاً برای یک صفت در محیطهایی با سطوح مختلف تنش (نرمال و تنش گل‌جالیز) شناسایی شدند. به عنوان نمونه نشانگر PT30126 با صفت وزن تر برگ در سال دوم، نشانگر PT30134 با صفت ارتفاع بوته در مرکب دو سال و نشانگر PT30061 با صفت وزن خشک بوته در مرکب دو سال تحت هر دو شرایط حضور و عدم حضور گل‌جالیز شناسایی شدند. شناسایی چنین نشانگرهایی می‌تواند حاکی از عدم وجود اثر متقابل بین این نشانگرها با محیط باشد (۲۸)؛ بنابراین می‌توان از آنها به عنوان نشانگرهای پیوسته با این صفات و مستقل از محیط در برنامه‌های اصلاح توتون استفاده کرد.

اگرچه شناسایی ژنهای کنترل کننده صفاتی نظیر مقاومت به بیماریهای مختلف در توتون به وفور انجام شده است (۱۰ و ۳۵) ولی در مورد صفات با توارث پیچیده نظیر عملکرد به خصوص تحت تنشهای مختلف گزارشات محدودی وجود دارد. یکی از دلایل مطالعات کم در این زمینه، وجود تنوع کم در داخل گونه *N. tabacum* می‌باشد (۳۱،۳۰)؛ این در حالی است که شناسایی QTLهای کنترل کننده صفات

تراکم بالا و گسترش داده‌های ژنوم مرجع برای بیشتر گیاهان، پیش‌بینی می‌شود که استفاده از تجزیه ارتباطی برای شناسایی مکانهای ژنی کنترل‌کننده صفات کمی بیش از این گسترش یابد (۷).

جدول ۳- نشانگرهای SSR پیوسته با صفات مورفو-فنولوژیک ارزیابی شده در ژنوتیپهای توتون شرقی تحت شرایط نرمال و تنش گل‌جالیز براساس مدل خطی مخلوط (MLM)

صفت	شرایط	سال اول			سال دوم			مرکب دو سال		
		R <sup>2</sup>	P-value	مکان SSR	R <sup>2</sup>	P-value	مکان SSR	R <sup>2</sup>	P-value	مکان SSR
		0.051	0.04	Pt30250	—	—	—	0.127	0.035	Pt30067
	نرمال	0.09	0.035	Pt30126	—	—	—	—	—	—
	روز تا گلدهی (روز)	0.136	0.03	Pt30067	—	—	—	—	—	—
	تنش گل	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	جالیز	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	نرمال	0.092	0.029	Pt30134	0.081	0.048	Pt30134	0.092	0.03	Pt30134
	ارتفاع بوته (سانتی‌متر)	—	—	—	0.080	0.042	Pt30126	—	—	—
	تنش گل	—	—	—	—	—	—	0.091	0.027	Pt30134
	جالیز	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	نرمال	0.077	0.049	Pt30126	—	—	—	0.080	0.043	Pt30061
	تعداد برگ	0.09	0.029	Pt30061	—	—	—	—	—	—
	تنش گل	0.128	0.009	Pt30134	0.08	0.0998	Pt30134	0.127	0.01	Pt30134
	جالیز	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	نرمال	—	—	—	0.146	0.014	Pt30319	0.053	0.047	Pt30250
	سطح برگ (سانتی‌متر مربع)	—	—	—	0.087	0.030	Pt30061	0.143	0.015	Pt30319
	تنش گل	0.105	0.029	Pt30046	0.19	0.015	Pt30046	0.119	0.022	Pt30046
	جالیز	0.054	0.035	Pt30094	—	—	—	—	—	—
	نرمال	—	—	—	0.081	0.039	Pt30126	—	—	—
	وزن تر برگ (گرم)	0.104	0.016	Pt30134	0.23	0.019	Pt30285	—	—	—
	جالیز	—	—	—	0.12	0.026	Pt30126	—	—	—
	نرمال	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	وزن خشک برگ (گرم)	—	—	—	0.28	0.005	Pt30285	—	—	—
	جالیز	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	نرمال	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	وزن تر ریشه (گرم)	0.087	0.031	Pt30134	—	—	—	0.051	0.042	Pt30241
	جالیز	—	—	—	—	—	—	0.088	0.029	Pt30134
	نرمال	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	وزن خشک ریشه (گرم)	—	—	—	—	—	—	0.060	0.037	Pt30292
	جالیز	—	—	—	—	—	—	0.101	0.047	Pt30046
	نرمال	—	—	—	0.134	0.013	Pt30205	—	—	—
	وزن تر اندام هوایی (گرم)	—	—	—	—	—	—	0.130	0.036	Pt30046
	جالیز	—	—	—	—	—	—	0.102	0.020	Pt30061
	نرمال	—	—	—	0.096	0.034	Pt30205	0.089	0.033	Pt30061
	وزن خشک اندام هوایی (گرم)	0.082	0.043	Pt30061	0.099	0.044	Pt30134	0.105	0.019	Pt30061
	جالیز	—	—	—	0.097	0.022	Pt30132	—	—	—

## نتیجه گیری

جالیز) شناسایی شدند. به عنوان نمونه نشانگر PT30134 با صفت ارتفاع بوته در تجزیه مرکب دو سال تحت هر دو شرایط حضور و عدم حضور گل جالیز شناسایی شدند. شناسایی چنین نشانگرهایی می‌تواند حاکی از عدم وجود اثر متقابل بین این نشانگرها با محیط باشد؛ بنابراین می‌توان از آنها به عنوان نشانگرهای پیوسته با این صفات و مستقل از محیط در برنامه‌های اصلاح توتون استفاده کرد. همچنین نتایج نشان داد که برخی از نشانگرها با چندین صفت مرتبط هستند که وجود چنین حالتی در به‌نژادی گیاهی از نظر اصلاح همزمان چندین صفت بسیار حایز اهمیت می‌باشد.

نتایج نشان داد که بین ژنوتیپهای توتون شرقی مورد بررسی از نظر صفات مورفو-فنولوژیکی تحت شرایط نرمال و تنش گل جالیز و همچنین مکانهای ریزماهواره مورد بررسی تنوع بالایی وجود دارد. با مطالعه ساختار جمعیت در ژرم-پلاسم توتون شرقی مورد مطالعه دو زیر جمعیت شناسایی شد. در تجزیه ارتباط بر اساس مدل MLM، در سال اول در مجموع ۱۲ مکان ژنی، در سال دوم ۱۴ نشانگر و در تجزیه مرکب ۲ سال در مجموع ۱۶ مکان ژنی مرتبط با صفات مورد ارزیابی در سطح احتمال پنج درصد ( $P < 0.05$ ) شناسایی شد. تعدادی از نشانگرها مشترکاً برای یک صفت در محیطهایی با سطوح مختلف تنش (نرمال و تنش گل-

## منابع

1. Abbasi Holasou H., Abdollahi Mandoulakani B. and Hassanzadeh Ghorttapeh A. (2019). Association analysis for yield and plant characteristics in Iranian flax genotypes (*Linum usitatissimum* L.) using IRAP and REMAP markers. Journal of Molecular and Cellular Research, [http://cell.ijbio.ir/article\\_1598.html](http://cell.ijbio.ir/article_1598.html).
2. Abdollahi Mandoulakani B. and Azizi H. (2014). Identification of ISSR markers associated with morphological traits in cultivated alfalfa (*Medicago sativa* L.) populations. Journal of Molecular and Cellular Research, 27(2): 260-268.
3. Abdurakhmonov, I.Y., Kohel, R.J., Yu, J.Z., Pepper, A.E., Abdullaev, A.A., Kushanov, F.N., Salakhutdinov, I.B., Buriev, Z.T., Saha, S., Scheffler, B.E. and Jenkins, J.N., (2008). Molecular diversity and association mapping of fiber quality traits in exotic *G. hirsutum* L. germplasm. Genomics, 92(6), 478-487.
4. Abdurakhmonov, I .Y., and Abdurakarimov, A. (2008). Application of association mapping to understanding the genetic diversity of plant germplasm resources. International Journal of Plant Genomics, 2008, 1-18. doi:10.1155/2008/574927.
5. Ahmadpour, S., Sofalian, O., Darvishzadeh, R. and Abbaspour, N. (2018). Preliminary evidence of the associations between DNA markers and morphological characters in sunflower under natural and salt stress conditions. Zemdirbyste-Agriculture, 105(3), 279-286.
6. Al-Maskri, A. Y., Sajjad, M. and Khan, S. H. (2012). Association mapping: a step forward to discovering new alleles for crop improvement. International Journal of Agriculture Biology, 14(1), 153-160. Retrieved from <http://www.fspublishers.org>.
7. Alipour, H. and Darvishzadeh, R. (2019). Association mapping of quantitative traits in molecular cereal breeding. Cereal Research, 9(3), 271-298. doi:10.22124/cr.2019.14333.1518. (In Persian).
8. Arslan, B. and Okumus, A. (2006). Genetic and geographic polymorphism of cultivated tobaccos (*Nicotiana tabacum*) in Turkey. Russian Journal of Genetics, 42(6), 667-671.
9. Azizi, H., Aalami, A., Esfahani, M. and Ebadi, A.A. (2017). Association and structure analysis of some of rice (*Oryza sativa* L.) genetic resources based on microsatellite markers. Cereal Research, 7(1), 1-16.
10. Bai, D., Reeleder, R. and Brandie, J. (1995). Identification of two RAPD markers tightly linked with the *Nicotiana debneyi* gene for resistance to black root rot of tobacco. Theoretical and Applied Genetics, 91(8), 1184-1189.

11. Basirnia, A., Hatami Maleki, H., Darvishzadeh, R. and Ghavami, F. (2014). Mixed linear model association mapping for low chloride accumulation rate in oriental-type tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) germplasm. *Journal of Plant Interactions*, 9(1), 666-672.
12. Bindler, G., Plieske, J., Bakaher, N., Gunduz, I., Ivanov, N., Van der 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(2), 219-230.
13. Bradbury, P.J., Zhang, Z., Kroon, D.E., Casstevens, T.M., Ramdoss, Y. and Buckler, E.S. (2007). TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*, 23(19), 2633-2635.
14. Cai, C., Chai, L., Wang, Y., Xu, F., Zhang, J. and Lin, G. (2009). Construction of genetic linkage map of burley tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) and genetic dissection of partial traits. *Acta Agronomica Sinica*, 35(9), 1646-1654.
15. Dadras, A. R., Sabouri, H., Nejad, G. M., Sabouri, A. and Shoai-Deylami, M. (2014). Association analysis, genetic diversity and structure analysis of tobacco based on AFLP markers. *Molecular Biology Reports*, 41(5), 3317-3329.
16. Darvishzadeh, R., Mirzaei, L., Maleki, H. H., Laurentin, H. and Alavi, S.R. (2013). Genetic variation in oriental tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) by agro-morphological traits and simple sequence repeat markers. *Revista Ciência Agronômica*, 44(2), 347-355.
17. El Mannai, Y., Shehzad, T. and Okuno, K. (2011). Variation in flowering time in sorghum core collection and mapping of QTLs controlling flowering time by association analysis. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 58(7), 983-989.
18. Evanno, G., Regnaut, S. and Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology Notes*, 14(8), 2611-2620.
19. Godwin, I. D., Aitken, E. A. and Smith, L. W. (1997). Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics. *Electrophoresis*, 18(9), 1524-1528.
20. Goldwasser, Y., Eizenberg, H., Hershenhorn, J., Plakhine, D., Blumenfeld, T., Buxbaum, H., Golan, S. and Kleifeld, Y. (2001). Control of *Orobanche aegyptiaca* and *O. ramosa* in potato. *Crop Protection*, 20(5), 403-410.
21. Goldwasser, Y. and Kleifeld, Y. (2004). Recent approaches to Orobanche management. In *Weed Biology and Management* (439-466): Springer.
22. Goodarzi, F., Hassani, A., Darvishzadeh, R. and Hatami, M. H. (2015). Genetic variability and traits association in castor bean (*Ricinus communis* L.). *Genetika*, 47(1), 265-274 .
23. Hittalmani, S., Huang, N., Courtois, B., Venuprasad, R., Zhuang, J.Y., Zheng, K.L., Liu, G.F., Wang, G.C., Sidhu, J.S., Srivantaneeyakul, S., Singh, V.P., Bagali, P.G., Prasanna, H.C., McLaren, G. and Khush, G.S. (2003). Identification of QTL for growth-and grain yield-related traits in rice across nine locations of Asia. *Theoretical and Applied Genetics*, 107(4), 679-690.
24. Hoshiyardeh, F., Darvishzadeh, R., Basirnia, A. and Hatami Maleki, H. (2016a). Association Mapping of Agronomic Traits in Oriental Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Genotypes. *Journal of Crop Breeding*, 8(18), 134-143. (In Persian).
25. Hoshiyardeh, F., Darvishzadeh, R. and Hatami, M. H. (2015). Identification of genetic loci controlling flowering time in oriental type tobacco. *Journal of Molecular and Cellular Research (Iranian Journal of Biology)*, 28(3), 438-447. (In Persian).
26. Hoshiyardeh, F., Darvishzadeh, R. and Hatami Maleki H. (2016b). Developing genetic linkage map and identification of quantitative trait loci controlling agro-chemical traits in oriental type tobacco. *Journal of Crop Biotechnology*, 5(14), 61-72.
27. Hosseinzadeh Colagar, A., Yusefi, M., Zarei, M. and Yosefzadeh, H. (2013). Assessment of genetic diversity of *Tilia rubra* DC. by RAPD analysis in the Hyrcanaian forests, North of Iran. *Polish Journal of Ecology*, 62(2), 341-348.
28. Jannatdoust, M., Darvishzadeh, R., Azizi, H., Ebrahimi, M. A., Ziaiefard, R. and Gholinezhad, E. (2017). Identification of Retrotransposon Markers Associated with Agromorphological Traits in Confectionery Sunflower (*Helianthus annuus* L.) under Normal and Drought Stress Conditions. *Journal of Crop Breeding*, 8(20), 183-197. (In Persian).

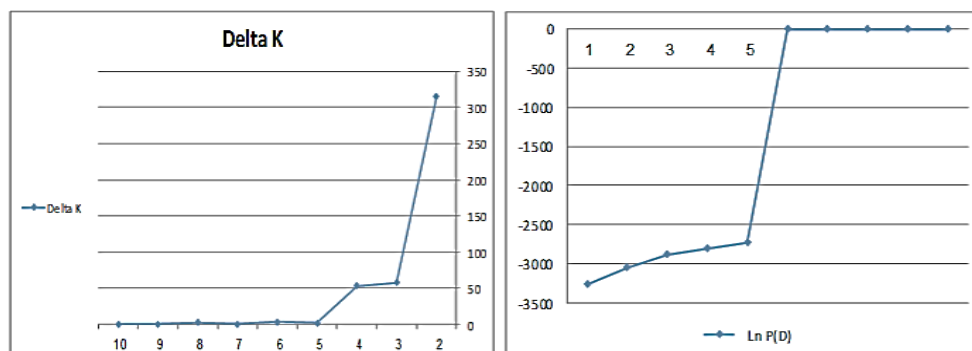
29. Joel, D. M. (2000). The long-term approach to parasitic weeds control: manipulation of specific developmental mechanisms of the parasite. *Crop Protection*, 19(8-10):753-758.
30. Julio, E., Denoyes-Rothan, B., Verrier, J.-L. and De Borne, F. D. (2006a). Detection of QTLs linked to leaf and smoke properties in *Nicotiana tabacum* based on a study of 114 recombinant inbred lines. *Molecular Breeding*, 18(1), 69-91.
31. Julio, E., Verrier, J. L., & Dorlhac de Borne, F. (2006b). Development of SCAR markers linked to three disease resistances based on AFLP within *Nicotiana tabacum* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 112, 335-346.
32. Jun, T.-H., Van, K., Kim, M. Y., Lee, S.-H. and Walker, D. R. (2008). Association analysis using SSR markers to find QTL for seed protein content in soybean. *Euphytica*, 162(2), 179-191.
33. Kalia, R. K., Rai, M. K., Kalia, S., Singh, R. and Dhawan, A. (2011). Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, 177(3), 309-334.
34. Nazarzadeh, Z., Onori, H. and Akrami, S. (2020). Genetic diversity of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes using RAPD and ISSR molecular markers. *Journal of Genetic Resources*, 6 (1), 69-76.
35. 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(4), 765-770.
36. Oraguzie, N. C., Gardiner, S. E., Rikkerink, E. H. and Silva, H. N. (2007). Association mapping in plants: New York: Springer.
37. Pritchard, J. K., Stephens, M., Rosenberg, N. A. and Donnelly, P. (2000). Association mapping in structured populations. *The American Journal of Human Genetics*, 67(1), 170-181.
38. Razi, M., Darvishzadeh, R., Amiri, M. E., Doulati-Banehd, H. and Martínez-Gómez, P. (2019). Molecular characterization of a diverse Iranian table grapevine germplasm using REMAP markers: population structure, linkage disequilibrium and association mapping of berry yield and quality traits. *Biologia*, 74(2), 173-185.
39. Remington, D.L., Thornsberry, J.M., Matsuoka, Y., Wilson, L.M., Whitt, S.R., Doebley, J., Kresovich, S., Goodman, M.M. and Buckler, E.S. (2001). Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(20), 11479-11484.
40. Rezaeizad, A., Wittkop, B., Snowdon, R., Hasan, M., Mohammadi, V., Zali, A., & Friedt, W. (2011). Identification of QTLs for phenolic compounds in oilseed rape (*Brassica napus* L.) by association mapping using SSR markers. *Euphytica*, 177(3), 335-342.
41. Rubiales, D., Alcántara, C. and Sillero, J. (2004). Variation in resistance to *Orobanche crenata* in species of *Cicer*. *Weed Research*, 44(1), 27-32.
42. Saeed, A. and Darvishzadeh, R. (2017). Association analysis of biotic and abiotic stresses resistance in chickpea (*Cicer spp.*) using AFLP markers. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31(4), 698-708.
43. Saeed, M., Wangzhen, G. and Tianzhen, Z. (2014). Association mapping for salinity tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) germplasm from US and diverse regions of China. *Australian Journal of Crop Science*, 8(3), 338-346.
44. Shazdehahmadi, M. and Kharrazi, M. (2016). Application of ISSR Molecular markers for genetic diversity study of some tobacco genotypes. *Journal of Plant Genetic Research*, 2(2), 33-46. (In Persian).
45. Shirmohammadli, S., Sabouri, H., Ahangar, L., Ebadi, A.A. and Sajjadi, S.J. (2018). Genetic diversity and association analysis of rice genotypes for grain physical quality using iPBS, IRAP, and ISSR markers. *Journal of Genetic Resources*, 4 (2), 122-129.
46. Slavov, S., Valkov, V., Batchvarova, R., Atanassova, S., Alexandrova, M., & Atanassov, A. (2005). Chlorsulfuron resistant transgenic tobacco as a tool for broomrape control. *Transgenic Research*, 14(3), 273-278.
47. Tanksley, S.D., Ganai, M.W., Prince, J.P., De Vicente, M.C., Bonierbale, M.W., Broun, P., Fulton, T.M., Giovannoni, J.J., Grandillo, S. and Martin, G.B. (1992). High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics*, 132(4), 1141-1160.
48. 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(2), 335-339.



49. Vaghari, A. E., Hatami, M. H., Basirnia, A., Ahmadi, D. and Darvishzadeh, R. (2015). Evaluation of genetic variation in some iranian oriental and semi oriental tobacco germplams by using simple sequence repeat markers. *Modern Genetics Journal*, 9(4), 517-523.
50. Yousefzadeh, H., Khodadost, A., Amirchakhmaghi, N., Abdollahi, H. and Hosseinzadeh Colagar, A. (2017). Genetic diversity of *Malus orientalis* in Hyrcanian forest using ISSR-PCR markers. *Journal of Molecular and Cellular Research (Iranian Journal of Biology)*, 29(4), 384-392.
51. Yu, J. and Buckler, E. S. (2006). Genetic association mapping and genome organization of maize. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(2), 155-160.

فایل تکمیلی ۱- نام و توالی آغازگرهای ریزماهوره مورد استفاده در این پژوهش

No.	Primer	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')	Repeat motif
1	PT30014	TGCCGTGTAATTTTCATTTGG	AGGATTCCTAACGTGTATTATGTTCT	TA
2	PT30172	AAACAACGTCGAAGCATTG	ACGCATGAAATTGTAAGGGC	GAA
3	PT30202	TCGAAACCTCGAGGACAGTT	TATCCAAATCTCCAAAGCCC	GA
4	PT30250	GAACACACGTTTCGTCATTGG	ATAAGTCCCTTTAATTTAATTGCG	TAG
5	PT30165	ACCTCTGTGGCCGTAAGCTA	CCTCTACTTCAACAGGGTAAGAAA	TAA
6	PT30241	AAGTCTCGTGTGGTTGCTTT	AAAGGGCAATGTGTCTAGCTC	GA
7	PT30027	CCGAGAGTTGCATTTGAATTT	AGGGTTCTACGCAAGAGATTG	TA
8	PT30021	CATTTGAACATGGTTGGCTG	CTCAACTCTCGTCGCTCTTG	TA
9	Pt30134			
10	PT20343	GGAACACCACCACCATAA	GGAGCTCAGGTTCCAATG	AC/AG/AT
11	PT30285	CATCATGGCAAGTCACCATC	TGCTGGAAATTAGCGAGGTT	TA
12	PT30126	GTGATTCACGCGGAAGACAT	TTCGAAATAAGTACCTAGAGTCCG	TA
13	PT30008	CGTTGCTTAGTCTCGCACTG	GGTTGATCCGACACTATTACGA	TA
14	PT30292	AAGACAGATTGGTGCGGAAC	AGCACTTGGACAGGCGAATA	TA
15	PT30319	ACAACAACACTACGTTAGTGTGAGAAA	TCATGTGTGCCAAGCTCTTC	TA
16	PT30324	TGCTCTGCGTTAGAACAGGA	CGACGAGAGAAGATTAGTGAAGA	TAA
17	PT30046	GATAGGTAGATTATCCTCTGCAACA	GGTGCTAGCAACATCATCAA	TA
18	PT30061	TCGTCCATTTCTTCTCTCTCA	CATAAATAGTTGCTCATTCAATCG	TA
19	PT30067	AAGCCTGGTCAGTTATCCCA	ATTCGCACCACTTAATCCCA	TA
20	PT30075	CGATCGGGTCGTTACACAAT	CCCATCAGGTTGTTGGGTTA	TA
21	PT30094	AACAAGAACGACGGTTACGC	GGGTCATGCGTTCGAATTAT	TA
22	PT30110	TTGTACGTTCTCGCTGATG	GGCCGACAATAAAGTGCGT	TA
23	PT30132	CCTAACAGCATTTGCTACCCA	GATGGACAAGAGTGGCCTT	TA
24	PT30159	GCATGCATATGAACATGGGA	TTTGACATCTCTACTCTCCGTTT	TA
25	PT30205	GGTGCATCCACAATTTAAACG	GCACTTGCTCCTTTGTACCC	TA
26	PT30260	GGTAGGGTGGAAACAAATTTATCA	AATATGGTCTATGCCCGCAA	TA



فایل تکمیلی ۲- نمودار دو سویه برای تعیین تعداد مناسب زیر جمعیت در ژنوتیپ‌های توتون شرقی مورد مطالعه ( $K=2$ ) براساس نشانگرهای SSR

با استفاده از نرم‌افزار Structure

# Association analysis of morpho-phenological traits in oriental tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) with SSR markers under presence and absence of orobanche conditions

Tahmasbali M.<sup>1</sup>, Darvishzadeh R.<sup>1,2\*</sup> and Fayaz Moghaddam A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran.

<sup>2</sup> Dept. of Plant Production and Genetics, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia, I.R. of Iran.

## Abstract

Identification of genetic loci controlling quantitative trait is an important subject in genetics and breeding programs, particularly under stress conditions. Broomrape is a holoparasitic weed in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) fields with devastating effects on its dry leaf yield production. In the present study, the reaction of 89 tobacco genotypes was evaluated against broomrape (*Orobanche aegyptiaca*) in randomized complete block design with three replications during two successive years in pot conditions. In each year, the genotypes were planted separately in non-inoculated and inoculated conditions. In broomrape conditions the soil was mixed with 0.06 g of broomrape seed. In the molecular experiment, 26 SSR primers pairs was used for preparing the molecular profile of genotypes. Studying population structure as a prerequisite for association analysis with bayesian method revealed that there are two possible subgroups (K=2) in the studied population. Based on D' statistics, 4.31% of possible SSR locus pairs showed significant level of linkage disequilibrium (P<0.01). In association analysis by MLM method, based on the average of 2 years' data, a total of 16 loci were identified to be significantly (P <0.05) associated with the evaluated traits. Some common markers were identified for a particular trait across normal and broomrape conditions. These markers show low interaction with environmental conditions (stable markers); therefore, selection by them for a trait under normal conditions will improve the trait value under stress conditions, too. The results of the current study provide valuable information on the marker aided selection and the genetic basis of studied traits. This information can be used in selecting individuals during tobacco breeding programs and developing varieties with high yield and performance.

**Keywords:** Association mapping, breeding for resistance to biotic stress, broomrape, linkage disequilibrium, molecular markers, tobacco.