



بررسی تنوع مولکولی و ساختار ژنتیکی ارقام و لاین‌های کلزا با استفاده از نشانگرهای SSR مرتبط با QTL‌های تحمل به خشکی

حسن زالی^۱، امید سفالیان^۲، مهرشاد زین‌العابدینی^۳، طاهره حسنی^۴، علی اصغری^۲ و بهرام علیزاده^۵

۱- استادیار، بخش تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، داراب، ایران (نویسنده مسوول: hzali90@yahoo.com)

۲- دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه محقق اردبیلی

۳- استادیار، بخش ژنومیکس، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۴- استادیار، بخش فیزیولوژی مولکولی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۵- دانشیار، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۹۶/۱/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۲۲

چکیده

در این تحقیق تنوع ژنتیکی ۴۱ لاین و ژنوتیپ کلزا شامل ۱۹ رقم آزاد گرده‌افشان و هیبرید، ۱۷ لاین امیدبخش و ۵ لاین هاپلوئید مضاعف‌شده کلزا با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره مرتبط با QTL‌های تحمل به خشکی مورد بررسی قرار گرفت. ۳۶ نشانگر مورد مطالعه، ۱۶۶ نوار قابل تشخیص ایجاد کردند و ۱۵۷ آلل (۹۴/۵۸٪) آن چندشکل بودند که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای در میان لاین‌ها و ژنوتیپ‌ها بود. میزان محتوای اطلاعات چندشکلی در بین نشانگرها از ۰/۰۴۶ تا ۰/۳۲۷ (BRMS-204) متغیر بود. متوسط میزان شاخص PIC برابر با ۰/۲۱۲ بود. نتایج نشان داد که متوسط شاخص نشانگری، تنوع ژنی، شاخص اطلاعات شانون و تعداد آلل‌های مؤثر به ترتیب ۱/۵۰۸، ۰/۴۴۹ و ۰/۲۹۸ بود. در ارزیابی تجزیه ساختار، ارقام و لاین‌ها مورد مطالعه به دو زیر جمعیت تقسیم شدند، که زیر جمعیت اول شامل ارقام Talaye، Hyola420 و Hyola401 و لاین‌های هاپلوئید مضاعف‌شده DH1، DH5، DH8، DH9 و DH11 و زیر جمعیت دوم شامل ارقام پاییزه (سایر ارقام و لاین‌ها) بودند. در تجزیه واریانس مولکولی، واریانس درون جمعیتی بیش‌تر از واریانس بین جمعیتی بود. در مجموع، نشانگری پیدا نشد که بتوان از آن به‌عنوان نشانگری در جهت انتخاب ارقام متحمل به خشکی در گام اول برنامه‌های اصلاحی استفاده کرد و این هدف نیاز به تحقیقات بیش‌تر در مورد شناسایی QTL‌های تحمل به خشکی در گیاه کلزا دارد.

واژه‌های کلیدی: کلزا، تنوع ژنتیکی، ساختار ژنتیکی، ریزماهوره‌ها

مقدمه

کلزا با نام‌های "Canola"، "Rapeseed" و "Oilseed rape"، سال‌های زیادی است که در صنعت و صنایع غذایی کاربرد دارد. در واقع ژنوتیپ‌های "Canola" طبقه‌بندی خاصی از "Rapeseed" می‌باشند که دارای مقدار اسید اروسیک کم‌تر از ۲ درصد و میزان پایین گلوکوزینولات در کنجاله (کم‌تر از ۳۰ میکرومول در هر گرم ماده خشک کنجاله) و کیفیت روغن بالا می‌باشند (۹).

یکی از مهم‌ترین استراتژی‌ها برای افزایش تولید، کاهش خسارت‌های ناشی از تنش‌های زیستی و غیرزیستی مانند تنش خشکی، شوری و غیره می‌باشد و این کار از طریق توسعه ارقام زراعی متحمل به این تنش‌ها میسر می‌باشد (۳۹، ۴۰). مانند بیش‌تر گیاهان زراعی، یکی از اولین کارها در بهبود تحمل به خشکی کلزا بررسی تنوع ژنتیکی بین ارقام و لاین‌های موجود از نظر تحمل به خشکی می‌باشد. بنابراین، آگاهی در مورد تنوع ژنتیکی ارقام و لاین‌های کلزا، اطلاعات مهمی برای اصلاح‌گران و ژنتیک‌دانان در زمینه تنوع آلی فراهم می‌کند که ممکن است به شناسایی ذخایر متنوع ژنتیکی برای تالاقی‌های بهتر در جهت تولید ارقام متحمل به خشکی، کمک کند (۹). برآورد تنوع ژنتیکی در گیاهان، نقش بسیار مهمی در پیشبرد برنامه‌های اصلاحی و ژنتیکی از جمله گروه‌بندی لاین‌ها و جمعیت‌ها، مطالعه تکامل خویشاوندان وحشی، بهبود شجره‌ها، بررسی تغییرات فراوانی آلل‌ها و حفاظت از منابع ژنتیکی دارد (۲۱).

با توجه به این‌که کلزای هیبرید عملکرد بیش‌تری از لاین‌های اینبرد دارد، لزوم تعیین تنوع ژنتیکی در 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 برنامه‌های به‌نژادی کلزا تلقی می‌شود (۱۸).

تنوع ژنتیکی را می‌توان با روش‌های مختلف و با مطالعه ویژگی‌های متفاوت بررسی کرد که از جمله آن‌ها می‌توان به بررسی صفات موفولوژیک، آناتومیک، نشانگرهای بیوشیمیایی و نشانگرهای DNA (مانند نشانگرهای AFLP، RFLP، RAPD و SSR) اشاره کرد (۱). نشانگرهای ریزماهوره، جزو نشانگرهای مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بوده و دارای کاربردهای فراوانی در مطالعات رده‌بندی، بررسی تنوع ژنتیکی و تهیه نقشه‌های پیوستگی در گونه‌های مختلف می‌باشد (۲۳). نشانگرهای SSR به‌طور گسترده‌ای در بررسی تنوع ژنتیکی ارقام و لاین‌های مختلف کلزا مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۲۸، ۲۰، ۱۰). نشانگرهای SSR شامل واحدهای یک تا شش‌تایی تکرار شونده‌اند که در ژنوم بیش‌تر یوکاریوت‌ها پراکنده‌اند به‌طوری‌که در هر ۱۰۰۰ جفت باز در طول DNA دست کم یک ردیف ریزماهوره با دو ردیف منحصر به‌فرد در

میلی مولار، ۱/۵ میکرولیتر بافر با غلظت ۱۰X، ۰/۲ میکرولیتر تک پلیمرز با غلظت ۵U و ۵/۸ میکرولیتر آب دوبار استریل بود. چرخه حرارتی استفاده شده شامل یک مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه حرارتی که ۱۰ چرخه اول سیکل حرارتی به صورت Touch Down برنامه‌ریزی شده بود. به این صورت که دمای اتصال آغازگر به رشته الگو ۱۰ درجه سانتی‌گراد بالاتر از دمای اتصال واقعی در نظر گرفته شد و در هر چرخه دور اول با کاهش یک درجه دما، به دمای اتصال واقعی رسید. در ۲۵ چرخه بعد دمای اتصال (بسته به دمای اتصال آغازگر متفاوت بود) و زمان آن نیز ثابت و ۳۰ ثانیه بود. در هر چرخه نیز، زمان و دمای واسرشته‌سازی به ترتیب ۳۰ و ۹۴ درجه بود. هم‌چنین دمای بسط رشته نیز به ترتیب ۱ دقیقه و ۷۲ درجه بود. برای ظاهرسازی باندها، نمونه‌ها در ژل پلی اکریل آمید ۶ درصد واسرشته شدند و رنگ‌آمیزی با نیترات نقره انجام شد. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها و برای بدست آوردن اندازه آلل‌ها و تعیین انواع آلل‌ها و ژنوتیپ‌ها، از تصاویر ژل استفاده شد. الگوهای نواری بر روی ژل پلی اکریل آمید براساس هم ردیفی نوارها و به‌صورت صفر (عدم وجود نوار) و یک (وجود نوار) امتیازدهی شدند. به این صورت که در هر ردیف آللی به نمونه‌های دارای نوار امتیاز یک و بدون باند امتیاز صفر داده شد. البته با توجه به استفاده از نشانگر وزنی، آلل‌های ریزماهوره به‌صورت اندازه نیز امتیازدهی شدند تا در برخی از آنالیزها و نرم افزارها مورد استفاده قرار گیرد.

تجزیه خوشه‌ای با استفاده از چند روش تجزیه خوشه‌ای انجام شد. در نهایت بهترین گروه‌بندی مربوط به ضریب شباهت نی (۲۴) و روش گروه‌بندی اتصال همسایگی^۱ بود که بالاترین مقادیر ضریب همبستگی کوفنتیک را به خود اختصاص داد. دندروگرام مربوطه به‌صورت Neighbor Net با ضریب فاصله ژنتیکی Uncorrected-P و با ۱۰۰۰ تکرار Bootstrap و با استفاده از نرم‌افزار Split Tree ver4.13.1 بدست آمد. به‌منظور انتخاب تعداد مطلوب خوشه از تجزیه واریانس مولکولی AMOVA^۲ با استفاده از نرم‌افزار GenAlex ver 6.5 استفاده شد. تجزیه به مختصات اصلی (PCoA)^۳ و رسم نمودار دو بعدی با استفاده از نرم‌افزار GenAlex انجام گردید. میزان PIC^۴ از طریق فرمول $PIC = \sum [2p_i (1 - p_i)]/n$ صورت گرفت (۲۶) که در آن، p_i فراوانی نوار نام تقسیم بر تعداد ژنوتیپ‌هاست و n تعداد نوارهای ایجاد شده بود. هم‌چنین، شاخص‌های نشانگری شامل: شاخص تنوع شانون (I)^۵، متوسط تعداد آلل در هر مکان ژنی (Ne)^۶، تنوع ژنتیکی نی (He)^۷ نیز با استفاده از نرم‌افزار GenAlex محاسبه شد.

به‌منظور تجزیه مؤثر ساختار جمعیت و دسته‌بندی دقیق ژنوتیپ‌ها به جمعیت‌های مناسب و تشخیص ژنوتیپ‌های مختلط، تجزیه ساختار جمعیت با استفاده از روش Bayesian و نرم‌افزار Structure انجام شد (۲۶). این روش هر یک از ژنوتیپ‌ها را با یک احتمال و طوری به زیرجمعیت‌های فرضی منتسب می‌کند که در هر زیرجمعیت میزان عدم تعادل

دو طرف آن دیده می‌شود. نشانگرهای SSR مزایایی هم‌چون سرعت بالا، سادگی، پلی‌مورفیسم و پایداری دارند، بنابراین به‌طور گسترده‌ای از آن‌ها در آنالیزهای تنوع ژنتیکی، نقشه‌یابی، مکان‌یابی ژن، انگشت‌نگاری، آزمایش خلوص ژنتیکی، آنالیز ژرم‌پلاسم، فهمیدن هتروزیس و تفسیر گونه‌ها و معرفی گونه‌های خویشاوند استفاده می‌شود (۲۸،۲۳).

نشانگرهای مولکولی به‌واسطه مستقل بودن از عوامل محیطی می‌توانند جایگزین مناسبی برای ارزیابی تنوع در گیاهان باشند. روش‌های مبتنی بر واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) به‌دلیل سهولت، هزینه پایین، سرعت و عدم نیاز به کاوشگرهای رادیواکتیو امروزه به‌طور گسترده‌ای در بررسی تنوع و فاصله ژنتیکی ارقام مختلف گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در سال‌های اخیر از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر واکنش PCR به‌عنوان ابزاری قدرتمندی برای شناسایی چندشکلی، مطالعه تنوع و روابط ژنتیکی در گیاهان استفاده شده است (۱۸،۱۳).

در کلزا مطالعات بسیار محدودی در مورد QTL‌های صفات مرتبط با تحمل به خشکی (۱۴) و هم‌چنین نشانگرهای مرتبط با این QTL‌ها انجام شده است. در حالی که، پیش‌تر مطالعات در زمینه نقشه‌یابی مکان‌های کنترل‌کننده مقاومت به بیماری‌ها (۴۱)، تعداد روز تا ظهور خورجین (۱۲)، میزان روغن (۲)، محتوای گلوکوزینولات (۱۱)، رنگ بذر (۳۴) و عملکرد و اجزای عملکرد (۳۰،۳) بوده است. هدف از این تحقیق استفاده از نشانگرهای مرتبط با QTL‌های کنترل‌کننده تحمل به خشکی به‌منظور ارزیابی تنوع و ساختار ژنتیکی جمعیت و نیز گروه‌بندی ارقام و لاین‌های کلزا مورد مطالعه بوده است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال‌های ۹۴-۱۳۹۳ در پژوهشکده بیوتکنولوژی و کشاورزی ایران (ABRII) انجام شد. به‌منظور اجرای این تحقیق یک جمعیت شامل ۱۹ ژنوتیپ هیبرید و آزاد‌گرده‌افشان، ۱۷ لاین امیدبخش و ۵ لاین هاپلوئید مضاعف‌شده کلزا از موسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کشور تهیه شد (جدول ۲). استخراج DNA ژنومی به روش دلاپورتا تغییر یافته (۵) انجام شد. کمیت و کیفیت DNA استخراجی نیز با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد و روش طیف سنجی نانودراپ تعیین گردید.

تعداد ۳۶ نشانگر ریزماهوره مورد استفاده در این پژوهش شامل نشانگرهایی بودند که توسط لی و همکاران (۱۴) جهت مکان‌یابی QTL‌های کنترل‌کننده ارتفاع بوته، وزن خشک اندام هوایی، وزن خشک ریشه و وزن خشک کل در شرایط تنش خشکی معرفی شده بودند (جدول ۱).

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، نمونه‌های DNA به غلظت ۲۵ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر DNA ژنومی در حجم ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر، ۱/۵ میکرولیتر آغازگر با غلظت ۱۰U، ۰/۹ میکرولیتر dNTPs با غلظت ۱۰ میلی مولار، ۱/۲ میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت ۲۵

1- Neighbor Joining

3- Principle co-ordinate analysis

5- Shannon's Information index

7- Nei's (1973) gene diversity

2- Analysis of Molecular Variance

4- Polymorphism Information Content

6- Effective number of alleles

K (تعداد واقعی زیرجمعیت) یک ماتریس به نام Qst را بدست می‌دهد. این ماتریس شامل برآورد ضرایب احتمال عضویت هر ژنوتیپ در هر یک از زیرجمعیت‌ها است. تعداد واقعی زیرجمعیت براساس روش ایوانو و همکاران (۷) تعیین شد. این روش بر آماره K استوار است که شیب تابع احتمالی را در نقطه‌ای می‌شکند که تعداد K فرضی در آن نقطه دارای حداکثر احتمال باشد.

پیوستگی حداقل و تعادل مرحله گامتی حداکثر باشد. در این تحقیق، بین ۱ تا ۱۰ زیرجمعیت فرضی اولیه در نظر گرفته شد و جهت افزایش دقت برای هرکدام از زیرجمعیت‌ها سه تکرار منظور گردید. برای این منظور از مدل ترکیبی Admixture و استقلال فراوانی آلی با ۵۰۰۰ اجرا در زمان ۵۰۰۰۰ جایگشت استفاده شد تا منحنی حداکثر درست‌نمایی حاصل شود. نرم‌افزار Structure برای هر مقدار

جدول ۱- مشخصات نشانگرهای SSR و توالی آن‌ها

Table 1. Characteristic of SSR primers and its sequencing

منبع	مکان نشانگر (سانتی مورگان)	گروه کروموزومی	توالی نشانگر معکوس	توالی نشانگر جلو رونده	نشانگر
۱۵	۵۲/۶	C5	TGCATAAGCTCGAAGAGACG	CACGAACGCGAGAGAGAGAG	O110-B02
۲۴	۵۰/۰	A1	ATGCAAGCTTAGACAGAGATT	CCAGACTCCGATAAAAACC	BRAS041
۲۴	۳۶/۹	A1	TTTTCTTCATCGTACCAC	ATTGGGTTCGACCTTTTCTC	BRAS084
۲۴	۲۹/۹	C6	TCTGTGTTCCTCGCC	CTGATGGACTAGGACCCC	CB10234
۲۴	۱۲/۶	A1	AACACTGCTCCTTCCCT	AAGCGCGCATAACTACAC	CB10597
۱۶	۶/۶	A5	TGTGACGCATCCGATCATA	TCGCGCATGTAATCAAAATC	Na10E02b
۳۲	۱۵/۴	A7	CATGGCAAGGGGTAACAAACAT	GGTCCATTCTTTTGCATCTG	BRMS-036
۲۴	۰	A1	ACCTCCATTGTGCTGAT	AATTTAAACCTCATTCTCTC	BRAS074a
۲۴	۲۲۰/۴	A3	CATTGGTTGGTGAATTGACAG	AACACTTGCAACTTCATTTTCC	Na12-A08a
۲۴	۳۹/۵	A1	GTGTCAGTGGCTACAGAGAC	AAGGACTCATCGTGAATCC	O112-F11a
۲۴	۲۸/۱	C6	TTCTTCTTCCACCACCA	ACTCGGCGTTAGAGAAT	CB10526
۲۴	۱۸/۷	C3	TTTTGTCCCCTGGGTTTTT	GGAAACTAGGGTTTTCCCTTC	Na10-C01f
۲۴	۱۲/۷	C3	ACGGTGCCGAATCTCAACG	AAATGGGTCACAGCCGAGAA	CB10003b
۷	۹/۵	C9	TTCTTCACTTACAGGCACG	TCCGAACACTCTAAGTTAGTCC	O111-H06
۲۴	۴۲/۶	C3	AATGGCAAAGTTATTCTACCC	AACACAACCACCACCAAC	FIT0133
۱۵	۱۶۲/۶	C2	AGGATGAGCAAAGGAAAGCA	ATCCCCAAACTACCCTACC	SR94102
۱۵	۱۹/۸	C5	CGTCAAGAAGACACAGATCAAA	CGTGGGCCAAGCTTAGATTA	sORF73b
۲۴	۲۷/۵	A1	GGTACCACCACCCTCGC	CTCCCACCGCTTACTCTCT	BRAS100
۲۴	۲۷/۷	A1	GATCACCATCTGCACCAT	CACAGCTTACCCTAATCG	CB10159b
۲۴	۸۷/۱	A1	TTGGGAGAGAAAATAACG	GGCTTAGCACTGTGATCCT	CB10081c
۱۶	-	A3	TTCCCTTATTGAGCAAGCTG	TCCCGTCGCTAAGATATTG	Na14-096
۲۴	۳۵/۵	A5	GCCATCTACACATTTATCCC	CACTAACCTTCTGTACCCT	BRAS072a
۲۴	۱۷۴/۴	C2	TTGCACCCATACGTTTTT	CATGGGAGGCTGTCTAAA	CB10143
۱۶	۶/۶	A5	TGTGACGCATCCGATCATA	TCGCGCATGTAATCAAAATC	NA10-E02b
۳۲	۴۴/۲	A5	CATGGCAAGGGGTAACAAACAT	GGTCCATTCTTTTGCATCTG	BRMS030
۳۲	۲۷/۵	A1	GATGCACTGGGACCCTTACATTT	TGCCACCAATGACAATGACTATC	BRMS-031
۳۲	۲۷/۵	A1	CAGCCTCCACCCTTATTCT	TGAATTGAAAGGCATAAGCA	BRMS-024
۳۵	۵۷/۵	A1	TGAAGAAGGATTGAAGCTGTTGTTG	AGTCGAGATCTCGTCTGCTCCC	BRMS-096
۳۲	۴۴/۲	C5	AAGGTCTCATACGATGGGAGTG	TCAGCCTACCAACAGTCAATA	BRMS-030
۲۴	۲۸/۱	C6	TTGAAGAGTGGGGATCA	GGTGAGCTTCTTCTCTCC	CB10502
۲۴	۴۰/۹	C6	TTATCTTTGAATGAGCATCT	ACCCTGTCTTCTACTAT	CB10010
۲۴	۷۱/۸	A9	TCAGAATCGGACTGTAGTCT	CGTACTCCGCTGATACTTT	MR013c
۱۳	۱۷۲/۷	C2	GAACCTGCAAGCTGCAATTA	TCGACATGGATTCTACAAA	Pmr52
۳۵	۱۴/۲	A8	CCTGCGGGATATTGAAGACC	CAAATATCCGTCATCGGAGC	Na12-B05
۲۴	۶۵/۴	C8	GGTGTCCTCAACTGTTGAA	CATTGGCATAGGAACAGG	CB10504
۱۶	۴۱/۳	C4	TTACTATCCCCTCTCCGCAC	GCGGATTATGATGACGCAG	NA14-E08a

جدول ۲- نام لاین‌ها و ژنوتیپ‌های مورد بررسی و مناطق آن‌ها

Origin	نوع ژنوتیپ	نام ژنوتیپ	Origin	نوع ژنوتیپ	نام ژنوتیپ
ایران	لاین خالص	L1013	آلمان	رقم آزاد گرده‌افشان	SLM046
فرانسه	رقم هیبرید	Lilian	فرانسه	رقم هیبرید	Oase
آلمان	رقم هیبرید	Cooper	ایران	لاین خالص	Karaj 1
آلمان	رقم هیبرید	Adriana	ایران	رقم آزاد گرده‌افشان	Ahmadi
آلمان	رقم هیبرید	Tassilo	فرانسه	رقم آزاد گرده‌افشان	Okapi
آلمان	رقم هیبرید	Karun	ایران	لاین خالص	L938
ایران	رقم آزاد گرده‌افشان	Zarfam	ایران	لاین خالص	L941
ایران	لاین خالص	Karaj 2	ایران	لاین خالص	L942
سوئد	رقم آزاد گرده‌افشان	Opera	ایران	لاین خالص	L944
آلمان	رقم آزاد گرده‌افشان	Orient	ایران	لاین خالص	L945
آلمان	رقم آزاد گرده‌افشان	Sarigol	ایران	لاین خالص	L955
آلمان	رقم آزاد گرده‌افشان	Licord	ایران	لاین خالص	L957
آلمان	رقم آزاد گرده‌افشان	Talaye	ایران	لاین خالص	L963
استرالیا	رقم هیبرید	Hyola420	ایران	لاین خالص	L969
استرالیا	رقم هیبرید	Hyola401	ایران	لاین خالص	L996
ایران	لاین خالص (دابل هاپلوئید)	DH1	ایران	لاین خالص	L1003
ایران	لاین خالص (دابل هاپلوئید)	DH5	ایران	لاین خالص	L1008
ایران	لاین خالص (دابل هاپلوئید)	DH8	ایران	لاین خالص	L1009
ایران	لاین خالص (دابل هاپلوئید)	DH9	ایران	لاین خالص	L1010
ایران	لاین خالص (دابل هاپلوئید)	DH11	ایران	لاین خالص	L1011
			ایران	لاین خالص	L1012

نتایج و بحث

اطلاعات مربوط به نوارهای حاصل از تکثیر نشانگرهای SSR در جدول ۳ نشان داده شده است. از تعداد ۳۶ (جفت آغازگر) نشانگر مورد استفاده، در مجموع ۱۶۴ نوار حاصل شد که از این تعداد ۱۵۷ نوار چندشکل بودند. اغلب نشانگرها چندشکلی بالایی را نشان دادند به طوری که متوسط درصد چندشکلی برای نشانگرهای مورد مطالعه برابر با ۹۶/۲۹ درصد بود. تعداد کل نوارهای تکثیرشده برای هر نشانگر از ۲ تا ۱۰ نوار متغیر بود و به طور متوسط ۴/۴۹ نوار به ازای هر نشانگر تکثیر شد. در مطالعه‌ای که به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ارقام کلزا با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره صورت گرفت، در مجموع ۱۴۳ آلل با متوسط آللی ۱۱/۹۲ به ازای هر نشانگر مشاهده شد (۱۹). در تحقیق ما، پایین بودن تعداد نوار به ازای هر نشانگر، احتمالاً به دلیل محدودیت در انتخاب نشانگرهای SSR و تعداد کم جمعیت بوده است. چون همان‌طور که قبلاً توضیح داده شد نشانگرها براساس ارتباط با QTL‌های تحمل به خشکی انتخاب شده‌اند و نه بر اساس میزان بالای چندشکلی. بنابراین این میزان پایین بودن چندشکلی نسبت به سایر تحقیقات دیگر طبیعی است.

نشانگر Na12-B05 در گروه کروموزومی A8 با تعداد ۱۰ نوار چندشکل، بیش‌ترین چندشکلی را نشان داد. تولید نوار زیاد و درصد چندشکلی بالا حاکی از کارایی این نشانگر در آشکارسازی تنوع بین ژنوتیپ‌ها و لاین‌های مورد بررسی بود (جدول ۳). نتایج تحقیق ما در توافق نسبی با یافته‌های سایر محققان بود (۳۳، ۲۸، ۲۰، ۴).

محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) برای هر نشانگر در جدول ۳ آورده شده است. مطابق با نتایج بدست آمده دامنه PIC از ۰/۴۶ تا ۰/۳۲۷ متغیر بود که بیش‌ترین میزان PIC مربوط به نشانگرهای BRAS041، BRMS-024، sORF73 و CB10143 و کم‌ترین آن مربوط به نشانگرهای FITO133، O110-B02 و pMR52 بود. متوسط میزان

شاخص PIC برابر با ۰/۲۱۲ بود. محتوای اطلاعات چندشکلی در حقیقت احتمال جداسازی چندشکلی را توسط یک ترکیب نشانگر، بین دو ژنوتیپ تصادفی را اندازه‌گیری می‌کند. حداکثر مقدار این شاخص برای نشانگر هم بارز یک و برای نشانگر غالب برابر ۰/۵ است (۲۷). توری و همکاران (۳۸)، در بررسی تنوع ژنتیکی سه گونه جنس براسیکا با استفاده از نشانگرهای SSR متوسط میزان شاخص PIC را ۰/۴۶ برآورد کردند. درویش نیا و همکاران (۴) تغییرات PIC را از ۰/۱۵ در آغازگر O110D08 تا ۰/۳۳۸ در آغازگر Na10B12 گزارش کردند. میزان شاخص PIC به عوامل متعددی مانند تعداد آلل در هر جایگاه، فراوانی آلل‌ها، محتوای نوکلوتیدهای G و T در نواحی تکرار شده و تعداد ژنوتیپ وابسته می‌باشد (۲۹). در این تحقیق به احتمال زیاد تعداد آلل در هر جایگاه، بیش‌ترین نقش را در میزان شاخص PIC داشته است.

از میان نشانگرهای مورد بررسی، نشانگرهای BRAS04، BRAS072، CB10504، CB10234، CB10003 و BRMS-030 و NA10-E02 به ترتیب بیش‌ترین تعداد آلل مؤثر در هر مکان ژنی، تنوع ژنی نی و شاخص تنوع شانون را نشان دادند و نشانگرهای O110-B02 و CB10003 نیز کم‌ترین این مقادیر را به خود اختصاص دادند (جدول ۳). بالاتر بودن تعداد آلل مؤثر در هر مکان ژنی، تنوع ژنی نی و شانون (۳۲) بیانگر قدرت بالای تفکیک و تمایز این نشانگرها در بین ارقام می‌باشد. هم‌چنین، براساس نتایج بدست آمده جمعیت ارقام هیبرید بالاترین تعداد آلل مؤثر در هر مکان ژنی، تنوع ژنی نی و شاخص تنوع شانون را نشان دادند که بالا بودن این شاخص‌ها در جمعیت ارقام هیبرید بیان‌گر وجود تنوع بالای در آن‌ها می‌باشد. از طرفی جمعیت لاین‌های هاپلوئید مضاعف‌شده کم‌ترین مقدار این شاخص‌ها را به خود اختصاص دادند که با توجه به طبیعت کاملاً خالص این لاین‌ها این نتایج دور از انتظار نبود. در تحقیق حاضر نشانگرهای BRAS04، BRAS072، BRAS04، CB10504،

نشان داد که واریانس بین و درون جمعیت‌ها معنی‌دار است. با توجه به میانگین درجه تمایز ژنی، ۱۶ درصد از تنوع کل مربوط به تنوع بین جمعیت و ۸۴ درصد آن مربوط به تنوع درون جمعیت‌ها بوده که این مطلب نشان داد که درون هر جمعیت تنوع قابل ملاحظه‌ای وجود داشته است.

CB10234، BRMS-030 و NA10-E02 بهتر از سایر نشانگرهای به کار برده، توانستند فاصله ژنتیکی ارقام و لاین‌های مورد بررسی را مشخص کنند. همان‌طور که پیش‌تر بیان شد جمعیت مورد بررسی شامل ۱۹ ژنوتیپ هیبرید، ۱۷ لاین امیدبخش و ۵ لاین هاپلوئید مضاعف شده بود. نتایج تجزیه واریانس مولکولی (جدول ۴)

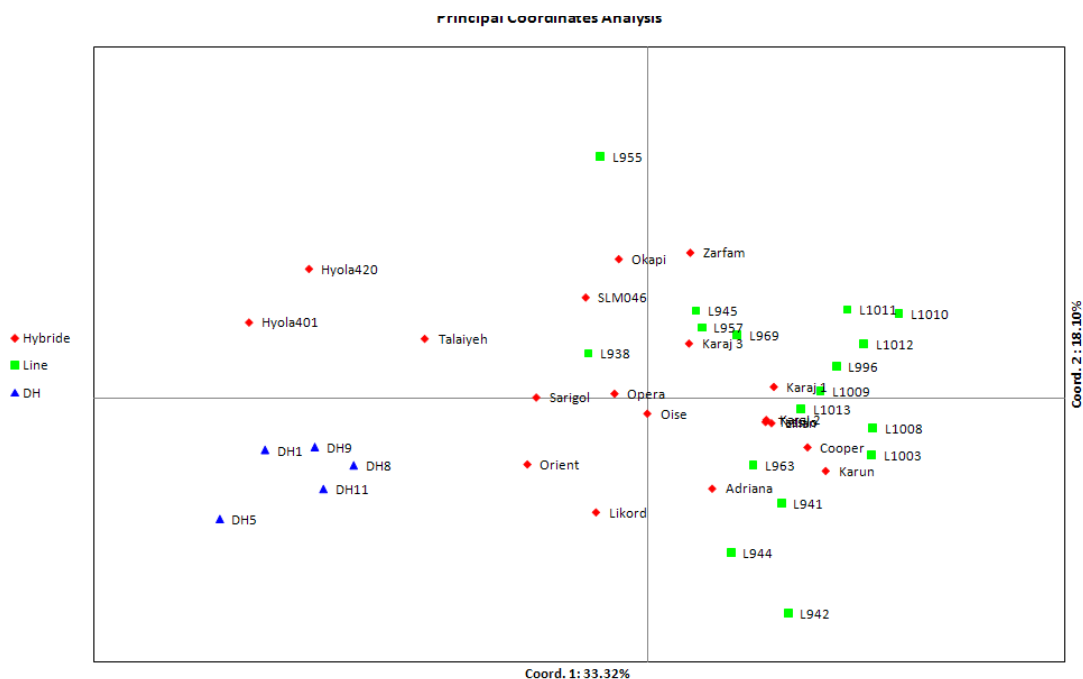
جدول ۳- شاخص‌های مختلف تنوع ژنتیکی نشانگرهای مورد بررسی در ۴۱ لاین و ژنوتیپ کلزا
Table 3. Genetic diversity different indices of primers under study in 41 canola lines and genotypes

He	I	Ne	Pi	فراوانی نوار	PIC	چندشکلی (%)	تعداد نوارهای چندشکل	تعداد آلل	نشانگر
۰/۰۴۰	۰/۰۸۸	۱/۰۴۳	۰/۳۵۴	۰/۳۷۴	۰/۰۶۹	۶۷	۲	۳	OI10-B02
۰/۴۹۶	۰/۶۸۹	۱/۹۸۲	۰/۴۷۶	۰/۷۳۴	۰/۳۱۷	۱۰۰	۳	۳	BRAS041
۰/۳۷۵	۰/۵۵۶	۱/۶۵۱	۰/۶۳۰	۰/۸۱۷	۰/۱۹۸	۱۰۰	۲	۲	BRAS084
۰/۲۳۶	۰/۳۶۸	۱/۳۸۳	۰/۲۰۳	۰/۳۲۱	۰/۲۱۶	۱۰۰	۶	۶	CB10234
۰/۴۵۰	۰/۶۴۱	۱/۸۲۴	۰/۵۰۷	۰/۷۳۲	۰/۲۷۳	۱۰۰	۳	۳	CB10597
۰/۰۹۹	۰/۱۸۲	۱/۷۳۶	۰/۰۵۶	۰/۱۰۶	۰/۱۳۶	۱۰۰	۳	۳	Na10E02b
۰/۳۱۷	۰/۴۸۶	۱/۵۰۸	۰/۴۱۳	۰/۵۷۱	۰/۲۴۱	۱۰۰	۷	۷	BRMS-036
۰/۱۴۰	۰/۲۶۸	۱/۱۶۴	۰/۰۷۶	۰/۱۴۶	۰/۲۱۸	۱۰۰	۳	۳	BRAS074a
۰/۲۵۹	۰/۴۰۱	۱/۴۳۳	۰/۲۴۶	۰/۳۷۶	۰/۲۲۱	۱۰۰	۵	۵	Na12-A08a
۰/۱۷۹	۰/۳۰۵	۱/۳۴۰	۰/۱۰۵	۰/۱۹۵	۰/۲۲۹	۱۰۰	۳	۳	OI12-F11a
۰/۲۹۲	۰/۴۴۱	۱/۴۹۰	۰/۳۸۵	۰/۵۳۰	۰/۱۸۷	۱۰۰	۴	۴	CB10526
۰/۲۶۱	۰/۳۷۹	۱/۴۵۷	۰/۷۴۸	۰/۸۲۹	۰/۲۱۰	۶۲/۵	۵	۸	Na10-C01f
۰/۰۷۰	۰/۱۳۵	۱/۰۸۲	۰/۵۳۸	۰/۵۷۳	۰/۲۱۳	۵۰	۲	۴	CB10003b
۰/۲۷۰	۰/۴۱۶	۱/۴۴۲	۰/۲۸۸	۰/۴۲۳	۰/۲۰۹	۱۰۰	۳	۳	OI11-H06
۰/۲۶۴	۰/۴۳۳	۱/۳۵۸	۰/۸۴۴	۰/۹۷۶	۰/۰۴۶	۱۰۰	۲	۲	FITO133
۰/۳۲۵	۰/۴۸۷	۱/۵۷۶	۰/۲۵۲	۰/۴۱۵	۰/۳۹۰	۱۰۰	۵	۵	SR94102
۰/۳۱۱	۰/۴۷۷	۱/۵۰۸	۰/۲۳۵	۰/۳۹۰	۰/۳۰۱	۱۰۰	۶	۶	sORF73b
۰/۳۴۳	۰/۵۰۵	۱/۶۰۹	۰/۵۶۰	۰/۷۳۲	۰/۱۵۴	۱۰۰	۶	۶	BRAS100
۰/۳۳۴	۰/۵۰۴	۱/۵۷۳	۰/۳۷۵	۰/۵۴۲	۰/۲۵۱	۱۰۰	۹	۹	CB10159b
۰/۲۶۷	۰/۴۱۱	۱/۴۵۹	۰/۲۴۰	۰/۳۷۴	۰/۲۳۱	۱۰۰	۶	۶	CB10081c
۰/۱۷۵	۰/۲۷۳	۱/۲۸۶	۰/۵۷۹	۰/۶۶۷	۰/۱۶۱	۱۰۰	۳	۳	Na14-096
۰/۴۶۰	۰/۶۵۲	۱/۸۵۸	۰/۵۶۳	۰/۷۹۳	۰/۲۴۸	۱۰۰	۶	۶	BRAS072a
۰/۲۳۷	۰/۴۰۰	۱/۳۱۱	۰/۱۳۸	۰/۲۵۶	۰/۳۰۸	۱۰۰	۲	۲	CB10143
۰/۴۴۴	۰/۶۳۶	۱/۸۰۰	۰/۵۲۲	۰/۷۴۴	۰/۲۶۴	۱۰۰	۲	۲	NA10-E02b
۰/۳۰۹	۰/۴۵۲	۱/۵۶۳	۰/۵۶۵	۰/۷۲۰	۰/۲۲۹	۸۳/۳	۵	۶	BRMS030
۰/۲۴۵	۰/۳۸۷	۱/۴۲۳	۰/۲۱۱	۰/۳۳۳	۰/۲۲۷	۱۰۰	۳	۳	BRMS-031
۰/۳۴۶	۰/۵۲۰	۱/۵۸۸	۰/۲۵۰	۰/۴۲۳	۰/۳۲۷	۱۰۰	۳	۳	BRMS-024
۰/۳۶۹	۰/۵۵۱	۱/۶۲۷	۰/۷۱۰	۰/۷۱۰	۰/۱۴۵	۱۰۰	۳	۳	BRMS-096
۰/۴۴۲	۰/۶۳۲	۱/۸۱۹	۰/۶۳۲	۰/۶۳۲	۰/۲۰۵	۱۰۰	۳	۳	BRMS-030
۰/۳۹۵	۰/۵۸۴	۱/۶۵۲	۰/۷۲۹	۰/۷۲۹	۰/۱۲۶	۱۰۰	۲	۲	CB10502
۰/۱۴۲	۰/۲۴۲	۱/۲۰۹	۰/۰۹۱	۰/۰۹۱	۰/۱۶۹	۱۰۰	۸	۸	CB10010
۰/۳۴۰	۰/۵۱۳	۱/۵۷۱	۰/۴۵۲	۰/۴۵۲	۰/۲۲۷	۱۰۰	۶	۶	MR013c
۰/۲۳۸	۰/۳۷۴	۱/۳۵۸	۰/۵۲۴	۰/۵۲۴	۰/۰۷۴	۱۰۰	۳	۳	Pmr52
۰/۳۷۵	۰/۵۵۸	۱/۶۳۳	۰/۵۴۲	۰/۵۴۲	۰/۲۱۲	۱۰۰	۱۰	۱۰	Na12-B05
۰/۴۵۴	۰/۶۴۵	۱/۸۴۶	۰/۵۸۲	۰/۵۸۲	۰/۲۳۷	۱۰۰	۶	۶	CB10504
۰/۳۷۶	۰/۵۵۸	۱/۶۴۸	۰/۴۷۱	۰/۴۷۱	۰/۲۴۰	۱۰۰	۷	۷	NA14-E08a
—	—	—	—	—	—	—	۱۵۷	۱۶۴	مجموع
۰/۲۹۸	۰/۴۴۹	۱/۵۰۸	—	—	۰/۲۱۲	۹۶/۲۹	۴/۲۴۳	۴/۴۸۶	میانگین
جمعیت									
۰/۳۷۷	۰/۴۱۷	۱/۴۷۳	ارقام هیبرید						
۰/۲۴۹	۰/۳۷۴	۱/۴۲۴	لاین امیدبخش						
۰/۱۴۹	۰/۲۲۱	۱/۲۵۶	لاین‌های دابل هاپلوئید						

PIC: محتوای اطلاعات چند شکلی؛ Pi: فراوانی آلل غالب؛ Ne: تعداد آلل مؤثر در هر مکان ژنی؛ I: شاخص تنوع شانون؛ He: تنوع ژنی نی

بودن نسبی مقدار واریانس دو بردار اصلی اول (۵۱/۴۲٪) احتمالاً به این دلیل می‌باشد که انتخاب نشانگرها با محدودیت زیادی صورت گرفته است و تنها نشانگرهایی که ارتباط معنی‌داری با QTLهای تحمل به خشکی داشته‌اند انتخاب شده‌اند.

در تجزیه به مختصات اصلی دو بردار اصلی اول ۵۱/۴۲ درصد واریانس کل داده‌ها را توجیه نمودند و نمودار دو بعدی براساس این دو مؤلفه ترسیم گردید و ارقام و لاین‌ها را به سه گروه تقسیم شدند (شکل ۱). به طوری که، لاین‌های هاپلوئید مضاعف شده در یک گروه مجزا قرار گرفتند ولی کمی تداخل بین ارقام هیبرید و لاین‌های امیدبخش وجود داشت. بالا



شکل ۱- نمودار دو بعدی تجزیه به مختصات اصلی براساس دو بردار اول در سه جمعیت ارقام آزاد گرده‌افشان و هیبرید، لاین‌های امیدبخش و لاین‌های هاپلوئید مضاعف شده کلزا

Figure 1. Two-dimensional plot of main coordinate's analysis on the first two coordinates in three populations including canola open-pollinated and hybrid cultivars, promising lines and double haploid lines

جدول ۴- تجزیه واریانس مولکولی براساس داده‌های SSR در ۴۱ لاین و رقم کلزا

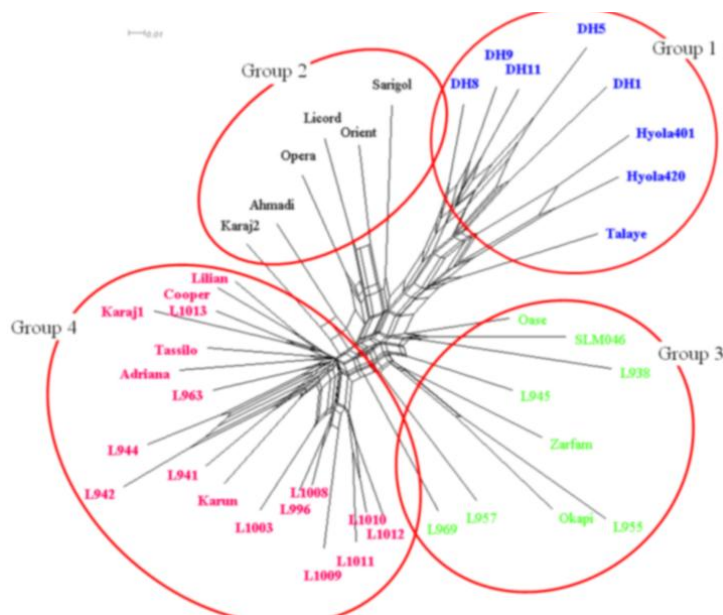
Table 4. Molecular variance analysis based on SSR data in 41 canola lines and genotypes

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	اجزاء واریانس	درصد واریانس
بین جمعیت	۲	۶۳/۳۸۴**	۳/۵۹۹	۱۶
درون جمعیت	۳۸	۱۹/۱۲۵**	۱۹/۱۲۵	۸۴

** معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۱

برای بررسی ضریب تشابه ژنتیکی بین ارقام و لاین‌های مورد بررسی از خوشه‌بندی شبکه‌ای براساس روش Neighbor Net استفاده شد (شکل ۲). با توجه به نتایج حاصل از خوشه‌بندی شبکه‌ای، مشاهده شد که ارقام و لاین‌ها به چهار گروه تقسیم شدند. گروه ۱ شامل لاین‌های هاپلوئید مضاعف‌شده و ژنوتیپ‌های Hyola420، Hyola401 و Talaye (رقم پاییزه) بود. در واقع این گروه، شامل ارقام بهاره می‌باشد. گروه دوم شامل دو زیرگروه بود. ژنوتیپ‌های Opera، Orient، Sarigol و Licord در زیرگروه اول و ژنوتیپ‌های Karaj 2 و Ahmadi در زیرگروه دوم قرار گرفتند. گروه سوم شامل ژنوتیپ‌های Oase، SLM046، Okapi و Zarfam و لاین‌های L957، L955، L945، L938 و L969 بود. گروه چهارم به دو زیرگروه تقسیم شد. زیرگروه اول شامل ژنوتیپ‌های Karaj 1، Karun، Adriana،

Cooper، Lilian، Tassilo، Zarfam و هم‌چنین لاین‌های L1013، L963، L941 و L942 بود. در این زیرگروه هیبریدهای پاییزه پرمحصول قرار گرفته بودند. زیر گروه دوم شامل لاین‌های L1010، L1011، L1008، L996، L1003 و L1012 بود (شکل ۲). با توجه به این‌که، یکی از اهداف برنامه‌های اصلاحی ایجاد هتروزیس بیش‌تر می‌باشد و این امر با دورگ‌گیری بین ارقام با فاصله ژنتیکی بیش‌تر امکان‌پذیر می‌گردد، لذا می‌توان توصیه نمود که از ارقام Hyola401، Hyola420 و Talaye در مقابل با سایر ژنوتیپ‌ها در برنامه‌های اصلاحی دورگ‌گیری استفاده نمود. هم‌چنین، نتایج خوشه‌بندی شبکه‌ای (شکل ۲) با نتایج تجزیه به مختصات اصلی (شکل ۱) تطابق نسبی داشت، ولی تمایز ژنوتیپ‌ها براساس منشاء ژنتیکی در روش خوشه‌بندی شبکه‌ای مشخص‌تر می‌باشد.



شکل ۲- خوشه‌بندی شبکه‌ای برای ۴۱ لاین و ژنوتیپ مورد مطالعه کلزا با استفاده از ۳۶ نشانگر SSR
Figure 2. Network clustering for 41 lines canola lines and genotypes using 36 SSR markers

با توجه به اینکه مقدار حداکثر ΔK در $K=2$ بدست آمده (شکل ۳) می‌توان گفت که ارقام و لاین‌ها به دو زیرجمعیت، ارقام بهاره و پاییزه تقسیم شده‌اند. ژنوتیپ‌های Talaye، Hyola401، Hyola420 و لاین‌های هاپلوئید مضاعف‌شده DH1، DH5، DH8، DH9 و DH1 در زیرجمعیت اول قرار گرفتند و سایر ارقام و لاین‌های امیدبخش در زیر جمعیت ۲ قرار گرفتند. لاین‌های L938، L955 و ژنوتیپ‌های Sarigol، Orient، SLM046، Okapi و Opera، علاوه بر زیرجمعیت دوم در بخش‌هایی از ژنوم خود با زیرجمعیت اول مشابهت داشتند اما با این وجود میزان شباهت‌شان به زیرجمعیت دوم بیشتر بود. هم‌چنین ژنوتیپ‌های Zarfam، Ahmadi و Oase، لاین‌های L945 و L957 در بخش کمی از ژنوم خود با زیرجمعیت یک مشترک بودند. در مجموع در $K=2$ از بین ۱۹ ژنوتیپ، ۲۶/۳ درصد در زیر جمعیت یک و ۷۳/۷ درصد در زیرجمعیت دوم قرار گرفتند. از بین ۱۷ لاین امیدبخش ۹۳/۷ درصد در زیرجمعیت دوم قرار گرفتند. هم‌چنین از بین ۵ لاین هاپلوئید مضاعف‌شده، ۹۶/۲ درصد در زیر گروه یک قرار گرفتند. یکسان شدن زیرجمعیت لاین‌های امیدبخش با ارقام و ژنوتیپ‌های مورد بررسی و نیز حالت اختلاط آن‌ها ممکن است به دلیل وجود جریان ژنی به ارقام اصلاحی طی انجام برنامه‌های اصلاحی باشد.

دیررز و اسبورن (۶) تنوع ژنتیکی ۸۳ لاین کلزا با منشاء اروپایی، آسیایی، آمریکایی و استرالیا از انواع بهاره و پاییزه را با استفاده از نشانگرهای RFLP بررسی کردند و مشاهده نمودند ارقام و لاین‌ها در دو گروه قرار گرفتند. باس و همکاران (۱) تنوع ژنتیکی ۵۰۹ لاین خالص کلزا را با استفاده از ۸۹ نشانگر SSR بررسی کردند. تجزیه به مختصات اصلی و تجزیه ساختار جمعیت، لاین‌های پاییزه، بهاره و لاین‌های سوئدی در سه گروه مجزا قرار داد. هم‌چنین تنوع لاین‌های پاییزه کلزا کم‌تر از سایر لاین‌ها بود. چن و همکاران (۳)

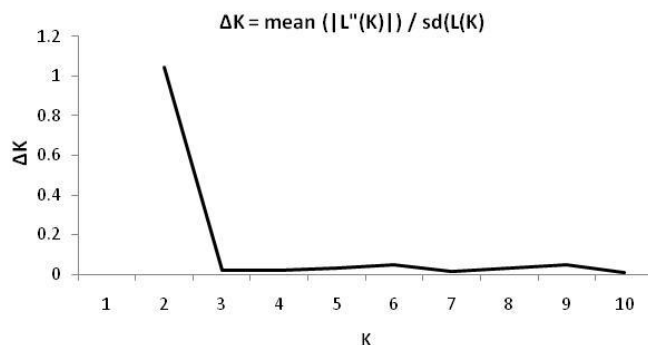
به‌منظور تجزیه مؤثر ساختار جمعیت و دسته‌بندی دقیق ژنوتیپ‌ها به جمعیت‌های مناسب و تشخیص ژنوتیپ‌های مختلط، تجزیه ساختار جمعیت با استفاده از روش Bayesian (۲۷) انجام شد (شکل ۴). در روش تجزیه خوشه‌ای با استفاده از روش مبتنی بر مدل، برنامه با فرض اینکه مدل تبار از نوع مخلوط و مدل فراوانی از نوع پیوسته باشد، اجرا شد. هم‌چنین فرض $K=1$ تا $K=10$ اجرا گردید (K نشان‌دهنده تعداد زیر جمعیت است) و سپس بر مبنای احتمالات ΔK و $\ln(PD)$ دست آمده از این مفروضات صحیح‌ترین زیرجمعیت مشخص شد. پایین‌ترین مقدار عددی $\ln(PD)$ و بالاترین مقدار عددی ΔK نشان‌دهنده بهترین معیار برای دسته‌بندی جمعیت مورد مطالعه می‌باشد. بنابراین در این تحقیق با توجه به اینکه مقدار حداکثر ΔK در $K=2$ بدست آمده (شکل ۳) بنابراین ارقام و لاین‌های مورد بررسی به احتمال بسیار قوی دارای دو زیرجمعیت هستند.

در شکل ۴، هر فرد و کد مربوط به آن به وسیله یک ستون رنگی عمودی نشان داده می‌شود که وجود بیش از یک رنگ، معرف ساختار مختلط ژنتیکی آن فرد یا نشان‌دهنده شباهت ژنتیکی بین این نمونه با زیرجمعیت‌های دیگر و اختلاط ژنتیکی آن فرد است. در این حالت آن فرد به گروهی تعلق می‌گیرد که بیش‌ترین پهنای رنگی آن کلاستر را دارا باشد. در کل ژنوتیپ‌های در داخل هر کلاستر دارای احتمال عضویت بیش از ۰/۷ و به احتمال بیش از ۷۰ درصد به کلاستر خود تعلق دارند (۳۷). بنابراین با توجه به نمودارهای رنگی (زیرجمعیت‌ها با استفاده از رنگ‌های سبز و قرمز مشخص شده‌اند) تجزیه خوشه‌ای نمونه‌های زیرجمعیت تا حدودی یکنواخت هستند. البته هر دو زیرجمعیت نمونه‌هایی از اختلاط را نشان می‌دهند. در مجموع شکل اثبات می‌کند که اختلاط ژنتیکی شدیدی در بین بسیاری از نمونه‌ها مشاهده نمی‌شود (شکل ۴).

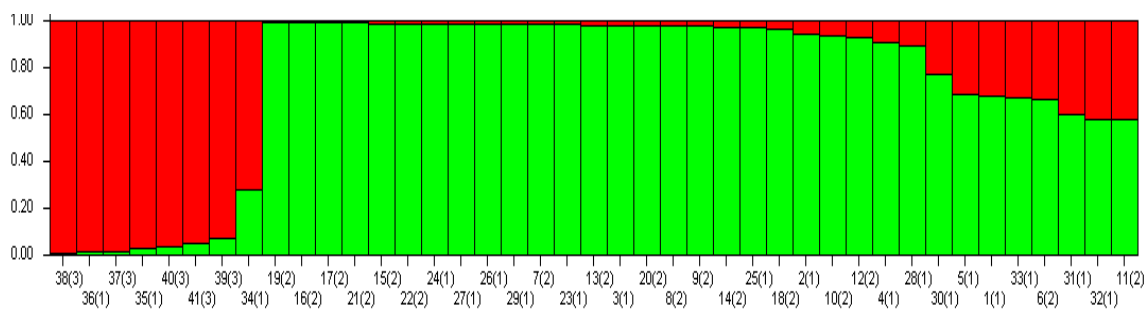
مربوط به نشانگرهای sORF73, BRAS041, BRMS-024 و CB10143 است. در ارزیابی تجزیه ساختار، ارقام و لاین‌ها به دو زیرجمعیت غالب تقسیم شدند، زیرجمعیت اول شامل ارقام بهاره (ژنوتیپ‌های Talaye, Hyola420, Hyola401) و لاین‌های هاپلوئید مضاعف شده DH1, DH5, DH8, DH9 و DH11) و دوم شامل ارقام پاییزه (سایر ارقام و لاین‌ها) بودند. از آنجایی که در این تحقیق، انتخاب نشانگرهای SSR براساس ارتباط آن‌ها با QTL‌های تحمل به خشکی انجام شده بود و با توجه به این که ارقام بهاره نسبت به ارقام پاییزه به خشکی حساس‌تر می‌باشند به نظر می‌رسد دسته‌بندی ارقام با استفاده از روش تجزیه ساختار به گروه غالب بهاره و پاییزه خیلی بی‌ارتباط با تحمل به خشکی ارقام و لاین‌ها نباشد. ولی در مجموع، نشانگری پیدا نشد که بتوان از آن به‌عنوان نشانگری در جهت انتخاب ارقام متحمل به خشکی در گام اول برنامه‌های اصلاحی استفاده کرد و این هدف نیاز به تحقیقات بیشتر در مورد شناسایی QTL‌های تحمل به خشکی در گیاه کلزا دارد.

الگوی تنوع آلی مربوط به ۷۲ ژنوتیپ کلزا از استرالیا، چین و لاین‌هایی از هند، اروپا و کانادا را با استفاده از ۵۵ نشانگر SSR بررسی نمودند و مشاهده کردند که ژنوتیپ‌های هندی و ژنوتیپ‌های چینی هر کدام در گروه‌های مجزایی قرار گرفتند و سایر ژنوتیپ‌ها با منشاء مختلف در گروه سوم قرار گرفتند. حسن و همکاران (۱۰) ساختار ژنتیکی ۹۴ ژنوتیپ کلزا شامل ارقام بهاره، پاییزه و تیپ‌های با مصرف علوفه‌ای و برگی از تمام اقلیم‌ها به‌جزه آفریقا را بررسی نمودند. نتایج آن‌ها سه گروه غالب را نشان داد. گروه اول شامل ارقام بهاره بودند گروه دوم ارقامی با مصرف علوفه‌ای و برگی قرار داشتند و ارقام پاییزه در گروه سوم قرار گرفتند.

از آنجایی که یکی از اهداف برنامه‌های اصلاحی ایجاد هتروزیس بیشتر از طریق دورگ‌گیری بین ارقام با فاصله ژنتیکی بیشتر است لذا توصیه می‌شود از ارقام Hyola401, Hyola420 و Talaye در مقابل با سایر ارقام در برنامه‌های اصلاحی دورگ‌گیری و تولید لاین‌های دبل‌هاپلوئید استفاده شود. در مجموع نتایج نشان داد که بیش‌ترین میزان PIC،



شکل ۳- نمودار منحنی ΔK جهت تعیین مقدار مطلوب K
Figure 3. Graph of ΔK curve to determine the optimal value K



شکل ۴- گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه براساس ساختار ژنتیکی جمعیت با استفاده از نرم‌افزار STRUCTURE
Figure 4. Genotypes clustering based on population genetic structure using the software STRUCTURE
نام ژنوتیپ‌ها و لاین‌ها: ۱. SLM046, ۲. Oase, ۳. Karaj, ۴. Ahmadi, ۵. Okapi, ۶. L938, ۷. L941, ۸. L942, ۹. L944, ۱۰. L945, ۱۱. L955, ۱۲. L957, ۱۳. Adriana, ۱۴. L969, ۱۵. L996, ۱۶. L1003, ۱۷. L1008, ۱۸. L1009, ۱۹. L1010, ۲۰. L1011, ۲۱. L1012, ۲۲. L1013, ۲۳. Lilian, ۲۴. Cooper, ۲۵. Talaye, ۲۶. Licord, ۲۷. Sarigol, ۲۸. Orient, ۲۹. Karaj2, ۳۰. Opera, ۳۱. DH1, ۳۲. Tassilo, ۳۳. DH5, ۳۴. DH8, ۳۵. DH9, ۳۶. DH11, ۳۷. Karun, ۳۸. Zarfam, ۳۹. Karaj2, ۴۰. DH11

منابع

1. Bus, A., N. Korber, R.J. Snowdon and B. Stich. 2011. Patterns of molecular variation in a species-wide germplasm set of *Brassica napus*. Theoretical and Applied Genetics, 123: 1413-1423.
2. Chen, W., Y. Zhang, L. Xueping, B. Chen, J. Tu and F. Tingdong. 2007. Detection of QTL for six yield-related traits in oilseed rape (*Brassica napus* L.) using DH and immortalized F2 populations. Theoretical and Applied Genetics, 115: 849-858.
3. Chen, S., M.N. Nelson, K. Ghamkhar, T. Fu and W.A. Cowling. 2008. Divergent patterns of allelic diversity from similar origins: the case of oilseed rape (*Brassica napus* L.) in China and Australia. Genome, 51: 1-10.
4. Darvishnia, F.D., B.A. Fakhri, F. Nazarian firouzabadi and N. Panjehkeh. 2015. Genetic diversity of rapeseed (*Brassica napus* L.) using SSR and ISJ molecular markers. Iranian Journal of Agricultural Science, 46(1): 1-14 (In Persian).
5. Dellaporta, S.L., J. Wood and J.B. Tickes. 1993. A plant molecular DNA mini preparation. Version II. Plant Molecular Biology Reporter, 1: 19-21.
6. Diers, B.W. and T.C. Osborn. 1994. Genetic diversity of oilseed *Brassica napus* germplasm based on restriction fragment length polymorphisms. Theoretical and Applied Genetics, 88: 662-668.
7. Evanno, G., S. Regnaut and J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. Molecular ecology, 14: 2611-2620.
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. Flakelar, C.L., D.J. Luckett, J.A. Howitt, G. Dorana and P.D. Prenzler. 2015. Canola (*Brassica napus*) oil from Australian cultivars shows promising levels of tocopherols and carotenoids, along with good oxidative stability. Journal of Food Composition and Analysis, 42: 179-186.
10. Hasan, M., W. Friedt, J. Pons-Ku'hnemann, N.M. Freitag, K. Link and R.J. Snowdon. 2008. Association of gene-linked SSR markers to seed glucosinolate content in oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *napus*). Theoretical and Applied Genetics, 116:1035-1049.
11. Howell, P.M., A.G. Sharpe and D.J. Lydiate. 2003. Homoeologous loci control the accumulation of seed glucosinolates in oilseed rape (*Brassica napus*). Genome, 46: 454-460.
12. Johnson, U., J. West, C. Lister, S. Michwels, R. Amasino and C. Dean. 2000. Molecular analysis of FRIGIDA, a major determinant of natural variation in Arabidopsis flowering time. Science, 290: 344-347.
13. Jun, Z., J. Congcong, C. Zhengying, L. Ruiyuan, L. Yan, C. Sheng and M. Jinling. 2010. Association mapping of seed oil content in *Brassica napus* and comparison with quantitative trait loci identified from linkage mapping. Genome, 53: 908-916.
14. Li, Z., Sh. Mei, Zh. Mei, X. Liu, T. Fu, G. Zhou and J. Tu. 2014. Mapping of QTL associated with waterlogging tolerance and drought resistance during the seedling stage in oilseed rape (*Brassica napus*). Euphytica, 197: 341-353.
15. Long, Y., J. Shi, D. Qiu, R. Li, C. Zhang, J. Wang, J. Hou, J. Zhao, L. Shi, B.S. Park, S.R. Choi, Y.P. Lim and J. Meng. 2007. Flowering time quantitative trait loci analysis of oilseed *Brassica* in multiple environments and genome wide alignment with Arabidopsis. Genetics, 177: 2433-2444.
16. Lowe, A.J., C. Moule, M. Trick and K.J. Edwards. 2003. Efficient large-scale development of microsatellites for marker and mapping applications in *Brassica* crop species. Theoretical and Applied Genetics, 108:1103-1112.
17. Lowe, A.J., C. Moule, M. Trick and K.J. Edwards. 2004. Efficient large-scale development of microsatellites for marker and mapping applications in *Brassica* crop species. Theoretical and Applied Genetics, 108:1103-1112.
18. Mahjoob, B., H. Najafi-Zarini and SH.R. Hashemi. 2014. Assessment of genetic relationships among 36 *Brassica* genotypes using ISSR molecular markers. Journal of Crop Breeding, 6(14): 96-106 (In Persian).
19. Moghaddam, M., S.A. Mohammadi, N. Mohebalipour, M. Toorchi, S. Aharizad and F. Javidfar. 2009. Assessment of genetic diversity in rapeseed cultivars as revealed by RAPD and microsatellite markers. African Journal of Biotechnology, 8(14): 3160-3167.
20. Moghaieb, R.E.A., F.H.K. Mohammed and S.S. Youssief. 2014. Genetic diversity among some canola cultivars as revealed by RAPD, SSR and AFLP analyses. Biotechnology, 4: 403-410.
21. Mohammadi, S.A. and B.M. Prasanna. 2003. Analysis of Genetic diversity in crop plants: Salient statistical tools and consideration. Crop Science, 43: 1235-1248.
22. Naghavi, M.R., M. Mardi, S.M. Pirseyedi, M. Kazemi, P. Potki and M.R. Ghaffari. 2007. Comparison of genetic variation among accessions of *Aegilops tauschii* using AFLP and SSR markers. Genetic Resources and Crop Evolution, 54: 237-240.
23. Nakao Kubo, M.H. 2008. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers in the. Aquatic Botany, 2164-2168.
24. Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 89: 583-590.
25. Piquemal, J., E. Cinquin, F. Couton, C. Rondeau, E. Seignoret, I. Doucet, D. Perret, M.J. Villeger, P. Vincourt and P. Blanchard. 2005. Construction of an oilseed rape (*Brassica napus* L.) genetic map with SSR markers. Theoretical and Applied Genetics, 111: 1514-1523.

26. Powell, W., M. Morgante, C. Ander, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingy and A. Rafalaski. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) marker for germplasm analysis. *Journal of Molecular Breeding*, 2: 225-238.
27. Pritchard, J.K., M. Stephens and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.
28. Qu, C., M. Hasan, K. Lu, L. Liu, X. Liu, J. Xie, M. Wang, J. Lu, N. Odat, R. Wang, L. Chen, Z. Tang and J. Li. 2012. Genetic diversity and relationship analysis of the *Brassica napus* germplasm using simple sequence repeat (SSR) markers. *African Journal of Biotechnology*, 11(27): 6923-6933.
29. Reddy, M.P., N. Sarla and E.A. Siddiq. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128: 9-17.
30. Rezaei Zad, A., V.A. Mohammadi, A.A. Zali, H. Zeinali and M. Mardi. 2012. Mapping QTLs controlling yield and yield components of oilseed rape under normal irrigation and drought stress conditions. *Journal of Breeding Seed and Plant*, 27: 199-218 (In Persian).
31. Roder, M.S., V. Korzun, K. Wendehake, J. Plaschke, M.H. Tixier, P. Leroy and M.W. Ganal. 1998. A microsatellite map of wheat. *Genetics*, 149: 2007-2023.
32. Shannon C.E. and W. Weaver. 1949. *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press, Urbana.
33. Siahisar, B.A., M. Allahdoo and H. Shahsavand Hasani. 2010. Evaluation of genetic diversity of tritipyrum, triticale and wheat lines through RAPD and ISJ markers. *Iran Journal of field Crop Science*, 41(3): 555-568 (In Persian).
34. Somers, D.J., K.R.D. Friesen and G. Rakow, G. 1998. Identification of molecular markers associated with linoleic acid desaturation in *Brassica napus*. *Theoretical and Applied genetics*, 96: 897-903.
35. Suwabe, K., H. Iketani, T. Nunome, T. Kage and M. Hirai. 2002. Isolation and characterization of microsatellites in *Brassica rapa* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 1092-1098.
36. Suwabe, K., H. Tsukazaki, H. Iketani, K. Hatakeyama, M. Fujimura, T. Nunome, H. Fukuoka, S. Matsumoto and M. Hirai. 2003. Identification of two loci for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) in *Brassica rapa* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 107: 997-1002.
37. Tondelli, A., X. Xu, M. Moragues, R. Sharma, F. Schnaithmann, Ch. Ingvarlsen, O. Manninen, J. Comadran, J. Russell and R. Waugh. 2013. Structural and temporal variation in genetic diversity of European spring two-row barley cultivars and association mapping of quantitative traits. *The Plant Genome*. 6(2).
38. Turi, N., A. Farhatullah, M.A. Rabbani and Z.K. Shinwari. 2012. Genetic diversity in the locally collected *Brassica species* of Pakistan based on microsatellite markers. *Pakistanian Journal Botany*, 44: 1029-1035.
39. Zali, H., O. Sofalian, T. Hasanloo, A. Asgharii and M. Zeinalabedini. 2016. Drought stress effect on physiological parameter and amino acids accumulations in canola. *Journal of Crop Breeding*, 8: 191-203 (In Persian).
40. Zali, H., O. Sofalian, T. Hasanloo, A. Asghari and M. Zeinalabedini. 2016. Appropriate strategies for selection of drought tolerant genotypes in canola. *Journal of Crop Breeding*, 78(20): 77-90 (In Persian).
41. Zhao, J. and J. Meng. 2003. Genetic analysis of loci associated with partial resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 759-764.

Assessment of Variability and Genetic Structure of Canola cultivars and Lines using SSR Markers Related on Drought Tolerance QTLs

Hassan Zali¹, Omid Sofalian², Mehrshad Zeinalabedini³, Tahereh Hasanloo⁴,
Ali Asghari² and Bahram Alizadeh⁵

1- Assistant Professor, Seed and Plant Improvement Department, Fars Agricultural and Natural Resources Research Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Darab, Iran
(Corresponding author: hzali90@yahoo.com)

2- Associate Professor, Plant Breeding Department, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil

3- Assistant Professor, Department of Genomics, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, AREEO, Karaj, Iran

4- Assistant Professor, Department of Molecular Physiology, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, AREEO, Karaj, Iran

5- Associate Professor, Seed and Plant Improvement Institute, AREEO, Karaj, Iran
Received: April 4, 2017 Accepted: August 13, 2017

Abstract

In the present study, genetic diversity among 41 lines and genotypes of canola including 19 open-pollinated and hybrid cultivars, 17 promising lines and 5 double-haploid lines were determined using simple sequence repeat (SSR) markers related on drought tolerance QTLs. Thirty-six selected primers produced 166 discernible bands, with 157 (94.58%) being polymorphic, indicating considerable genetic diversity among lines and genotypes. The polymorphic information content values of loci were varied from 0.046 (FITO133) to 0.327 (BRMS-024), respectively. The average of PIC index was estimated 0.212. Cultivars were classified into two sub-populations according to analysis of population structure including (Talaye, Hyola420 and Hyola401 genotypes and DH1, DH5, DH8, Dh9 and DH11 double haploids) as first group and winter cultivars as second group (other cultivars and lines). Based on the analysis of molecular variance, intra-population variance was higher than inter-population variance. The results showed that average of marker index including Nei's gene diversity, Shannon's information index, the effective number of alleles were 1.508, 0.449 and 0.298 respectively in line and genotypes of canola. In total, the marker wasn't found to be using it as a marker for selecting genotypes of drought tolerant used in the first step of breeding programs.

Keywords: *Brassica napus*, Genetic diversity, Genetic structure, Microsatellites