دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

ارزیابی روابط ژنتیکی بین ۳۶ ژنوتیپ از گونه‌های کلزا (*Brassica* sp.) با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR

بنفشه محجوب[۱]، حمید نجفی زرینی[۲] و سیدحمیدرضا هاشمی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، (نویسنده مسوول: mahjoobbanafshe@yahoo.com)
۲- استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۳- کارشناس ارشد، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۱/۱

چکیده

مطالعه روابط ژنتیکی، پیش‌نیازی برای اصلاح گیاهان زراعی و هم‌چنین پیش‌نیازی برای حفظ و نگهداری منابع ژنتیکی است. با توجه به اینکه کلزای هیبرید عملکرد بیشتری از لاین‌های اینبرد دارد، لزوم تعیین تنوع ژنتیکی در این گیاه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است در این مطالعه تنوع ژنتیکی ۳۶ ژنوتیپ جنس Brassica با استفاده از ۱۳ نشانگر ISSR مورد ارزیابی قرار گرفت. در مجموع ۲۶۷ قطعه تکثیری امتیازدهی شدند که از این تعداد ۲۵۷ مکان چندشکلی (۹۶/۳۸٪) نشان دادند. میانگین PIC و MI به‌ترتیب ۰/۳۴ و ۶/۴۸ بدست آمد. آغازگر ISSR16 بالاترین مقدار PIC، ۰/۴ را نشان داد. نتایج نشان داد که میانگین شاخص‌های نشانگری شامل تنوع ژنتیکی نی، ضریب شانون، تعداد آلل موثر به‌ترتیب ۰/۳۴، ۰/۵۱، ۱/۵۸ می‌باشد. ترسیم تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA ژنوتیپ‌های مورد بررسی را به ۳ گروه و۳ گروه فرعی تفکیک نمود که حاکی از گروه‌بندی بر اساس دو سطح پلوییدی، تتراپلوییدو دیپلوییدمی‌باشد. تنوع ژنتیکی نشان داده شده بوسیله نشانگر ISSR در این پژوهش نشان‌دهنده این است که این نشانگر میتواند برای شناسایی تفاوت‌های بین‌گونه‌ای و همچنین داخل گونه‌ای در مطالعات فیلوژنتیکی استفاده شود و به‌منظور بررسی دقیق‌تر روابط و ساختار ژنتیکی ژنوتیپ‌های کلزا همزمان با بکارگیری صفات مورفولوژیکی پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، نشانگرهای ISSR، کلزا

مقدمه

کلزای زراعی (*Brassica napus*) از مهم‌ترین گیاهان دانه روغنی در دنیا می‌باشد به‌طوری که دانه کلزا حاوی ۴۶-۴۰ درصد روغن می‌باشد (۴). بر اساس FAO 2012 کلزا به‌عنوان گیاه دانه روغنی، بیشترین سطح زیر کشت را در جهان بعد از آفتابگردان و سویا دارا می‌باشد (۷). به‌طورکلی روغن کلزا در مقایسه

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1393.6.14.8.9]

با روغن‌های حاصل از دانه‌های روغنی نظیر آفتابگردان، ذرت و سویا به‌دلیل دارا بودن اسیدهای چرب اشباع نشده و عدم وجود کلسترول از کیفیت تغذیه‌ایی بالایی برخوردار است (۹). کلزا گیاهی است خودگشن که میزان خودگشنی در آن ۶۷ تا ۷۸ درصد می‌باشد.

گونه‌های مهم کلزا شامل *B. napus*، *B. juncea* و *B. rapa* هستند. گونه *B. napus* یک گونه آمفی‌دیپلوئید طبیعی است که از تلاقی گونه روغنی (*B.rapa*(AA)) با کلم (*B. oleracea*(CC)) و دو برابر شدن کروموزوم‌های هیبرید حاصله بدست آمده است (۱). با توجه به اینکه کلزای هیبرید (دورگ) عملکرد بیشتری از لاین‌های اینبرد دارد، لزوم تعیین تنوع ژنتیکی در این گیاه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و استفاده از روش‌های جدید ارزیابی تنوع ژنتیکی به‌منظور انتخاب والدین دورگ و تعیین میزان قرابت ارقام ضروری می‌باشد. در آغاز یک برنامه اصلاحی، آگاهی از روابط خویشاوندی و فیلوژنی در میان ژنوتیپ‌ها، تکمیل‌کننده اطلاعات فنوتیپی در پیشبرد اصلاح جمعیت‌هاست. بنابراین آگاهی از تنوع ژنتیکی و مدیریت منابع ژنتیکی به‌عنوان اجزاء مهم پروژه‌های اصلاح نباتات کلزا تلقی می‌گردند.

جهت بررسی تنوع و ساختار ژنتیکی ژنوتیپ‌های گیاهی روشهای متفاوتی از جمله روشهای کلاسیک وجود دارد که استفاده از صفات مورفولوژیک می‌باشد، اما با توجه به اینکه تعداد صفات مورفولوژیک محدود بوده و تحت‌تأثیر سن گیاه و محیط قرار دارند، امروزه از روش‌های مطمئن‌تری مانند نشانگرهای مولکولی استفاده می‌شود (۸). استفاده از نشانگرهای DNA به‌عنوان ابزارهای کارآمد و مکمل جهت بررسی و برآورد سطح تنوع ژنتیکی و روابط بین افراد گونه و جمعیت، به طور چشمگیری افزایش یافته است. استفاده از این روش‌ها، نه تنها دقت، قدرت، سرعت اندازه‌گیری و برآوردها را افزایش داده، بلکه موجب تولید حجم عظیم داده‌ها شده است (۱۳).

در میان تکنیک‌های انگشت‌نگاری DNA، ISSR (Inter Simple Sequence Repeat) به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حضور یک آغازگر مکمل با توالی موتیف ریزماهواره‌ها در ژنوم تکثیر می‌شود (۲). ISSR اولین بار توسط زتکیوویچ و همکاران (۲۷) ارائه گردید. این نشانگر قابلیت تکثیر بین جایگاه‌های ریزماهواره را داشته و به اطلاعات قبلی از توالی ژنوم موردنظر، نیاز ندارد (۲۴). این نشانگرها از یک سو همانند نشانگرهای RAPD از نظر تکنیکی ساده و تصادفی بوده و از طرف دیگر تکرارپذیری نشانگرهای SSR را به دلیل طویل بودن طول آغازگرهایشان دارا می‌باشند (۲۴،۴). یک روش سریع، کم هزینه و مطمئن برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و نشان دادن روابط خویشاوندی کلزا می‌باشد.

ردی و همکاران (۱۸) گزارش کردند که ارزیابی معتبر و قابل تکراری برای بررسی تنوع ژنتیکی در بسیاری از گیاهان بوسیله تکنیک ISSR انجام می‌شود. تکنیک ISSR بطور

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1393.6.14.8.9]

موفق‌آمیزی در مطالعه تنوع ژنتیکی بین و درون گونه‌ها در بسیاری از گونه‌های گیاهی شامل برنج (۱۰)، ذرت (۱۱)، گندم (۱۴)، پنبه (۲۱)، کلزا (۲۳)، گلرنگ (۲۶)، تتون (۲۵)، استفاده شده است. این پژوهشگران اشاره کردند که ISSR بازتاب خوبی از تنوع ژنتیکی درون‌گونه‌ای، بین‌گونه‌ای و بین ارقام را نشان میدهد. هدف از این پژوهش شناسایی نشانگرهای ISSR موثر در تفکیک گونه‌های جنس براسیکا می‌باشد. در واقع آیا این ژنوتیپ‌ها بر اساس سطوح‌پلوییدی (دیپلوییدی و آلوتتراپلوییدی) تفکیک می‌شوند یا بر اساس گونه مورد نظرشان.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در این تحقیق از ۳۶ ژنوتیپ جنس براسیکا از موسسه کشت و توسعه دانه‌های روغنی تهیه شد. ژنوتیپ‌ها از دو سطح پلوییدی دیپلوییدی و تتراپلوییدی انتخاب گردید به گونه‌ای که مقایسه‌ای در گروه‌بندی بر اساس گونه و سطح پلوییدی داشته باشیم، شامل ۲۲ ژنوتیپ *B. napus* و ۵ ژنوتیپ *B. rapa* و ۵ ژنوتیپ *B. juncea* و ۴ ژنوتیپ *B. nigra* استفاده شد (جدول ۱). نمونه‌گیری از برگ‌های جوان در مرحله ۵ برگی انجام شد.

جدول ۱- کد و گونه ژنوتیپ‌های مورد استفاده در این تحقیق

گونه ژنوتیپ	کد ژنوتیپ	شماره	گونه ژنوتیپ	کد ژنوتیپ	شماره
B. napus	Okapi	۲۰	*B. napus*	ARC116	۱
B. napus	ARC115	۲۱	*B. napus*	ARC118	۲
B. napus	Arc109	۲۲	*B. juncea*	ARC135	۳
B. juncea	ARC137	۲۳	*B. rapa*	ARC165	۴
B. napus	ARC104	۲۴	*B. nigra*	ARC156	۵
B. napus	ARC103	۲۵	*B. rapa*	ARC170	۶
B. napus	Arc108	۲۶	*B. napus*	RGS003	۷
B. napus	ARC119	۲۷	*B. nigra*	ARC160	۹
B. napus	ARC122	۲۸	*B. napus*	Sarigol	۱۰
B. nigra	ARC148	۲۹	*B. napus*	ARC121	۱۱
B. napus	ARC107	۳۰	*B. juncea*	ARC131	۱۲
B. napus	ARC114	۳۱	*B. juncea*	ARC138	۱۳
B. napus	ARC120	۳۲	*B. napus*	Zafam	۱۴
B. rapa	ARC164	۳۳	*B. rapa*	ARC163	۱۵
B. napus	ARC117	۳۴	*B. juncea*	ARC130	۱۶
B. nigra	ARC155	۳۵	*B. napus*	Licard	۱۷
B. napus	ARC102	۳۶	*B. napus*	ARC112	۱۸
			B. rapa	ARC169	۱۹

استخراج DNA: استخراج DNA با استفاده از روش دلاپورتا و همکاران (۵) با کمی تغییرات انجام و کمیت و کیفیت نمونه‌ها با روش الکتروفروز ژل آگارز ۱ درصد و

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1393.6.14.8.9]

اسپکتروفتومتری تعیین شد و رقیق‌سازی لازم با توجه به غلظت هر نمونه جهت استفاده در واکنش‌های PCR انجام گردید. در این تحقیق از ۱۳ آغازگر ISSR تهیه شده از شرکت فرمنتاز استفاده گردید مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۲ ارائه شده است. هر واکنش ۱۵ میکرولیتری عبارت بود از ۸/۴ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۱/۵ میکرولیتر بافر واکنش (10X)، ۰/۶ میکرولیتر کلریدمنیزیم ۵۰ میلی‌مولار، ۰/۳ میکرولیتر مخلوط نوکلئوتیدی ۱۰ میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر آغازگر ۱۰ میکرومولار، یک واحد تک‌پلی‌مراز و ۲ میکرولیتر DNA با غلظت ۱۲۰ نانوگرم با استفاده از دستگاه ترموسایکلر انجام شد. چرخه حرارتی به صورت ۵ دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد، سپس سیکل بصورت ۱ دقیقه واسرشته‌سازی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه مرحله اتصال آغازگر بسته به دمای اتصال (Tm) آغازگر (۵۸-۵۵)، ۱ دقیقه مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و یک چرخه نهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ بود، سپس نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بود. مشاهده الگوی نواری محصولات تکثیری بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید صورت گرفت.

آنالیزهای آماری

پس از ثبت اطلاعات، باندهای حاصل از هر آغازگر بر روی ژل براساس هم‌ردیفی باندها و به صورت صفر (عدم وجود باند) و یک (وجود باند) امتیازدهی شدند پس از انجام آزمون مانتل (۱۲)، از ضریب تشابه جاکارد برای محاسبه تشابه بین ژنوتیپ‌ها استفاده گردید و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده از تجزیه خوشه‌ای بر مبنای میانگین حسابی فاصله‌ها UPGMA[1] با نرم‌افزار NTSYSpc ver 2.02 محاسبه و نمودار خوشه‌ای آن ترسیم گردید. به منظور انتخاب تعداد مطلوب خوشه از تجزیه واریانس مولکولی AMOVA[2] با استفاده نرم‌افزار GenAlex ver 6.5 استفاده شد. تجزیه به مختصات اصلی PCOA[3] و رسم نمودار دو بعدی بای پلات با استفاده از GenAlEx 6.5 انجام گردید. میزان اطلاعات چندشکلی PIC[4] از طریق فرمول PIC=∑ [2 pi (1-pi)]/n صورت گرفت (۱۷) که در آن، pi فراوانی باند iام تقسیم بر تعداد ژنوتیپ‌هاست، n تعداد نوارهای ایجاد شده (۱۳) و شاخص نشانگری (MI=Marker Index) برای هر آغازگر با استفاده از رابطه MI=PIC×EMR محاسبه گردید (۱۷) که EMR[5] از نسبت نشانگرهای چند شکل به کل نشانگرها، بدست آمد. همچنین شاخص‌های نشانگری شامل، I[6] (شاخص تنوع شانون)، ne[7] (متوسط تعداد آلل موثر در هر مکان ژنی)، h[8] (تنوع ژنتیکی نی) نیز با استفاده از GenAlEx 6.5 محاسبه گردید.

در این تحقیق ۱۳ آغازگر مورد استفاده قرار گرفت. در مجموع ۲۶۷ باند امتیازدهی شد که از بین آنها ۲۵۷ باند چند شکل بودند (جدول ۲). از بین آغازگرهای مورد استفاده، آغازگر ISSR16 با ۲۷ نوار بیشترین تعداد نوار

1- Unweighted paired group method using arithmetic average
2- Analysis of Molecular Variance
3- Principle cordinate analysis
4- Polymorphism Information Content
5- Effective Multiplex Ratio
6- Shannon's Information index
7- Effective number of alleles
8- Nei's (1973) gene diversity

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1393.6.14.8.9]

چندشکلی را ایجاد نمود. میانگین درصد چندشکلی بدست آمده در این تحقیق (۹۶/۳۸ درصد)، تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌ها را توجیه می‌کند. بیشترین مقدار PIC، ۰/۴ و مربوط به آغازگر ISSR16 و میانگین PIC در این تحقیق برابر ۰/۳۴ بود. شاخص کارایی نشانگر MI بر اساس تعداد نوارهای چندشکلی برای هر آغازگر محاسبه شد که بین ۱۰/۸ تا ۳/۵۱ متغیر بود بیشترین مقدار شاخص نشانگری مربوط به آغازگر ISSR16 که نشان‌دهنده قدرت تفکیک بالای این آغازگر در مقایسه با سایر آغازگرها می‌باشد. یکی از مهم‌ترین شاخص‌ها برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در بین ژنوتیپ‌ها و جمعیت‌ها، شاخص تنوع ژنی نی (۱۵) است. برآورد شاخص نی نشان داد که میزان تنوع ژنی بین ۰/۲۶ تا ۰/۴ متغییر بود. میانگین تنوع ژنی ۰/۳۴ بود. ضریب شانون بیانگر میزان چندشکلی در بین ژنوتیپ‌هاست (۲۱). میانگین ضریب شانون ۰/۵۱ می‌باشد که نشان‌دهنده تنوع متوسط در ژنوتیپ‌های مورد بررسی است. آغازگر ISSR16 بیشترین شاخص شانون را نشان می‌دهد و آغازگر ISSR17 کمترین شاخص شانون را دارد (جدول ۲).

جدول ۲- نام و توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای مورد استفاده در تحقیق، درصد چندشکلی، تعداد مکان‌های تکثیر شده چند شکل، محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) و شاخص نشانگری (MI)، شاخص شانون (I)، تنوع ژنی نی (h)، تعداد آلل موثر (ne) در بررسی تنوع ژنتیکی۳۶ ژنوتیپ جنس Brassica با استفاده از نشانگر ISSR

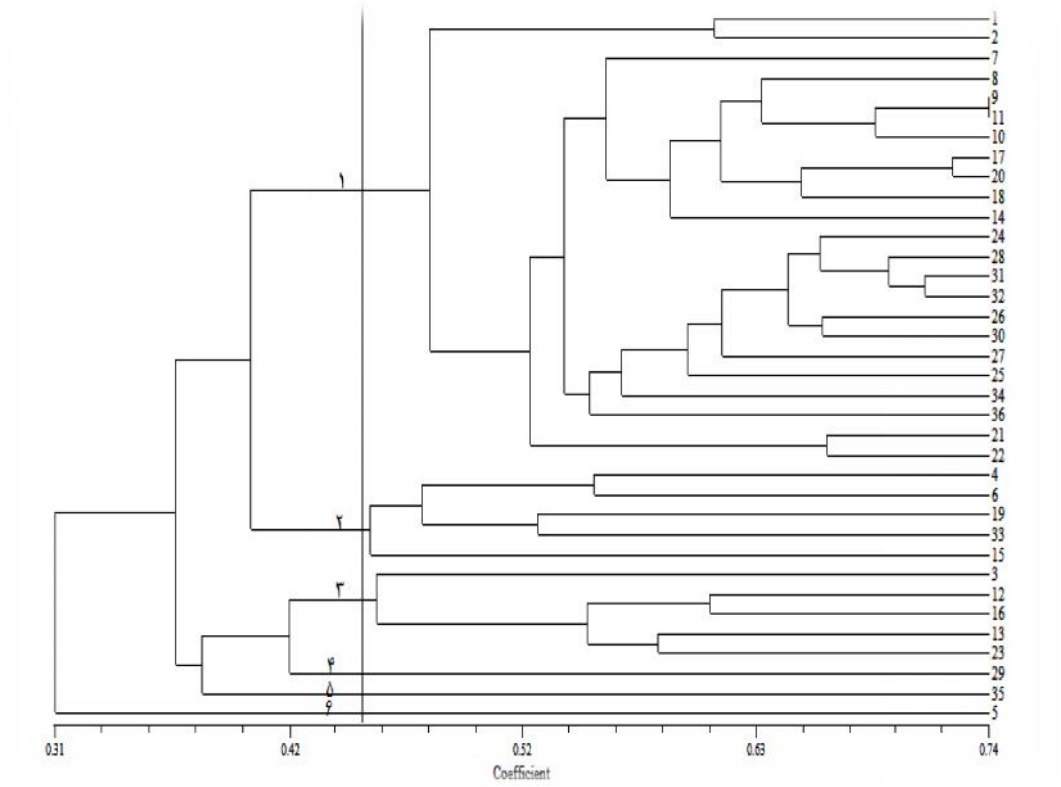
نام پرایمرها	توالی پرایمرها	تعدادمکان تکثیر شده	تعداد مکان‌های چندشکل	درصد چندشکلی	PIC	MI	I	h	ne
ISSR2	5´GAGAGAGAGAGAGAGAGAC	۲۴	۲۲	۹۱	۰/۳	۶/۰	۰/۴۶	۰/۳۰	۱/۵۱
ISSR5	5´-GTGTGTGTGTGTGTGTGTC	۹	۹	۱۰۰	۰/۳۹	۳/۵	۰/۵۸	۰/۳۹	۱/۷۰
ISSR7	5´-CGAGAGAGAGAGAGAGA	۲۳	۲۱	۹۱	۰/۳۲	۶/۱	۰/۴۶	۰/۳۰	۱/۵۳
ISSR9	5´-AGAGAGAGAGAGAGAGC	۱۹	۱۹	۱۰۰	۰/۳۱	۵/۸	۰/۴۸	۰/۳۱	۱/۵۳
ISSR10	5´-AGAGAGAGAGAGAGAGG	۱۱	۱۱	۱۰۰	۰/۳۷	۴/۰	۰/۵۵	۰/۳۷	۱/۶۵
ISSR11	5´-GAGAGAGAGAGAGAGAC	۲۰	۲۰	۱۰۰	۰/۳۷	۷/۴	۰/۵۶	۰/۳۷	۱/۶۴
ISSR12	5´-GAGAGAGAGAGAGAGAA	۲۵	۲۵	۱۰۰	۰/۳۷	۹/۲	۰/۵۵	۰/۳۷	۱/۶۵
ISSR13	5´-TCTCTCTCTCTCTCTCC	۱۹	۱۸	۹۴	۰/۳۲	۵/۴	۰/۴۸	۰/۳۲	۱/۵۶
ISSR14	5´-TCTCTCTCTCTCTCTCG	۱۹	۱۹	۱۰۰	۰/۳۵	۶/۶	۰/۵۴	۰/۳۶	۱/۵۹
ISSR16	5´-TGTGTGTGTGTGTGTGA	۲۷	۲۷	۱۰۰	۰/۴	۱۰/۸	۰/۵۸	۰/۴۰	۱/۷۱
ISSR17	5´-ACACACACACACACACC	۲۳	۲۰	۸۶	۰/۲۵	۴/۳	۰/۴۱	۰/۲۶	۱/۴۲
ISSR18	5´-ATCATCATCATCATCATCT	۲۴	۲۲	۹۱	۰/۳۳	۶/۶	۰/۴۹	۰/۳۳	۱/۵۵
ISSR19	5´ATCATCATCATCATCATCC	۲۴	۲۴	۱۰۰	۰/۳۴	۸/۱	۰/۵۱	۰/۳۴	۱/۵۹
	مجموع	۲۶۷	۲۵۷						
	میانگین			۹۶/۳۸	۰/۳۴	۶/۴	۰/۵۱	۰/۳۴	۱/۵۸

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1393.6.14.8.9]

بر اساس نتایج به دست آمده از آزمون منتل، ضریب همبستگی کوفنتیک (r =۰/۹۲) بدست آمد که نشان‌دهنده برازش خوب و همبستگی بالا بین ماتریس‌های تشابه و نمودار خوشه‌ای نهایی بر اساس ضریب تشابه جاکارد می‌باشد. تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA) انجام شده بطوری که محلی که بیشترین واریانس بین گروه‌ها برآورد شد انتخاب شد بر این اساس محل اول که ژنوتیپ‌ها را به سه خوشه اصلی و سه خوشه فرعی با واریانس بین گروه‌ها ۸٪، به‌عنوان بهترین محل برش دندروگرام انتخاب شد. درصد بالایی هتروزیگوسیتی درون گروه‌ها مشاهده شد که این می‌تواند به دلیل درصد بالای دگرگشنی در کلزا باشد.

بر اساس نمودار خوشه‌ای ترسیم شده، گروه اول شامل ۲۲ ژنوتیپ *napus*، گروه دوم ۵ ژنوتیپ *rapa*، گروه سوم ۵ ژنوتیپ *juncea* و سه گروه فرعی شامل ژنوتیپ‌های *nigra* می‌باشد (شکل ۱).



شکل ۱- دندروگرام ترسیم شده براساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد برای ۳۶ ژنوتیپ جنس براسیکا مورد مطالعه با نشانگر ISSR شماره‌گذاری ژنوتیپ‌ها در جدول ۱ آمده است.

تجزیه به مختصات اصلی PCOA[1] یک روش مقیاس‌گذاری یا مختصات‌یابی است که با ماتریس شباهت‌ها یا تفاوت‌های بین مجموعه‌ای از افراد شروع میشود و هدف آن بوجود آوردن یک نمودار گرافیکی از داده‌ها با ابعاد کمتر است، بطوریکه فاصله بین نقاط در

1- Principal Coordinate Analysis

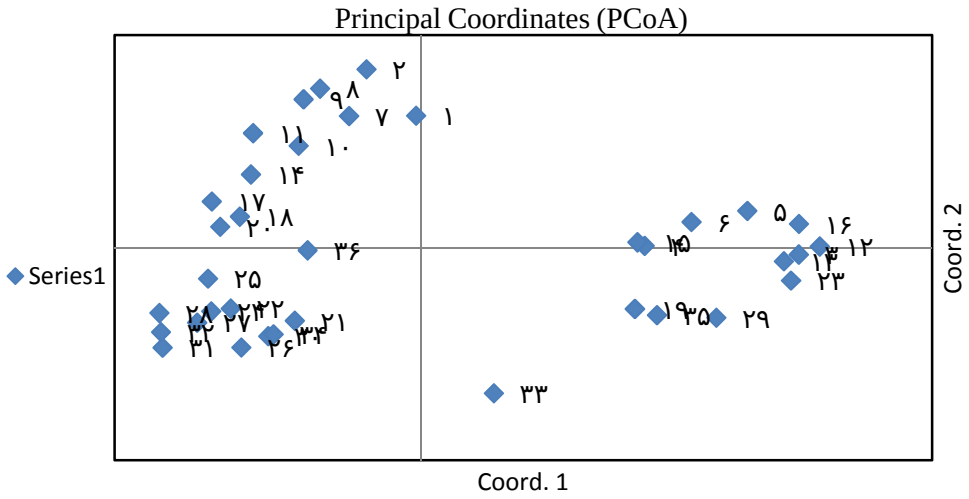
[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1393.6.14.8.9]

نمودار، نزدیک به تفاوت‌های اصلی می‌باشد (۱۹). بر این اساس دو مؤلفه اصلی اول ۵۴/۷۲ درصد واریانس کل داده‌ها را توجیه نمودند (جدول ۳) و نمودار دوبعدی بر اساس این دو مؤلفه ترسیم گردید که واریته‌ها را به ۲ گروه اصلی تقسیم‌بندی نمود (شکل ۲) بطوری‌که ژنوتیپ‌های *napus* را در گروه جداگانه‌ای قرار داد.

جدول ۳- تجزیه به مختصات اصلی مربوط به نشانگر ISSR

	۱	۲	۳
واریانس نسبی	۳۶/۶۹	۱۸/۰۳	۱۵/۲۰
واریانس تجمعی	۳۶/۶۹	۵۴/۷۲	۶۹/۹۲



شکل ۲- گروه‌های مشتق شده از PCoA در نمودار دو بعدی. شماره‌گذاری ژنوتیپ‌ها در جدول ۱ آمده است

نتایج و بحث

به‌طورکلی آغازگرهای مورد استفاده در این آزمایش از PIC بالایی برخوردار بودند که نشان‌دهنده چندشکلی و کارایی بالای آنها در این آزمایش می‌باشد. آغازگرهای ISSR16 و ISSR11 می‌توانند تنوع ژنتیکی را بهتر توجیه کنند زیرا شاخص شانون بیشتری را آشکار ساخته‌اند. گروه‌بندی بدست آمده، ژنوتیپ‌های کلزا را بر اساس گونه تفکیک نمود نه بر اساس سطح پلوییدی. دونگره و همکاران (۶) نشانگر ISSR را برای بررسی تنوع ارقام پنبه بکار بردند بطوری‌که ارقام پنبه را به دو گروه تتراپلوییدو و دیپلوییدتفکیک می‌نمود و دلیل این امر را ناشی از متفاوت بودن دو گونه و همچنین بزرگتر بودن ژنوم ارقام تتراپلوییدنسبت به ارقام دیپلوییدمی‌دانند. نکته جالب در نتایج قرارگرفتن ژنوتیپی از گونه nigra در بین گونه‌های napus است به نظر می‌رسد دلیل این امر استفاده از آغازگرهای دونوکلئوتیدی باشد چرا که نواحی

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1393.6.14.8.9]

هتروکروماتینی کروموزوم‌ها در بین گونه‌ها نیز دونوکلئوتیدی می‌باشد بنابراین در صورت استفاده از آغازگرهای سه نوکلئوتیدی، بدلیل اختصاصی شدن جایگاه توالی امکان جدا شدن دوگونه را فراهم می‌شود (۲۰).

در تجزیه به مختصات اصلی، زمانی‌که تعداد صفات یا نوارها به تعداد کمی مولفه کاهش یابد، آغازگرهای مورد استفاده به طور صحیح انتخاب نشده و تعداد محدودی از کروموزوم‌ها را تحت پوشش قرار می‌دهند و در نتیجه نمی‌توانند افراد را از همدیگر به خوبی جدا کنند (۲۲). در این پژوهش به دلیل اینکه تعداد مولفه‌های کم توجیه‌کننده نیمی از تغییرات کل می‌باشد، آغازگرهای مورد استفاده ناحیه کروموزومی کمی را تحت پوشش قرار داده و پراکنش مناسبی در قسمت‌های مختلف ژنوم ندارند. بنابراین لزوم استفاده از آغازگرهای بیشتر که ژنوم گیاه را مورد پوشش قرار دهند برای بررسی‌های تمکیلی ضروری است.

نعمتی و همکاران (۱۶) با بررسی تاثیر تنش خشکی بر ۱۰ رقم کلزا با استفاده از نشانگرهای ISSR و صفات مورفولوژیک اظهار داشتند که، نشانگرهای ISSR تنوع ژنتیکی بالایی برای ارقام کلزای مورد مطالعه آشکار کردند که می‌تواند برای برنامه‌های اصلاحی استفاده شود (۱۵). بوداک و همکاران (۳) با بررسی تنوع ژنتیکی ۲۰ گیاه علفی بوفالو گراس با سطوح کروموزومی مختلف و جمع‌آوری شده از مناطق مختلف با کمک نشانگرهای ISSR، SRAP، SSR، RAPD در ژنوم هسته و بررسی همین نشانگرها در ژنوم میتوکندری و کلروپلاست دریافتند که ارتباط معنی‌داری بین سطوح پلوییدی و تعداد آلل‌های حاصل از نشانگرهای ISSR، SRAP، SSR وجود دارد، ولی در بررسی داده‌های بدست آمده از این نشانگرها در ژنوم میتوکندری و کلروپلاست، چنین ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد.

بالابودن شاخص‌های، تنوع ژنیکی نی، شاخص شانون و میزان PIC و MI برای آغازگر ISSR16 نشان‌دهنده کارایی بالای این آغازگر در تمایز ژنوتیپ‌های براسیکا در این تحقیق بود و می‌توان از این آغازگر در بررسی تنوع ژنتیکی درون‌گونه‌ای کلزا و ارتباط آن با صفات کمی استفاده نمود. با توجه به اینکه آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق چندشکلی قابل قبولی را نشان دادند، می‌توان در مطالعات آینده روی این گیاه در ترکیب با نشانگرهای رتروترنسپوزانی بصورت نشانگرهای REMAP از آنها استفاده کرد.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1393.6.14.8.9]

منابع

1. Azizi, M., A. Soltani and S. Khavari-Khorasani. 1998. Canola, Agriculture, Physiology and Biotechnology. Jihad-e-Daneshgahi Mashhad Press. Mashhad, Iran. 230 pp. (In Persian)
2. Bornet, B. and M. Branchard. 2001. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) marker: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. Plant Molecular Biology Reporter, 19: 209-215.
3. Budak, H., R. Shearman, C. Gulsen and I. Dweikat. 2005. Understanding ploidy complex and geographic origin of the *Buchloe dactyloides* genome using cytoplasmic and under marker systems. Theorical Applied Genetics, 11: 1545-1552.
4. Chen, Y., R. Zhau, X. Lin, K. Wu, X. Qian and Sh. Huang. 2008. ISSR analysis of genetic diversity in sacred lotus cultivars. Aquatic Botany, 89: 311-316.
5. Dellaporta, S.L., J. WOOD and J.B. Tickes. 1993. A plant molecular DNA mini-preparation.: Version Π. Plant Mollecular Biology Reporter, 1: 19-21.
6. Dongre, A.B., M. Bhandarkar and Sh. Banerjee. 2007. Genetic diversity in tetraploid and diploid cotton (*Gossypium spp*.) using ISSR and microsatellite DNA markers. Indian Journal of Biotechnology, 6: 349-353.
7. Food and Agriculture Organization (FAO). 2012. Crop Production Statistics. URL: http:// www.Fao.org.
8. Fares, K., F. Guasmi, L. Touil, T. Triki and A. Ferchichi. 2009. Genetic diversity of Pistachio tree using Inter-Simple Sequence markers (ISSR) supported by morphological and chemical markers. Biotechnology, 8(1): 24-34.
9. Farzin, A., GH. Normohammdi and A.H. Shirazizade. 2006 An investigation on quantitative and qualitative characters of 25 winter Rapeseed cultivars. Journal of Research and sciences of Agricultural sciences, 12(2): 430-436. (In Persian)
10. Joshi S.P, V.S. Gupta, R.K. Aggarwal, P.K. Ranjekar and D.S. Brar. 2000. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. Theor Appl Genet, 100: 1311-1320.
11. Kantety, R.V., X.P. Zeng, J.L. Bennetzen and B.E. Zehr. 1995. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. Molecular Breeding, 1: 365-373.
12. Mantel, N.A. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Res, 27: 209-220.
13. Mohammadi, S.A. and B.M. Prasanna. 2003. Analysisi of Genetic divesity in crope plants: Salient statistical tools and consideration. Crope Science, 43: 1235-1248.
14. Nagaoka, T. and Y. Ogihara. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. Theor Apppl Genet, 94: 597-602.
15. Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *Am Nat*, 106(949): 283-92.
16. Nemati, M., A. Asghari, O. Sofalian, A. Rasoulzadeh and H. Mohamaddoust. 2012. Effect of Water Stress on Rapeseed Cultivars Using Morpho-Physiological Traits and Their Relations with ISSR Markers. Plant Physiology and Breeding, 2(1): 55-66. (In Persian)
17. Powell, W., M. Morgante, C. Andre, J. Vogel, S. Tingey and A. Rafalski. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsattlite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding, 2: 225-238.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1393.6.14.8.9]

18. Reddy, P.M., N. Sarla and E.A. Siddiq. 2000. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euphytica, 128: 9-17.
19. Rohlf, F.J. 1972. An empirical comparison of three ordination tech niques in numerical taxonomy. Syst. Zool, 21: 271-280.
20. Shahriyari Ahmadi, F., M. Salehi, V. Ghasemi Omran and M. Ramezani moghadam. 2011. Assessment of genetic diversity among some genotypes of cotton (*Gossypium* sp.) in Germplasm of Iran using microsatellite molecular markers between an ISSR. Iranian Journal of agricultural research, 4: 680-674. (In Persian)
21. Shannon, C.E. 1948. A mathematical theory of communication. AT and T Technical Journal, 27: 379-423.
22. Siahsar, B.A., M. Allahdoo and H. Shahsavand Hassan. 2010. Evaluation of Genetic Diversity of Ttiitipyrum, Triticale and Wheat Lines through RAPD and ISJ Markers. *Iranian* Journal of Agricultural Sciences, 41(3): 555-568. (In Persian)
23. Wakui, K.H. Iwata, Y. Takahashi and J. Fujigaki. 2009. Assessment of the congruity of genetic relationships and variation revealed by individual-and bulked-samples-based approaches using RAPD and ISSR markers in Japanese turnip (*Brassica rapa* ssp. *Rapa*) cultivars. Breed Science, 59: 447-452.
24. Wang, X., F. Zhao, Z. Hu, A.T. Critchley, S.L. Morrell and D. Duan. 2008. Inter simple sequence repeat (ISSR) analysis of genetic variation of *chonadrus crispus* populations from North Atlantic. Aquatic Botany, 88: 154-159.
25. Xiao, B.G. and B.C. Yang. 2007. Assessment of genetic diversity among tobacco germplasms by ISSR markers. Scientia Agricultural Sinica, 40(10): 2153-2161.
26.Yang, Y.X., W. Wu, Y.L. Zheng, L. Chen, R.J. Liu and C.Y. Huang. 2007. Genetic diversity and relationships among safflower (*Carthamus tinctorious* L.) analyzed by inter-simple sequence repeats (ISSRs). Genet. Resour. Crop Evolution. 54: 1043-1051.
27. Zietkiewicz, E., A. Rafalske and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. Genome, 20: 178-183.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1393.6.14.8.9]

Assessment of Genetic Relationships Among 36 *Brassica* Genotypes using ISSR Molecular Markers

Banafsheh Mahjoob[1], Hamid Najafi-Zarini[2] and Seyed Hamid Reza Hashemi[3]

1- M.Sc. Student, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
(Corresponding author: mahjoobbanafshe@yahoo.com)
2- Assistant Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
3- M.Sc. Genetic and Agricultural Biotechnology Institute of Tabadrestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
Received: September 20, 2013 Accepted: January 21, 2014

Abstract

Study of genetic relationships is a prerequisite for plant breeding activities as well as for conservation of genetic resources. Since the hybrid canola have more yield than inbred lines, determine the genetic diversity of this have particular importance. In the present study, genetic diversity among 36 genotype of *Brassica sp*. were determined using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. Thirteen selected primers produced 267 discernible bands, with 257 (96.38%) being polymorphic, indicating considerable genetic diversity among genotypes. Average PIC and MI of all primers were 0.34 and 6.48, respectively. The results showed that average of marker index including Nei's gene diversity, Shannon's information index, the effective number of alleles were 0.34, 0.51, 1.58 respectively in genotypes of *Brassica*. Based on an un-weighted pair-group method using arithmetic average (UPGMA) clustering algorithm, three distinct groups were established. Genetic diversity shown by the marker ISSR, indicates that these markers can be used to identify differences between species and within species, In studies of phylogenetic. In order to evaluate the relationships and genetic structure of genotype canola using morphological characteristics is proposed.

Keywords: Genetic variation, Molecular markers, ISSR, Rapeseed

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1393.6.14.8.9]