دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

بررسی روابط ژنتیکی ارقام کلزا با استفاده از نشانگرهای RAPD

سارا صفری[۱] و علی اشرف مهرابی[۲]

۱- دانشجوی دکتری، دانشگاه ایلام، (نویسنده مسوول safari_6564@yahoo.com)
۲- دانشیار، دانشگاه ایلام

تاریخ دریافت: ۹۳/۷/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۴/۴/۲۳

چکیده

منطقه جغرافیایی محدود و اصلاح متمرکز کلزا، منجر به اساس ژنتیکی محدود این گیاه شده است. بنابراین لزوم بررسی تنوع ژنتیکی در ارقام مختلف کلزا جهت برآورد و حفظ این خزانه ژنتیکی ضروری به نظر می‌رسد. در تحقیق حاضر تنوع ژنتیکی ٤٥ ژنوتیپ کلزا با استفاده از ۱۲ نشانگر RAPD بررسی شد. تجزیه کلاستر با ضریب عدم تشابه دایس و روش نزدیک‌ترین همسایه (NJ) ژنوتیپ‌ها را به هفت دسته اصلی تقسیم نمود. تنوع کل ژنوتیپ‌ها ۰/٦٦۲ بود. شاخص چند شکلی اطلاعات (PIC) از ۰/۱٥۸ تا ۰/٤۸۳ و با میانگین ۰/۳٤٦ بدست آمد. تعداد کل آلل‌های تکثیر شده برابر ٦۸ با میانگین ٥/٦٦ آلل برای هر نشانگر بود. درصد پلی‌مورفیسم ژنوتیپ‌ها برای همه نشانگرها صددرصد بود. این نشانگرها توانستند ۱ باند منحصر به فرد در نشانگر Oligo 213 برای ژنوتیپ Hyola 420 نشان دهند. این می‌تواند نکته‌ای با ارزش در مورد این نشانگر برای مطالعات بعدی باشد. بنظر می‌رسد بررسی و توجه به تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، بر پایه نشانگرهای این تحقیق می‌تواند منبعی برای تحقیقات بعدی در اصلاح کلزا برای دستیابی به اهدافی چون هتروزیس بیشتر در تولید هیبرید باشد.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، کلزا، RAPD

مقدمه

کلزا بعد از سویا مقام دوم را در تأمین روغن نباتی دارد. به طوری که حدود ۱۴/۷ درصد کل روغن نباتی را در جهان به خود اختصاص داده است، قدمی (۵). در سال‌های اخیر کشت و توسعهٔ کلزا در کشور مورد توجه قرار گرفته‌است. ویژگی‌های خاص کلزا و سازگاری آن با شرایط آب و هوایی اکثر نقاط کشور سبب شده است که توسعه کشت این گیاه به عنوان نقطه امیدی جهت رهایی از وابستگی به واردات روغن کشور به شمار آید. از دلایل افزایش تقاضا برای کلزا، ارزش تغذیه‌ای بالای روغن آن و هزینه پایین تولید در مقایسه با سایر روغن‌های گیاهی است، خواجه‌پور (۸). لذا توجه به ژرم‌پلاسم و ژنتیک این گیاه به منظور شناسایی ارقام برتر ژنتیکی جهت کمک به برنامه‌های اصلاحی و افزایش سازگاری و عملکرد آن در سطح کشور مفید به نظر می‌رسد، قدمی (۵). کلزا نیز مانند گندم (*Triticum aestivum*) از هیبریداسیون خودبه‌خودی دنبال شده توسط پلی‌پلوئیدیزاسیون سرچشمه گرفته است. به‌هرحال، در مقایسه با T. aestivum و بیشتر گونه‌های زراعی دیگر، *Brassica napus* یکی از گونه‌های نسبتاً جدید است که احتمالاً فقط چند قرن پیش به وجود آمده است. ممکن است مسافرت بازرگانان بین آسیا، اروپا و آفریقا، *B. rapa* را از اروپای شرقی و آسیا به منطقه مدیترانه منتقل کرده و احتمالاً *B. oleracea* نیز به‌طرف مشرق آورده شده و اولین هیبریداسیون خودبه‌خودی منجر به ایجاد *B. napus* شده است، مین و حسن (۱۲). تعیین سطح تنوع ژنتیکی گونه‌های گیاهی و خویشاوندان وحشی آن‌ها، نقش اساسی در اصلاح موفقیت‌آمیز ارقام زراعی دارای مقاومت پایدار به تنش‌های زیستی و متحمل به تنش‌های غیرزیستی، ایفا می‌کند. تنوع ژنتیکی معمولاً با محاسبه فاصله ژنتیکی یا شباهت ژنتیکی که دلالت بر تفاوت‌ها یا شباهت‌هایی در سطح ژنتیکی دارد، بر اساس داده‌های حاصل از ارزیابی صفات مختلف یا بررسی مولکول‌های زیستی سنجیده می‌شود. در واقع تنوع ژنتیکی از تکامل طبیعی نشأت گرفته و مهم‌ترین جزء در پایداری نظام‌های بیولوژیکی است و سازگاری دراز مدت و بقای جمعیت را تضمین می‌کند، قره‌یاضی (۶).

پیشرفت در زمینه تکنولوژی نشانگرهایDNA، امکانات جدیدی برای تجزیه ژنتیکی و اصلاح گیاهان فراهم نموده‌است. با توجه به این نکته که قسمت اعظم DNA، شاید در حدود ۹۰ درصد در بسیاری از گونه‌ها شامل نواحی غیر کد شونده می‌باشد، با تکیه بر تنوع بیوشیمیایی یا مورفولوژیکی فقط قسمت محدودی از تنوع که مربوط به نواحی کدکننده ژنوم است، بررسی می‌شود. تنوع در قسمت‌های غیرکدکننده 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، نقوی و همکاران (۱۴). روش‌های اصلاحی مبتنی بر نشانگر به خاطر سازگاری‌شان و غیر وابسته بودن به پارامترهای محیطی و مراحل رشدی، روش‌هایی قدرتمند و انتخاب‌های مناسبی هستند، بورنت و همکاران (۲). متأسفانه برای بیشتر گیاهان زراعی توالی بازی بسیاری از نقاط ژنوم فعلاً در دسترس نیست. بنابراین روشی که بتواند از مزایای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بهره جوید اما نیازمند اطلاعات اولیه در مورد توالی بازی DNA مورد نظر نباشد، ضروری می‌باشد. ویلیامز و همکارانش نام DNA چند شکل تکثیر شده تصادفی را برای این روش برگزیدند. این روش به دلیل سهولت و هزینه کم، در موجودات مختلف به ویژه در

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.19.14.9]

گیاهان به وفور مورد استفاده قرار می‌گیرد، قره‌یاضی (۶) از کاربردهای نشانگرهای RAPD، تعیین جنسیت، تولید آغازگرهای اختصاصی PCR برای ژنوم‌های ناشناخته، تجزیه و تحلیل کمی نمونه‌های زیستی مختلف، بررسی روند تکامل و رده‌بندی موجودات و همچنین تجزیه و تحلیل ژرم‌پلاسم می‌باشد، کیانی و همکاران (۹)، با توجه به موارد ذکر شده در خصوص اهمیت تنوع ژنتیکی در بهبود و افزایش کیفیت گیاهان و با توجه به افزایش روزافزون برنامه‌های اصلاحی بر روی گیاهان زراعی و اهلی‌سازی گونه‌های وحشی، تحقیق و مطالعه در این خصوص نیز روز به روز در حال افزایش و پیشرفت می‌باشد و تحقیقات بسیاری در این زمینه صورت گرفته‌است که از آن جمله، فاضلی و همکاران (۴) با بررسی تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مختلف *B. napus* با استفاده از نشانگرهای RAPD، گزارش دادند که این نشانگرها دارای پتانسیل نسبتاً بالایی بوده و ژنوتیپ‌های بررسی شده بر اساس تجزیه کلاستر به پنج گروه تقسیم شدند. هدایتی مرزونی و سمیع زاده لاهیجی (۷) با بررسی تنوع ژنتیکی ارقام و لاین‌های زمستانه کلزا با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD و SSR با ترکیب داده‌های حاصل از این دو نشانگر، ۲۰ ژنوتیپ مورد بررسی را در ۵ گروه قرار دادند. مرجانویکو همکاران (۱۱) با ارزیابی فنوتیپی و مولکولی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های کلزا گزارش دادند، دندروگرام بدست آمده برای صفات مورفوبیوشیمیایی و نتایج RAPD، برای هر دو مورد به مقدار جزئی ژنوتیپ‌ها را بر اساس منشاء جغرافیایی‌شان گروه‌بندی نمود. شنگ وو و همکاران (۱۵) نیز با ارزیابی تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم *B. napus* چین و اروپا با استفاده از نشانگرهای RAPD، وقوع تنوع ژنتیکی قابل توجهی بین اکسشن‌های چینی و اروپایی را گزارش دادند. محجوب و همکاران (۱۰) نیز با ارزیابی روابط ژنتیکی بین ۳۶ ژنوتیپ از گونه‌های کلزا با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR ژنوتیپ‌های مورد بررسی را به سه گروه تفکیک نمودند. همچنین مقدم و همکاران (۱۳) در بررسی تنوع ژنتیکی در ارقام کلزا توسط نشانگرهای RAPD و ریزماهواره، گزارش دادند که دندروگرام حاصل از ترکیب نتایج دو نشانگر، ارقام پاییزه و بهاره را در دو گروه جداگانه تقسیم کرد. در تحقیق دیگری اصغری و همکاران (۱) در بررسی تنوع ژنتیکی ارقام کلزا با استفاده از صفات مورفولوژیکی و نشانگرهای مولکولی، تفاوت‌های معنی‌داری بین ارقام مورد نظر در همه صفات مورد مطالعه، نشان دادند. استفاده از تجزیه کلاستر (UPGMA) ارقام را در سه گروه قرار داد. نتایج این تحقیق نشان داد که تنوع بالایی درون و بین ارقام وجود دارد. با توجه به این که نشانگرهای مولکولی برای بررسی تنوع ژنتیکی در انواع مختلفی از ژرم‌پلاسم *B. napus* مفید شناخته شده‌است، مین و حسن (۱۲). در تحقیق حاضر نیز از نشانگرهای مولکولی RAPD جهت بررسی تنوع ژنتیکی ۴۵ رقم کلزا استفاده شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق ۴۵ ژنوتیپ مختلف کلزا (جدول ۱)، از مرکز تحقیقات و اصلاح بذر کرج تهیه و به میزان ۲۰ تا ۳۰ بذر از هر ژنوتیپ در گلدان‌های کوچک در گلخانه کشت و مورد بررسی قرار گرفت. پس از کشت بذور ژنوتیپ‌های مختلف، بعد از ۱۰ تا ۱۴ روز در مرحله ۲ تا سه برگی DNAی نمونه برگی به روش CTAB استخراج شد (۳). کیفیت نمونه‌های DNA نیز از طریق الکتروفورز بر روی ژل آگارز با غلظت ۰/۸ درصد تعیین شد. بعد از تعیین کیفیت DNAهای استخراج شده، تنها نمونه‌های باکیفیت خوب انتخاب و برای تکثیر PCR با ۱۲ نشانگر RAPD (جدول ۳)، که قادر به تکثیر ژنوم ژنوتیپ‌های مورد تحقیق بودند، استفاده شد. حجم نهایی واکنش ۲۰ µL و مخلوط واکنش برای هر نمونه شامل، ۲µL بافر PCR (۱X)، ۱µL آغازگر (CinaGene)، ۰/۵۳ µL مخلوط dNTP (۱mM)، ۱/۸ µL MgCl2 (۲۰mM)، ۲U آنزیم Taq پلیمراز (Armin Shegarph) و ۲µL DNA ژنومی بود. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Biorad C1000^{TM}) اجرا شد (جدول ۲).

محصولات PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد، تحت ولتاژ ۹۰V به‌مدت ۳ ساعت جداسازی شده و باندهای تکثیر شده با محلول اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و توسط دستگاه مستندسازی ژل تصویربرداری شد.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.19.14.9]

جدول ۱- مشخصات ژنوتیپ‌های مورد استفاده در تحقیق

Table1. Information of used genotypes

ردیف	نام ژنوتیپ	تیپ رشدی	منشأ ژنوتیپ
۱	Kristiana	بهاره	کانادا
۲	Dankeld	پاییزه	استرالیا
۳	Shiralee	بهاره	استرالیا
۴	Kimberly	بهاره	استرالیا
۵	Hyola308	پاییزه	استرالیا
۶	Hyola401	پاییزه	استرالیا
۷	Hyola420	پاییزه	استرالیا
۸	Licord	پاییزه	آلمان
۹	Sarigol	بهاره	آلمان
۱۰	RGS	بهاره	آلمان
۱۱	SLM046	پاییزه	آلمان
۱۲	Ebonite	پاییزه	آلمان
۱۳	RGS003	بهاره	آلمان
۱۴	Talaye	پاییزه	آلمان
۱۵	PF	بهاره	آلمان
۱۶	Dexter	پاییزه	آلمان
۱۷	Vectra	پاییزه	آلمان
۱۸	Iris	بهاره	آلمان
۱۹	Nkbilbao	پاییزه	فرانسه
۲۰	Nkoctans	پاییزه	فرانسه
۲۱	Okapi	پاییزه	فرانسه
۲۲	Nkkarabia	پاییزه	فرانسه
۲۳	NKAVIator	پاییزه	فرانسه
۲۴	Chmplain	پاییزه	فرانسه
۲۵	Savannah	پاییزه	فرانسه
۲۶	Adriana	پاییزه	فرانسه
۲۷	RNX361	پاییزه	فرانسه
۲۸	Bilbao	پاییزه	فرانسه
۲۹	Karun	پاییزه	فرانسه
۳۰	Cooper	پاییزه	فرانسه
۳۱	Olpro	پاییزه	فرانسه
۳۲	Elvis	پاییزه	فرانسه
۳۳	Goliath	بهاره	دانمارک
۳۴	Modena	پاییزه	دانمارک
۳۵	VDH8003	پاییزه	هلند
۳۶	Parad	پاییزه	هلند
۳۷	Opera	پاییزه	سوئد
۳۸	Zarfam	پاییزه	ایران
۳۹	Karaj1	پاییزه	ایران
۴۰	Elect	ناشناخته	ناشناخته
۴۱	Magnet	ناشناخته	ناشناخته
۴۲	Heros	ناشناخته	ناشناخته
۴۳	Madrigal	ناشناخته	ناشناخته
۴۴	Elite	ناشناخته	ناشناخته
۴۵	Karola	ناشناخته	ناشناخته

جدول ۲- برنامه داده شده به دستگاه PCR

Table 2. Given program of PCR reaction

مرحله واکنش	عمل انجام شده	دما (C°)	زمان
۱	واسرشته‌سازی DNA ژنومی	۹۴	۴ دقیقه
۲	واسرشته‌سازی DNA ژنومی	۹۲	۳۰ ثانیه
۳	اتصال آغازگر به رشته الگو	Tm-۵	۴ دقیقه
۴	گسترش رشته جدید	۷۲	۵ دقیقه
۵	۵ چرخه تکرار مراحل ۴-۲	--	--
۶	واسرشته‌سازی DNA ژنومی	۹۲	۴۰ ثانیه
۷	اتصال آغازگر به رشته الگو	Tm	۱ دقیقه
۸	گسترش رشته جدید	۷۲	۲ دقیقه
۹	۳۳ چرخه تکرار مراحل ۸-۶	--	--
۱۰	گسترش نهایی	۷۲	۵ دقیقه
۱۱	مرحله نگهداری	۴	۱۰ دقیقه

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.19.14.9]

به منظور تجزیه داده‌ها، در ابتدا برای تشکیل ماتریس فاصله، باندهای حاصل از تکثیر ژنوتیپ‌ها با استفاده از هر آغازگر بعنوان داده‌های اولیه با اعداد یک برای وجود باند و صفر برای عدم وجود باند تشکیل شد و سپس این اطلاعات با استفاده از نرم‌افزارهای DARwin 5.0، MEGA 3.1 و XLSTAT مورد بررسی قرار گرفت. سودمندی نشانگرها به تعداد و فراوانی آلل‌ها مربوط می‌شود و با شاخص‌های متعددی از جمله، محتوای اطلاعات چند شکل، احتمال یکسانی و قدرت تفکیک هر نشانگر محاسبه می‌شود. در این تحقیق برای بررسی این مورد، شاخص‌های PIC[1]، PPB[2] و تعداد آلل‌های تکثیر شده برای هر نشانگر بدست آمد (جدول ۳).

معادله (۱): شاخص محتوای چند شکلی اطلاعات:

$$PIC\ Value=1-\Sigma Pij^2$$

Pij: فراوانی آلل i ام در نشانگر j ام

نتایج و بحث

برای بررسی کارایی سیستم نشانگری بکار گرفته شده در این تحقیق، از پارامترهای تنوع ژنتیکی بدست آمده از جمله شاخص چند شکلی اطلاعات (PIC)، میزان کل تنوع بدست آمده، تعداد کل باندهای تکثیر شده توسط هر نشانگر و درصد پلی مورفیسم باندها (PPB) و تحلیل دندروگرام بدست آمده استفاده شد. در مجموع ۶۸ آلل برای آغازگرها تکثیر شد. تعداد آلل‌ها از ۳ تا ۱۱ با میانگین ۵/۶۶ برای هر نشانگر بود. در بین آغازگرها، نشانگر Oligo 342 با ۸ آلل و سپس نشانگرهای Oligo 348 و Oligo 341 با ۷ آلل، بیشترین تعداد آلل تولید شده را داشتند (جدول ۳).

محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) از ۰/۱۵۸ (نشانگر Oligo 349) تا ۰/۴۸۳ (نشانگر Oligo 348) با میانگین ۰/۳۴۶ بدست آمد (جدول ۳).

برای داشتن دیدگاه بهتر و کامل‌تر در مورد فواصل ژنتیکی بین ارقام و همچنین برای مشاهده این فواصل بصورت چند بعدی، نمودار بای پلات بین ۴۵ ژنوتیپ مختلف با استفاده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس دو مؤلفه اصلی اول و دوم برای ماتریس عدم تشابه، با استفاده از برنامه DARwin5.0 ترسیم شد. با استفاده از این اطلاعات میزان پراکنش نشانگرهای مختلف بر روی ژنوم ژنوتیپ‌های مختلف کلزا بررسی شد (شکل ۱). بر اساس نمودار بدست آمده سهم دو مؤلفه اصلی اول به ترتیب برابر با ۱۵/۵۵ و ۱۱/۰۳ و مجموعاً برابر با ۲۶/۵۶ درصد شد. این نشان می‌دهد که دو مؤلفه اول برای تمام نشانگرهای بکار رفته، سهم کمی از اطلاعات را در بر می‌گیرند، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که این نشانگرها احتمالاً در سطح ژنوم کلزا و ۱۹ کروموزوم مختلف آن پراکنش خوبی دارند و می‌توانند سطح وسیعی از آن را پوشش دهند.

جدول ۳- مشخصات آغازگرهای RAPD و متغیرهای محاسبه شده

Table 3. The information of RAPD markers and calculated variables

ردیف	نام پرایمر	توالی پرایمر	دمای اتصال (C°)	تعداد آلل	اندازه قطعات تکثیری (bp)	PIC	PPB
۱	Oligo 42	TTAACCCGGC	۳۲	۲	۷۰۰–۱۱۰۰	۰/۲۷۱	۱۰۰
۲	Oligo 338	CTGTGGCGGT	۳۴	۶	۲۵۰–۱۲۰۰	۰/۳۷۸	۱۰۰
۳	Oligo 339	CTCACTTGGG	۳۲	۶	۴۰۰–۱۵۰۰	۰/۲۲۵	۱۰۰
۴	Oligo 340	GAGAGGCACC	۳۴	۶	۳۰۰–۱۷۰۰	۰/۳۴۸	۱۰۰
۵	Oligo 341	CTGGGGCCGT	۳۶	۷	۴۰۰–۱۵۰۰	۰/۴۰۰	۱۰۰
۶	Oligo 342	GAGATCCCTC	۳۲	۸	۲۵۰–۱۰۰۰	۰/۴۰۶	۱۰۰
۷	Oligo 343	TGTTAGGCTC	۳۰	۶	۲۵۰–۸۰۰	۰/۴۲۹	۱۰۰
۸	Oligo 345	GCGTGACCCG	۳۶	۶	۲۹۰–۸۰۰	۰/۳۸۲	۱۰۰
۹	Oligo 347	TTGCTTGGCG	۳۲	۵	۴۰۰–۱۰۰۰	۰/۴۶۳	۱۰۰
۱۰	Oligo 348	CACGGCTGCG	۳۶	۷	۲۰۰–۱۰۰۰	۰/۴۸۳	۱۰۰
۱۱	Oligo 349	GGAGCCCCCT	۳۶	۶	۲۵۰–۱۰۰۰	۰/۱۵۸	۱۰۰
۱۲	Oligo 213	CAGCGAACTA	۳۰	۳	۲۰۰–۹۰۰	۰/۲۱۱	۱۰۰

این مطلب نیز کارامدی و کارایی نشانگرهای مورد استفاده را یادآور می‌شود. برای بررسی میزان شباهت بین ژنوتیپ‌های مختلف و گروه‌بندی آنها، با استفاده از روش نزدیک‌ترین همسایه (NJ) و ضریب عدم تشابه دایس، دندروگرام ژنوتیپ‌های مختلف در برنامه MEGA ترسیم شد (شکل ۲). طبق نتایج حاصل از دندروگرام بدست آمده، ژنوتیپ‌ها به هفت گروه اصلی تقسیم شدند. بیشترین تعداد ژنوتیپ‌ها در گروه I (۳۳ ژنوتیپ) قرار گرفت. گروه III و V نیز هر کدام با ۱ ژنوتیپ، کمترین تعداد ژنوتیپ‌ها را در خود جای دادند. دو ژنوتیپ ایرانی نیز در دو گروه مختلف قرار گرفتند. در مورد این نتایج می‌توان چنین تفسیر کرد که ژنوتیپ‌های قرار گرفته در هر گروه دارای تشابهات ژنومی بیشتر و ژنوتیپ‌های قرار گرفته در گروه‌های دورتر دارای اختلافات بیشتر ژنتیکی هستند. این اطلاعات را می‌توان در بررسی و برنامه‌های بعدی اصلاح کلزا مورد توجه قرار داد.

بر اساس نتایج بدست آمده می‌توان چنین برداشت کرد که ۱۲ نشانگر بکار رفته در این تحقیق دارای قابلیت خوبی برای شناسایی تنوع موجود در ژنوتیپ‌های مورد بررسی می‌باشند. درصد پلی‌مورفیسم صد درصد به‌دست آمده برای ژنوتیپ‌های تحت مطالعه با تمام نشانگرها نیز مبین همین مطلب است. در این مطالعه میانگین محتوای اطلاعات چند شکل PIC در نشانگرهای RAPD، از ۰/۱۵۸ تا ۰/۴۸۳ به‌دست آمد

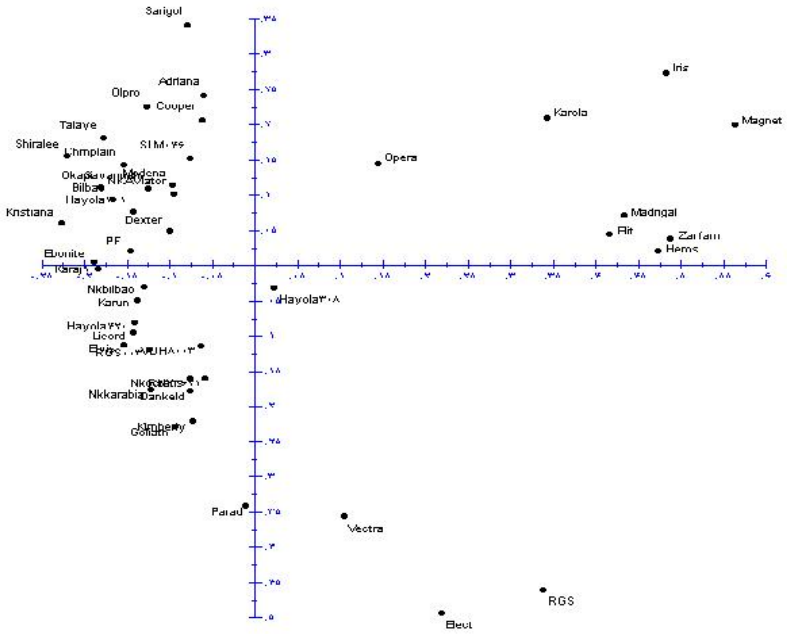
1- Polymorphism Information Content

2- Percentage of Polymorphic Bands

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.19.14.9]

(جدول ۳). پس می‌توان نتیجه گرفت این ژنوتیپ‌ها دارای تنوع قابل قبولی برای بررسی‌های بیشتر و به منظور بکارگیری در برنامه‌های اصلاحی کلزا برای رفع معایب و نواقص موجود و همچنین بهره‌گیری از هتروزیس بیشتر و سریع‌تر در تولید هیبرید هستند. در این خصوص Yu و همکاران (۱۶)، در تحقیقی فواصل ژنتیکی بین لاین‌های کلزا را بر اساس صفات مورفولوژیکی، آیزوزایم‌ها، پروتئین‌ها و نشانگرهای DNA به منظور پیش‌بینی عملکرد و هتروزیس هیبریدها مورد استفاده قرار دادند. مطابق با نتایج آنها فواصل بین لاین‌ها بر اساس صفات مورفولوژیکی از ۰/۴۵۵ تا ۰/۸۳۳ با میانگین ۰/۶۷۸، برای صفات مولکولی از ۰/۳۰۹ تا ۰/۵۵۳ با میانگین ۰/۲۹۷ محاسبه شد.



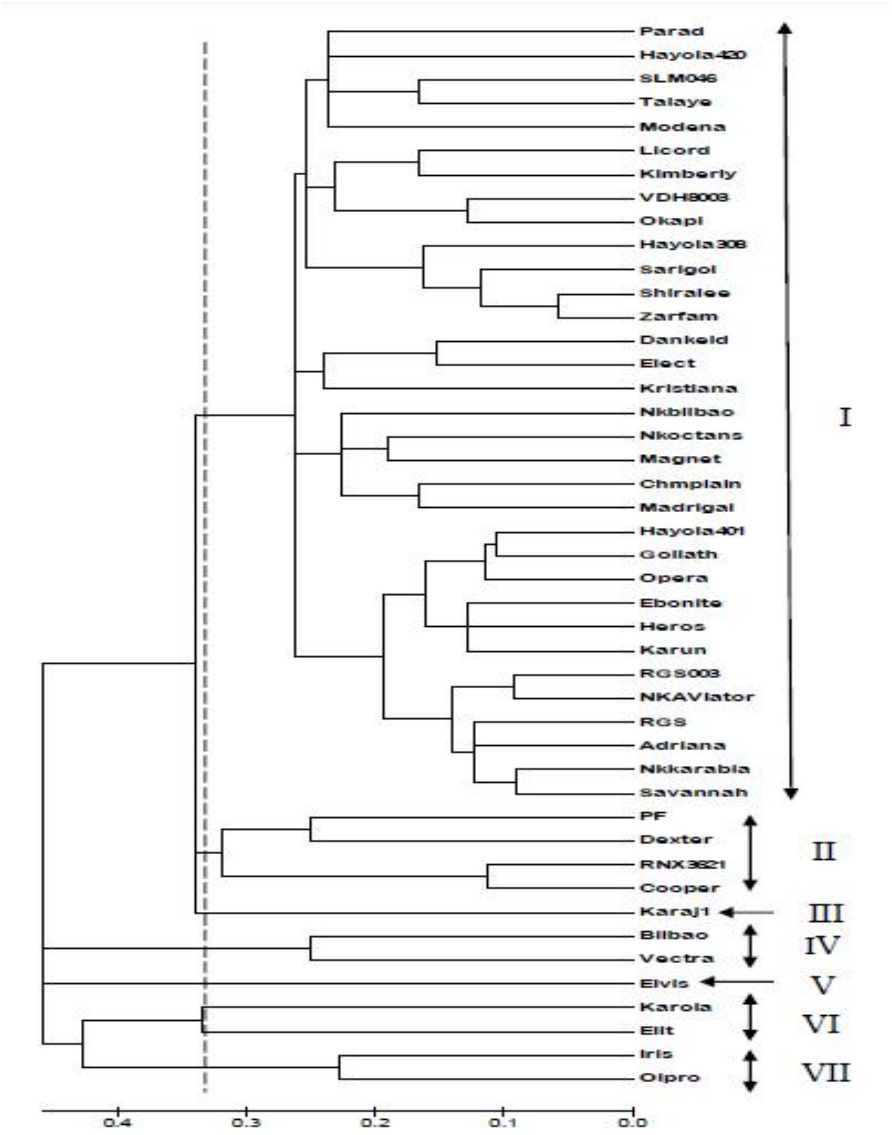
شکل ۱- نمودار بای‌پلات حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی ۴۵ ژنوتیپ مختلف کلزا با استفاده از داده‌های حاصل از نشانگر RAPD بر روی دومؤلفه اصلی اول و دوم.

Figure 1. Biplot diagram of principal components analysis of 45 Rapeseed genotypes using RAPD markers data on first and second principal components

بر اساس ضرایب عدم تشابه دایس، کمترین فاصله بین ژنوتیپ‌های Zarfam (پاییزه و با منشاء ایران) و Shiralee (بهاره و با منشاء استرالیا)، برابر با ۰/۱۱۵ بدست آمد. این می‌تواند به این علت باشد که احتمالاً والدین مورد تلاقی در هیبریداسیون اولیه برای تولید این ارقام دارای منشاء یکسان بوده‌اند. بیشترین فاصله نیز برابر با یک بود که فاصله دو به دو بین تعداد زیادی از ژنوتیپ‌ها برابر با همین مقدار شد. این نشان می‌دهد که باندهای تکثیر شده هر نشانگر برای یک ژنوتیپ در ژنوتیپ دیگر وجود نداشته و بالعکس، که خود ناشی از تنوع صد در صدی بین نشانگرها در بین ژنوتیپ‌های مورد استفاده است. همچنین می‌تواند نشانه‌ای از پراکنش خوب نشانگرهای مختلف در سطح ژنوم کلزا باشد. میانگین فاصله حاصل از این نشانگرها نیز برابر با ۰/۶۶۲ شد. لذا می‌توان ژنوتیپ‌های با فاصله ژنتیکی بیشتر را در صورت داشتن صفات مطلوب به عنوان والد در برنامه‌های دورگ‌گیری مورد استفاده قرار داد. برای این منظور می‌توان توجه بیشتری را روی ژنوتیپ‌های دارای فاصله ژنتیکی بیشتر معطوف کرد. تصور می‌شود ژنوتیپ‌هایی که در گروه‌های دور ازهم قرار گرفته‌اند، برای این منظور مناسب می‌باشند.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.19.14.9]



شکل ۲- دندروگرام حاصل از ۶۸ آلل RAPD تکثیر شده در ۴۵ ژنوتیپ مختلف کلزا با استفاده از روش NJ و ماتریس عدم تشابه دایس
Figure 2. Dendrogram of RAPD amplified 68 alleles in 45 Rapeseed genotypes using NJ and dice dissimilarity matrix

در این مطالعه با توجه به شاخص‌های بدست آمده مشخص شد که روش RAPD یک ابزار سریع، قدرتمند و مؤثر است که نیاز به اطلاعات و کار اولیه اندکی دارد. پیشنهاد می‌گردد از این تکنیک در ارزیابی و شناسایی گونه‌های وحشی براسیکا در ایران استفاده شود. همچنین می‌توان با ترکیب و مقایسه نتایج به‌دست آمده از این تحقیق با مطالعات قبلی در خصوص بررسی تنوع این ارقام بر اساس صفات مورفولوژیک به اطلاعات ارزشمندی برای کمک به اصلاح ارقام کلزا در ایران دست یافت.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-25]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.19.14.9]

منابع

1. Asghari, A., M. Shokrpour, H. Mohammaddoust-Chamanabad and O. Sofalian. 2011. Evaluation genetic diversity of canola cultivars using morphological traits and molecular markers. Romanian Biotechnological Letters, 16: 6305.
2. Bornet, B., E. Antoine, M. Bardouil and C.M.L. Baut. 2004. ISSR as new markers for genetic characterization and evaluation of relationships among phytoplankton. Journal of Applied Phycology, 16: 285-290.
3. Doyle, J.J. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12: 13-15.
4. Fazeli, E., F. Shahriari, H. Samizadeh, A. Bagheri and M. Farsi. 2008. Evaluation of genetic diversity among different genotypes of Brassica napus using Random Amplified Polymorphic DNA markers. Pakistan Journal of Biological Sciences, 11: 2629-2633.
5. Ghadami, N. 2010. Agriculture & Correction Colza (Production). Agricultural Extension and Education Publications, Tehran, Iran, 231 pp (In Persian).
6. Ghareh-yazi, B. 1995. Application of DNA Markers in Plant Breeding. Third Congress of Agriculture & Plant Breeding. (In Persian).
7. Hedayati-Marzoni, H. and H.A. Samiezadeh-Lahiji. 2016. Genetic diversity assessment of lines and varieties in winter Rapeseed (*Brassica napus* L.) using RAPD and SSR molecular markers. Journal of Crop Breeding, 8:131-139 (In Persian).
8. Khajehpoor, M.G. 2004. Industrial Plants. Jihad-e-Daneshgahi of Esfahan University Publications, Esfahan, Iran, 571 pp (In Persian).
9. Kiani, S., S. Abdemishani and A. Shahnejat-Boshehri. 2002. Evaluation of genetic diversity of Rapeseed using RAPD marker. Tehran University, Tehran. Iran, 120 pp (In Persian).
10. Mahjoob, B., H. Najafi-Zarini and S.H.R. Hashemi. 2014. Assessment of genetic relationships among 36 Brassica genotypes using ISSR molecular markers. Journal of Crop Breeding, 6: 96-106.
11. Marjanovic-Jerome, A., A. Kondic-Spika, D. Saftic-Pankovic, R. Marinkovic and N. Hristov. 2009. Phenotyping and molecular evaluation of genetic diversity of rapeseed (*Brassica napus* L.) genotypes. AfricianJornal of Biotechnology, 8: 4835-4844.
12. Mean, K. and A. Hasan. 2008. Genetic diversity in Brassica napusand association studies with seed glucosinolate content, Research Center for Biosystems, Land Use and Nutrition, Department of Plant Breeding, 360-371.
13. Moghadam, M., S.A. Mohammadi, N. Mohebalipour, M. Toorchi, S. Aharizad and F. Javidfar. 2009. Assessment of genetic diversity in rapeseed cultivars as reveald by RAPD and microsatellite markers. African Journal of Biotechnology, 3160-3167.
14. Naghavi, M., B. Ghareh-yazi and G.H. Hoseini-Salkadeh. 2010. Molecular Markers. Tehran University Publications, Tehran, Iran, 3: 334 pp (In Persian).
15. Shengwu, H., J. Ovesna´, L.K. Era, V.K. Era and M. Vyvadilova. 2003. Evaluation of genetic diversity of Brassica napus by RAPD markers. Plant soil Environ, 49: 106-113.
16. Yu, C.Y., S.W. Hu, H.Z. Zhao and A.G. Guo. 2005. Genetic distances revealed by morphological characters, isozymes, proteins and RAPD markers and their relationships with hybrid performance in oilseed rape (*Brassica napus* L.). Theoretical and Applied Genetics, 110: 511-518.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.19.14.9]

Genetic Relationships of Rapeseed Cultivars Revealed by RAPD Markers

Sara Safari[1] and Ali-Ashraf Mehrabi[2]

1- PhD. Student, Ilam University, (Corresponding Author: safari_6564@yahoo.com)
2- Associated Professor, Ilam University
Received:October 19, 2014 Accepted: July 14, 2015

Absract

Limited geographic area and focused modification of rapeseed during of its breeding cases have been led to the limited genetic basis. So, the evaluation of genetic diversity in modern cultivars of canola to estimating and maintain of genetic resources is essential. In this study, the genetic diversity of 45 genotypes of rapeseed was investigated using 12 RAPD markers .Cluster analysis by Dice coefficient and non-nearest neighbor method (NJ) divided genotypes into seven main groups. The total variation was 0.662. Polymorphism information index (PIC) was from 0.158 to 0.483 and mean of 0.346. The total number of alleles amplified was 68 with average of 5.66 alleles per marker. The percentage of polymorphism for all markers was one hundred percent. These markers could represent a unique band for Oligo 213 primer in Hyola 420 genotype. It seems that more attention to genetic diversity of studied genotypes, based on primers used can use as a source for further research in modification of rapeseed to achieve goals such as more heterosis in hybrids.

Keywords: Genetic diversity, Rapeseed, RAPD

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-04-25]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1395.8.19.14.9]