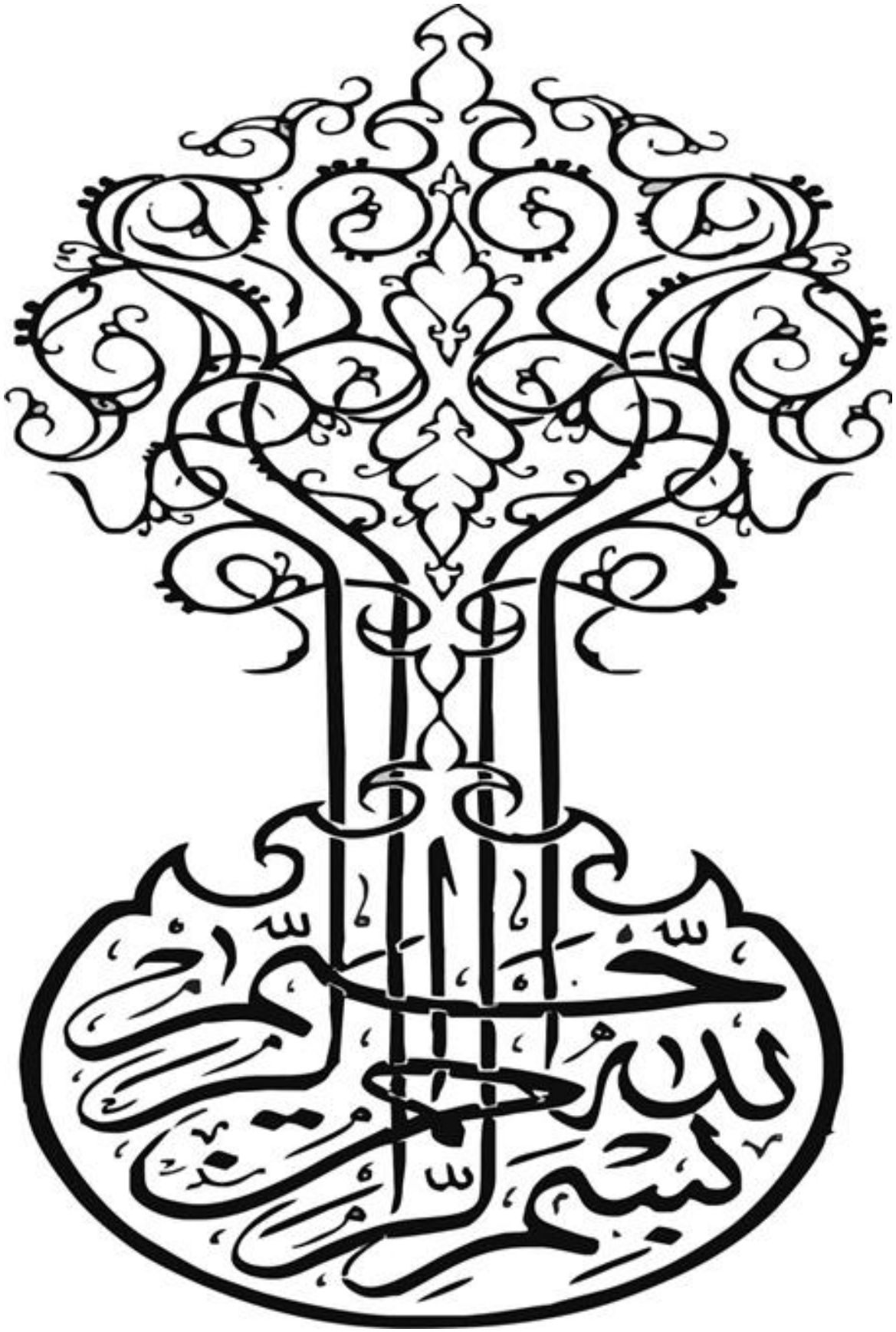
بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده علوم کشاورزی
گروه بیوتکنولوژی
(بیوتکنولوژی در کشاورزی)

عنوان:

بررسی تنوع ژنتیکی انواع مختلف توتون (*Nicotiana tabacum* L.) با استفاده از نشانگرهای مولکولی

از:

سیده فاطمه حسنی تسیه

استاد راهنما:

دکتر حبیب الله سمیع زاده لاهیجی

استاد مشاور:

مهندس مرداویج شعاعی دیلمی

اسفند ۱۳۹۱

تقدیم به حضور گرانقدر:

پدر و مادر عزیز، دلسوز و فداکارم که در دوران مختلف زندگی روشنگر راه من در سختی‌ها بوده و

با مهربانی چگونه زیستن را به من آموخته‌اند.

به همسرم، همدلی که در طول تحصیل همراه و همگام من بوده است و مرا در رسیدن به

اهداف عالی یاری می‌رساند.

به آنان که در راه کسب دانش راهنمایم بوده‌اند.

می ستایم خدایی راکه لایق ستایش است و داشتش جبران همه نداشتن هاست.

از استادراهنمای محترم، جناب آقای دکتر حبیب الله سمیع زاده لایجی که همواره بار، نمودهای ارزنده و زحمات بی دریغ، راهنمای تحقیقاتم بودند کمال تشکر رادارم.

از استادمشاور محترم جناب آقای مهندس مرداویج شعاعی دیلمی که مراصمیمانه ومشفقانه یاری دادند، خالصانه تشکر می نمایم.

از اساتید محترم داور آقایان دکتربابک ربیعی و دکترمحمد مهدی سوهانی که زحمت بازخوانی پایان نامه رابرعهده داشتند، تشکر می نمایم.

ازمدیر محترم گروه بیوتکنولوژی آقای دکتر حسن حسنی تشکر می کنم.

ازاعضای محترم هیئت علمی گروه بیوتکنولوژی که ازمحضرپرفیض تدریسشان بهره هابرده ام، مسئول محترم آزمایشگاه بیوتکنولوژی وکارکنان محترم دانشکده کشاورزی تشکرم.

از جناب آقای مهندس محمد محسن زاده که از راهنمایی های ارزنده ایشان استفاده نمودم، سپاسگزارم.

ازمدیریت وکارکنان محترم مؤسسه ی تحقیقات توتون رشت بی نهایت سپاسگزارم.

ازدوستان وهم کلاسی های خوبم خانم هاژاله حکمتی، حمیده کاروانکش، مینا خوشبخت، هاایزددوست، حمیده طاهری، طاهره فتحی، آرمینه حیدریان، فاطمه چمنی وآقایان محسن ایمان زاده، علی مبارکی، تقی مؤذن زاده، یونس میرزایی، یعقوب احمدیوسفی تشکر می کنم.

ازهمه ی کسانی که به نوعی مرادر به انجام رساندن این مهم یاری نموده اند، سپاسگذارم.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

چکیده فارسی ..... چ
چکیده انگلیسی ..... ح
مقدمه ۱

فصل اول: کلیات و بررسی منابع

۱-۱-تاریخچه ی توتون ۵
۱-۲- خصوصیات گیاه‌شناسی توتون ۶
۱-۲-۱- تقسیم بندی توتون‌ها از نظر عمل آوری و جغرافیایی ۷
۱-۳- تنوع ژنتیکی و لزوم بررسی آن ۸
۱-۴- نشانگرهای DNA ۹
۱-۴-۱- کاربردهای نشانگرهای DNA ۱۰
۱-۵- ویژگی‌های نشانگر برتر ۱۱
۱-۶- اجزای جابه‌جا شونده‌ی ژنوم ۱۱
۱-۶-۱- رتروترانسپوزون‌ها ۱۲
۱-۶-۱-۱- انواع رتروترانسپوزون‌ها ۱۳
۱-۶-۱-۲- توزیع رتروترانسپوزون‌ها ۱۶
۱-۶-۱-۳- چرخه‌ی جابه‌جایی رتروترانسپوزون‌ها ۱۷
۱-۶-۱-۴- منشأ رتروترانسپوزون‌ها و روند تکاملی آن‌ها ۱۸
۱-۶-۱-۵- تاثیر تنش‌ها در فعالیت رتروترانسپوزون‌ها ۱۸
۱-۶-۱-۶- جهش‌های ناشی از فعالیت رتروترانسپوزون‌ها ۱۹
۱-۷-رتروترانسپوزون‌ها به‌عنوان نشانگرهای مولکولی ۱۹
۱-۷-۱- نشانگر S-SAP ۲۲
۱-۷-۲- نشانگر RBIP ۲۲
۱-۷-۳- نشانگرهای IRAP و REMAP ۲۳
۱-۷-۴- نشانگر IMP ۲۴
۱- ۸- DNAی تکراری ۲۵
۱-۹- نشانگرهای مولکولی ISSR ۲۶
۱-۱۰- مروری بر تحقیقات انجام شده ۲۸

فصل دوم : مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد گیاهی ۳۲
۲-۲- کاشت نمونه‌های بذری و نمونه‌برداری ۳۳
۲-۳- استخراج DNA ۳۴

۲-۴- تعیین کیفیت و کمیت DNA ۳۶
۲-۵- رقیق سازی DNAی ژنومی استخراج شده ۳۷
۲-۶- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ۳۸
۲-۶-۱- برنامه‌ی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ۳۹
۲-۷- الکتروفورز ۴۰
۲-۸- روش‌های آماری برای تجزیه و تحلیل داده‌ها ۴۱
۲-۸-۱- نمره‌دهی نوارها ۴۱
۲-۸-۲- اندازه‌گیری فواصل و تشابه‌های ژنتیکی ۴۱
۲-۸-۳- تجزیه واریانس مولکولی ۴۲
۲-۸-۴- تجزیه خوشه‌ای ۴۲
۲-۸-۵- ضریب همبستگی کوفنتیک ۴۲
۲-۸-۶- تجزیه تابع تشخیص ۴۳
۲-۸-۷- تجزیه به مختصات اصلی ۴۳
۲-۸-۸- معیارهای تنوع ۴۳
۲-۸-۸-۱- محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) ۴۴
۲-۸-۸-۲- شاخص نشانگر (MI) ۴۴
۲-۸-۸-۳- سودمندی نشانگر ۴۵
۲-۸-۸-۴- شاخص شانون ۴۵
۲-۸-۸-۵- تنوع ژنتیکی نی ۴۵
۲-۸-۸-۶- معیار تمایز ژنی ۴۵
۲-۸-۹-۷- جریان ژنی ۴۶

فصل سوم : نتایج و بحث

۳-۱- تعداد نوار مشاهده شده و درصد چندشکلی نشانگرهای ISSR، IRAP و REMAP ۴۸
۳-۲- محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) نشانگرها ۵۲
۳-۳- بررسی تنوع ژنتیکی درون جمعیتی ۵۵
۳-۴- تنوع ژنتیکی بین تیپ‌ها ۵۶
۳-۵- تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) ۵۸
۳-۶- فاصله ژنتیکی و تجزیه خوشه‌ای ۵۹
۳-۷- تجزیه تابع تشخیص ۶۴
۳-۸- تجزیه به مختصات اصلی ۷۱
۳-۹- مقایسه‌ی نتایج حاصل از روش‌های مختلف گروه‌بندی ۷۶
۳-۱۰- نتیجه گیری کلی ۷۸
۳-۱۱- پیشنهادها ۷۹
منابع ۸۰

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱- میزان تولید برگ خشک توتون بر اساس آمار سازمان خواربار جهانی ۶
جدول ۱-۲- میزان سطح زیرکشت توتون بر اساس آمار سازمان خواربار جهانی ۶
جدول ۲-۱- اسامی ژنوتیپ‌های توتون مورد مطالعه ۳۲
جدول ۲-۲- ترکیب بافرهای مورد استفاده جهت استخراج DNA ۳۵
جدول ۲-۳- مقادیر مواد تشکیل دهنده‌ی بافر ۱ لیتری TAE 10X و TBE 5X (pH= ۸/۳-۸/۵) ۳۶
جدول ۲-۴- اجزای تشکیل‌دهنده‌ی بافر بارگذاری 6X ۳۷
جدول ۲-۵- مواد مورد نیاز با حجم و غلظت مربوطه جهت انجام واکنش PCR ۳۹
جدول ۲-۶- برنامه‌ی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ۳۹
جدول ۲-۷- مشخصات آغازگرهای ISSR، IRAP و REMAP مورد استفاده در این مطالعه ۴۰
جدول ۳-۱- مشخصات آغازگرهای ISSR مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های توتون مورد مطالعه ۵۱
جدول ۳-۲- مشخصات آغازگرهای IRAP و REMAP مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های توتون مورد مطالعه ۵۱
جدول ۳-۳- محتوای اطلاعات چندشکل (PIC)، نسبت چندگانه‌ی موثر (EMR) و شاخص نشانگر (MI)، در جایگاه ISSR در ژنوتیپ‌های توتون مورد مطالعه ۵۲
جدول ۳-۴- محتوای اطلاعات چندشکل (PIC)، نسبت چندگانه‌ی موثر (EMR) و شاخص نشانگر (MI)، در جایگاه IRAP و REMAP در ژنوتیپ‌های توتون مورد مطالعه ۵۴
جدول ۳-۵- تعداد آلل موثر، تنوع ژنی نی و شاخص شانون در جایگاه ISSR در ژنوتیپ‌های توتون مورد مطالعه ۵۵
جدول ۳-۶- تعداد آلل موثر، تنوع ژنی نی و شاخص شانون در جایگاه IRAP و REMAP در ژنوتیپ‌های توتون مورد مطالعه ۵۶
جدول ۳-۷- هتروزیگوسیتی کل (H_T)، هتروزیگوسیتی درون تیپ‌ها (H_S)، ضریب تمایز ژنی (F_{ST}) و جریان ژنی (N_M) در ژنوتیپ‌های توتون مورد مطالعه ۵۸
جدول ۳-۸- ضریب همبستگی بین شاخص‌های تنوع مورد مطالعه ۵۸
جدول ۳-۹- تجزیه واریانس مولکولی برای تیپ‌های مختلف توتون مورد مطالعه ۵۹
جدول ۳-۱۰- تشابه ژنتیکی و فاصله ژنتیکی نی تیپ‌های مختلف توتون مورد مطالعه ۶۳
جدول ۳-۱۱- توابع تشخیص کانونی حاصل از تجزیه تشخیص خطی فیشر بر اساس گروه‌بندی اولیه حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۶۵
جدول ۳-۱۲- نسبت موفقیت افراد درون گروه‌ها با تابع تشخیص با استفاده از داده‌های حاصل از نشانگر ISSR ۶۷
جدول ۳-۱۳- نسبت موفقیت افراد درون گروه‌ها با تابع تشخیص با استفاده از داده‌های حاصل از نشانگرهای IRAP و REMAP ۶۹
جدول ۳-۱۴- نسبت موفقیت افراد درون گروه‌ها با تابع تشخیص با استفاده از ترکیب داده‌های حاصل از نشانگرهای ISSR، IRAP و REMAP ۷۱
جدول ۳-۱۵- درصد واریانس و درصد تجمعی برای ۱۵ مولفه‌ی اول ۷۶

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱- ساختار انواع رترو ترانسپوزون‌ها ۱۴
شکل ۱-۲- نحوه‌ی تکثیر روش‌های نشانگری مبتنی بر نواحی رتروترانسپوزونی ژنوم (S-SAP) ۲۲
شکل ۱-۳- نحوه‌ی تکثیر روش‌های نشانگری مبتنی بر نواحی رتروترانسپوزونی ژنوم (RBIP) ۲۳
شکل ۱-۴- نحوه‌ی تکثیر روش‌های نشانگری مبتنی بر نواحی رتروترانسپوزونی ژنوم ۲۴
شکل ۱-۵- انواع مختلف آغازگرهای تعریف شده برای شناسایی نواحی ریزماهوارکی ۲۷
شکل ۲-۱- خزانه‌ی مرکز تحقیقات توتون رشت ۳۳
شکل۳-۱- الگوی نواری ISSR حاصل تکثیر ژنوتیپ‌های توتون با استفاده از آغازگر UBC825 ..... ۴۸
شکل ۳-۲- الگوی نواری REMAP حاصل از تکثیر ژنوتیپ‌های توتون با استفاده از آغازگر UBC826+RTR8 ..... ۴۹
شکل ۳-۳- دندروگرام ترسیم‌شده بر اساس روش W-AVERAGE و ماتریس تشابه تطابق ساده برای ۴۵ ژنوتیپ توتون مورد مطالعه با استفاده از داده‌های حاصل از نشانگر ISSR ۵۹
شکل ۳-۴- دندروگرام ترسیم‌شده بر اساس روش UPGMA و ماتریس تشابه تطابق ساده برای ۴۵ ژنوتیپ توتون مورد مطالعه با استفاده از داده‌های حاصل از نشانگرهای IRAP و REMAP ۶۰
شکل ۳-۵- دندروگرام ترسیم‌شده بر اساس روش UPGMA و ماتریس تشابه تطابق ساده برای ۴۵ ژنوتیپ توتون مورد مطالعه با استفاده از ترکیب داده‌های حاصل از نشانگرهای ISSR، IRAP و REMAP ۶۱
شکل ۳-۶- گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس تابع تشخیص با استفاده از داده‌های حاصل از نشانگر ISSR ۶۶
شکل ۳-۷- گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس تابع تشخیص با استفاده از داده‌های حاصل از نشانگرهای IRAP و REMAP ۶۸
شکل ۳-۸- گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس تابع تشخیص با استفاده از ترکیب داده‌های حاصل از نشانگرهای ISSR، IRAP و REMAP ۷۰
شکل ۳-۹- الگوی تنوع ۴۵ ژنوتیپ توتون مورد مطالعه بر اساس اولین و دومین مولفه‌ی اصلی با استفاده از داده‌های حاصل از نشانگر ISSR ۷۳
شکل ۳-۱۰- الگوی تنوع ۴۵ ژنوتیپ توتون مورد مطالعه بر اساس اولین و دومین مولفه‌ی اصلی با استفاده از داده‌های حاصل از نشانگرهای IRAP و REMAP ۷۴
شکل ۳-۱۱- الگوی تنوع ۴۵ ژنوتیپ توتون مورد مطالعه بر اساس اولین و دومین مولفه‌ی اصلی با استفاده از ترکیب داده‌های حاصل از نشانگرهای ISSR، IRAP و REMAP ۷۵

چکیده

بررسی تنوع ژنتیکی انواع مختلف توتون (*Nicotiana tabacum* L.) با استفاده از نشانگرهای مولکولی

سیده فاطمه حسنی تسیه

در این مطالعه به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی ۴۵ ژنوتیپ از ژرم‌پلاسم تیپ‌های مختلف توتون شامل هواخشک (بارلی)، گرمخانه‌ای (ویرجینیا) و آفتاب‌خشک (شرقی) از ۱۲ آغازگر ISSR و ۲۰ ترکیب آغازگری IRAP و REMAP استفاده شد که از بین این آغازگرها، همه‌ی آغازگرهای ISSR، ۵ آغازگر IRAP و ۹ آغازگر REMAP قادر به تولید الگوی نواری، با وضوح و چندشکلی بالا بودند. در نشانگر ISSR از تعداد ۱۷۰ نواری که تولید شدند، ۱۲۸ نوار چندشکل بودند. محتوای اطلاعات چندشکل آغازگرها در کل ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، بین ۰/۱۶ تا ۰/۳۳ و شاخص نشانگر بین ۱/۲۱ تا ۳/۵۵ در هر آغازگر در نوسان بودند. آغازگرهای UBC813، UBC816، UBC817، UBC873، RTR-2، RTR-8 و RTR-10 دارای مقادیر بالای محتوای اطلاعات چندشکل و شاخص شانون بودند، که نشان‌دهنده‌ی کارایی بهتر این آغازگرها در بررسی تنوع ژنتیکی توتون است. همچنین روابط ژنتیکی بین نمونه‌ها با استفاده از ضریب تطابق ساده محاسبه شد و دندروگرام حاصل با استفاده از روش W-Average، ۴۵ ژنوتیپ مورد مطالعه را در ۶ گروه قرار داد که به‌ترتیب گروه‌های ۱ و ۳ ژنوتیپ‌های هواخشک (بارلی)، گروه ۲ ژنوتیپ‌های گرمخانه‌ای (ویرجینیا) و گروه‌های ۴، ۵ و ۶ ژنوتیپ‌های آفتاب خشک (شرقی) را شامل شدند. همچنین نشانگرهای IRAP و REMAPدر مجموع ۱۸۸ مکان را تکثیر کردند که از این تعداد ۱۵۳ مکان، چندشکل بودند. آغازگر RTR-10 با ۲۲ نوار و RTR-1 با ۱۶ نوار، بیشترین و آغازگر UBC817+RTR1 با ۴ نوار، کمترین تعداد مکان‌های چندشکل را تکثیر کردند. میزان اطلاعات چندشکل نشانگرها بین ۰/۱۶ تا ۰/۳۳ و شاخص نشانگر از ۰/۳۴ تا ۶/۲۵ در کل ژنوتیپ‌های مورد مطالعه متغیر بود. تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را در پنج گروه قرار داد که گروه اول تیپ هواخشک (بارلی)، گروه دوم تیپ گرمخانه‌ای (ویرجینیا) و گروه‌های ۳، ۴ و ۵ ژنوتیپ‌های آفتاب خشک (شرقی) را شامل شدند. صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای توسط تابع تشخیص کانونی به روش خطی فیشر ۷۳/۳ درصد بود. نتایج تجزیه واریانس مولکولی نشان دادکه تنوع بین تیپ‌ها برابر ۳۲/۳۹٪ و درون تیپ‌ها ۶۷/۶۱٪ بود. بیشترین تنوع درون تیپ آفتاب خشک (شرقی) مشاهده شد و تیپ‌های هواخشک (بارلی) و آفتاب‌خشک (شرقی) با میزان فاصله‌ی ۰/۲۵ حداکثر تفاوت را در بین تیپ‌های مورد مطالعه از آن خود کردند. همچنین بالا بودن شاخص F_{st} به‌دست آمده در این مطالعه حاکی از آن است که تیپ‌های مورد بررسی به‌طور کامل از هم جدا بوده و تکامل جداگانه دارند.

واژه‌های کلیدی: تجزیه تابع تشخیص، تجزیه خوشه‌ای، رتروترانسپوزون، ضریب تشابه انطباق ساده، میزان اطلاعات چندشکل

Abstract

Assessment of genetic diversity in different types of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) using molecular markers

Seyede Fateme Hassani Tesie

ISSR, IRAP and REMAP markers were used to assess genetic diversity levels in 45 genotypes of different types of tobacco germplasm, including burley, flue-cured and oriental tobacco. Out of 20 combined primers, 5 IRAP, 9 REMAP and all 12 ISSR primers produced scorable and polymorphic banding patterns. In ISSR markers, out of 170 bands, 128 showed polymorphism. Polymorphic information content (PIC value) in total genptypes studied ranged from 0.16 to 0.33 and marker index (MI) ranged from 1.21 to 3.55 per primer. UBC813, UBC816, UBC817, UBC873, RTR-2, RTR-8, RTR-10 primers had Poymorphic information contect and Shannon's information index more than the others, indicating the efficiency of these primers in studing gentic diversity of tobacco cultivar. In this study, cluster analysis using W-Average, placed 45 genotypes in six cluster groups. The groups I and III included burley type, group II flue-cured and groups IV, V and VI oriental tobacco genotypes. Also, in total 188 loci were amplified by using 14 primers of IRAP and REMAP, 153 loci were polymorph. RTR-10 primer with 22 followed by RTR-1 with 16 bands had the maximum and UBC817+RTR-1 with 4 band had the minimum polymorphic bands. In total genotypes studied, PIC value varied between 0.16 to 0.33 and MI between 0.34 to 6.25. In this study, cluster analysis using UPGMA, placed genotypes in five cluster groups. The group I included burley type, group II included flue-cured tobacco and groups III, IV and V inclued oriental tobacco genotypes. Discriminate Function via Fisher's linear (73.3 percent) confirmed the validity of clustering analysis result. According to the analysis of molecular variance among populations were observed variation among and within types was 32.39% versus 67.61%. Genetic diversity within sun-cured tobacco was more than other types. The maximum difference between burley and oriental types with genetic distances was 0.25. Also, a high F_{st} index derived by this study showed that the types investigated were completely different from each other and had independent evolution.

Key word: Cluster analysis, Discriminant Function Analysis, Polymorphism Information Contect, Retrotransposon, Simple Matching Coefficient

مقدمه

اصلاح‌نباتات و بیوتکنولوژی، دانش و فن‌آوری‌هایی هستند، که ساختار ژنتیکی گیاه را در جهت منافع اقتصادی انسان تغییر می‌دهند. لازمه‌ی هر تغییر وجود تنوع است، پس لازمه‌ی تغییر ژنتیکی نیز وجود تنوع ژنتیکی است. تنوع ژنتیکی یک صفت معین، اندازه‌ی پراکنش ارزش‌های ژنوتیپی آن صفت است، به‌طوری‌که تاثیر محیط از آن حذف شده باشد. تنوع، اساس برنامه‌های اصلاح‌نباتات و بیوتکنولوژی و ماده‌ی خام ضروری برای آن است و یک به‌نژادگر در صورتی می‌تواند امید موفقیت زیادی در برنامه-های اصلاحی خود داشته باشد که شانس انتخاب مواد مناسب برای او وجود داشته باشد. از این‌رو است که منابع ژنتیکی گیاهی، یکی از مهم‌ترین، پرارزش‌ترین و حیاتی‌ترین ذخایر و منابع طبیعی بشر محسوب می‌شوند [وجدانی، ۱۳۷۲].

توتون (*Nicotiana tabacum* L.) از مهم‌ترین محصولات تجاری در سطح جهان است. این گیاه زراعی در اقتصاد کشورهای تولیدکننده، نقش مهمی ایفا می‌کند و درآمد حاصل از فرآورده‌های مختلف آن میزان قابل توجهی از درآمد این کشورها را تشکیل می‌دهد. استفاده‌ی روزافزون مردم از سیگار و سیگارت سبب شده است که این گیاه در سطح جهانی به‌صورت یک محصول ارزنده به‌شمار آید [آهی‌فر و همکاران، ۱۳۸۴]. با اینکه توتون امروزه یکی از گیاهان صنعتی مهم در سطح جهان محسوب می‌شود، اما به-علت وجهه‌ی منفی آن در زمینه‌ی تولید سیگار مورد بی‌مهری بسیاری از محققین قرار می‌گیرد. با این وجود گیاه توتون در حال حاضر کاربردهای دیگری نیز دارد. به‌عنوان مثال استخراج نیکوتین از این گیاه در سطح وسیعی صورت می‌گیرد و نیز در زمینه‌ی بیوتکنولوژی به‌عنوان گیاه مدل استفاده می‌شود [فارسی و ذوالعلی، ۳۸۲]. همچنین ساقه‌ی گیاه توتون به‌صورت پس‌ماند برای بعضی از مصارف نظیر تولید کود، الکل و حشره‌کش استفاده می‌شود [Grise, 1988; Martin *et al.*, 2002]. در آینده نیز به‌علت بیوماس بالا می‌تواند کاربردهای بیش‌تری در زمینه‌ی تولید مواد مختلف با استفاده از تراریختی داشته باشد [Dimanov, 2001].

اصلاح گیاهان زراعی مانند توتون به‌منظور افزایش عملکرد و کیفیت آن‌ها، مستلزم شناخت ساختار ژنتیکی، ترکیب‌پذیری ارقام زراعی و میزان وراثت‌پذیری صفات در آن‌ها است [هنرنژاد و شعاعی دیلمی، ۱۳۸۱]. آگاهی دقیق از تنوع ژنتیکی مجموعه‌های ژنتیکی گیاهی ضمن حفظ ذخایر ژنتیکی گیاهی، قابلیت استفاده از آن‌ها را در برنامه‌های اصلاحی تامین می‌کند. همچنین کسب اطلاع از فاصله‌ی ژنتیکی نسبی بین افراد و روابط خویشاوندی بین آن‌ها، امکان سازماندهی ژرم‌پلاسم و تهیه‌ی جمعیت‌های مناسب برای ترسیم نقشه‌ی ژنتیکی و مکان‌یابی ژن‌ها را فراهم می‌سازد [عبدالهی مندولکانی و همکاران، ۱۳۸۲].

با توجه به اینکه قسمت اعظم DNAی ژنومی در بسیاری از گونه‌ها شامل نواحی غیر رمزکننده است، با اتکا به تنوع بیوشیمیایی یا ریخت‌شناسی فقط قسمت محدودی از تنوع که به نواحی رمزکننده برمی‌گردد، بررسی می‌شود. تنوع در قسمت‌های بدون رمز ژنوم، خواه در نواحی بین ژنی باشد و یا در اینترون‌ها، احتمالاً کم‌تر تحت فشار گزینش طبیعی است، بنابراین تعداد

جایگاه‌های چندشکل در این نواحی ژنوم فوق‌العاده زیاد خواهد بود [Kearsey, 1997]. از جمله نشانگرهای مبتنی بر نواحی غیر رمزکننده، می‌توان از SSR[۱]، ISSR[۲]، IRAP[۳] و REMAP[۴] نام برد. نشانگر ISSR به دلیل ویژگی‌های بسیار مطلوبی مانند تکرارپذیری، تجزیه و تحلیل همزمان تعداد زیاد جایگاه ژنی، دقت بالا، تنوع بسیار بالا، هزینه‌ی پایین، سرعت و سهولت اجرا به‌طورگسترده‌ای به‌خصوص در گیاهان به‌کار گرفته شده است [Souframanien and Gopalkrishna, 2004]. استفاده از نشانگرهای ISSR به دلیل نیاز نداشتن به اطلاعات قبلی در مورد توالی هدف در مقایسه با نشانگر SSR آسان است [Tsumura *et al.*, 1996]. همچنین ویژگی‌های نشانگرهای مبتنی بر نواحی رتروترانسپوزونی IRAP و REMAP، مانند تعداد زیاد کپی‌های رتروترانسپوزون‌ها در ژنوم، توزیع وسیع و تصادفی آن‌ها در کروموزوم‌های گیاهی و چندشکلی درجی[۵] و پایدار آن‌ها در بین و داخل گونه‌های گیاهی، استفاده از آن‌ها را به‌عنوان نشانگرهای مولکولی بسیار ایده‌آل می‌سازد [Kalender *et al.*, 1999; Schulman *et al.*, 2004; Sabot and Schulman, 2007; Schulman, 2007].

هرچند بررسی‌های زیادی در رابطه با تنوع ژنتیکی توتون صورت گرفته است، ولی با توجه به اینکه هر نشانگر تنها قسمتی از سطح ژنوم را پوشش می‌دهد، لازم است جهت دست‌یابی به اطلاعات دقیق و مشخص در مورد روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های توتون، از نشانگرهای مختلف جهت پوشش مناسب سطح ژنوم استفاده گردد. از این‌رو در این پژوهش از نسل جدید نشانگرهای DNA، یعنی نشانگرهای مبتنی بر نواحی رتروترانسپوزونی REMAP و IRAP و نشانگرهای ISSR برای بررسی تنوع ژنتیکی ۴۵ ژنوتیپ از ژرم‌پلاسم تیپ‌های مختلف توتون شامل گرمخانه‌ای (ویرجینیا[۶]) ، هوا خشک (بارلی[۷]) و آفتاب خشک (شرقی) موجود در مرکز تحقیقات توتون گیلان (رشت) استفاده شد. تا علاوه برتعیین مشخصات و گروه‌بندی ژرم‌پلاسم، آغازگرهایی که کارآیی بالا در تمایز ژنوتیپ‌های توتون مورد مطالعه در این تحقیق را داشتند، جهت استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های توتون معرفی گردند.

1. Simple Sequence Repeat
2. Inter Simple Sequence Repeat
3. Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism
4. Retrotransposon-Microsatellite Ampliphied Polymorphism
5. Insertion Polymorphism
6. Virginia
7. Burley

فصل اول

کلیات و بررسی منابع

۱-۱- تاریخچه‌ی توتون

کشت توتون ابتدا در آمریکا آغاز شد و اولین کشور اروپایی که کشت این گیاه در آنجا صورت گرفت، پرتغال بود. این گیاه بعد از ورود به اروپا، برای درمان بیماری‌های پوستی به‌کار رفت و به‌تدریج استفاده از برگ آن به‌صورت سیگار و سیگارت مورد استفاده قرار گرفت. پس از آنکه پرتغالی‌ها به جنوب ایران حمله کردند و جزیره‌ی هرمز را به مدت ۱۰۰ سال به اشغال خود درآوردند، بذر توتون را نیز با خود به ایران وارد نمودند. بذر تنباکو در زمان صفویه از طریق بنادر جنوب به ایران وارد شده و بذر توتون چپق نیز به احتمال زیاد از کشور ترکیه به ایران وارد و در غرب کشور کشت گردیده است. بذر توتون سیگارت در سال ۱۲۵۱ شمسی بنا به توصیه‌ی محمودخان ناصرالملک همدانی به‌وسیله‌ی دکتر استپان هاراطونیانس که در آن زمان در گیلان به حکیم فانوس مشهور بود، به ایران وارد و در گیلان کشت شد. کشت توتون سیگارت در گیلان، ابتدا در محلی به اسم موازی (نزدیک رشت) و پس از آن در مازندران و سپس در گرگان (استرآباد) و پس از مدتی در ارومیه (رضائیه) شروع شد [خدابنده، ۱۳۶۶]. قانون انحصار دخانیات در سال ۱۲۹۴ به‌تصویب رسید و دولت در سال‌های ۱۳۱۴-۱۳۱۳ مبادرت به خرید توتون و تنباکو از توتون‌کاران نمود. در مهرماه سال ۱۳۱۶ نخستین کارخانه‌ی سیگارسازی در تهران گشایش یافت که متعاقب آن، صنعت سیگارسازی از گیلان به تهران انتقال یافت و کارگاه‌های موجود در گیلان، تعطیل شدند. سابقاً ۹ نقطه از گیلان، از مناطق کشت توتون سیگار به‌شمار می‌آمدند که عبارت بودند از: طاهرگوراب، کسما، صومعه‌سرا، بازارجمعه، فومن، رشت، بندرانزلی، آستارا و هشتپر. با ایجاد مرکزی موسوم به پژوهش توتون گیلان در سال ۱۳۳۴ و احداث مزرعه در آن، امکان بالقوه-ی مساعدی برای توتون‌کاران گیلان، به‌ویژه توتون‌کاران منطقه‌ی فومنات به‌وجود آمد. این مرکز، بذر سالم را به‌طور رایگان در اختیار توتون‌کاران قرار داد و این کار سطح زیرکشت این محصول را بالا برد [بی‌نام، ۱۳۸۲].

طبق آخرین آمارهای ارائه شده توسط سازمان خواربار جهانی، بزرگ‌ترین تولیدکننده‌ی توتون در سال ۲۰۱۰ در جهان، کشور چین با مقدار ۳۰۰۵۷۵۳ تن و پس از آن به‌ترتیب کشورهای برزیل، هندوستان، ایالات متحده امریکا و جمهوری مالاوی می‌باشند. همچنین از نظر بازده‌ی تولید در هر هکتار، کشور امارات متحده‌ی عربی بیش‌ترین بازده را دارا بوده و کشورهای پرو، عمان، ایالات مستقل ساموآ و لائوس در رده‌های بعدی قرار دارند [FAO, 2010].

جدول ۱-۱- میزان تولید برگ خشک توتون بر اساس آمار سازمان خواربار جهانی [FAO, 2010]

سال	جهان (تن)	آسیا (تن)	ایران (تن)
۲۰۰۹	۷۰۸۵۴۶۲.۹	۴۵۶۳۸۲۱.۹	۸۸۲۶
۲۰۱۰	۷۰۳۷۵۱۴.۳۴	۴۵۹۹۹۴۰.۲	۱۴۱۴۵

جدول ۱-۲- میزان سطح زیرکشت توتون بر اساس آمار سازمان خواربار جهانی [FAO, 2010]

سال	جهان (هکتار)	آسیا (هکتار)	ایران (هکتار)
۲۰۰۹	۳۹۴۱۰۵۱.۸	۲۴۷۰۷۲۶.۸	۷۹۹۳
۲۰۱۰	۳۹۴۶۶۶۵.۳۲	۲۴۴۸۵۸۷.۶	۹۵۸۶

۱-۲- خصوصیات گیاه‌شناسی توتون

توتون با نام علمی *Nicotiana tabacum* گیاهی است دولپه‌ای و نهاندانه از خانواده‌ی *solanaceae* که دارای سه زیرجنس *Rustica*، *Tabacum* و *Petunioides* با ۶۵ گونه‌ی مختلف می‌باشد [Goodspread, 1954; Narayan, 1987]. *N. tabacum* یک آمفی‌پلوئید طبیعی (آلوتتراپلوئید) با ۲n=۴۸ است که تصور می‌شود از تلاقی گونه‌های وحشی ایجاد شده باشد. گونه‌ی دیپلوئید *Nicotiana sylvestris*، گونه‌ی مادری تلاقی یا ژنوم S بوده، درحالی‌که گونه‌ی پدری یا ژنوم T متعلق به یکی از دو گونه‌ی *Nicotiana tomentosiformis* یا *Nicotiana otophora* می‌باشد [Goodspread, 1954; Gerstel, 1960; Gerstel, 1963]. ژنوم این گیاهان در مقایسه با سایر گونه‌های خانواده‌ی *solanaceae* کوچک بوده و طولی حدود ۴۴۳۴ مگاباز دارند که بخش بزرگی از آن را توالی‌های بسیار تکراری تشکیل داده‌اند [Murad *et al.*, 2002]. خاستگاه اصلی این گیاه مناطق حاره‌ای بوده ولی درحال حاضر از حدود ۶۰ درجه‌ی شمالی تا ۴۵ درجه‌ی جنوبی کره‌ی زمین یافت می‌شود [Akehurst, 1981]. شناخته‌شده‌ترین گونه‌ی این جنس *Nicotiana tabacum* است که حداقل در ۹۷ کشور به‌صورت تجاری کاشته می‌شود. گیاه توتون به درجه حرارت هوا، رطوبت و نوع زمین حساس است. دمای ۲۰ تا ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، دمای بهینه‌ی رشد این گیاه بوده و رطوبت جوی ۸۰ تا ۸۵ درصد برای رشد این گیاه مطلوب است. خاک‌های غنی از نیتروژن عموماً عامل بازدارنده، جهت رشد مناسب این گیاه محسوب می‌شوند [Ren and Timko, 2001]. توتون گیاهی یک یا

چندساله می‌باشد که عمدتاً به شکل بوته‌ای و به‌ندرت درختچه‌ای است. مهم‌ترین مواد تشکیل‌دهنده‌ی برگ توتون ترکیبات ازت‌دار، کربوهیدرات، اسید آلی، تانن‌ها، مواد رنگی و اسانس می‌باشند. مهم‌ترین آلکالوئیدهای توتون، نورنیکوتین[۱]، آنابازین[۲] و نیکوتین[۳] هستند که از همه مهم‌تر نیکوتین می‌باشد. این مواد مؤثره در ریشه ساخته و به برگ منتقل می‌شوند [Layten and Nielsen, 1999]. توتون گیاهی است با ریشه‌ی راست که در شرایط طبیعی خاک، ریشه‌ی اصلی آن، حدود ۵۰ سانتی‌متر و گاهی نیز ۱۵۰ تا ۲۰۰ سانتی‌متر در خاک نفوذ می‌کند. چگونگی رشد و تعداد انشعابات آن در خاک، در گونه‌های مختلف متفاوت است. ساقه‌ی توتون، ابتدا علفی و سبزرنگ و به‌تدریج سفت و نیمه‌خشبی شده و دارای الیاف نازکی می‌باشد. ارتفاع ساقه در ارقام مختلف بین ۵۰ سانتی‌متر تا ۲ متر و گاهی تا ۲/۵ متر متغیر می‌باشد. در طول ساقه تعدادی گره وجود دارند که تعداد و فواصل آن‌ها در نژادهای مختلف متفاوت است. قطر ساقه نیز از پایین به بالا به‌تدریج کم‌تر می‌گردد. برگ‌های توتون ساده و نسبتاً پهن، بزرگ، سبزرنگ و با لبه‌ی کامل است که به‌طور متناوب در روی ساقه قرار گرفته و فاقد دمبرگ می‌باشند. سطح برگ‌ها از ماده‌ی چسبناکی پوشیده شده و اندازه‌ی آن‌ها نیز در ارقام مختلف متفاوت است. طول هر برگ حدود ۵۰ و عرض آن ۲۵ تا ۲۷ سانتی‌متر می‌باشد. گل‌آذین توتون خوشه‌ای و گل‌ها که به رنگ سفید، صورتی، قرمز، سبز و زرد هستند، از ۵ کاسبرگ، ۵ گلبرگ به‌هم پیوسته (قیفی شکل)، ۵ پرچم و یک مادگی دوبرچه‌ای تشکیل شده است. میوه‌ی توتون کپسولی است که معمولاً از دو خانه تشکیل شده و در بعضی از گونه‌ها، تعداد خانه‌ها بیش از دو عدد است (معمولاً ۴ خانه‌ای می‌باشند). در داخل هر کپسول تعداد زیادی دانه‌ی ریز قهوه‌ای رنگ و آلبومن‌دار وجود دارد و هر گرم آن به‌طور متوسط شامل ۱۲۰۰۰ دانه می‌باشد [خدابنده، ۱۳۶۶].

۱-۲-۱- تقسیم‌بندی توتون‌ها از نظر عمل آوری و جغرافیایی

توتون‌ها از نظر عمل آوری به چهار تیپ آتش خشک، آفتاب خشک، هوا خشک و گرمخانه‌ای (Ren and Timko 2001) و از نظر جغرافیایی به سه گروه تقسیم می‌شوند که گروه اول توتون‌های غربی می‌باشند و مرکز اصلی کاشت و تولید آن‌ها در کشورهای آمریکا و اروپا است. این گروه دارای برگ‌هایی بزرگ هستند که در ساخت سیگارت، سیگار و توتون پیپ به‌کار می‌روند. و مهم‌ترین آن‌ها بارلی (هوا خشک) و ویرجینیا (گرمخانه‌ای) می‌باشند. گروه دوم توتون‌های شرقی هستند که دارای بوته

[1]. Nornicotine
[2]. Anabasine
[3]. Nicotine

و برگ‌هایی کوچک‌تر و ظریف‌تر از سایر توتون‌ها می‌باشند و رنگ برگ‌های آن‌ها زرد طلایی و دارای عطر و طعم مطبوعی هستند. گروه سوم نیز توتون‌های نیمه‌شرقی می‌باشند که از نظر مشخصات و خصوصیات، حد واسط توتون‌های شرقی و غربی می‌باشند و به این دلیل به آن‌ها نیمه‌شرقی می‌گویند [خدابنده، ۱۳۶۶].

۱-۳- تنوع ژنتیکی و لزوم بررسی آن

تنوع ژنتیکی بیانگر تفاوت‌ها و تنوع ژن‌ها در درون یک گونه می باشد. تنوع، قابلیت سازگاری درازمدت و بقای جمعیت‌ها را تضمین می‌کند، به‌عبارت دیگر هر چه تنوع افراد در یک جمعیت بیش‌تر باشد، توان زنده ماندن جمعیت در مقابل شرایط نامساعد و تغییرات محیطی بیش‌تر خواهد بود. بنابراین آگاهی از سطح تنوع ژنتیکی و برآورد دقیق سطح آن در ژرم‌پلاسم‌های گیاهی و تعیین روابط ژنتیکی بین مواد اصلاحی، پایه و اساس بسیاری از برنامه‌های اصلاحی است. وجود تنوع ژنتیکی در ژرم-پلاسم‌های گیاهی و جمعیت‌ها، لازمه‌ی بهبود و کارآیی گزینش است. اطلاع از سطح تنوع ژنتیکی و روابط بین ژنوتیپ‌ها برای انتخاب والدین، جهت انجام تلاقی‌های کارآ و اتخاذ روش اصلاحی مناسب ضروری است. نشانگرهای مولکولی ابزارهایی توانمند برای شناسایی ارقام، بررسی تکامل گونه و بررسی تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌ها هستند [Russel *et al.*, 1997].

تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های گیاهی ممکن است از طریق فرآیندهای متفاوتی نظیر جهش، نوترکیبی، مهاجرت، جریان ژنی، رانده شدن ژنتیکی و گزینش ایجاد شود [باقری و همکاران، ۱۳۸۱]. به عقیده‌ی واویلف[1] [به نقل از Ghebru *et al.*, 2002] جایگاه‌های عمده‌ی تنوع ژنتیکی گیاهان، خاستگاه‌های اصلی آن‌ها می‌باشند و مجموعه‌های تهیه شده از این مناطق، منابع بسیار غنی از ژن‌های مهم به‌حساب می‌آیند.

به‌کارگیری و استفاده از تنوع طبیعی به چند دلیل مهم است [Kumar, 1999]:

- یکنواختی ژنتیکی در گیاهان زراعی باعث آسیب‌پذیری گیاهان در برابر اپیدمی‌ها و عوامل نامساعد محیطی می‌شود که در نتیجه‌ی آن کاهش و افت عملکرد رخ می‌دهد.

[1]. Vavilov

- بسیاری از خویشاوندان وحشی گیاهان زراعی دارای ژن‌های مفیدی هستند که باعث تحمل به تنش‌های زیستی و غیر زیستی می‌شوند. شناسایی این ژن‌ها و انتقال آن‌ها به ارقام تجاری از افت عملکرد جلوگیری خواهد کرد. بنابراین شرط لازم برای اصلاح و بهبود صفات گیاهی مهم، شناخت ساختار ژنتیکی مجموعه‌ی ژرم‌پلاسم است.

با توجه به اینکه پرهزینه‌ترین بخش در برنامه‌های اصلاحی و تولید هیبریدهای پرمحصول انتخاب والدین مناسب می‌باشد، بنابراین روشی که بتواند شناسایی مطلوب‌تری را فراهم نماید، در پیشبرد اهداف اصلاحی حائز اهمیت خواهد بود. تخمین فاصله‌ی ژنتیکی به کمک نشانگرهای DNA در سازماندهی ژرم‌پلاسم و گزینش افراد مناسب برای دورگ‌گیری اهمیت دارد. در این صورت شانس به‌دست آوردن لاین‌های مطلوب و موردنظر افزایش می‌یابد. بنابراین با داشتن اطلاعات کافی از روابط خویشاوندی، امکان موفقیت طرح افزایش خواهد یافت و هرچه اطلاعات درباره‌ی روابط ژنتیکی افراد جامع‌تر باشد، احتمال گزینش سریع و دست‌یابی به لاین‌های امیدبخش، بیش‌تر خواهد بود [Bukler and Thornsberry, 2002].

۱-۴- نشانگرهای DNA

برآورد دقیق سطح تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاسم‌های گیاهی و مواد اصلاحی، پایه و اساس بسیاری از برنامه‌های اصلاح‌نباتات را تشکیل می‌دهد. اگرچه قابلیت نشانگرهای مولکولی برای اصلاح‌کنندگان از حدود ۷۵ سال پیش شناخته شده است، ولی کاربرد آن‌ها تا حدود ۳۰ سال پیش به دلیل نبود نشانگرهای مناسب بسیار محدود بوده است. با وجود این، کشف انواع مختلف آنزیم-های برشی از یک سو و کشف واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR[1]) از سوی دیگر فرصت مناسبی را برای بررسی تنوع و تفاوت موجودات مختلف در سطح مولکول DNA امکان‌پذیر کرده است [نقوی و همکاران، ۱۳۸۴]. نشانگرهای DNA، می‌توانند در هر مرحله از چرخه‌ی زندگی موجود استفاده شوند، تحت تأثیر شرایط محیطی قرار نمی‌گیرند و جهت بررسی از هر نوع بافتی نیز می‌توان استفاده کرد [Kumar, 1999].

[1]. Polymerase Chain Reaction

۱-۴-۱- کاربردهای نشانگرهای DNA [نقوی و همکاران، ۱۳۸۴]

الف- **توالی‌یابی ژنوم:** از آنجا که ژنوم یوکاریوت‌ها خیلی بزرگ است، برای توالی‌یابی آن باید ژنوم را به قطعات خیلی کوچک تقسیم و هر قطعه را جداگانه توالی‌یابی نمود. لذا باید روی DNA، نقاط معیاری وجود داشته باشد تا بتوان بر اساس آن‌ها، نتایج حاصل از توالی‌یابی قطعات را کنار هم چید. این معیارها می‌توانند نشانگرها باشند.

ب- **نشان‌مندکردن ژن**[1]: عبارت است از یافتن پیوستگی بین صفت مورد نظر با یک نشانگر. این امر با بررسی تفرق همزمان[2] صفت و نشانگر تحقق می‌یابد.

ج- **مکان‌یابی ژن**[3]: عبارت است از تعیین محل یک ژن روی کروموزوم.

د- **بررسی روابط خویشاوندی:** این مورد بیش‌تر در مطالعات فیلوژنتیکی و تعیین مبدأ تنوع اهمیت دارد.

ذ- **تعیین گروه‌های هتروتیک:** در تهیه‌ی بذر هیبرید تعیین لاین‌های اینبرد والدینی اهمیت زیادی دارد. این والدین باید طوری انتخاب شوند که مقدار هتروزیس حداکثر باشد. مقدار هتروزیس به میزان غالبیت در هر مکان ژنی و فاصله‌ی ژنتیکی والدین بستگی دارد. این فاصله را می‌توان از آنالیز کلاستری که با استفاده از پلی‌مورفیسم نشانگری در بین اینبرد لاین‌های مختلف به‌دست می‌آید، تعیین کرد و بهترین اینبردها را انتخاب نمود.

ر- **انتخاب به کمک نشانگر (MAS[4]):** مهم‌ترین کاربرد نشانگرها در اصلاح‌نباتات است. هدف این است که بتوان صفت مورد نظر را با واسطه‌ی نشانگر پیوسته با صفت، انتخاب کرد. این مسأله بسیار مهم است، چرا که اگر پیوستگی یک نشانگر با ژن مورد نظر تایید شود، آنگاه می‌توان در هر مرحله‌ای از رشد گیاه و در هر محیطی اقدام به گزینش نمود. اغلب صفات مهم زراعی، مثل عملکرد، مقابله با خشکی، شوری و ... صفاتی کمّی هستند که توسط لوکوس‌های کمّی (QTL[5]) کنترل می‌شوند. لذا امروزه در پروژه‌های اصلاحی سعی بر نقشه‌یابی QTLها است تا بتوان از آن‌ها در MAS استفاده کرد.

ز- **حفظ ذخایر ژنتیکی:** به کمک نشانگرها می‌توان تنوع ژنتیکی موجود را بررسی کرد و در حفظ و سازماندهی آن اقدام نمود.

---

1. Gene tagging
2. Cosegeration
3. Gene mapping
4. Market- Asisted Selection
5. Quantitative trait loci