بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه ارومیه

دانشکده کشاورزی

**گروه زراعت و اصلاح نباتات**

**پایان‌نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته بیوتکنولوژی کشاورزی**

عنوان:

# بررسی تنوع ژنتیکی و شناسایی نشانگرهای مولکولی ریزماهواره همبسته با مقاومت به ویروس Y سیب‌زمینی در ارقام شرقی توتون

اساتید راهنما:

**دکتر امیر فیاض مقدم ـ دکتر رضا درویش زاده**

استاد مشاور:

**دکتر مینا راستگو**

اساتید داور:

**دکتر ایرج برنوسی _ دکتر یوبرت قوستا**

پژوهشگر:

**احمد حیدری**

شهریور ۹۱

حق چاپ برای دانشگاه ارومیه محفوظ است.

تقدیم به

بزرگترین مرد تاریخ، الگویم علی (ع)

و

روح بزرگ پدرم

و

مادر بهتر از جانم

و

خواهران و برادران عزیزم

که در تمام دوران زندگیم راهنمایم بودند.

# تقدیر و سپاس فراوان

از اساتید راهنمای عزیز، جناب آقای دکتر امیر فیاض مقدم، جناب آقای دکتر رضا درویش زاده و سرکار خانم دکتر مینا راستکو که در انجام این پایان نامه زحمات بسیاری را متحمل شده اند بسیار سپاسگزارم و نیز از داور داخلی جناب آقای دکتر ایرج برنوسی و داور خارجی جناب آقای دکتر یوبرت قوستا بدلیل قبول زحمت مطالعه و ویرایش این پایان نامه بسیار سپاسگزارم و از خداوند منان برایشان آرزوی توفیق دارم.

از سرکار خانم مهندس عیوضی به خاطر راهنمایی هایشان در امر و اجرای این پایان نامه و از اداره جهاد کشاورزی به دلیل در اختیار گذاشتن امکانات به خصوص سرکار خانم مهندس توسی که اینجانب را در این امر یاری کردند نیز کمال تشکر را دارم.

از پژوهشکده زیست فناوری به خاطر تمامی امکانات و تجهیزات که در اختیار قرار دادند تشکر می کنم و نیز از مرکز تحقیقات توتون ارومیه تشکر و قدردانی نموده و برای تمامی دوستانی که در اجرای این پایان نامه بنحوی مرا یاری نمودند، آرزوی سلامتی و توفیق دارم.

از دوستان و همکلاسی هایم که در این مدت همواره مرا یاری رساندن کمال تشکر را دارم.

## چکیده

ویروس Y سیب زمینی (*Potato Virus Y; PVY*) یکی از عوامل مهم تأثیرگذار بر روی کیفیت و عملکرد توتون (*Nicotiana tabacum* L.) می‌باشد. نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA ابزار ارزشمندی برای به-نژادی گیاهان و انتخاب به کمک نشانگر (Marker Assisted Selection: MAS) برای مقاومت به آفات و بیماری‌ها و برخی صفات مطلوب هستند. در این مطالعه تنوع ژنتیکی ۲۷ ژنوتیپ شرقی و نیمه‌شرقی توتون با ۲۸ جفت آغازگر SSR بررسی گردید. میانگین تعداد آلل‌ها برای هر مکان ۲/۲۱۴، میانگین تعداد آلل‌های مؤثر ۲/۲۱ و هتروزیگوسیتی مورد انتظار در دامنه‌ای از ۰/۳۲۰ تا ۰/۶۶۴ با میانگین ۰/۱۲۲ بود. ماتریس تشابه ژنتیکی با استفاده از ضریب تشابه جاکارد تشکیل شد. تشابه ژنتیکی بین این ژنوتیپ‌ها که دامنه‌ای از ۰/۱ تا ۰/۹۵ را شامل می‌شد، تنوع ژنتیکی بالائی را بین ژنوتیپ‌ها نشان داد. تجزیه کلاستر به روش UPGMA انجام گرفت و همه ژنوتیپ‌ها در ۳ گروه مجزا قرار گرفتند. واکنش ۹۰ ژنوتیپ توتون در مقابل PVY در شرایط کنترل شده با طرح بلوک‌های کامل تصادفی در ۳ تکرار بررسی گردید. هر تکرار شامل ۶ نمونه آزمایشی بود. ژنوتیپ‌ها در مرحله ۶-۴ برگی به روش مکانیکی با ویروس مایه‌زنی شدند. پس از گذشت ۴ هفته از مایه‌زنی ژنوتیپ‌ها برای حضور ویروس با آزمون ELISA بررسی شدند. سپس میزان غلظت ویروس در هر نمونه آلوده در طول موج ۴۰۵nm با استفاده از ELISA Reader قرائت گردید.

تجزیه آماری داده‌های الایزا بر اساس مدل طرح آماری فوق صورت گرفت و حاکی از اختلاف معنی‌دار میان ژنوتیپ‌ها بود. مقایسات میانگین با آزمون توکی در سطح ۵٪ نشان داد که ژنوتیپ Erzeogovina با جذب OD=۰/۶۸۸۸۱ دارای بیشترین غلظت ویروس و ژنوتیپ KB101 با جذب OD=-۰/۰۰۰۵ دارای کمترین غلظت ویروس می‌باشند. به منظور شناسائی نشانگرهای ریزماهواره پیوسته با ژن مقاومت به PVY در ژنوتیپ‌های توتون، تجزیه ارتباط در نرم افزار SAS با استفاده از روش ANOVA انجام گرفت. از میان نشانگرها، ۷ نشانگر در ارتباط با مقاومت یا حساسیت به ویروس شناسائی شدند. دامنه تنوع فنوتیپی توصیف شده ($R^2$) توسط نشانگرها بین ۱۲-۵٪ بود. در اکثر ژنوتیپ‌ها وجود باند با حساسیت به ویروس PVY و عدم وجود باند با مقاومت به این ویروس مشاهده شد. این نشانگرها می‌توانند به عنوان شاخصی برای تعیین مقاومت یا حساسیت به PVY در توتون در نظر گرفته شوند.



کلمات کلیدی: ویروس Y سیب‌زمینی، ژنوتیپ‌های توتون، تنوع ژنتیکی، ELISA، نشانگر ملکولی SSR، تجزیه ارتباط

فهرست مطالب

عنوان صفحه

مقدمه ..... ۲
توتون ..... ۶
۲-۱ تاریخچه توتون ..... ۶
۲-۲ گیاهشناسی ..... ۶
۲-۳ نیاز اکولوژیکی ..... ۶
۲-۴ کاشت، داشت و برداشت ..... ۷
۲-۵ توالی‌یابی ژنوم و ESTها در توتون ..... ۷
۲-۶ تیپ‌های مختلف *N. tabacum* ..... ۸
۲-۶-۱ توتون‌های تیپ غربی شامل دسته‌های ویرجینیا، بارلی، مریلند و کنتاکی می‌باشد ..... ۸
۲-۶-۱-۱ دسته ویرجینیا یا برایت یا Flue-cured (Virginia tobacco) ..... ۸
۲-۶-۱-۲ دسته بارلی (Burley tobacco) ..... ۸
۲-۶-۱-۳ دسته مریلند (Maryland tobacco) ..... ۹
۲-۶-۱-۴ دسته کنتاکی (Kentuky tobacco) ..... ۹
۲-۶-۲ توتون‌های تیپ شرقی (Oriental tobacco) ..... ۹
۲-۶-۳ توتون‌های تیپ نیمه شرقی (Semi - oriental tobacco) ..... ۹
۲-۷ تنباکو ..... ۹
۲-۸ مناطق مهم کشت توتون در ایران ..... ۱۰
۲-۹ تنوع ژنتیکی و اهمیت ارزیابی آن ..... ۱۰
۲-۱۰ روش‌های ارزیابی تنوع ژنتیکی ..... ۱۱
۲-۱۰-۱ داده‌های مورفولوژی ..... ۱۱
۲-۱۰-۲ داده‌های مرتبط با نشانگرهای مولکولی (نشانگرهای دی ان ا و بیوشیمیائی) ..... ۱۱
۲-۱۰-۲-۱ نشانگرهای بیوشیمیائی ..... ۱۱
۲-۱۰-۲-۲ نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA ..... ۱۲
الف) نشانگرهای غیر مبتنی بر PCR ..... ۱۲
ب) نشانگرهای مبتنی بر PCR ..... ۱۳

ب-۱) روش‌های مبتنی بر PCR توالیهای غیر ویژه ..... ۱۳
ب-۲) روش‌های مبتنی بر PCR توالی‌های هدف ..... ۱۳
ب-۱-۱) دی ان ای چند شکل تکثیر شده تصادفی (RAPD)..... ۱۳
ب-۱-۲) چندشکلی طول قطعات حاصل از تکثیر (AFLP) ..... ۱۳
ب-۲) نشانگرهای مبتنی بر PCR توالی‌های ویژه..... ۱۴
ب-۲-۱) تفاوت‌های تک نوکلئوتیدی (SNP) ..... ۱۴
ب-۲-۲) توالی‌های تکراری ساده (SSR) ..... ۱۵
ب-۳) نشانگرهای مبتنی بر DNA غیر هسته‌ای..... ۱۷
ب-۴) نشانگرهای مولکولی مبتنی بر عناصر جابه‌جا شونده..... ۱۷
۲-۱۱ بیماری‌های مهم ویروسی توتون ..... ۱۸
۲-۱۱-۱ ویروس Y سیب‌زمینی Potato Virus Y (PVY) ..... ۱۸
۲-۱۱-۱-۱ خصوصیات فیزیکوشیمیایی ویروس ..... ۱۹
۲-۱۱-۱-۲ استراتژی ترجمه ..... ۲۰
۲-۱۱-۱-۳ تشکیل اندامک‌های ویژه ..... ۲۰
۲-۱۱-۱-۴ اپیدمیولوژی ویروس ..... ۲۰
۲-۱۱-۱-۵ نژادهای ویروس وای سیب‌زمینی ..... ۲۱
۲-۱۱-۱-۵-۱ نژاد N ..... ۲۱
۲-۱۱-۱-۵-۲ نژاد C ..... ۲۱
۲-۱۱-۱-۵-۳ نژاد O ..... ۲۲
۲-۱۱-۱-۶ نوترکیبی در ژنوم ویروس وای سیب‌زمینی..... ۲۲
۲-۱۱-۱-۷ حضور ویروس وای سیب‌زمینی در ایران..... ۲۲
۲-۱۱-۱-۸ کنترل بیماری ..... ۲۳
جدول ۲-۱ ژن‌های مقاومت غالب گیاهی در برابر ویروس ..... ۲۳
جدول ۲-۲ ژن‌های مقاومت مغلوب گیاهی در برابر ویروس ..... ۲۳
جدول ۲-۳ ژن‌های مقاومت کمی (QTL) گیاهی در برابر ویروس ..... ۲۴
۲-۱۱-۲ مهندسی ژنتیک گیاهان برای کنترل بیماری‌های ویروسی..... ۲۴
۲-۱۱-۲-۱ تراریخت‌های حامل PDR ..... ۲۴

۲-۱۱-۲-۲ تراریخت‌های حامل non- PDR ..... ۲۵
مکان‌یابی ژن ..... ۲۵
۲-۱۲ مکان‌یابی پیوستگی و عدم تعادل پیوستگی ..... ۲۵
۲-۱۲-۱ دقت و قدرت تفکیک AM ..... ۲۶
۲-۱۲ -۲ مراحل انجام نقشه‌یابی پیوستگی ..... ۲۹
۲-۱۲-۳ فاکتورهای موثر بر LD و AM ..... ۳۱
۲-۱۲-۴ تخمین LD با استفاده از نشانگرهای غالب و همبارز ..... ۳۳
۲-۱۲-۵ روش‌های مختلف برای انجام AM ..... ۳۵
۲-۱۲-۶ قدرت AM ..... ۳۶
۲-۱۲-۷ تاریخچه AM در گیاهان ..... ۳۶
۲-۱۲-۸ دسترسی به منابع و اطلاعات ژنومیک ..... ۳۷
۳-۱۲ پیشینه تحقیق ..... ۳۸
۳-۱ مواد گیاهی ..... ۴۱
۳-۱-۲ ارزیابی ملکولی ..... ۴۲
۳-۱-۲-۱ استخراج DNA ..... ۴۲
۳-۱-۲-۲ تعیین کیفیت وکمیت DNA ..... ۴۳
۳-۱-۲-۳ واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR) ..... ۴۳
۳-۱-۲-۴ تهیه ژل آگارز ..... ۴۴
۳-۱-۲-۵ الکتروفورز محصولاتPCR ..... ۴۵
۳-۱-۲-۶ تجزیه و تحلیل آماری داده‌های مولکولی ..... ۴۵
۳-۱-۳ ارزیابی سرولوژیکی ..... ۴۵
۳-۱-۳-۱ تهیه ویروس و تکثیر آن ..... ۴۵
۳-۱-۳-۲ مایه‌زنی گیاهان ..... ۴۶
۳-۱-۳-۳ نمونه برداری گیاهان آلوده ..... ۴۶
۳-۱-۳-۴ آزمون الایزا (ELISA) ..... ۴۶
۳-۱-۳-۴-۱ پوشش دادن چاهک‌های بشقابک با آنتی ژن (عصاره خام) ..... ۴۷
۳-۱-۳-۴-۲ افزودن آنتی‌بادی (IgG) در چاهک‌ها ..... ۴۷

۳-۱-۳-۴-۳ بلاکینگ (Blocking) ..... ۴۷
۳-۱-۳-۴-۴ افزودن آنتی‌ربیت در چاهک‌ها ..... ۴۸
۳-۱-۳-۴-۵ افزودن سوبسترا ..... ۴۸
۳-۱-۳-۵ ارزیابی نتایج آزمون الایزا ..... ۴۸
۳-۱-۳-۶ تجزیه و تحلیل آماری داده‌های الایزا ..... ۴۹
۳-۲ ارزیابی آماری تجزیه ارتباط داده‌های مولکولی و داده‌های الایزا ..... ۴۹
۴-۱ اطلاعات نشانگرها ..... ۵۱
۴-۱-۱ ارزیابی میزان تنوع ژنتیکی توتون‌های تیپ شرقی و نیمه شرقی ..... ۵۱
۴-۱-۲ ارزیابی مشابهت افراد ..... ۵۳
۴-۲ ارزیابی تنوع ژنتیکی میزان مقاومت ژنوتیپ‌های توتون به PVY ..... ۵۵
۴-۳ تجزیه ارتباط ..... ۵۸
۵-۱ نتیجه‌گیری کلی ..... ۶۴
۵-۲ پیشنهادات ..... ۶۶
فهرست منابع ..... ۶۷

فهرست اشکال و جداول

عنوان صفحه

شکل۲- ۱ شمای کلی ژنوم ویروس Y سیب‌زمینی (Riechman *et al*., 1992) ..... ۲۰
جدول ۲-۱ ژن‌های مقاومت غالب گیاهی در برابر ویروس ..... ۲۳
جدول ۲-۲ ژن‌های مقاومت مغلوب گیاهی در برابر ویروس ..... ۲۳
جدول ۲-۳ ژن‌های مقاومت کمی (QTL) گیاهی در برابر ویروس ..... ۲۴
شکل ۲-۲ مقایسه روش‌های مختلف تعیین مکان ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی براساس قدرت تفکیک‌پذیری، تعداد آلل، زمان مورد نیاز برای انجام مطالعه ..... ۲۸
شکل۲-۳ شمای طرح مکان‌یابی پیوستگی برای نشاندار کردن ژن مورد نظر ..... ۳۰
جدول۲-۴ مکان‌یابی پیوستگی و عدم تعدل پیوستگی مطالعه شده در گیاهان (Abdurakhmonov *et al*., 2008) ..... ۳۴
جدول ۳-۱ کد و نام ژنوتیپ‌های توتون تیپ شرقی و نیمه شرقی مورد مطالعه در واکنش به ویروس Y سیب زمینی ..... ۴۱
جدول ۳-۲ کد و نام ژنوتیپ‌های توتون تیپ شرقی و نیمه شرقی مورد مطالعه جهت بررسی تنوع ژنتیکی ۴۱
جدول ۳-۳ تهیه بافر استخراج DNA (حجم نهائی توسط آب دیونیزه به cc ۱۰۰رسانده و اتوکلاو شد.) .. ۴۲
جدول ۳-۴ تهیه بافر TE (حجم نهائی توسط آب دیونیزه به ۱۰cc رسانده می‌شود.) ..... ۴۳
جدول ۳-۵ برنامه PCR ..... ۴۳
جدول ۳-۶ نام، توالی و گروه لینکاژی ۲۸ آغازگر SSR بکاربرده شده ..... ۴۴
جدول ۳-۷ تهیه بافر 10x TBE (حجم نهائی توسط آب دیونیزه به 1000cc رسانده می شود.) ..... ۴۴
جدول ۳-۸ تهیه Formamide dye با حجم cc ۱۰۰ ..... ۴۵
شکل ۳-۱ دستگاه الیزا ریدر (Anthos ELISA reader model 2020)..... ۴۸
جدول ۴-۱ تعدادآلل، تعداد آلل مؤثر، هتروزیگوسیتی مورد انتظار و مشاهده شده و فراوانی آللی از ۲۸ آغازگر SSR بکار برده شده درانگشتنگاری ژنوتیپ‌های توتون ..... ۵۲
شکل۴-۱ نمونه تصویری از انگشت‌نگاری ژنوتیپ‌های توتون توسط آغازگر PT30008..... ۵۳
جدول ۴-۲ مقایسه روش‌های مختلف برای تولید ماتریس مشابهت و دندروگرام در ژنوتیپ‌های توتون ... ۵۳
شکل ۴-۲ دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های توتون با استفاده از روش UPGMA..... ۵۴

جدول ۴- ۳ تجزیه واریانس واکنش ارقام توتون شرقی و نیمه شرقی به ویروس PVY در شرایط کنترل شده ..... ۵۵

جدول ۴-۴ مقایسه میانگین واکنش به ویروس Y سیب‌زمینی در ۹۰ ژنوتیپ توتون با استفاده از آزمون توکی در سطح احتمال ۰/۰۵ ..... ۵۷

جدول ۴-۵ شناسائی نشانگرهای ریز ماهواره برای مقاومت به بیماری PVY در ژنوتیپ‌های توتون با استفاده از آنالیز تک نشانگر ..... ۵۹

جدول ۴-۶ شدت بیماری ژنوتیپ‌های توتون به ویروس Y سیب‌زمینی و نشانگرهای ریزماهواره پیوسته به مقاومت در آنها ..... ۶۰

# فصل اول

## مقدمه

## مقدمه

توتون (*Nicotiana tabacum* L.) مهم‌ترین محصول غیر غذائی در بخش کشاورزی در جهان و ایران بوده که در بیش از ۱۰۰ کشور جهان در حدود ۴/۲ میلیون هکتار از زمین‌های زراعی کشت می‌شود Davalieva). (2010 *et al*.,توتون هم چنین به عنوان یک مدل در اکثر مطالعات بیولوژی گیاهی و زراعت مولکولی برای تولید مواد تجاری مهمی نظیر داروهای پزشکی و واکسن‌ها مطرح می‌باشد. منابع ژنتیکی گیاهی بوسیله گیاهان یا بخش‌هائی از آنها با پتانسیل باززائی، دارای ارزش اقتصادی، علمی و یا اجتماعی برای بشریت عرضه می‌شوند. آنها یکی از با ارزش‌ترین منابع طبیعی هستند که تنوع ژنتیکی مورد نیاز برای کشاورزان و اصلاح‌گران را به منظور بدست آوردن ارقام جدید با عملکرد بالا، کیفیت بهتر یا سازگاری بیشتر به تنش‌های غیر زیستی یا مقاومت به حشرات و بیماری‌ها مهیا می‌کنند. بنابراین حفاظت و استفاده از منابع ژنتیکی گیاهی نقش مهمی در کشاورزی، امنیت غذائی و جنگلداری بازی می‌کند. فعالیت‌های حفاظت ژرم‌پلاسم شامل نگهداری، تشریح ویژگی‌ها و ارزیابی تنوع ژنتیکی می‌باشد. تشریح ویژگی‌ها، یک مرحله بسیار مهم است چون همانندی ژنتیکی هر یک از توده‌های بومی در کلکسیون ژرم پلاسم را تعیین می‌کند و نتیجتاً اطلاعات داده شده به کاربر، وابسته به این مرحله خواهد بود. تشریح ویژگی‌ها به جهت تشخیص توده‌های بومی و نیز پی بردن به رابطه‌ی ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها انجام می‌شود. با این حال پایه ژنتیکی محدود در ارقام زراعی یک مانع جدی جهت تقویت و توسعه تولید ارقام زراعی مطابق با آسیب‌پذیری ژنتیکی شدید توسط تنش های جدید زیستی و غیر زیستی می‌باشد (Esbroeck *et al*., 1999). ویروس Y سیب‌زمینی (*Potato virus Y; PVY*) یکی از شایع‌ترین و گسترده‌ترین ویروس‌های گیاهی در بین ۷۸ گونه از خانواده *Potyviridae* و جزو پنج ویروس مخرب در جهان محسوب می‌شود. این ویروس یکی از مهم‌ترین و مخرب-ترین عامل بیماری ویروسی در توتون بوده که از مدتها قبل در مناطق مختلف ایران و جهان مشخص شده است و به عنوان تهدید جدی در تولید این گیاه محسوب می‌شود. رگبرگ روشنی (Vein clearing) و نواری شدن رگبرگ (vein banding) از علائم این بیماری در توتون می‌باشد (De Bokx *et al*., 1981). هم چنین PVY می‌تواند علائم نکروزه در بافت‌های آلوده (به عنوان مثال برگ توتون) ایجاد کند که علاوه بر کاهش عملکرد با توجه به وضعیت آلوده میزبان، تأثیر سوء روی کیفیت محصول نیز خواهد گذاشت. کنترل بیماری از طریق پیشگیری از گسترش ویروس براساس روش‌های مختلف از جمله کنترل شیمیائی ناقل ویروس، از بین بردن منابع آلودگی و اصلاح ارقام مقاوم انجام می‌شود (Whitworth *et al*., 2009)، ولی مقاومت ژنتیکی میزبان در برابر PVY به منظور محدود کردن اثرات آن در مزارع نسبت به دیگر روش‌ها ترجیح داده می‌شود (Lacroix *et al*., 2010). استفاده از ارقام مقاوم یکی از راهکارهای اصلی کاهش خسارت ناشی از تنش‌های زیستی در گیاهان است و لازمه تولید چنین ارقامی شناسائی، جداسازی و مکان‌یابی ژن‌های مقاومت به بیماری است. مهم‌ترین هدف به‌نژادگران تعیین اساس ژنتیکی صفات پیچیده مهم اقتصادی محسوب شده که بطور وسیعی با استفاده از مکان‌یابی QTL[1] انجام شده است. امروزه تلاش‌ها به سمت استفاده از مکان‌یابی

[1] Quantitative Trait Loci

پیوستگی[1] (AM) متمرکز شده است که ابتدا در بیماری‌های ژنتیکی انسان بکار گرفته شد (Mackay and Powell, 2006). برای گزینش گیاهان مقاوم در داخل جمعیت در حال تفرق استفاده از نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن‌های مقاومت پیشنهاد شده است (Whitworth *et al*., 2009). با کشف و گسترش نشانگرهای مولکولی تعداد نقشه‌های پیوستگی مرتبط با توتون همانند سایر گیاهان به صورت نمائی در حال افزایش است. جمعیت، نشانگر و تجزیه آماری سه جنبه مکان‌یابی پیوستگی را تشکیل می‌دهند. این سه جنبه در طول زمان تکامل تدریجی داشته‌اند. امروزه ساخت نقشه‌های پیوستگی توسط تعداد زیادی از نشانگرهای مولکولی با استفاده از جمعیت‌های مختلف و تجزیه آماری توسط نرم‌افزارهای مختلف موجود در این زمینه صورت می‌پذیرد. در مطالعه‌ای توسط Bindler و همکاران (۲۰۰۶)، اولین نقشه لینکاژی توتون بوسیله‌ی ۶۳۷ جفت آغازگر نشانگر ریزماهواره و توسط همین گروه (۲۰۱۱) دومین نقشه لینکاژی توتون تهیه شد. بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان مورد مطالعه در این تحقیق با استفاده از ۲۷۸ جفت آغازگر از مجموعه‌ی لینکاژی Bindler و همکاران (۲۰۰۶) بررسی گردید. مطالعه ژرم‌پلاسم توتون توسط نشانگرهای مختلف مانند نشانگرهای SSR توسط (Bindler *et al*., 2007; 2011; Davalieva *et al*., 2010; Moon *et al*., 2008; 2009) نشانگرهای AFLP توسط (Denduangboripant *et al*., 2010; Liu *et al*., 2009; Raju *et al*., 2008) نشانگرهای RAPD توسط (Qayyamkhan and Narayan, 2006; Sarala and Rao, 2008) و نشانگرهای IRAP و ISSR توسط (Yang *et al*., 2007) مورد بررسی قرارگرفته است. نتایج مختلف و متفاوتی از این تحقیقات منتشر شده است که به دلیل جمعیت گیاهی متفاوت مورد بررسی می‌باشد. نتایج منتشرشده توسط یانگ (2007) اشاره به سطح پائین چندشکلی در توتون‌های مورد بررسی می‌باشد، در حالیکه نتایج منتشر شده توسط Davalieva و همکاران (۲۰۱۰) سطح بالای چندشکلی را در توتون‌های بومی جمهوری مقدونیه نشان داد. اخیراً نشانگرهای ملکولی مبتنی بر رتروترنسپوزون‌ها مانند SSAP[2] (Waugh *et al*., 1997)، IRAP[3] و REMAP[4] (Kalendar *et al*., 2006) و RBIP[5] (Flavell *et al*., 1998) معرفی شده‌اند که گستردگی، توزیع وسیع و تصادفی آنها در ژنوم و کروموزوم‌های گیاهی و چندشکلی درجی[6] آنها در بین و داخل گونه‌های گیاهی، استفاده از آنها را به عنوان نشانگرهای ملکولی برای انجام مطالعات مختلف از جمله ارزیابی تنوع ژنتیکی، انگشت‌نگاری ژنوتیپ‌ها، تعیین روابط تکاملی و حتی تهیه نقشه‌های پیوستگی بسیار ایده‌آل می‌سازد (Sabot and Schulman, 2006). نشانگرهای مبتنی بر رتروترنسپوزون‌ها در توتون چندان کار نشده‌اند به جز IRAP که توسط Yang و همکاران (۲۰۰۷) بکار رفته است. توسعه‌ی اخیر صدها نشانگر ریزماهواره در توتون توسط Bindler و همکاران (۲۰۰۷ و ۲۰۱۱)، راهی را برای آنالیز تنوع ژنتیکی مولکولی و تهیه نقشه ژنتیکی در این گیاه باز کرده است. ولی علیرغم این اهمیت منابع نشانگرهای مولکولی برای آنالیز ژنومی و نقشه‌یابی ژنتیکی و اصلاح این گیاه مهم

[1] Association Mapping
[2] Sequence Specific Amplified Polymorphism
[3] Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism
[4] Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism
[5] Retrotransposon-Based Insertion Polymorphism
[6] Insertional Polymorphism

دارای محدودیت است و از این رو ارزیابی ژنتیکی این گیاه بسیار مهم بوده و راهگشای بسیاری از مسائل مربوط در مورد این گیاه زراعی- صنعتی و مدل آزمایشگاهی و حتی داروئی خواهد بود (Bindler *et al.*,). در 2011) *N. tabacum*، مقاومت نسبی به PVY توسط چندین آلل مغلوب به نام (*va*, *va*1, *va*2,…) ''*va*'' که بر روی کروموزوم E قرار دارند کنترل می‌شود اما اطلاعات کافی از چگونگی اثر این ژن هنوز در دسترس نیست و چندین اینبرد لاین (PBD6 , ITB32 ,TN86) مقاومت نسبی به PVY نشان داده‌اند (Julio *et al.*, 2006; Yamamoto, 1992). بررسی تنوع ژنتیکی مقاومت توتون نسبت به این ویروس یک دستاورد مهم جهت معرفی ژن(های) مقاومت درون ژنوتیپ‌های قابل انتظار و استفاده از آنها در مقاومت به ویروس در برنامه‌های اصلاحی تلقی می‌شود. با شناسائی ژن‌های گیاهی مقاوم در برابر بیماری از آن می‌توان درگزینش به کمک نشانگرهای مولکولی MAS (Markers Assisted Selection) استفاده نمود که این عمل امکان گزینش سریع و دقیق ژنوتیپ‌های مطلوب را در مراحل اولیه رشد فراهم می‌نماید. ناحیه تکثیر شونده با ردیف مشخص یا اسکار (SCAR) نشانگرهای پیوسته با مقاومت به PVY و مقاومت در برابر پوسیدگی سیاه ریشه مشخص شده‌اند (Julio *et al.*, 2006). چندین نشانگر مرتبط با ژن مقاومت به بیماری در توتون شامل نشانگرهای RAPD پیوسته با ژن مقاومت به بیماری پوسیدگی سیاه ریشه به نام (Noguchi *et al.*, 1999; Bai *et al.*, 1995)، پیوسته با ژن *'Ph'* مقاوم به بیماری ساقه سیاه (Johnson *et al.*, 2002) و ژن مقاومت به نماتد گره ریشه *'Rk'* (Julio *et al.*, 2006) گزارش شده است. Julio و همکاران (۲۰۰۶) پیوستگی چندین نشانگر AFLP را به ژن(ها) دخیل در مقاومت به برخی بیماری‌ها در ژنوتیپ‌های مختلف توتون شامل PVY، سفیدک داخلی(کپک آبی رنگ) و پوسیدگی سیاه ریشه (Black root rot) گزارش گردند. آنها نشان دادند که درجه اطلاعاتی که هر نشانگر حمل می‌کند مطابق با مقاومت به بیماری یا تیپ توتون است بطوریکه هیچ ژنوتیپی از توتون توسط یک نشانگر برگزیده شناسائی نگردید.

هدف از انجام تحقیق:

۱. بررسی واکنش ژنوتیپ‌های مختلف توتون‌های شرقی و نیمه شرقی در مقابل عامل بیماری ویروسی
۲. بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف توتون‌های شرقی و نیمه شرقی
۳. شناسائی نشانگرهای مولکولی پیوسته با مقاومت به ویروس Y سیب‌زمینی در ارقام توتون

# فصل دوم

## کلیات و بررسی منابع

## توتون

### ۲–۱ تاریخچه توتون

توتون گیاهی است متعلق به دنیای جدید، زیرا در سال ۱۴۹۲ میلادی پس از کشف قاره آمریکا توسط کریستف کلمب و در جزیره گواناهانی از مجمع الجزایر باهاما در قاره آمریکا شناخته شد و پس از آن به سایر کشورها راه یافته است. توتون نخستین بار در سال ۱۵۴۸ میلادی توسط پرتغالی‌ها در کشور برزیل کشت گردید، آنگاه در سال ۱۵۵۶ میلادی توسط سفیر فرانسه در پرتغال به نام ژان نیکوت به فرانسه برده شد و به افتخار این شخص جنس توتون، نیکوتیانا و آلکالوئید آن نیکوتین نام گرفت.

با حمله پرتغالی‌ها به ایران و در خلال اشغال صد ساله جزیره هرمز به دست آنان، ایرانیان با توتون آشنا شدند. قدر مسلم این که توتون در زمان صفویه به ایران وارد شد.

### ۲–۲ گیاه‌شناسی

توتون گیاهی است چندساله متعلق به خانواده بادنجانیان (*Solanacae*) که جنس آن در سال ۱۷۵۳ میلادی توسط لینه *Nicotiana* نامگذاری گردید. طبقه‌بندی‌های مختلفی روی توتون صورت گرفته است که کاملترین آن توسط دانشمندی به نام Good speed در سال ۱۹۵۴ میلادی با در نظر گرفتن عوامل متعددی از قبیل خصوصیات مورفولوژیکی گونه‌ها، توزیع جغرافیائی و خصوصیات سیتولوژیکی ارائه شده است. این جنس به ۳ زیرجنس *Rustica*، *Tabacum* و *Petunioides* و ۶۴ گونه‌ی علفی و درختچه‌ای تقسیم می‌شود (Denduangboripant *et al*., 2010). هیبریدهای بین و داخل گونه‌ای ممکن می‌باشد اما موانع ژنتیکی، کروموزومی و سیتوپلاسمی برای هیبریداسیون بین بعضی از گونه‌ها نیز وجود دارد. تقریباً تمام توتون کشت شده در جهان متعلق به گونه‌ی *N. tabacum* می‌باشد. تا حدودی نیز گونه‌ی *N. rustica* به صورت تجاری کشت می‌شود (Raju *et al*., 2008). این دو گونه، آمفی دیپلوئید طبیعی (۲n=۴x=۴۸) بوده که از تلاقی دو گونه دیپلوئید، *N. sylvestries* و *N. tometosiformis* هر کدام با ۲۴ کروموزوم و دو برابر شدن کروموزوم های هیبرید حاصل از آنها بدست آمده‌اند.

### ۲–۳ نیاز اکولوژیکی

توتون در اقلیم‌های مختلف قابلیت رشد را دارد ولی به منظور افزایش عملکرد بایستی در مناطق گرم کشت شود. درجه حرارت خاک نقش عمده ای در رویش بذر توتون دارد. دمای مطلوب برای جوانه‌زنی بذر توتون ۲۵ تا ۲۷ درجه سلسیوس است. نور سبب افزایش مقدار آلکالوئیدهای برگ توتون می‌شود. آب فراوان اگر چه سبب افزایش عملکرد برگ می‌شود ولی با کاهش نیکوتین و پروتئین برگها همراه است. برای تهیه توتون سیگارت باید از خاکهائی با بافت سبک استفاده کرد. pH خاک بین ۵/۲ تا ۷ برای کشت توتون مناسب است.

## ۲–۴ کاشت، داشت و برداشت

کاشت و تکثیر توتون توسط بذر و بطور غیر مستقیم انجام می شود. رویش گیاه توتون شامل دو مرحله است:

مرحله اول، از بدو رویش بذر تا تشکیل دومین برگهای حقیقی که کلاً ۱۲ تا ۱۵ روز طول می‌کشد. تنظیم درجه حرارت خزانه (بین ۲۰ تا ۳۰ درجه سانتی گراد) و آبیاری باید مورد توجه قرار گیرد. مرحله دوم، از بدو تشکیل سومین برگ حقیقی تا انتقال نشاءها به زمین اصلی است این مرحله ۲۵ تا ۳۰ روز بطول می‌انجامد رویش گیاه در این مرحله سریعتر از مرحله اول است در این مرحله گیاهان به آب زیادی نیاز دارند. زمانی که نشاءها پنج برگی شدند می توان آنها را به زمین اصلی منتقل کرد. برای افزایش کمیت و کیفیت توتون (مزه و بو و خاصیت سوزش) پس از تشکیل گل باید آن را از ناحیه زیر گل‌آذین به همراه دو تا سه برگ قله‌ای قطع کرد این عمل را گل‌زنی می گویند عمل گل‌زنی سبب می شود تا برگها بزرگتر شده و سریعتر به اندازه نهائی خود برسند زمان مناسب برای گل‌زنی هنگامی است که ۵۰ درصد گیاهان به غنچه رفته باشند. گل‌زنی در توتون‌های تیپ شرقی معمول نیست.

در خزانه به منظور جلوگیری از رشد و توسعه علف‌های هرز و همچنین از بین رفتن عوامل بیماری‌زا، خاک خزانه را باید با موادی مانند واپام[1] یا متیل بروماید[2] و همچنین با استفاده از قارچ کش‌هائی مانند فوندازول[3] به مقدار ۲ گرم در هر متر مربع ضد عفونی کرد. مهمترین مرحله داشت در مزرعه، کنترل علفهای هرز می باشد. توتون مورد حمله آفات عمومی زیادی مثل تریپس توتون، کرم اگروتیس، شته سیاه باقلا، کرم غوزه پنبه و غیره قرار میگیرد.

نماتد مولد غده ریشه توتون و تنباکو از عوامل بیماریزا در این محصولات بوده و در نواحی توتون و تنباکوکاری شمال و شمال غرب کشور خسارت قابل توجهی را وارد می سازد. مبارزه با نماتدها با استفاده از نماتدکش‌هایی چون پوسن و فورتنوم انجام می‌گیرد. برگها ممکن است تحت تاثیر عوامل متعدد اقلیمی مانند تاخیر در کاشت، سرد بودن هوا، بارندگی زیاد و یا ازت فراوان با تاخیر برسند و یا ممکن است رویش گیاهان با سرمای پائیز مواجه و دچار سرمازدگی شوند.

## ۲–۵ توالی یابی ژنوم و ESTها در توتون

Bindler و همکاران (۲۰۱۱) ۵۱۱۹ نشانگر ریزماهواره جدید و عملکردی را در ژنوم گیاه توتون شناسایی نموده و نقشه ژنتیکی دقیقی را برای ژنوم توتون تتراپلوئید تهیه کردند. این نقشه ژنتیکی با استفاده از یک جمعیت *F2* حاصل از تلاقی دو والد Hicks Broadleaf × Red Russian تولید شده است. با توسعه این منبع نشانگری، کارهای مختلف از قبیل اصلاح مولکولی توتون تا آنالیز مقایسه‌ای ژنوم فراهم شده است. بر اساس تلاش‌های صورت گرفته تا به حال بیش از ۹۰ درصد ژنوم توتون شامل چهارچوب‌های باز خواندن با استفاده از تکنولوژی متیل فیلتریشن با تاکید بر هدف‌گذاری نواحی غنی از ژن‌های غیرمتیله،

[1] Vapam
[2] Methyl Bromide
[3] Fundazol

توالی یابی شده است. تعداد ۱۳۷۹۰۶۷ سطر، توالی و EST ۵۵۴۱۱ از توالی ژنوم توتون بدست آمده است که برای ارائه ی توالی ریزماهواره‌ها و نیز برای ایجاد ۵۵۰۰ مکان SSR کاندید، استفاده شده‌اند (Bindler *et al.*, 2011).

## ۲-۶ تیپ‌های مختلف *N. tabacum*

*N. tabacum* در اثر عواملی چون موتاسیون و هیبریداسیون (طبیعی یا مصنوعی)، تیپ‌های مختلفی را بوجود آورده است که هر کدام از این تیپ‌ها دارای واریته‌های مختلفی می‌باشند. متداولترین و مرسوم‌ترین نوع طبقه‌بندی در ایران براساس تیپ رشدی می‌باشد که به ۳ تیپ غربی، شرقی و نیمه‌شرقی تقسیم بندی می‌گردد.

### ۲-۶-۱ توتون‌های تیپ غربی شامل دسته‌های ویرجینیا، بارلی، مریلند و کنتاکی می‌باشد

#### ۲-۶-۱-۱ دسته ویرجینیا یا برایت یا Flue-cured (Virginia tobacco)

علت اینکه به توتون‌های این دسته لفظ گرمخانه‌ای اطلاق می‌شود به خاطر اینست که در دهه ۱۸۳۹ توسط یکی از کشاورزان کارولینای شمالی خشک کردن این دسته از توتون‌ها به طور تصادفی از طریق لوله‌های آب گرم فلزی، ابداع گردید. درصد قند بالا و مقدار نیکوتین نسبتاً زیاد از خصوصیات این نوع توتون-ها است.

نام **Flue-cured** از روش ویژه‌ی عمل آوری توتون مشتق شده است که برای تولید رنگ لیمویی تا نارنجی برگ‌های توتون با میزان قند بالا مورد استفاده قرار می گیرد. عمل آوری (curing) مرحله‌ای برای خشک کردن توتون‌های تازه برداشت شده با دمای کنترل شده و رطوبت برنامه ریزی شده بصورتی است که کیفیت ذاتی برگها را در طول مدت خشک کردن حفظ نماید. عمل آوری توسط لوله در انبارهای بنا شده‌ی محکم و با دمای شروع ۳۵ درجه سلسیوس و دمای پایان ۷۵ درجه سلسیوس به مدت ۷-۵ روز انجام می شود.

مرحله‌ی آغازین و بسیار مهم از عمل‌آوری توتون‌ها توسط لوله، زرد شدن است که در طی این مرحله کلروفیل تخریب شده و اغلب کربوهیدرات‌ها به قندهای ساده تبدیل می‌شوند. توتون‌های **Flue-cured** دارای رایحه‌ی شیرینی می باشند که در نتیجه‌ی میزان قند بالا بود و یک طعم ملایم اسیدی دارند. به دلیل وجود این ویژگی‌ها، توتون‌های **Flue-cured** به خوبی با انواع دیگر توتون‌ها همچون بارلی مریلند یا شرقی مخلوط شده و تولید یک دود نرم و مطبوع در سیگارت‌ها می‌نمایند. توتون‌های **Flue-cured** بخش اصلی سیگارت‌های ترکیبی می‌باشند.

#### ۲-۶-۱-۲ دسته بارلی (Burley tobacco)

بافت برگ این توتون‌ها متخلخل، ظریف و محتوی نیکوتین زیاد و دارای درصد قند خیلی کم می‌باشد. توتون‌های این دسته به طریقه هواخشک عمل‌آوری می‌گردند.

**۲-۶-۱-۳ دسته مریلند (Maryland tobacco)**

توتون‌های این دسته حاصل تلاقی بین ویرجینیا و برازیلین‌سیس می‌باشد. توتون‌های مریلندی باریک برگ و طویل هستند. عمل‌آوری این دسته از توتون‌ها به طریقه هواخشک انجام می‌شود.

**۲-۶-۱-۴ دسته کنتاکی (Kentuky tobacco)**

توتون‌هائی هستند با برگ‌های بزرگ و تیره که میزان نیکوتین آنها از دسته ویرجینیا بیشتر می‌باشد و به طریقه آتش خشک عمل‌آوری می‌شوند.

**۲-۶-۲ توتون‌های تیپ شرقی (Oriental tobacco)**

توتون‌های این تیپ دارای برگ‌های کوچک و ظریف همراه با عطر و طعم مطبوع (در برگ عمل‌آوری شده) می‌باشند. توتون‌های شرقی و عموماً باسما در مقابل کم آبی مقاومت داشته و روی زمین‌های شیب دار و تپه‌ها رشد خود را به خوبی ادامه می‌دهند. از نظر نحوه عمل‌آوری، آفتاب خشک بوده ولی در شرایطی که ساعات آفتابی در طول روز کافی نباشد (شمال ایران) از روش گرمخانه‌ای استفاده می‌شود.
Flue-cured و شرقی تنها توتون‌هایی هستند که برگشان در چند چین برداشت می‌شوند و این برداشت از پایین به بالا انجام می شود. یکی از فاکتورهای بسیار مهم در تولید سیگار درجه رسیدگی برگ موقع برداشت است. برگ‌های رسیده بوی مطبوعی را ایجاد می‌کنند در حالیکه برگ‌های نارس دارای رایحه و عطر کمی می‌باشند. رگبرگ اصلی برگ از سبز روشن به شیری رنگ تغییر رنگ داده که این تغییرات رنگها راهنمای اساسی در رسیدگی برگ می‌باشند

**۲-۶-۳ توتون‌های تیپ نیمه شرقی (Semi - oriental tobacco)**

این توتون‌ها معمولاً از تلاقی بین گونه‌های تیپ شرقی و غربی بوجود آمده‌اند که از نظر اندازه برگ، عطر و طعم، نیکوتین و سایر خصوصیات شیمیائی حد واسط بین توتونهای غربی و شرقی می‌باشند.

## ۲-۷ تنباکو

تنباکو همانند توتون از خانواده *Solanaceae* و جنس *Nicotiana* بوده و برحسب شکل ظاهری و خصوصیات مورفولوژیکی و سایر خصوصیات به چهارگونه تقسیم می شود که دو گونه آن بنام‌های *N. tabacum* و *N. rustica* در ایران کشت می‌گردد. تنباکوی مورد کاشت در استان‌های بوشهر، خراسان، شهرهای خوانسار، خمین، گلپایگان، لار، گله دار فارس از گونه *N. rustica* L. و در سایر مناطق مورد کاشت شامل اصفهان، خمینی شهر، کاشان، سروستان، جهرم، هکان و شاهرود از گونه *N. tabacum* L. می باشد.