دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

نقشه‌یابی ارتباطی صفات زراعی در توتون‌های شرقی (*Nicotiana tabacum* L.)

فرامرز هوشیاردل[۱]، رضا درویش زاده[۲]، اشکان بصیرنیا[۳] و حمید حاتمی ملکی[۴]

۱ و ۳- دانشجوی کارشناسی ارشد و کارشناس ارشد، دانشگاه ارومیه
۲- استاد، دانشگاه ارومیه (نویسنده مسوول: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir)
۴- استادیار، دانشگاه مراغه

تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۳/۸/۴

چکیده

توتون (*Nicotiana tabacum* L.) یکی از محصولات با ارزش کشاورزی و صنعتی است. مطالعه اکثر صفات مهم در توتون، به دلیل ماهیت کمّی، کنترل چندژنی و تاثیرپذیری از عوامل محیطی دشوار است. در میان روش‌های مختلف مطالعه صفات کمی، نقشه‌یابی ارتباطی به واسطه استفاده از اطلاعات فنوتیپی و نشانگرهای مولکولی DNA، از جمله کاراترین روش‌ها برای این منظور است. در این تحقیق، ارزیابی فنوتیپی ۱۰۰ ژنوتیپ توتون شرقی در قالب طرح لاتیس ساده ۱۰ × ۱۰ با دو تکرار در مزرعه تحقیقاتی مرکز تحقیقات توتون ارومیه انجام گرفت. صفات مختلف زراعی شامل ارتفاع بوته (PH)، قطر ساقه (SD)، تعداد روز تا ۵۰ درصد گل‌دهی (D50F)، تعداد برگ (LN)، طول برگ (LL)، عرض برگ (LW)، عملکرد برگ تر در کرت (FLYP) و عملکرد برگ خشک در کرت (DLYP) اندازه‌گیری شدند. انگشت‌نگاری ۹۰ ژنوتیپ از ۱۰۰ ژنوتیپ با استفاده از ۲۶ جفت آغازگر ریزماهواره انجام گرفت. بررسی ساختار جمعیت ژرم‌پلاسم‌های مورد مطالعه با استفاده از نرم‌افزار Structure آن‌ها را به سه زیر مجموعه تقسیم کرد. فقدان تعادل پیوستگی ژنی و تجزیه ارتباط بین نشان‌گر و صفات مورد مطالعه با استفاده از نرم‌افزار TASSEL 2.1 انجام شد. نتایج مربوط به شاخص‌های فقدان تعادل پیوستگی ژنی نشان داد که ارزش r^2 بین ۰/۰۰۰۰۱ الی ۰/۲۶۷ با میانگین R^2 برابر با ۰/۰۲۷ و همچنین مقدار D´ بین ۰/۰۰۶۵ الی ۱ با میانگین ۰/۲۴۲ بوده است. با استفاده از مکان‌یابی ارتباطی براساس مدل GLM و MLM به‌ترتیب ۱۶ و ۱۰ نشان گر شناسایی گردید که ارتباط معنی‌دار با عوامل کنترل‌کننده صفات زراعی داشتند. در این مطالعه نشان گر PT30159 با صفات تعداد برگ، ارتفاع بوته و تعداد روز تا ۵۰ درصد گلدهی و نشانگر PT30046 با صفات طول برگ و قطر ساقه و نشانگر PT30292 با صفات قطر ساقه و تعداد روز تا ۵۰ درصد گلدهی پیوستگی داشته و هم‌مکان بودند. وجود نشانگرهای هم‌مکان در به‌نژادی گیاهی موثر می‌باشد.

واژه های کلیدی: تجزیه ارتباط، توتون، فقدان تعادل لینکاژی، صفات زراعی، نشانگر ریزماهواره

مقدمه

جنس Nicotiana از خانواده Solanaceae شامل ۶۴ گونه است که بعضی از این گونه‌ها به‌صورت گیاه دارویی و زینتی کشت می‌شوند (۳۲). توتون (*Nicotiana tabacum* L.) یکی از محصولات با ارزش کشاورزی و صنعتی است که در شرایط مختلف آب و هوایی در بیش از صد کشور دنیا کشت می‌شود (۲). در ایران توتون جز مهم‌ترین گیاهان صنعتی بوده و سطح زیر کشت آن بیش از شش هزار هکتار و تولید سالانه آن نزدیک به ده هزار تن می‌باشد (مکاتبات شخصی با مرکز تحقیقات توتون ارومیه). توتون‌های شرقی یک گروه از واریته‌های آفتاب خشک می‌باشند که از نظر صفاتی از قبیل داشتن برگ‌های کوچک، بافت ظریف، دود ملایم و عطر نافذ از دیگر گروه‌ها جدا بوده و از اجزای اصلی سازنده خرمن سیگارت‌ها می‌باشند (۱۰).

اغلب صفات مهم زراعی به صورت کمّی هستند. به دلیل پلی‌ژنیک بودن و تاثیرپذیری زیاد این گونه صفات از عوامل محیطی، تجزیه صفات کمی همواره با چالش روبه رو بوده است (۲۲). با توسعه نشان گرهای مولکولی DNA تحول بزرگی در روش‌های کلاسیک اصلاح نباتات به وجود آمده است. در اصلاح نباتات مدرن می‌توان با استفاده از روش‌های ژنتیکی و آماری مناسب، نشانگرهای مولکولی مرتبط با صفات کمّی را شناسایی نموده و در پروژه‌های به نژادی، گزینش افراد در جمعیت‌های در حال تفرق را با کمک نشانگرها انجام داد. از بین انواع مختلف نشانگرهای DNA، نشانگرهای ریزماهواره یا SSR (توالی تکراری ساده) به‌دلیل میزان بالای چندشکلی، توزیع تصادفی در ژنوم و توارث همبارز، از برترین و قابل اعتمادترین نشانگرها برای مطالعات ژنتیکی می‌باشند (۱۸).

از روش‌های شناسایی نشانگرهای مولکولی مرتبط با صفات کمّی می‌توان به نقشه‌یابی QTL (QTL mapping) اشاره کرد که نیازمند توسعه جمعیت نقشه از قبیل F_2، بک‌کراس و یا لاین‌های اینبرد نوترکیب (RILs) می‌باشد. روش دیگر برای مطالعه صفات کمّی روش نقشه‌یابی ارتباطی (Association mapping) است که در سال‌های اخیر به طور گسترده در جمعیت‌های گیاهی استفاده می‌شود (۳). از این روش برای اولین بار در مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده بیماری‌ها در انسان استفاده شده است. در این روش مجموعه بزرگی از افراد یک جمعیت به طور تصادفی جمع‌آوری شده و براساس نبود تعادل پیوستگی نقشه‌یابی انجام می‌گیرد (۳). از جمله مزایای این روش استفاده از تنوع موجود در جمعیت

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.18.16.9]
[DOI: 10.29252/jcb.8.18.134]

طبیعی می‌باشد و در مقایسه با جمعیت‌های حاصل از تلاقی دو والدی تنوع ژنتیکی گسترده‌تری مورد بررسی قرار می‌گیرد (۲۶،۳). نقشه‌یابی ارتباطی در مقایسه با نقشه‌یابی پیوستگی به مراتب دقیق‌تر است زیرا از تمام رویدادهای میوزی انباشته شده در طول تاریخچه تکاملی گیاه استفاده می‌نماید (۲۶).

تعیین نشانگرهای مرتبط با صفات مهم با استفاده از تجزیه ارتباط در چندین گونه گیاهی از جمله پنبه (۱)، سورگم (۲۷،۲۱)، آفتابگردان (۱۵)، ذرت (۲۸)، جو (۲۶،۱۹،۳)، گندم هگزاپلوئید (۷)، نخود (۲۵) و توتون (۹،۴) انجام گرفته است. در توتون، بصیرنیا و همکاران (۴) با استفاده از نقشه‌یابی ارتباطی یک نشانگر SSR پیوسته با صفت تجمع کلر در برگ را شناسایی نمودند که در گروه پیوستگی ۱۳ نقشه مرجع قرار داشت. همچنین دادرس و همکاران (۹) نه نشانگر AFLP مرتبط با هفت صفت مهم زراعی در توتون‌های هواخشک را شناسایی نمودند. در مطالعه حاضر ابتدا ساختار جمعیت توتون‌های شرقی با استفاده از نشانگرهای SSR بررسی و سپس از طریق نقشه‌یابی ارتباطی، نشانگرهای مرتبط با نواحی ژنومی کنترل‌کننده صفات زراعی شناسایی گردید.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و داده‌های فنوتیپی

در این مطالعه، ۱۰۰ ژنوتیپ توتون شرقی (جدول ۱) در قالب طرح لاتیس ساده ۱۰ × ۱۰ با دو تکرار در مزرعه تحقیقاتی مرکز تحقیقات توتون ارومیه مورد ارزیابی قرار گرفتند. هر کرت زراعی شامل پنج خط به طول پنج متر بود. فاصله خطوط ۶۵ سانتی‌متر و فاصله بوته‌ها در روی ردیف ۲۰ سانتی‌متر (تراکم حدوداً هشت هزار بوته در هکتار) در نظر گرفته شد. کلیه عملیات زراعی مطابق با توصیه‌های مرکز تحقیقات توتون ارومیه در رابطه با کشت و عمل‌آوری توتون‌های شرقی انجام گرفت. صفات مختلف زراعی شامل ارتفاع بوته (PH)، قطر ساقه (SD)، تعداد روز تا ۵۰ درصد گلدهی (C50F)، تعداد برگ (NL)، طول برگ (LL) و عرض برگ (LW) از طریق انتخاب پنج بوته تصادفی از گیاهان رقابت‌کننده در هر کرت و بعد از مرحله گلدهی اندازه‌گیری شدند. عملکرد برگ تر (FLYP) و برگ خشک (DLYP) در هر واحد آزمایشی با حذف اثر حاشیه اندازه‌گیری شدند.

جدول ۱- ژنوتیپ‌های توتون شرقی مورد مطالعه

Table 1. Studied oriental-type tobacco genotypes

Genotype name	Code	Genotype name	Code	Genotype name	Code
SPT 403	G63	Pobeda 1	G31	Kharmanli 163	G01
SPT 405	G64	Pobeda 2	G32	Nevrokop	G02
SPT 406	G65	Rustica	G33	Trabozan	G03
SPT 408	G66	Samsun 959	G35	Krumovgraid	G04
SPT 409	G67	Samsun dere	G36	Basma S. 31	G05
SPT 410	G68	OR-205	G38	Triumph	G06
SPT 412	G69	OR-345	G39	Xanthi	G07
Esfahani5	G70	OR-379	G40	Matianus	G08
SPT 420	G71	C.H.T.209.12e	G41	Immni 3000	G09
SPT 430	G72	C.H.T.209.12e×F.K.40-1	G42	Melkin 261	G10
SPT 432	G73	C.H.T.266-6	G43	Tyk-Kula	G11
SPT 433	G74	C.H.T.283-8	G44	Ss-289-2	G12
SPT 434	G75	C.H.T.273-38	G45	Ohdaruma	G13
SPT 436	G76	Basma 12-2	G46	Ploudive 58	G14
SPT 439	G77	Basma 16-10	G47	Line 20	G15
SPT 441	G78	Basma 104-1	G48	T-B-22	G16
Esfahani2	G79	Basma 181-8	G49	Ts 8	G17
SPT 413	G80	Zichna	G50	Alborz23	G18
Esfahani	G81	Izmir	G51	F.K.40-1	G19
Jahrom14	G82	P.D.324	G52	Pz17	G20
Borazjan	G83	P.D.325	G53	K.P.Ha	G21
L 16	G84	P.D.406	G54	K.B	G22
Balouch	G85	P.D.328	G55	G.D.165	G23
Lengeh	G86	P.D.329	G56	H.T.I	G24
Saderati	G87	P.D.336	G57	Kramograd N.H.H. 659	G25
Eraghi	G88	P.D.345	G58	T.K.23	G26
Shahroudi	G89	P.D.364	G59	Samsun katerini	G27
T.K.L	G90	P.D.365	G60	Izmir 7	G28
L 17	G91	P.D.371	G61	Mutant 3	G29
C.H.T.269-12e	G92	P.D.381	G62	Mutant 4	G30

داده‌های ژنتیکی

استخراج DNA از نمونه برگ ۹۰ ژنوتیپ از ۱۰۰ ژنوتیپ توتون مورد مطالعه، با استفاده از روش Doyle و Doyle (۱۲) انجام گرفت. میزان خلوص و غلظت DNA استخراجی با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۲۶۰ نانومتر تعیین شد (BioPhotometer 6131; Eppendorf, Hamburg, Germany). کیفیت DNA با استفاده از الکتروفورز با ژل آگارز ۱٪ بررسی شد. از مجموعه ریزماهواره‌های موجود در پایگاه داده توتون (۶،۵)، ۲۶ جفت آغازگر برای انگشت‌نگاری توتون انتخاب شدند (جدول ۲). نشانگرهای انتخابی علاوه بر تولید باندهای چندشکل با وضوح بالا، دارای پوشش ژنومی مناسب از ژنوم توتون (۶) بودند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۵۰mM) (BioFluxbiotech: http://biofluxbiotech.com)، ۰/۷ میکرولیتر $MgCl_2$ (۱۰mM) (CinnaGen, Tehran, Iran)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰X)، ۱ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرها، ۰/۳ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase (CinnaGen Inc., Tehran, Iran)، ۱۴ میکرولیتر آب دوبار تقطیر شده و ۲۵ نانوگرم DNA پایه با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر ۹۶ پایه Master cycler gradient Eppendorf (Type 5331, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) انجام گرفت.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.18.16.9]
[DOI: 10.29252/jcb.8.18.134]

الگوی دمایی مورد استفاده در واکنش PCR عبارت بود از یک چرخه 94°C به مدت ۴ دقیقه برای شروع واسرشت سازی DNA، ۳۶ چرخه شامل ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال ۵۵°C به مدت ۹۰ ثانیه و دمای گسترش ۷۲C° به مدت ۹۰ ثانیه و در انتها یک چرخه ۷۲C° به مدت ۱۰ دقیقه برای بسط نهایی. برای الکتروفورز محصولات حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و جداسازی محصولات PCR از ژل آگارز سه درصد در بافر TBE 0.5X استفاده شد. رنگ‌آمیزی قطعات حاصل از تکثیر با استفاده از محلول اتیدیوم بروماید یک میکروگرم بر میلی‌لیتر صورت گرفت و تصویربرداری از قطعات با استفاده از دستگاه ژل داکیومنتیشن (Gel Logic 212 PRO, USA) زیر نور فرابنفش انجام شد.

جدول ۲- مشخصات نشانگرهای ریزماهواره مورد استفاده برای انگشت نگاری ژنوتیپ‌های توتون
Table 2. Characteristics of microsatellite markers used for DNA fingerprinting of oriental-type tobacco genotypes

Repeated motif	Reverse (5′→3′)	Forward (5′→3′)	Primer	Repeated motif	Reverse (5′→3′)	Forward (5′→3′)	Primer name
TA	AGCACTTGGACAGGC GAATA	AAGACAGATTGGTGCG GAAC	PT3029 2	TA	AGGATTCCTAACGTGTAT TATGTTCT	TGCCGTGTAAATTTC ATTTGG	PT30014
TA	TCATGTGTGCCAAGCT CTTC	ACAACAACTACGTTAG TGTGAGAAA	PT3031 9	GAA	ACGCATGAAATTGTAAGG GC	AAACAACGTCGAAGC ATTTG	PT30172
TAA	CGACGAGAGAAGATT AGTGAAAGA	TGCTCTGCGTTAGAACA GGA	PT3032 4	GA	TATCCAAATCTCCAAAGC CC	TCGAAACCTCGAGGA CAGTT	PT30202
TA	GGTGCTAGCAACATCA TCAAA	GATAGGTAGATTATCCT CTGCAACA	PT3004 6	TAG	ATAAGTCCCTTTAATTTA ATTGCG	GAACACACGTTCGTC ATTGG	PT30250
TA	CATAAATAGTTGCTCA TTCAATCG	TCGTCCATTTCTTTCTC TCTCA	PT3006 1	TAA	CCTCTACTTCAACAGGGT AAGAAA	ACCTCTGTGGCCGTA AGCTA	PT30165
TA	ATTCGCACCACTTAAT CCCA	AAGCCTGGTCAGTTATC CCA	PT3006 7	GA	AAAGGGCAATGTGTCTAG CTC	AAGTCTCGTGTGGTT GCTTT	PT30241
TA	CCCATCAGGTTGTTGG GTTA	CGATCGGGTCGTTACA CAAT	PT3007 5	TA	AGGGTTCTACGCAAGAGA TTG	CCGAGAGTTGCATTT GAATTT	PT30027
TA	GGGTCATGCGTTCGAA TTAT	AACAAGAACGACGGTT ACGC	PT3009 4	TA	CTCAACTCTCGTCGCTCTT G	CATTTGAACATGGTT GGCTG	PT30021
TA	GGCCGACAATAAAGT GGCT	TTGTACGTTCCTCGCTG ATG	PT3011 0		TGGAAACAAAGCCATTAC CC	GACGAAACTGAGGAT ATTCCAAA	PT30034
TA	GATGGACAAGAGTGG CCTTT	CCTAACAGCATTTGCTA CCCA	PT3013 2	AC/AG/AT	GGAGCTCAGGTTCCAATG	GGAACACCACCACCA TAA	PT20343
TA	TTTGACATCTCTACTC TTCCGTTT	GCATGCATATGAACAT GGGA	PT3015 9	TA	TGCTGGAAATTAGCGAGG TT	CATCATGGCAAGTCA CCATC	PT30285
TA	GCACTTGCTCCTTTGT ACCC	GGTCGATCCACAATTTA AACG	PT3020 5	TA	TTCGAAATAAGTACCTAG AGTCGG	GTGATTCCAGCGGAA GACAT	PT30126
TA	AATATGGTCTATGCCC GCAA	GGTAGGGTGGAACAAA TTTATCA	PT3026 0	TA	GGTTGATCCGACACTATT ACGA	CGTTGCTTAGTCTCGC ACTG	PT30008

تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های ریزماهواره به صورت نشانگر همبارز (شماره آلل تولیدی) امتیازدهی شدند. به منظور تجزیه مؤثر ساختار جمعیت و دسته‌بندی دقیق ژنوتیپ‌ها به زیر جمعیت‌های مناسب و تشخیص ژنوتیپ‌های مختلط، ارزیابی ساختار جمعیت با استفاده از روش Bayesian در نرم‌افزار Structure 2.3.4 انجام گرفت (۳۰). در این روش، هر یک از ژنوتیپ‌ها با یک احتمال و طوری به زیرجمعیت‌های فرضی منتسب می‌گردند که در هر زیرجمعیت میزان نبود تعادل پیوستگی حداقل و تعادل مرحله گامتی حداکثر باشد (۲۴). در این مطالعه، بین یک تا ده زیرجمعیت فرضی اولیه در نظر گرفته شد و برای افزایش دقت برای هرکدام از زیرجمعیت‌ها پنج تکرار منظور گردید. برای این منظور از مدل ترکیبی Admixture و استقلال فراوانی آللی با ۱۰۰۰۰۰ تکرار آزمایش (burn-in) و ۱۰۰۰۰۰ تکرار MCMC (Markov Chain Monte Carlo) استفاده گردید تا منحنی حداکثر درست‌نمایی حاصل شود. نرم‌افزار Structure برای هر مقدار K (تعداد واقعی زیر جمعیت) ماتریس Q را به دست می‌دهد که در این ماتریس، برآورد ضرایب احتمال عضویت هر ژنوتیپ در هر یک از زیرجمعیت‌ها آورده شده است. تعداد واقعی زیرجمعیت‌ها براساس روش اوانو و همکاران (۱۳) تعیین شد. این روش بر پایه آماره ΔK است که شیب تابع احتمالی را در نقطه‌ای می‌شکند که تعداد K فرضی درآن نقطه دارای حداکثر احتمال باشد.

تجزیه ارتباط برای آنالیز ارتباط نشانگرها با صفات فنوتیپی با استفاده از نرم‌افزار TASSEL 2.1 انجام شد. در این رویکرد از مدل خطی عمومی (General linear model; GLM) و مدل خطی مخلوط (Mixed linear model; MLM) استفاده شد. در رویکرد GLM از ماتریس Q یا ساختار جمعیت به‌صورت کوواریت در مدل استفاده شد. ماتریس روابط خویشاوندی (ماتریس K) براساس داده‌های ریزماهواره و با استفاده از نرم‌افزار TASSEL 2.1 محاسبه شد. ضرایب ساختار جمعیت و روابط خویشاوندی به صورت مدل Q + K در رویکرد MLM که کوواریت محسوب می‌شود، مورد استفاده قرار گرفتند. میزان نبود تعادل لینکاژی (LD) با استفاده از نرم‌افزار TASSEL 2.1 محاسبه شد. تجزیه کلاستر براساس داده‌های ریزماهواره و روش UPGMA با استفاده از نرم‌افزار TASSEL 2.1 انجام گردید (۸).

نتایج و بحث

تنوع ژنتیکی توتون‌های شرقی

مقادیر حداقل، حداکثر، میانگین حسابی، انحراف معیار و ضریب تغییرات فنوتیپی صفات در ۹۰ ژنوتیپ مشترک در آزمایشات مزرعه‌ای و مولکولی در جدول ۳ ارائه شده است. بالاترین ضرایب تغییرات فنوتیپی به ترتیب مربوط به عملکرد برگ تر در کرت (۴۱/۲ درصد)، عملکرد برگ خشک در کرت (۳۵/۲ درصد) و تعداد روز تا ۵۰٪ گلدهی (۳۱/۹۹ درصد) بوده است (جدول ۳). با توجه به این که برگ خشک عملکرد گیاه توتون محسوب می‌شود، وجود تنوع برای این صفت حایز اهمیت بوده و می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی مورد استفاده قرار گیرد. انگشت‌نگاری ژنوم ۹۰ ژنوتیپ توتون شرقی با

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.18.16.9]
[DOI: 10.29252/jcb.8.18.134]

استفاده از ۲۶ جفت آغازگر ریزماهواره انجام شد و در مجموع ۶۶ آلل با میانگین ۲/۵۳ آلل برای هر نشانگر مشاهده شد. در تجزیه کلاستر براساس داده‌های SSR به روش UPGMA در نرم‌افزار TASSEL 2.1 ژنوتیپ‌های مورد بررسی در چهار گروه هتروتیک عمده و یک گروه کوچک قرار گرفتند (شکل ۱).

جدول ۳- آماره‌های توصیفی صفات فنوتیپی در۹۰ ژنوتیپ توتون شرقی مورد مطالعه

Table 3. Descriptive statistics on the phenotypic traits of 90 studied oriental-type tobacco genotypes

Item	NL	LL	LW	FLYP	DLYP	PH	SD	D50F
Minimum	۱۰/۰۰	۲۲/۲۵	۱۱/۶۷	۱/۸۶	۰/۵۷	۷۲/۸۳	۴/۷۸	۲۵/۰۰
Maximum	۴۸/۱۷	۴۷/۹۲	۲۵/۹۲	۲۳/۱۱	۴/۴۶	۱۸۹/۰۰	۹/۵۲	۱۱۷/۰۰
Mean	۲۸/۸۵	۳۱/۴۷	۱۶/۳۴	۸/۵۶	۱/۸۰	۱۳۴/۲۰	۶/۳۴	۵۶/۸۷
Standard deviation	۸/۷۱	۵/۴۰	۳/۲۰	۳/۵۳	۰/۶۳	۲۸/۹۵	۰/۹۷	۱۸/۱۹
Coefficient of variation	۳۰/۱۹	۱۷/۱۷	۱۹/۶۳	۴۱/۲۳	۳۵/۲۵	۲۱/۵۷	۱۵/۴۲	۳۲/۰۰

نکته: NL: تعداد برگ، LL: طول برگ، LW: عرض برگ، FLYP: عملکرد برگ تر در کرت، DLYP: عملکرد برگ خشک در کرت، PH: ارتفاع گیاه، SD: قطر ساقه، D50F: روز تا ۵۰ درصد گلدهی.

تجزیه مؤثر ساختار جمعیت و دسته‌بندی دقیق افراد به زیر جمعیت‌های مناسب با استفاده از نرم‌افزار Structure انجام گرفت. با توجه به این که مقادیر حداکثر ΔK در K=۳ به‌دست آمده، بنابراین ژنوتیپ‌های توتون مورد مطالعه به احتمال قوی دارای سه زیرجمعیت می‌باشند.

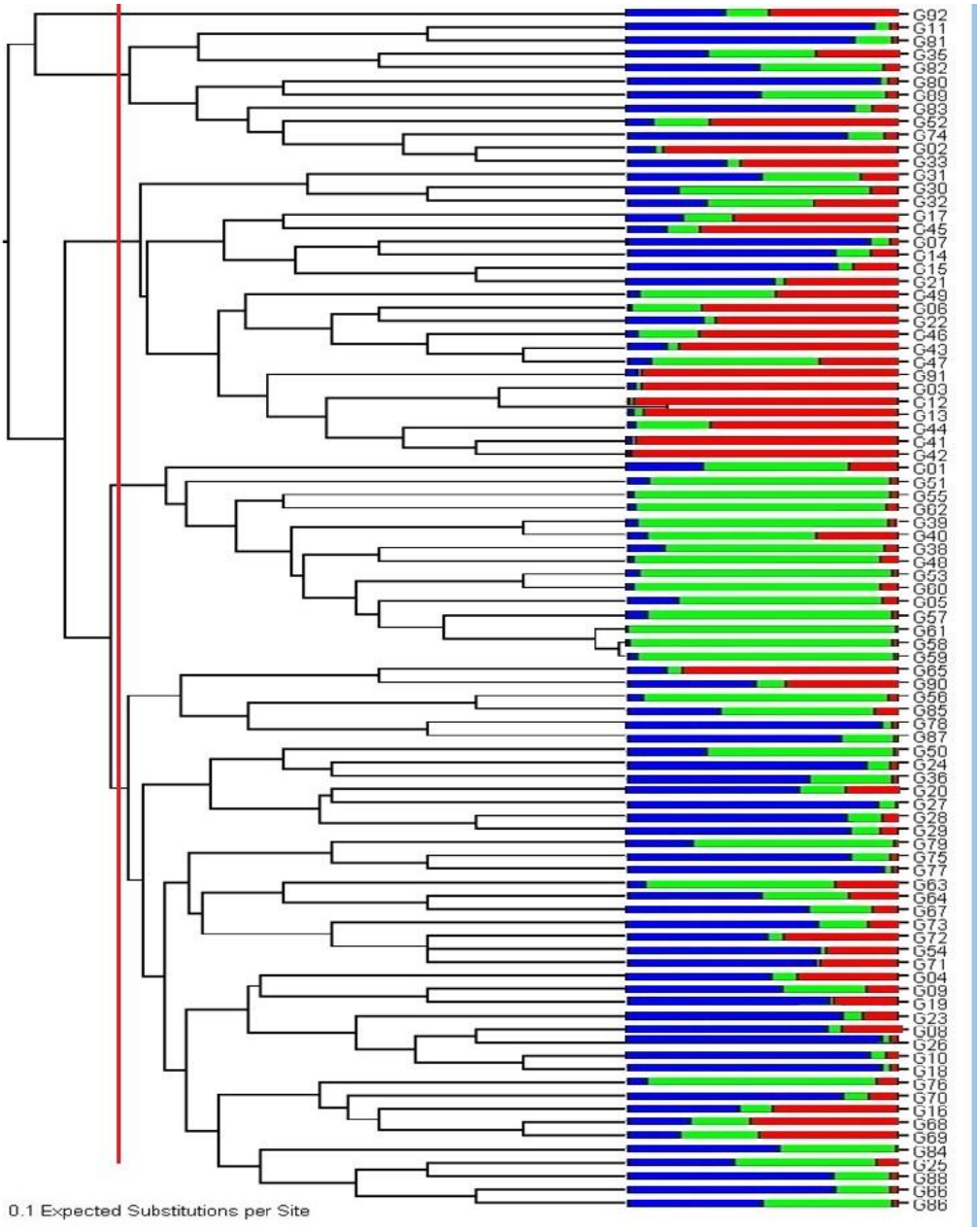
این سه زیرجمعیت با سه گروه ژرم پلاسم: چپق (SPTs)، لاین‌های اینبرد نوترکیب (PDs) و تیکلاک (CHTs) مطابقت داشتند. در مجموع ۸۱٪ از لاین‌های PD و ۷۰/۵۸٪ از لاین‌های SPT و ۷۰٪ از لاین‌های تیکلاک در زیرگروه مربوط به خود قرار گرفتند. لاین‌های باقی مانده بسته به میزان ارزش Q به گروه خاصی منتسب نشده و مخلوط در نظر گرفته شدند. در کل گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با تجزیه کلاستر، در تطابق با نتایج حاصل از گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها توسط نرم‌افزار Structure بوده است. در تحقیقات انجام شده از سوی دادرس و همکاران (۹) در تجزیه کلاستر و ساختار، ۵۰ ژنوتیپ توتون هواخشک مورد مطالعه در هشت گروه و سه زیر جمعیت طبقه‌بندی شدند (۹). نتایج مشابهی در مطالعه فریکانو و همکاران (۱۴) که روی ۳۱۲ ژنوتیپ توتون انجام دادند گزارش شده است.

تاریخ پیچیده اصلاحی بسیاری از گیاهان مهم و جریان ژنی محدود شده در بیشتر گیاهان وحشی، ساختارهای پیچیده‌ای در ژرم‌پلاسم به وجود آورده است که باید در مطالعات تجزیه ارتباط در نظر گرفته شود. روش‌هایی که ساختار جمعیت (Q) را در تجزیه ارتباط در نظر می‌گیرند نتایج مثبت دروغین یعنی کشف ارتباط کاذب بین نشانگر و عوامل کنترل‌کننده صفت را کاهش می‌دهند (۳۷،۳۳).

نبود تعادل لینکاژی (Linkage disequilibrium; LD)

در مجموعه ژنوتیپی مورد مطالعه ارزش r^2 (شاخصی برای سنجش نبود تعادل لینکاژی) بین ۰/۰۰۰۰۱ الی ۰/۲۶۷ و مقدار میانگین r^2 برابر با ۰/۰۲۷ بود. از ۳۲۵ جفت نشانگر ریزماهواره ۷/۳۸٪ دارای r^2 بزرگ‌تر از ۰/۱ و معنی‌دار بودند ($r^2 \geq 0.1$, $P \leq 0.01$). مقدار ´D (شاخص دیگر سنجش نبود تعادل لینکاژی) بین ۰/۰۰۶۵ الی یک و مقدار میانگین برابر با ۰/۲۴۲ بود. ۸۴/۶٪ از مقادیر ´D بزرگ‌تر از ۰/۱ بود ($D' \geq 0.1$, $P \leq 0.01$). نتایج مشابهی از سوی جون و همکاران (۱۷) و ژانگ و همکاران (۳۵) به‌ترتیب در سویا و ذرت مشاهده شده است. در تحقیقات دادرس و همکاران (۹) مقدار r^2 در توتون‌های هواخشک بین ۰/۱۵۰ و ۰/۳۶۱ متغیر بود. نبود تعادل لینکاژی (LD) ارتباط غیر تصادفی مکان‌های متفاوت روی یک کروموزوم است و اخیراً از آن در مطالعات نقشه‌یابی ارتباطی و مکان‌یابی صفات کمی و ژن‌های مهم استفاده می‌شود (۳۵،۲۳). وجود LD یک پیش‌نیاز برای مکان‌یابی ارتباطی می‌باشد. میزان دقت مکان‌یابی ارتباطی به ساختار LD روی ژنوم بستگی دارد. میزان وسعت LD در ژنوم گیاهان، بین گونه‌های مختلف متغیر می‌باشد. عواملی از قبیل اندازه جمعیت، اینبردینگ، ایزولاسیون ژنتیکی بین اجداد، میزان کم نوترکیبی، هم‌ترکیبی جمعیت‌ها، رانش ژنتیکی و اپیستازی موجب افزایش LD می‌شوند در حالی که عواملی از قبیل دگرگشنی، میزان نوترکیبی بالا، میزان جهش بالا و تغییر ژنی منجر به کاهش مقدار LD می‌شود. همچنین فاصله ژنتیکی بالا به دلیل احتمال بیشتر نوترکیبی باعث کاهش مقدار نبود تعادل لینکاژی خواهد شد.

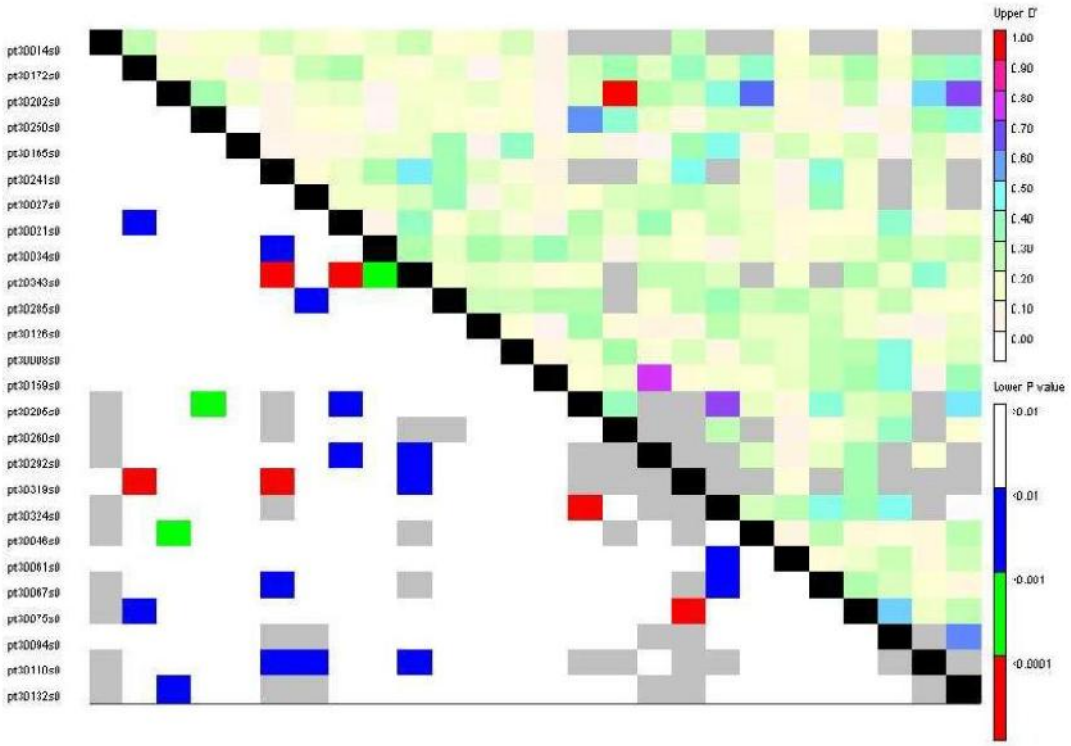
[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.18.16.9]
[DOI: 10.29252/jcb.8.18.134]



شکل ۱- نتایج تجزیه ساختار جمعیت توتون با استفاده از نرم‌افزار Structure و گروه بندی ژنوتیپ‌های با تجزیه کلاستر بر اساس روش UPGMA در نرم‌افزار TASSEL

Figure 1. Results of analyzed population structure of oriental-type tobacco by the Structure program and un-weighted pair-group method using arithmetic average (UPGMA) dendrogram of genotypes in TASSEL software.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.18.16.9]
[DOI: 10.29252/jcb.8.18.134]



شکل ۲- پلات نبود تعادل لینکاژی (LD plot). قسمت بالا قطری نشان‌دهنده میزان نبود تعادل لینکاژی با استفاده از آماره ´D و قسمت پایین قطری P-value برای جفت نشانگرها را نشان می‌دهد.

Figure 2. LD plot generated by SSR marker pairs. The upper diagonal shows D′ among each pair of markers. The lower diagonal shows the levels of significance between each pair of markers.

ارتباط نشانگر با صفات

از نرم‌افزار TASSEL 2.1 برای استنباط احتمال وجود ارتباط واقعی میان نشانگرهای ریزماهواره با عوامل کنترل‌کننده صفات زراعی استفاده گردید. بدین منظور تجزیه ارتباط براساس مدل خطی عمومی (GLM) با لحاظ کردن Q که کواریت به شمار می‌آید و همچنین بر اساس مدل خطی مخلوط (MLM) با لحاظ کردن Q + K انجام شد.

در مطالعات تجزیه ارتباط الزاماً از جمعیت‌های طبیعی استفاده می‌شود و در حالت ایده‌ال نباید ساختاری در جمعیت مورد مطالعه وجود داشته باشد زیرا وجود ساختار در جمعیت مورد مطالعه عامل بازدارنده در جهت دست‌یابی به نتایج قابل اعتماد می‌باشد و در صورتی که اثر عوامل ساختار جمعیت و روابط خویشاوندی در تجزیه ارتباط در یک جمعیت لحاظ نشوند نتایج مثبت دروغین به‌وجود خواهد آمد (۷). مدل‌های مختلفی برای کاهش نتایج مثبت کاذب در تجزیه‌های ارتباط مورد استفاده قرار می‌گیرد که از آن جمله می‌توان به ماتریس K در داخل مدل K و ماتریس Q در داخل مدل Q اشاره نمود. مدل دیگر Q + K می‌باشد که ترکیبی از دو مدل قبلی است و تأثیر آن در کاهش نتایج مثبت کاذب بیشتر از دو مدل Q و K است (۳۶،۳۱،۳۰). نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که استفاده از مدل ترکیب شده (Q + K) در ذرت بهبود معنی‌داری در کاهش نتایج مثبت کاذب در بررسی صفاتی مانند زمان گل‌دهی، وزن خوشه و قطر خوشه در مقایسه با مدل‌های خطی منفرد K یا Q ایجاد نموده است (۳۷).

در این تحقیق، نتایج به‌دست آمده براساس مدل GLM نشان داد که ۱۶ مکان ریزماهواره ارتباط بسیار معنی‌داری با عوامل کنترل‌کننده صفات مورد بررسی دارند (P≤0.01). از این تعداد پنج مکان با ژن‌های کنترل‌کننده صفت تعداد برگ (NL)، یک مکان با ژن‌های کنترل‌کننده صفت طول برگ (LL)، دو مکان با ژن‌های کنترل‌کننده صفت ارتفاع بوته (PH)، چهار مکان با ژن‌های کنترل‌کننده صفت قطر ساقه (SD) و چهار مکان با ژن‌های کنترل‌کننده صفت تعداد روز تا ۵۰٪ گلدهی (D50F) ارتباط بسیار معنی‌دار داشتند (جدول ۴). در تجزیه ارتباط براساس مدل MLM در مجموع ده مکان ریزماهواره ارتباط بسیار معنی‌داری با ژن‌های کنترل‌کننده صفات نشان دادند (P≤0.01). ده مکان شناسایی شده برای صفات همان ده مکان از ۱۶ مکانی بودند که براساس مدل GLM نیز شناسایی شده بودند. بر اساس مدل MLM، یک مکان با صفت تعداد برگ (NL)، یک مکان با طول برگ (LL)، دو مکان با ارتفاع بوته (PH)، چهار مکان با قطر ساقه (SD) و دو مکان با تعداد روز تا ۵۰٪ گل‌دهی (D50F) پیوستگی نشان دادند (جدول ۴). براساس نتایج این مطالعه برخی از ریزماهواره‌ها میان صفات مختلف مشترک بودند از جمله می‌توان به نشانگر PT30159- که با صفات

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.18.16.9]
[DOI: 10.29252/jcb.8.18.134]

تعداد برگ (NL)، ارتفاع بوته (PH) و تعداد روز تا ۵۰ درصد گلدهی (D50F) مرتبط بود- اشاره نمود. همچنین نشانگر PT30046 با صفات طول برگ (LL) و قطر ساقه (SD) و نشانگر PT30292 با صفات قطر ساقه (SD) و تعداد روز تا ۵۰ درصد گلدهی (D50F) پیوستگی نشان دادند (جدول ۴).

وجود نشانگر مشترک بین چندین صفت ممکن است به‌دلیل پلیوتروپی و یا پیوستگی شدید ژن‌ها باشد. وجود چنین حالتی کارایی گزینش براساس نشانگر را بالا برده و موجب می‌شود به دنبال اصلاح یک صفت در یک گیاه، افزایش یا کاهش ارزش صفات همبسته دیگر را شاهد باشیم.

جدول ۴- نشانگرهای SSR شناسایی شده برای صفات زراعی- موفولوژیکی در ژنوتیپ‌های توتون شرقی با استفاده از مدل‌های GLM و MLM

Table 4. SSR loci identified for agro-morphological traits in oriental-type tobacco genotypes using association mapping by GLM and MLM procedures

MLM	GLM					
P-Marker	R^2 Marker	R^2 Model	P-Adj-Marker	P-Marker	Locus	Trait
۰/۰۳۳۵	۰/۱۷۷۶	۰/۲۵۷۴	۰/۲۳۴۸	۰/۰۱۸۳	PT30014	LN
–	۰/۰۹۹۵	۰/۱۸۳۰	۰/۰۶۵۹	۰/۰۰۶۱	PT30250	
–	۰/۱۷۸۲	۰/۲۲۶۱	۰/۰۰۶	۰/۰۰۱۸	PT30134	
۰/۰۰۹۲	۰/۲۴۶۷	۰/۲۵۸۶	۰/۰۰۰۹۹۹	۰/۰۰۰۱۳۹	PT30159	
–	۰/۱۳۲۰	۰/۱۸۰۲	۰/۰۱۷۰	۰/۰۰۲۹	PT30205	
۰/۰۳۲۸	۰/۱۹۲۶	۰/۲۵۴۸	۰/۰۰۴۰	۰/۰۰۱۸	PT30075	
۰/۰۲۴۸	۰/۰۸۹۵	۰/۲۸۱۴	۰/۳۷۷۶	۰/۰۲۴۸	PT30241	LL
۰/۰۳۶۰	۰/۱۲۶۱	۰/۲۶۴۲	۰/۵۸۱۴	۰/۰۳۶۰	PT30027	
۰/۰۳۹۹	۰/۱۱۶۷	۰/۲۸۹۴	۰/۶۹۱۳	۰/۰۳۹۹	PT30008	
۰/۰۲۸۳	۰/۱۰۰۸	۰/۲۵۸۱	۰/۴۵۸۰	۰/۰۲۸۳	PT30292	
۰/۰۰۸۵	۰/۱۶۴۲	۰/۳۲۱۳	۰/۱۱۸۹	۰/۰۰۸۵	PT30046	
۰/۰۳۴۱	۰/۰۹۰۸	۰/۲۳۸۴	۰/۷۳۰۳	۰/۰۳۴۱	PT30110	
۰/۰۴۵۱	-	-	–	–	PT30008	LW
۰/۰۳۰۹	-	-	-	-	PT30205	
–	۰/۰۷۶۴	۰/۲۸۹۴	۰/۷۱۴۳	۰/۰۴۰۱	PT30241	
–	۰/۰۸۵۵	۰/۲۳۴۵	۰/۸۰۰۲	۰/۰۳۹۶	PT30134	
–	۰/۰۸۹۷	۰/۲۷۳۶	۰/۶۴۱۴	۰/۰۳۸۴	PT30292	
–	۰/۰۶۳۰	۰/۲۲۳۶	۰/۷۶۰۲	۰/۰۳۵۸	PT30324	
–	۰/۰۱۰۹	۰/۲۹۱۶	۰/۶۸۸۳	۰/۰۴۲۹	PT30046	
–	۰/۰۸۷۵	۰/۲۴۹۳	۰/۶۱۱۴	۰/۰۳۶۷	PT30110	
۰/۰۳۵۳	۰/۰۷۲۱	۰/۰۷۲۶	۰/۵۵۰۴	۰/۰۳۴۸	PT30205	DLYP
۰/۰۲۹۸	۰/۰۷۷۸	۰/۱۲۱۸	۰/۲۵۹۷	۰/۰۱۸۴	PT30250	PH
–	۰/۱۲۹۰	۰/۱۶۵۳	۰/۱۴۳۹	۰/۰۱۲۵	PT30134	
۰/۰۰۸۰	۰/۱۳۲۳	۰/۱۸۴۲	۰/۰۵۰۹	۰/۰۰۵۹	PT30159	
۰/۰۰۸۷	۰/۱۵۵۲	۰/۱۷۷۷	۰/۰۸۸۹	۰/۰۰۸۶	PT30075	
۰/۰۰۳۰	۰/۱۵۷۱	۰/۲۲۲۶	۰/۰۴۳۰	۰/۰۰۳	PT30241	SD
۰/۰۰۲۲	۰/۱۸۸۵	۰/۲۳۰۸	۰/۰۱۵۰	۰/۰۰۲۲	PT30292	
۰/۰۲۵۹	۰/۱۶۲۰	۰/۲۲۹۲	۰/۶۷۲۳	۰/۰۲۵۹	PT30319	
۰/۰۰۱۶	۰/۲۵۵۴	۰/۳۴۰۶	۰/۰۰۰۹۹۹	۰/۰۰۰۷۴۶	PT30046	
۰/۰۰۵۲	۰/۱۵۰۵	۰/۲۱۶۲	۰/۰۸۶۹	۰/۰۰۵۲	PT30110	
۰/۰۴۷۱	۰/۱۱۳۵	۰/۱۳۹۰	۰/۶۲۹۴	۰/۰۲۰۲	PT30241	D50F
۰/۰۰۹۸	۰/۲۰۲۲	۰/۲۵۰۲	۰/۰۰۰۹۹۹	۰/۰۰۰۵۱۶	PT30159	
۰/۰۰۵۷	۰/۲۱۶۳	۰/۲۳۰۸	۰/۰۰۰۹۹۹	۰/۰۰۰۹۶۹	PT30292	
۰/۰۱۴۶	۰/۲۰۸۱	۰/۲۵۱۴	۰/۰۳۷۰	۰/۰۰۴۵	PT30046	
–	۰/۱۲۰۳	۰/۲۰۰۰	۰/۳۲۴۷	۰/۰۲۱۲	PT30075	
۰/۰۱۸۳	۰/۱۴۸۱	۰/۱۷۷۵	۰/۱۵۴۸	۰/۰۰۷	PT30110	

نکته: NL: تعداد برگ، LL: طول برگ، LW: عرض برگ، FLYP: عملکرد برگ تر در کرت، DLYP: عملکرد برگ خشک در کرت، PH: ارتفاع گیاه، SD: قطر ساقه، D50F: روز تا ۵۰ درصد گلدهی.

در مطالعات متعددی از نقشه‌یابی ارتباطی مبتنی بر خانواده (Family-based linkage (FBL) mapping برای یافتن QTLهای کنترل‌کننده صفات در ژنوم توتون استفاده شده است، برای مثال جولیو و همکاران (۱۶) با استفاده از نقشه ژنتیکی تهیه شده با نشانگرهای SSAP، SCAR، AFLP و ISSR در یک جمعیت لینه‌های خالص نوترکیب توتون، ۷۵ QTL را در ۱۲ گروه لینکاژی برای صفاتی مانند کیفیت برگ، ترکیبات شیمیایی و خواص دود شناسایی کردند. ژیائو و همکاران (۲۹) با استفاده از خانواده‌های دابل هاپلوئید تعداد هفت QTL برای مقادیر شکر، نیکوتین و پتاسیم موجود در برگ‌های توتون شناسایی کردند. در مطالعه دیگر لی و همکاران (۲۰) با استفاده از نقشه‌یابی ارتباطی مبتنی بر خانواده، دو QTL برای مقدار نیکوتین، دو QTL برای مقدار کلر، یک QTL برای مقادیر پتاسیم، چهار QTL برای طول برگ و یک QTL برای مقاومت به سفیدک سطحی شناسایی کردند. اخیراً دادرس و همکاران (۹) با استفاده از نقشه‌یابی ارتباطی مبتنی بر نبود تعادل لینکاژی (Linkage disequilibrium based association mapping) در ۵۰ ژنوتیپ توتون هوا خشک، نه نشانگر AFLP مرتبط با صفات سطح برگ، ارتفاع گیاه،

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.18.16.9]
[DOI: 10.29252/jcb.8.18.134]

تعداد برگ، طول و عرض برگ را شناسایی کردند. تجزیه ارتباط مبتنی بر نبود تعادل لینکاژی می‌تواند به دو صورت انجام گیرد: رویکرد اول پویش کل ژنوم با تعداد زیادی از نشانگرها و رویکرد دوم مکان‌یابی ارتباطی ژن‌های کاندیدا می‌باشد که در این رویکرد ژن‌های خاص براساس روش تجزیه ارتباط انتخاب می‌شوند (۲۷). تجزیه ارتباط با روش ژن‌های کاندیدا در گیاهان زراعی از جمله تلخه (۳۴) و مطالعات تجزیه ارتباط مبتنی بر پویش کل ژنوم (GWAS) در گیاهانی مانند گندم نان (۲۰)، سیب‌زمینی (۱۱) و توتون (۱۴،۹،۴) انجام شده است.

نتایج نشان داد که بین ژنوتیپ‌های توتون‌شرقی مورد مطالعه از نظر صفات مورفولوژیکی و نیز مکان‌های ریزماهواره مورد بررسی، تنوع ژنتیکی بالایی وجود داشت. مطالعه ساختار جمعیت حاضر با استفاده از نرم‌افزار Structure صورت گرفت و ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در سه زیرجمعیت قرار گرفتند. مکان‌یابی ارتباطی براساس مدل GLM و MLM انجام گرفت و به‌ترتیب ۱۶ و ده مکان ژنی مرتبط با صفات مورد بررسی شناسایی شدند. نتایج نشان می‌دهد 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.

منابع

1. Abdurakhmonov, I.Y., R.J. Kohel, J.Z. Yu, A.E. Pepper, A.A. Abdullaev, F.N. Kushanov, I.B. Salakhutdinov, Z.T. Buriev, S. Saha, B.E. Scheffler, J.N. Jenkins and A. Abdukarimov. 2008. Molecular diversity and association mapping of fiber quality traits in exotic *G. hirsutum* L. germplasm. Genomics, 92: 478-487.
2. ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/006/y4956e/y4956e00.pdf (Projections of tobacco production, consumption and trade to the year 2010, Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome, 2003). 107 pp.
3. Ataii, R., V. Mohammadi, A.R. Taleai and M.R. Nagavi. 2013. Association mapping of root traits in barley. Iranian Journal of Field Crop Science, 44: 347-357.
4. Basirnia, A., H. Hatami Maleki, R. Darvishzadeh and F. Ghavami. 2014. Mixed linear model association mapping for low chloride accumulation rate in oriental-type tobacco (*Nicotiana tabaccum* L.) germplasm. Journal of Plant Interactions, 9: 666-672.
5. Bindler, G., J. Plieske, N. Bakaher, I. Gunduz, N. Ivanov, R. Van der Hoeven, M. Ganal and P. Donini. 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.
6. Bindler, G., R. Van der Hoeven, I. Gunduz, J. Plieske, M. Ganal, L. Rossi, F. Gadani and P. Donini. 2007. A microsatellite marker based linkage map of tobacco. Theoretical and Applied Genetics, 114: 341-349.
7. Breseghello, F. and M. Sorrells. 2006. Association mapping of kernel size and milling quality in wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. Genetics, 172: 1165-1177.
8. Buckler, E., T. Casstevens, P. Bradbury and Z. Zhang. 2009. Trait Analysis by Association, Evolution and Linkage (TASSEL) Version 2.1, User Manual, Cornell University, Ithaca, NY, USA. 96 pp.
9. Dadras, A.R., H. Sabouri, G. Mohammadi Nejad, A. Sabouri and M. Shoai-Deylami. 2014. Association analysis, genetic diversity and structure analysis of tobacco based on AFLP markers. Molecular Biology Report, 41: 3317-29.
10. Darvishzadeh, R., S.R. Alavi and A. Sarrafi. 2009. Genetic variability for chlorine concentration in oriental tobacco genotypes. Archives of Agronomy and Soil Science, 57: 167-177.
11. D'hoop, B.B., M.J. Paulo, K. Kowitwanich, M. Sengers, R.G.F. Visser, H.J. Van Eck and F.A. Van Eeuwijk. 2010. Population structure and linkage disequilibrium unraveled in tetraploid potato. Theoretical and Applied Genetics, 121: 1151-1170.
12. Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemistry, 19: 11-15.
13. Evanno, G., S. Regnaut and J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Molecular Ecology, 14: 2611-2620.
14. Fricano, A., N. Bakaher, M. Del Corvo, P. Piffanelli, P. Donini, A. Stella, V. Nikolai, N.V. Ivanov and C. Pozz. 2012. Molecular diversity, population structure and linkage disequilibrium in a worldwide collection of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) germplasm. BMC Genetics, 13: 18 pp.
15. Fusari, C.M., J.A.D. Rienzo, C. Troglia, V. Nishinakamasu, M.V. Moreno, C. Maringolo, F. Quiroz, D. Álvarez, A. Escande, E. Hopp, R. Heinz, V.V. Lia and N.B. Paniego. 2012. Association mapping in sunflower for Sclerotinia head rot resistance. BMC Plant Biology, 12: 1-13.
16. Julio, E., B. Denoyes-Rothan, J.L. Verrier and F. Dorlhac de Borne. 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.
17. Jun, T.H., K. Van, M.Y. Kim, H.S. Lee and D.R. Walker. 2007. Association analysis using SSR markers to find QTL for seed protein content in soybean. Euphytica, 162: 179-191.
18. Kalia, R.K., M.K. Rai, S. Kalia, R. Singh and A.K. Dhawan. 2011. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. Euphytica, 177: 309-334.
19. Kraakman, A.T.W., F. Martínez, B. Mussiraliev, F.A. Van Eeuwijk and R.E. Niks. 2006. Linkage disequilibrium mapping of morphological, resistance and other agronomically relevant traits in modern spring barley cultivars. Molecular Breeding, 17: 41-58.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.18.16.9]
[DOI: 10.29252/jcb.8.18.134]

20. Li-Hua, L., C. Mei-Xia, Z. Dong-Xin, C. Shun-Hui, T. Ai-Fen, L. Yan-Kun, M.A. Hong-Bo, Q.A. Jian-Min and G. Yu-Chun. 2011. QTL Analysis of six important traits in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). Acta Agronomica Sinica, 37: 1577-1584.
21. Mannai, Y.E., T. Shehzad and K. Okuno. 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: 983-989.
22. Movafegh, S., B. Rabiee, A. Zare-Feizabadi and G. Taheri. 2009. Mapping QTLs controlling yield in two Iranian rice cultivars-F2 populations. Iranian Journal of Agricultural Research, 7: 673-683.
23. Rafalski, A. and M. Morgante. 2004. Corn and humans: recombination and linkage disequilibrium in two genomes of similar size. Trends Genetics, 20: 103-111.
24. Rezaeizad, A., B. Wittkop, R. Snowdon, M. Hasan, V. Mohammadi, A. Zali and W. Friedt. 2011. Identification of QTLs for phenolic compounds in oilseed rape (*Brassica napus* L.) by association mapping using SSR markers. Euphytica, 177: 335-342.
25. Saeed, A., R. Darvishzadeh and A. Basirnia. 2013. Simple sequence repeat markers associated with agro-morphological traits in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Zemdirbyste-Agriculture, 100: 433-440.
26. Shaaf, S., M.R. Bihamta, A.R. Taleai, V. Mohammadi and B. Kaliliyan. 2012. Association analysis of single nucleotide variation in flowering time genes PpdH1, HvCO1 and HvGI in the barley. Modern Genetics, 7: 179-191.
27. Shehzad, T., H. Iwata and K. Okuno. 2009. Genome-Wide association mapping of quantitative traits in sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) by using multiple models. Breeding Science, 59: 217-227.
28. Thornsberry, J.M., M.M. Goodman, J. Doebley, S. Kresovich, D. Nielsen and E.S. Buckler. 2001. Dwarf8 polymorphisms associate with variation in flowering time. Nature Genetics, 28: 286-289.
29. Xiao, B.G., Z.L. Xu, X.J. Chen, A.R. Shen, Y.P. Li and J. Zhu. 2006. Genetic linkage map constructed by using a HD population for the flue-cured tobacco. Acta Tabacaria Sinica, 12: 35-40.
30. Xu, W., P.K. Subudhi, O.R. Crasta, D.T. Rosenow, J.E. Mullet and H.T. Nguyen. 2000. Molecular mapping of QTLs conferring stay-green in grain sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). Genome, 43: 461-469.
31. Yan, J., T. Shan, M. Warburton, E. Buckler, M. Mcmullen and J. Crouch. 2009. Genetic characterization and linkage disequilibrium estimation of a global maize collection using SNP markers. Plos One, 4: e8451.
32. Yang, B.C., B.G. Xiao, X.J. Chen and C.H. Shi. 2007. Assessing the genetic diversity of tobacco germplasm using inter simple sequence repeat and inter-retrotransposon amplification polymorphism markers. Annuals of Applied Biology, 150: 393-401.
33. Yu, J., G. Pressoir, W.H. Briggs, B.I. Vroh and M. Yamasaki. 2006. A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. Nature Genetics, 38: 203-208.
34. Yu, X. and Y. Jiang. 2013. Association of candidate genes with drought tolerance traits in diverse perennial Ryegrass accessions. 2012 Annu. Rep. Purdue University, Turf grass Science, 1-6.
35. Zhang, Q., C. Wu, F. Ren, Y. Li and C. Zhang. 2012. Association analysis of important agronomical traits of maize inbred lines with SSRs. Australian Journal of Crop Science, 6: 1131-1138.
36. Zhao, J., M.J. Paulo, D. Jamer, P. Lou, F.V. Eeuwijk, G. Bonnema, D. Vreugdenhil and M. Koornneef. 2007. Association mapping of leaf traits, flowering time and phytate content in *Brassica rapa*. Genome, 50: 963-973.
37. Zhu, C.M., E. Gore, S. Buckler and J. Yu. 2008. Status and prospects of association mapping in plants. The Plant Genome, 1: 5-20.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.18.16.9]
[DOI: 10.29252/jcb.8.18.134]

Association Mapping of Agronomic Traits in Oriental Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Genotypes

Faramarz Hoshyardel[1], Reza Darvishzadeh[2], Ashkan Basirnia[3] and Hamid Hatami Maleki[4]

1 and 3- M.Sc. Student and M.Sc., Urmia University
2- Professor, Urmia University
(Corresponding author: r.darvishzadeh@urmia.ac.ir)
4- Assistant Professor, University of Maragheh
Received: July 14, 2014 Accepted: October 26, 2014

Abstract

Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) is one of valuable agricultural and industrial crops. Studying most important traits of tobacco is difficult because of quantitative nature that are controlled by multiple genes and affected by environmental factors. Among various methods for the study of quantitative traits, association mapping which utilize phenotypic and DNA markers information is one of the effective methods for this purpose. In this study, the phenotypic variability of 100 oriental type of tobacco genotypes were evaluated using 10 × 10 simple lattice design with two replications at Urmia Tobacco Research Center. Several agronomic traits including plant height (PH), stem diameter (SD), number of days to 50% flowering (D50F), number of leaves (NL), leaf length (LL), leaf width (LW), fresh leaf yield per plot (FLYP), and dry leaf yield per plot (DLYP) were measured. Also, fingerprinting of 90 out of 100 genotypes was done by using 26 SSR primer pairs. Analysis of population structure of studied germplasm using Structure software classified the association panel into 3 sub-populations. Linkage disequilibrium and analysis of association between markers and traits were performed using TASSEL 2.1 software. The results related to linkage disequilibrium revealed that r^2 values ranged from 0.00001 to 0.267 with mean r^2 value of 0.027 and also, value of D´ ranged from 0.0065 to 1 with mean D´ value of 0.242. Using association mapping based on GLM and MLM models, 16 and 10 loci were identified which possessed significant relationship with factors controlling agronomical traits. In this study, marker PT30159 was common for number of leaves, plant height and days to 50% flowering traits, marker PT30046 was common for leaf length and stem diameter and marker PT30292 was common for stem diameter and days to 50% flowering traits. Common markers are important and effective in plant breeding activities.

Keywords: Association analysis, Agronomic traits, Linkage disequilibrium, SSR marker, Tobacco

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-20]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.18.16.9]
[DOI: 10.29252/jcb.8.18.134]