دانشکده کشاورزی

گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی

رساله برای دریافت درجه دکتری (Ph.D) در رشته اصلاح نباتات

با عنوان:

ارزیابی تنوع ژنتیکی و شناسایی QTL های کنترل کننده تجمع کلر در برگ توتون های شرقی

حمید حاتمی ملکی

اساتید راهنما:

دکتر قاسم کریم زاده

دکتر رضا درویش زاده

شهریور ۱۳۹۱

بسم الله الرحمن الرحیم
الحمد لله رب العالمین الرحمن الرحیم مالک یوم الدین
ایاک نعبد و ایاک نستعین اهدنا الصراط المستقیم
صراط الذین انعمت علیهم غیر المغضوب علیهم
ولا الضالین

بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیأت داوران حاضر در جلسه دفاع از رساله دکتری

آقای حمید حاتمی ملکی رساله دکتری ۱۸ واحدی خود را با عنوان : ارزیابی تنوع ژنتیکی و شناسایی QTL های کنترل کننده تجمع کلر در برگ توتون های شرقی در تاریخ ۱۳۹۱/۰۶/۲۵ ارائه کردند.

اعضای هیأت داوران نسخه نهایی این رساله را از نظر فرم و محتوا تایید کرده است و پذیرش آن را برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد می کنند.

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنمای اصلی	دکتر قاسم کریم زاده	دانشیار	
۲- استاد راهنمای دوم	دکتر رضا درویش زاده	دانشیار	
۳- استاد مشاور اول	دکتر محمدرضا نقوی	استاد	
۴- استاد مشاور دوم	دکتر احمد صرافی	استاد	
۵- استاد ناظر	دکتر جعفر احمدی	دانشیار	
۶- استاد ناظر	دکتر محمد ناجی	استادیار	
۷- استاد ناظر	دکتر احمد معینی	دانشیار	
۸- استاد ناظر	دکتر محمدصادق ثابت	استادیار	
۹- نماینده شورای تحصیلات تکمیلی	دکتر احمد معینی	دانشیار	

بسمه تعالی

آیین نامهٔ چاپ پایان نامه(رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبیّن بخشی از فعالیتهای علمی-پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

مادّه ۱ در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به **دفتر نشر آثار علمی** دانشگاه اطلاع دهد.

مادّه ۲ در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

" کتاب حاضر، حاصل پایان نامهٔ رسالهٔ دکتری نگارنده در رشته **اصلاح نباتات** است که در سال **۱۳۹۱** در دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه تربیت مدرّس به راهنمایی جناب آقای دکتر **قاسم کریم زاده و** جناب آقای **دکتر رضا درویش زاده** و مشاورهٔ جناب آقای دکتر **محمدرضا نقوی** و جناب آقای دکتر **احمد صرافی** از آن دفاع شده است.

مادّه ۳ به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به **دفتر نشر آثار علمی** دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

مادّه ٤ در صورت عدم رعایت مادّه ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تأدیه کند.

مادّه ۵ دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند، به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در مادّه ٤ را از محلّ توقیف کتابهای عرضه شدهٔ نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

مادّه ٦ اینجانب **حمید حاتمی ملکی** دانشجوی رشته **اصلاح نباتات** مقطع **دکتری** تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: حمید حاتمی ملکی

تاریخ و امضاء:

دستورالعمل حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه : با عنایت به سیاست های پژوهشی دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسان ها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیات علمی، دانشجویان، دانش آموختگان و دیگر همکاران طرح در مورد نتایج پژوهش های علمی که تحت عناوین پایان نامه، رساله و طرح های تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد ذیل را رعایت نمایند:

ماده ۱- حقوق مادی و معنوی پایان نامه ها، رساله های مصوب دانشگاه متعلق به دانشگاه است و هرگونه بهره برداری از آن باید با ذکر نام دانشگاه و رعایت آیین نامه ها و دستورالعمل های مصوب دانشگاه باشد.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان نامه/رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی می باید به نام دانشگاه بوده و استاد راهنما نویسنده مسئول مقاله باشند.

تبصره : در مقالاتی که پس از دانش آموختگی به صورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان نامه و رساله منتشر می شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب حاصل از نتایج پایان نامه، رساله و تمامی طرح های تحقیقاتی دانشگاه باید با مجوز کتبی صادره از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه و براساس آیین نامه های مصوب انجام شود.

ماده ۴- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه در جشنواره های ملی، منطقه ای و بین المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان نامه، راسله و تمامی طرح های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق حوزه پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این دستورالعمل در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ ۱۳۸۴/۴/۲۵ در شورای پژوهشی دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب لازم الاجرا است و هرگونه تخلف از مفاد این دستورالعمل از طریق مراجع قانونی قابل پیگیری خواهد بود.

دانشکده کشاورزی

گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی

رساله برای دریافت درجه دکتری (Ph.D.) در رشته اصلاح نباتات

با عنوان:

ارزیابی تنوع ژنتیکی و شناسایی QTL های کنترل کننده تجمع کلر در برگ توتون های شرقی

حمید حاتمی ملکی

اساتید راهنما:

دکتر قاسم کریم زاده

دکتر رضا درویش زاده

اساتید مشاور:

دکتر محمدرضا نقوی **دکتر احمد صرافی**

شهریور ۱۳۹۱

تقدیم به

همسر مهربان و صبورم

سپاس و قدردانی

با استعانت از درگاه ایزدمنان و توکل بر حول و قوه لایزال الهی، بدین وسیله بر خود لازم می‌دانم از کلیه بزرگواران و عزیزانی که بنده را مورد الطاف خویش قرار داده و از هیچ‌گونه مساعدت و همفکری در طول انجام این پایان‌نامه دریغ ننموده‌اند کمال تقدیر و تشکر را داشته باشم و از خداوند باری‌تعالی برای ایشان صحت و سلامت وجود و موفقیت در تمامی مراحل زندگی را خواستار باشم.

استادان راهنمای بسیار عزیز و گرامی جناب آقای دکتر قاسم کریم زاده و جناب آقای دکتر رضا درویش زاده که از زمان آغاز تحقیق بنده را مورد لطف قرار داده و در اجرای تحقیق و نگارش پایان‌نامه بنده را راهنمایی نمودند. استادان مشاور عزیز جناب آقای دکتر محمدرضا نقوی و جناب آقای دکتر احمد صرافی که در هر چه بهتر شدن پایان نامه بنده را یاری نموده اند سپاسگذارم.

کارشناس محترم آزمایشگاه اصلاح نباتات جناب آقای مهندس ایری که در امر انجام کارهای آزمایشگاهی، کمک حال اینجانب بودند. همچنین از ریاست محترم مرکز تحفیفات توتون ارومیه جناب آقای مهندس سید رضا علوی، کارشناس مرکز تحقیقات توتون جناب آقای مهندس حسنی، کارشناسان پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه جناب آقای مهندس عزیزی و جناب آقای مهندس مشکی قدردانی می‌گردد.

از دوستان عزیزم آقایان پیام پورمحمدی، اصغر عبادی، ابوالفضل علیرضالو، که در مراحل مختلف انجام تحقیق به بنده کمک نمودند، قدردانی می نمایم.

همچنین برخود لازم می‌دانم از اساتید و محققین خارجی و از جمله، پروفسور L. Gentzbittel، پروفسورM. Reckauer و پروفسور C.Ben اساتید دپارتمان اصلاح نباتات دانشگاه Paul Sabatier و موسسه INRA در شهر تولوز فرانسه که در فراهم نمودن و یادگیری نرم‌افزارهای لازم برای انجام این تحقیق بنده را یاری کرده‌اند، تشکر و قدردانی نمایم. در نهایت از خانواده عزیزم که در تمامی مراحل انجام این تحقیق همراه و یاری‌رسان اینجانب بودند تقدیر و تشکر می‌نمایم.

چکیده

توتون (*Nicotiana tabacum* L.) از جمله گیاهان صنعتی مهمی است که در اقتصاد بسیاری از کشور ها اهمیت دارد. علاوه بر برگ به عنوان بخش اقتصادی مهم آن، بذر توتون حاوی ۳۸٪ روغن غیرخوراکی می باشد که می تواند به عنوان یک جایگزین مناسب برای سوخت های دیزلی مورد استفاده قرار گیرد. ایران به علت شرایط اقلیمی خاص و مناسب از دیرباز به عنوان یکی از مناطق مستعد جهت کشت انواع توتون محسوب شده و ژرم پلاسم غنی توتون به ویژه توتون شرقی در ایران وجود دارد. این توتون یک گروه از واریته های آفتاب خشک با برگ های کوچک و ترکیبات آروماتیک فراوان می باشند که اطلاعات کمی در مورد تنوع آن وجود دارد. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ژرم پلاسم توتون شرقی موجود در کشور از نظر صفات مورفولوژیک، تعداد ۱۰۰ ژنوتیپ توتون شرقی خارجی و داخلی موجود در بانک ژن مرکز تحقیقات توتون ارومیه در قالب طرح لاتیس ساده با ۲ تکرار مورد ارزیابی قرار گرفتند. تعداد ۸ صفت شامل ارتفاع و قطر ساقه، تعداد برگ در بوته، طول و عرض برگ، وزن تر و خشک برگ و روز تا ۵۰٪ گلدهی مورد مطالعه قرار گرفتند. تجزیه واریانس تفاوت بسیار معنی داری بین ژنوتیپ ها را از لحاظ تمامی صفات نشان داد که حاکی از وجود تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ های مورد مطالعه است. نتایج همبستگی نشان داد که صفت وزن برگ خشک به عنوان عملکرد دارای ارتباط مثبت معنی دار با سایر صفات می باشد. با استفاده از تجزیه مسیر، صفات مورد مطالعه بر اساس اهمیتی که در متغیر تابع (وزن برگ خشک) داشتند در ۳ سطح اهمیت قرار گرفتند. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، متغیرها را به ۵ مؤلفه با واریانس تجمعی ۹۶٪ کاهش داد. در مؤلفه اول تمامی صفات (به جز ارتفاع ساقه) دارای همبستگی مثبت و معنی دار با آن بودند. با استفاده از تجزیه خوشه‌ای به روش متوسط گروه‌ها، ژنوتیپ‌ها در ٤ گروه متفاوت قرار گرفتند. بیشترین فاصله بین ژنوتیپ‌های دو گروه ۲ و ۳ بود. مقایسه میانگین‌های صفات در گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای بیانگر این بود که ژنوتیپ‌های موجود در گروه چهارم (Trimph و Ohdaruma) از نظر اکثر صفات دارای مقادیر حداکثر بوده و بنابراین می‌توانند در برنامه‌های اصلاحی به عنوان والد در تلاقی‌ها استفاده شوند.

یکی از فاکتورهای مهمی که قابل استفاده بودن توتون را تعیین می نماید قابلیت سوختن برگ های آن می باشد. مقدار کلر موجود در برگ یکی از عوامل مهم در کیفیت سوختن برگ می باشد. نتایج نشان داده که زیاد بودن کلر (بیش از ۲٪ وزن خشک برگ) دارای اثرات نامطلوب در کیفیت سوختن برگ می باشد. با توجه به کمی بودن صفت انباشت کلر در برگ، شناسایی QTL های مربوط به مقدار تجمع کلر در برگ می تواند گامی مهم در جهت شناخت ماهیت تنوع کمی آن و انتخاب

استراتژی اصلاحی برای بهبود این صفت پیچیده باشد. بدین منظور دو ژنوتیپ توتون شرقی شامل Basma Seres 31 (با تجمع متوسط کلر؛ والد ماده) و SPT 406 (با تجمع کم کلر؛ والد نر) که از نظر اکثر صفات زراعی نیز در نقطه مقابل همدیگر بودند، با یکدیگر تلاقی داده شده و تعداد ۱۰۰ بوته از جمعیت F_2 حاصل از تلاقی آنها به عنوان جمعیت تهیه نقشه برای شناسایی مکان های ژنی دخیل در تجمع کلر در برگ مورد استفاده قرار گرفتند. برای تهیه نقشه پیوستگی، از دو نشانگر SSR و ISSR استفاده گردید. آزمون چندشکلی آغازگرها در بین دو والد نشان داد که از مجموع ۱٦۲ جفت آغازگر SSR، ۳٤ جفت از آنها و از مجموع ۸۰ عدد آغازگر ISSR، ۲۰ عدد از آنها در بین والدین چندشکل بودند. نتایج آزمون χ^2 به منظور شناسایی نشانگرهای دارای انحراف از نسبت های مورد انتظار مندلی نشان داد که ۲۳ نشانگر SSR و ۲۹ نشانگر ISSR دارای توزیع مندلی بودند. نقشه پیوستگی حاصل دارای ۷ گروه پیوستگی بود که ۵۷۰/۸ cM از ژنوم توتون را تحت پوشش قرار می داد. فاصله هر دو نشانگر مجاور از یکدیگر به طور متوسط ۱٦/۷۸ cM برآورد شد. روش های تجزیه QTL از قبیل تجزیه تک نشانگری، مکان یابی فاصله ای ساده و مرکب به منظور شناسایی QTL ها قرار گرفتند. با استفاده از روش تجزیه تک نشانگری، نشانگر PT30346 دارای ارتباط معنی دار با مقدار تجمع کلر در برگ بود. با استفاده از هر یک از روش های مکان یابی فاصله ای ساده و مرکب یک QTL شناسایی شد. QTL شناسایی شده از طریق روش مکان یابی فاصله ای ساده (Chl_{IM})، در گروه پیوستگی ۵ و QTL شناسایی شده از طریق روش مکان یابی فاصله ای مرکب (Chl_{CIM})، در گروه پیوستگی ۲ قرار داشتند و به ترتیب ٤۰٪ و ۷٪ تغییرات فنوتیپی صفت را کنترل می نمودند.

کلمات کلیدی: توتون شرقی، تنوع ژنتیکی، تجمع کلر در برگ، مکان های ژنی کنترل کننده صفات کمی (QTL)، تجزیه تک نشانگری، مکان یابی فاصله ای ساده و مکان یابی فاصله ای مرکب

فهرست مطالب

فصل اول ۱
۱- مقدمه ۲
فصل دوم ٤
۲- بررسی منابع ۵
۲-۱- تاریخچه ۵
۲-۲- سطح زیرکشت و تولید توتون در جهان و ایران ۵
۲-۳- گیاه شناسی توتون ۷
۲-٤- مطالعات ژنومی در توتون ۹
۲-۵- انواع توتون ۱۱
۲-۵-۱- توتون های تیپ غربی ۱۱
۲-۵-۲- توتون های تیپ شرقی ۱۲
۲-۵-۳- توتون های تیپ نیمه شرقی ۱۲
۲-٦- تنوع ژنتیکی صفات زراعی در توتون های شرقی ۱۲
۲-۷- روابط بین صفات در توتون های شرقی ۱٤
۲-۸- عوامل موثر در کمیت و کیفیت توتون های شرقی ۱۵
۲-۹- صفات کمی و ضرورت مطالعات مولکولی ۱۷
۲-۱۰- نشانگرهای مولکولی DNA ۱۷
۲-۱۰-۱- نشانگر ریزماهواره ۱۸
۲-۱۰-۲- نشانگر بین ریزماهواره ای ۲۱
۲-۱۱- استفاده از نشانگرهای مولکولی در تجزیه صفات کمی ۲۲
۲-۱۲- جمعیتهای نقشه یابی ۲۳
۲-۱۲-۱- جمعیت F_2 ..... ۲۳
۲-۱۲-۲- جمعیت $F_{2:3}$ ۲٤
۲-۱۲-۳- تلاقی برگشتی ۲۵
۲-۱۲-٤- لاینهای اینبرد نوترکیب ۲۵
۲-۱۲-۵- هاپلوئیدهای دوگانه ۲٦
۲-۱۳- تفرق نشانگری در جمعیت ها و تهیه نقشه پیوستگی ژنتیکی ۲٦

۲-۱٤- تشخیص پیوستگی بین صفات کمی و نشانگرهای مولکولی ۲۹
۲-۱٤-۱- تجزیه پیوستگی ۲۹
۲-۱٤-۱-۱- روش های مبتنی بر صفت ۳۰
۲-۱٤-۱-۲- روش های مبتنی بر نشانگر ۳۱
۲-۱٤-۱-۲-۱- تجزیه تک نشانگری ۳۱
۲-۱٤-۱-۲-۲- روش نقشه یابی بین نشانگرهای مجاور یا مکان یابی فاصله ای ۳۷
۲-۱٤-۱-۲-۳- مکان یابی فاصله ای مرکب ٤۱
۲-۱٤-۲- مکان یابی ارتباطی ٤۳
۲-۱۵- آستانه معنی داری برای LOD و LR.....٤٤
۲-۱٦- مکان یابی ژن های کنترل کننده صفات کمی (QTLs) در توتون ٤۵
فصل سوم.....٤۸
مواد و روش‌ها ٤۹
۳-۱- ارزیابی تنوع ژنتیکی ژرم پلاسم توتون شرقی ایران ٤۹
۳-۱-۱- مواد گیاهی ٤۹
۳-۱-۲- محل اجرا، خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک و مشخصات آب و هوایی منطقه .٤۹
۳-۱-۳- آماده سازی زمین و اجرای نقشه طرح ۵۱
۳-۱-٤- صفات مورد مطالعه در بررسی تنوع ژنتیکی ۵۲
۳-۱-۵- محاسبات آماری ۵٤
۳-۱-۵-۱- آماره های توصیفی، تجزیه واریانس و مقایسات میانگین ۵٤
۳-۱-۵-۲- همبستگی بین صفات و تجزیه مسیر ۵٤
۳-۱-۵-۳- تجزیه به مولفه های اصلی ۵٤
۳-۱-۵-٤- تجزیه خوشه ای.....۵٤
۳-۱-۵-۵- تجزیه تابع تشخیص ۵۵
۳-۲- شناسایی مکان های ژنی کنترل کننده مقدار تجمع کلر در برگ توتون شرقی ۵۵
۳-۲-۱- جمعیت تهیه نقشه ژنتیکی توتون شرقی ۵۵
۳-۲-۲- اندازه گیری مقدار تجمع کلر در برگ بوته های F_2.....۵٦
۳-۲-۳- استخراج DNAی ژنومی والدین و بوته های F_2.....۵۷
۳-۲-٤- اندازه‌گیری کمیت و کیفیت DNA ۵۸

۳-۲-٤-۱- استفاده از ژل آگارز ۵۸
۳-۲-٤-۲- روش اسپکتروفتومتری ۵۹
۳-۲-۵- واکنش زنجیرهای پلیمراز (PCR) ٦۰
۳-۲-۵-۱- آغازگرهای ریزماهواره و شرایط بهینه انجام واکنش PCR..... ٦۰
۳-۲-۵-۲- آغازگرهای بین ریزماهواره ای (ISSR) و شرایط بهینه انجام واکنش PCR.... ٦۲
۳-۲-٦- الکتروفورز فراورده های PCR..... ٦٤
۳-۲-٦-۱- تهیه ژل آگارز ٦٤
۳-۲-٦-۲-الکتروفورز ژل آگارز ٦۵
۳-۲-۷- تجزیه و تحلیل داده ها ٦٦
۳-۲-۷-۱- ارزیابی فنوتیپی بوته های F_2 ..... ٦٦
۳-۲-۷-۲- تهیه نقشه پیوستگی ٦٦
۳-۲-۷-۳- تجزیه QTL..... ٦۷
فصل چهارم ٦۸
نتایج و بحث ٦۹
٤-۱-ارزیابی تنوع ژنتیکی ژرم پلاسم توتون شرقی ایران ٦۹
٤-۱-۱- تجزیه واریانس و مقایسه میانگین ها ٦۹
٤-۱-۲- آماره های توصیفی ۷٦
٤-۱-۳- همبستگی ساده بین صفات مورد مطالعه ۷۷
٤-۱-٤- تجزیه مسیر ۷۹
٤-۱-۵- تجزیه به مؤلفه‌های اصلی ۸۲
٤-۱-٦- تجزیه خوشه ای..... ۸۵
٤-۱-۷- تجزیه تابع تشخیص ۹۰
٤-۲- شناسایی مکان های ژنی کنترل کننده مقدار تجمع کلر در برگ توتون شرقی ۹۳
٤-۲-۱- انتخاب والدین مناسب برای تهیه جمعیت در حال تفرق ۹۳
٤-۲-۲- ارزیابی مقدار تجمع کلر در افراد جمعیت F_2 ..... ۹٤
٤-۲-۳- تهیه نقشه پیوستگی توتون شرقی ۹٦
٤-۲-٤- مکان یابی QTLهای کنترل کننده مقدار تجمع کلر در برگ ۱۰۰
٤-۲-٤-۱- تجزیه تک نشانگری ۱۰۰

٤-٢-٤-٢- مکان یابی فاصلهای ساده (SIM) ١٠١
٤-٢-٤-٣- مکان یابی فاصلهای مرکب (CIM) ١٠٣
٤-٣- نتیجه گیری نهایی ١٠٥
٤-٤- پیشنهاد ها ١٠٧
فصل پنجم ١٠٨
فهرست منابع ١٠٩

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱- فراوانی گامت‌های F_1، ژنوتیپ‌های F۲ و ارزش ژنوتیپی QTL ۳۲

جدول ۲-۲- کلاس‌های ژنوتیپی نشانگر و میانگین ارزش‌های ژنوتیپی مورد انتظار آنها در یک جمعیت F۲ ۳۲

جدول ۲-۳- فراوانی شرطی مورد انتظار ژنوتیپ‌های QTL در داخل کلاس‌های ژنوتیپی نشانگر در یک جمعیت F_2 ۳۵

جدول ۳-۱- اسامی ژنوتیپ های توتون شرقی مورد مطالعه ۵۰

جدول ۳-۲- برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک زراعی مزرعه آزمایش ۵۱

جدول ۳-۳- مواد لازم برای تهیه بافر استخراج DNA ۵۸

جدول ۳-٤- اجزاء واکنش PCR برای آغازگرهای SSR ٦۲

جدول ۳-۵ - اجزاء واکنش PCR برای آغازگرهای ISSR ٦۳

جدول ۳-٦- تهیه بافر TBE ۱۰ برابر (X ۱۰) ٦۵

جدول ۳-۷- مواد مورد نیاز برای تهیه بافر نمونه کذاری ٦٦

جدول ٤-۱- تجزیه واریانس صفات مورد مطالعه در ژنوتیپ های توتون شرقی بر اساس طرح لاتیس ساده ۷۰

جدول ٤-۲- مقایسه میانگین ژنوتیپ های مورد مطالعه از نظر صفات زراعی مختلف با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی دار ۷۲

جدول ٤-۳- مقادیر آماره های توصیفی صفات مختلف در توتون های شرقی ۷۷

جدول ٤-٤- ضرایب همبستگی ساده بین صفات مورد مطالعه در ژنوتیپ های توتون شرقی ۷۸

جدول ٤-۵- ضرایب مسیر و برآورد مقادیر خطای استاندارد با استفاده از bootstrap ۸۰

جدول ٤-٦- اثرات غیرمستقیم متغیرهای پیش بینی کننده واقع شده در سطوح مختلف اهمیت بر متغیرهای تابع ۸۲

جدول ٤-۷- ضرایب همبستگی متغیرها با پنج مؤلفه اصلی اول و ضریب تبین بر روی صفات مورفولوژیک ژنوتیپ های توتون شرقی ۸۳

جدول ٤-۸- مقادیر T^2 هتلینگ و F کاذب برای تعیین تعداد واقعی گروه ها ۸٦

جدول ٤-۹- فاصله (اقلیدسی) بین چهار گروه حاصل از تجزیه خوشه ای به روش ۸۹

UPGMA
جدول ٤-١٠- نتایج مقایسه میانگین صفات در گروه های حاصل از تجزیه خوشه ای ژنوتیپ ها با استفاده از آزمون دانکن ۸۹
جدول ٤-١١- نتایج تابع تشخیص برای تعیین صحت گروه بندی حاصل از تجزیه خوشه ای ۹۱
جدول ٤-١٢- ضرایب استاندارد صفات اندازه گیری شده در توابع تشخیص ۹۲
جدول ٤-١٣- ارزش‌های فنوتیپی مقدار تجمع کلر در برگ والدین و مقایسه میانگین آنها از طریق t- استیودنت ۹٤
جدول ٤-١٤- نشانگرهای پیوسته شناسایی شده برای تجمع کلر از طریق روش تجزیه تک نشانگری ۱۰۱
جدول ٤-١٥- QTLهای شناسایی شده برای مقدار تجمع کلر در برگ به روش مکان یابی فاصله‌ای ساده در جمعیت F_2 ۱۰۲
جدول ٤-١٦- QTLهای شناسایی شده برای مقدار تجمع کلر در برگ به روش مکان یابی فاصله‌ای مرکب در جمعیت F_2 ۱۰٤

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۲-۱- توزیع سطح توتون و تنباکو استان ها نسبت به کل کشور در سال زراعی ۱۳۸۹ ٦

شکل ۲-۲- تولید میزان توتون و تنباکو استان ها نسبت به کل کشور در سال زراعی ۱۳۸۹ ٦

شکل ۲-۳- گیاه توتون ۹

شکل ۲-٤- نحوه تکثیر ناحیه ریزماهواره ای توسط جفت آغازگر SSR ۲۰

شکل ۲-۵- نحوه تکثیر ناحیه بین ریزماهواره ای احاطه شده توسط توالی $(TC)_n$ از طریق آغازگر $(AG)_8$ غیر قلاب شونده (a)، قلاب شونده در ناحیه ´۵ (b) و قلاب شونده در ناحیه ´۳ (c) ۲۲

شکل ۳-۱- الگوی نواری نمونه های DNA استخراج شده روی ژل آگارز ۰/۸٪ ۵۹

شکل ۳-۲- PCR گرادیانت به منظور تعیین دمای اتصال بهینه برای نشانگرهای مختلف SSR ٦۱

شکل ۳-۳- آزمون چندشکلی به منظور شناسایی نشانگرهای SSR چندشکل در بین والدین جمعیت نقشه ژنتیکی ٦۱

شکل ۳-٤- برنامه دمایی دستگاه PCR برای آغازگرهای SSR ٦۲

شکل ۳-۵- PCR گرادیانت به منظور تعیین دمای بهینه اتصال برای نشانگرهای مختلف ISSR ٦۳

شکل ۳-٦- برنامه دمایی دستگاه PCR برای آغازگرهای ISSR ٦٤

شکل ٤-۱- دیاگرام تجزیه مسیر ۷۹

شکل ٤-۲- دسته بندی ژنوتیپ‌های توتون بر اساس دو مؤلفه اول و دوم تجزیه به مؤلفه‌های اصلی روی صفات مورفولوژیک ۸۵

شکل ٤-۳- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های توتون بر اساس صفات مورفولوژیک ۸۸

شکل ٤-٤- والد Basma seres 31 (سمت راست) و SPT 406 (سمت چپ) ۹٤

شکل ٤-۵- نمودار توزیع فراوانی ارزش‌های فنوتیپی صفت تجمع کلر در برگ در نتاج F_2 حاصل از تلاقی (والد ماده) SPT 406 × Basma seres 31 (والد نر) ۹۵

شکل ٤-٦- نمایی از ژل مربوط به الکتروفورز تعدادی از افراد جمعیت با آغازگر SSR (PT30346) ۹۷

شکل ٤-٧- نمایی از ژل مربوط به الکتروفورز تعدادی از افراد جمعیت با آغازگر ISSR (UBC 810) ٩٧

شکل ٤-٨- نقشه پیوستگی توتون شرقی در جمعیت F_2 حاصل از تلاقی (والد ماده) SPT 406 × Basma seres 31 (والد نر) ٩٨

شکل ٤-٩- مقایسه نقشه پیوستگی تهیه شده برای توتون شرقی با نقشه مرجع بر اساس موقعیت نشانگرهای SSR ٩٩

شکل ٤-١٠- منحنی LOD به منظور ردیابی QTLهای کنترل کننده مقدار تجمع کلر در برگ در روی گروه پیوستگی شماره ٥ با استفاده از روش مکان یابی فاصله‌ای ساده (SIM) در جمعیت F_2 ١٠٣

شکل ٤-١١- منحنی LOD به منظور ردیابی QTLهای کنترل کننده مقدار تجمع کلر در برگ در روی گروه پیوستگی شماره ٢ با استفاده از روش مکان یابی فاصله‌ای مرکب (CIM) در جمعیت F_2 ١٠٥

فصل اول

مقدمه

۱- مقدمه

توتون (*Nicotiana tabacum* L.) یکی از مهم ترین گیاهان صنعتی است که در اقتصاد کشورهای تولید کننده آن نقش مهمی داشته و درآمد حاصل از برگ خشک (مهم ترین قسمت اقتصادی توتون) رقم قابل توجهی از درآمد ملی کشورهای تولید کننده را شامل می شود (زمانی، ۱۳۸۹). انوع مختلفی از توتون بر اساس نوع مصرف، نحوه خشکانیدن برگ و خصوصیات ظاهری گیاه وجود دارد (Ren and Timko, 2001). بر اساس خصوصیات ظاهری این گیاه که متداول ترین و مرسوم ترین طبقه بندی می باشد، توتون به سه تیپ غربی، شرقی و نیمه شرقی تقسیم می شود (زمانی، ۱۳۸۹). توتون های شرقی متمایز از دیگر انواع توتون بوده و دارای برگ های کوچک و ظریف همراه با عطر و طعم مطبوع می باشند و به وفور در خرمن سیگارت ها مورد استفاده قرار می گیرند. توتون های شرقی در ترکیه، لبنان، یونان، ایران و بلغارستان به طور وسیع کشت می شوند (Karaivazoglou *et al.,* 2006). در ایران ژرم پلاسم غنی از توتون شرقی وجود دارد.

تنوع ژنتیکی اساس و پایه کار اصلاح نباتات است. به‌نژادگران در صورتی می‌توانند موفقیت زیادی در برنامه‌های اصلاحی توتون شرقی داشته باشند که تنوع و شانس انتخاب مواد مناسب برای آن‌ها موجود باشد. به همین دلیل گام نخست در آغاز برنامه اصلاحی، ارزیابی تنوع ژنتیکی و پتانسیل بالقوه موجود در ژرم پلاسم توتون شرقی می باشد. در همین راستا، بررسی مورفولوژیک ژرم پلاسم اولین قدم جهت توصیف و گروه بندی ژنوتیپ ها می‌باشد. ارزیابی تنوع ژنتیکی می تواند در شناسایی گروه های هتروتیک برای برنامه های دورگ گیری و تشکیل جمعیت های در حال تفرق به منظور تعیین مکان های ژنی کنترل کننده صفات مختلف موثر واقع شود (Darvishzadeh *et al.,* 2010). تحقیقات مختلف نشان داده است که ترکیبات فراوانی در برگ توتون وجود دارد که از میان آن ها ترکیبات معدنی و به ویژه عنصر کلر نقش مهمی در کیفیت برگ توتون شرقی دارد (Gisquet and Hitier, 1961; Hawks, 1970). اصلاح کیفیت توتون در کنار عملکرد برگ خشک توتون از شاخص ترین اهداف به‌نژادی به شمار می آید. این صفت به عنوان صفت پیچیده ژنتیکی تحت تاثیر عوامل محیطی قرار گرفته، توسط ژن هایی