دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

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 زین العابدینی[۳]، طاهره حسنلو[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 ٤١ لاین و ژنوتیپ کلزا شامل ۱۹ رقم آزاد گرده‌افشان و هیبرید، ۱۷ لاین امیدبخش و ۵ لاین هاپلوئید مضاعف‌شده کلزا با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره مرتبط با QTLهای تحمل به خشکی مورد بررسی قرار گرفت. ٣٦ نشانگر مورد مطالعه، ١٦٦ نوار قابل تشخیص ایجاد کردند و ١٥٧ آلل (٩٤/٥٨٪) آن چندشکل بودند که نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای در میان لاین‌ها و ژنوتیپ‌ها بود. میزان محتوای اطلاعات چندشکلی در بین نشانگرها از ٠/٠٤٦ (FITO133) تا ٠/٣٢٧ (BRMS-204) متغیر بود. متوسط میزان شاخص PIC برابر با ٠/٢١٢ بود. نتایج نشان داد که متوسط شاخص نشانگری، تنوع ژنی نِی، شاخص اطلاعات شانون و تعداد آلل‌های مؤثر به‌ترتیب ١/٥٠٨، ٠/٤٤٩ و ٠/٢٩٨ 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 درجهت انتخاب ارقام متحمل به خشکی درگام 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، ریزماهواره‌ها

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 آللی فراهم می‌کند که ممکن است به شناسایی ذخایر متنوع ژنتیکی برای تلاقی‌های 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 بیوشیمیای و نشانگرهای DNA (مانند نشانگرهای RFLP، AFLP، RAPD و SSR) اشاره کرد (۱). نشانگرهای ریزماهواره، 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 به‌طوری در هر ۱۰۰۰۰ جفت باز در طول DNA دست کم یک ردیف ریزماهواره با دو ردیف منحصر به‌فرد در

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1397.10.26.16.9]
[DOI: 10.29252/jcb.10.26.65]

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 پلیمراز (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، بیش‌تر 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 QTLsهای 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 آزاد گرده‌افشان، 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 تغییریافته (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 ریزماهواره 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 پلیمراز، نمونه‌های DNA به غلظت ۲۵ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 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 میلی‌مولار، ۱/۲ میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت ۲۵ میلی‌مولار، ۱/۵ میکرولیتر بافر با غلظت ۱۰X، ۰/۲ میکرولیتر تک پلیمراز 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 صورت‌که 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 صورت‌که 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 ریزماهواره 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 نِی (۲۴) و روش گروه‌بندی اتصال همسایگی[1] 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[2] با استفاده از نرم‌افزار GenAlex ver 6.5 استفاده شد. تجزیه به مختصات اصلی (PCoA)[3] و رسم نمودار دو بعدی با استفاده از نرم‌افزار GenAlex انجام گردید. میزان PIC[4] از طریق فرمول $PIC = \Sigma[2p_i (1 - p_i)]/n$ صورت گرفت (۲۶) که در آن، p_i فراوانی نوارiام تقسیم بر تعداد ژنوتیپ‌هاست و n تعداد نوارهای ایجاد شده بود. هم‌چنین، شاخص‌های نشانگری شامل: شاخص تنوع شانون (I)[5]، متوسط تعداد آلل در هر مکان ژنی (Ne)[6]، تنوع ژنتیکی نی (He)[7] 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

1- Neighbor Joining
2- Analysis of Molecular Variance
3- Principle co-ordinate analysis
4- Polymorphism Information Content
5- Shannon's Information index
6- Effective number of alleles
7- Nei's (1973) gene diversity

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1397.10.26.16.9]
[DOI: 10.29252/jcb.10.26.65]

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 آللی با ۵۰۰۰ اجرا در زمان[1] و ۵۰۰۰۰ جایگشت[2] استفاده شد تا منحنی حداکثر درست‌نمایی حاصل شود. نرم‌افزار Structure برای هر مقدار 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 درآن نقطه دارای حداکثر احتمال باشد.

جدول ۱- مشخصات نشانگرهای SSR و توالی آن‌ها

Table 1. Characteristic of SSR primers and its sequencing

نشانگر	توالی نشانگر جلو رونده	توالی نشانگر معکوس	گروه کروموزومی	مکان نشانگر (سانتی مورگان)	منبع
Ol10-B02	CACGAACGCGAGAGAGAGAG	TGCATAAGCTCGAAGAGACG	C5	۵۲/۶	۱۵
BRAS041	CCAGACTCCGATAAAACC	ATGCAAGCTTAGACAGAGATT	A1	۵۰/۰	۲۴
BRAS084	ATTGGGTTCTGACCTTTTCTC	TTTTCCTTCATCGCTACCAC	A1	۳۶/۹	۲۴
CB10234	CTGATGGACTAGGACCCC	TCTGTTGTTTCTCTCGCC	C6	۲۹/۹	۲۴
CB10597	AAGCGCGCATAACTACAC	AACACTGCTCCTTTCCCT	A1	۱۲/۶	۲۴
Na10E02b	TCGCGCATGTAATCAAAATC	TGTGACGCATCCGATCATAC	A5	۶/۶	۱۶
BRMS-036	GGTCCATTCCTTTTTGCATCTG	CATGGCAAGGGGTAACAAACAT	A7	۱۵/۴	۳۲
BRAS074a	AATTTAAACCTCATTTTCTTC	ACCTCCATTGTGTCTGAT	A1	۰	۲۴
Na12-A08a	AACACTTGCAACTTCATTTTCC	CATTGGTTGGTGAATTGACAG	A3	۲۲۰/۴	۲۴
Ol12-F11a	AAGGACTCATCGTGCAATCC	GTGTCAGTGGCTACAGAGAC	A1	۳۹/۵	۲۴
CB10526	ACTCGGCGGTTAGAGAAT	TTCTTCTTTCCACCACCA	C6	۲۸/۱	۲۴
Na10-C01f	GGAAACTAGGGTTTTCCCTTC	TTTTGTCCCACTGGGTTTTC	C3	۱۸/۷	۲۴
CB10003b	AAATGGGTCACAGCCGAGAA	ACGGTGCCGAATCTCAACG	C3	۱۲/۷	۲۴
Ol11-H06	TCCGAACACTCTAAGTTAGCTCC	TTCTTCACTTCACAGGCACG	C9	۹/۵	۷
FITO133	AACACAACCACCACCAAC	AATGGCAAAGTTATTCTACCC	C3	۴۲/۶	۲۴
SR94102	ATCCCCAAACTACCCTCACC	AGGATGAGCAAAGGAAAGCA	C2	۱۶۲/۶	۱۵
sORF73b	CGTGGGCCAAGCTTAGATTA	CGTTCAAGAAGACACAGATCAAA	C5	۱۹/۸	۱۵
BRAS100	CTCCCACCGCTTTACCTCT	GGCTACCACCACCACTCGC	A1	۲۷/۵	۲۴
CB10159b	CACAGCTTTACCCAATCG	GATCACCATCTGCACCAT	A1	۲۷/۷	۲۴
CB10081c	GGCTTTAGCACTGTGATCCT	TTGGGAGAGAAAACTATACG	A1	۸۷/۱	۲۴
Na14-096	TCCCGGTCGCTAAGATATTG	TTCCCTTTATTGAGCAAGCTG	A3	–	۱۶
BRAS072a	CACTAACCTTCTTGCTACCGT	GCCATCTACACATTTATCCC	A5	۳۵/۵	۲۴
CB10143	CATGGGAGGCTGTCTAAA	TTGCACCCATACGTTTTC	C2	۱۷۴/۴	۲۴
NA10-E02b	TCGCGCATGTAATCAAAATC	TGTGACGCATCCGATCATAC	A5	۶/۶	۱۶
BRMS030	GGTCCATTCCTTTTTGCATCTG	CATGGCAAGGGGTAACAAACAT	A5	۴۴/۲	۳۲
BRMS-031	TGCCACCAATGACAATGACACTATC	GATGCACTGGGACCACTTACATTTT	A1	۲۷/۵	۳۲
BRMS-024	TGAATTGAAAGGCATAAGCA	CAGCCTCCACCACTTATTCT	A1	۲۷/۵	۳۲
BRMS-096	AGTCGAGATCTCGTTCGTGTCTCCC	TGAAGAAGGATTGAAGCTGTTGTTG	A1	۵۷/۵	۳۵
BRMS-030	TCAGCCTACCAACGAGTCATAA	AAGGTCTCATACGATGGGAGTG	C5	۴۴/۲	۳۲
CB10502	GGTGAGCTTCTTCCTTCC	TTGAAGAGTGGGGATTCA	C6	۲۸/۱	۲۴
CB10010	ACCCTGTTCCTTCTACTAT	TTATCTTTGAATGAGCATCT	C6	۴۰/۹	۲۴
MR013c	CGCTACTTCCGCTGATACTTT	TCAGAATCGCGACTGTAGTCT	A9	۷۱/۸	۲۴
Pmr52	TCGACATGGATTCTACCAAA	GAACTTGCAAGCTGCAATTA	C2	۱۷۲/۷	۱۳
Na12-B05	CAAATATCCGTCATCGGAGC	CCTGCGGGATATTGAAGACC	A8	۱۴/۲	۳۵
CB10504	CATTGGCATAGGAACAGG	GGTGTCCCAACTGTTGAA	C8	۶۵/۴	۲۴
NA14-E08a	GCGGATTATGATGACGCAG	TTACTATCCCCTCTCCGCAC	C4	۴۱/۳	۱۶

1- Burn in time

2- Permutation

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1397.10.26.16.9]

[DOI: 10.29252/jcb.10.26.65]

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

Table 2. Lines and genotypes name and its origin

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

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 به‌طوری 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 به‌طور متوسط ۴/۴۹ نوار به ازای هر نشانگر تکثیر شد. در مطالعه‌ای که به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی ارقام کلزا با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره صورت گرفت، در مجموع ۱۴۳ آلل با متوسط آللی ۱۱/۹۲ به ازای هرنشانگر مشاهده شد (۱۹). در تحقیق ما، پایین بودن تعداد نوار به ازای هر نشانگر، احتمالاً به‌دلیل 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 چند شکلی 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 ۰/۰۴۶ تا ۰/۳۲۷ متغیر بود که بیش‌ترین میزان PIC مربوط به نشانگرهای BRMS-024، BRAS041، sORF73 و CB10143 و کم‌ترین آن مربوط به نشانگرهای FITO133، Ol10-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 ۰/۰۱۵ در آغازگر Ol10D08 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، BRMS-030 و NA10-E02 به‌ترتیب بیش‌ترین تعداد آلل مؤثر در هر مکان ژنی، تنوع ژنی نِی و شاخص تنوع شانون را نشان دادند و نشانگرهای Ol10-B02 و CB10003 نیز کم‌ترین این مقادیر را به‌خود اختصاص دادند (جدول ۳). بالاتر بودن تعداد آلل مؤثر در هر مکان ژنی، تنوع ژنی نِی (۲۴) و شاخص تنوع 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 نِی 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 به‌خود اختصاص دادند که با توجه به طبیعت کاملاً خالص این لاین‌ها این نتایج دور از انتظار نبود. در تحقیق حاضر نشانگرهای BRAS04، BRAS072، CB10504،

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1397.10.26.16.9]
[DOI: 10.29252/jcb.10.26.65]

CB10234، BRMS-030 و NA10-E02 بهتر از سایر نشانگرهای به‌کار 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 مضاعف‌شده بود. نتایج تجزیه واریانس مولکولی (جدول ۴) 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 ست.

جدول ۳- شاخص‌های مختلف تنوع ژنتیکی نشانگرهای مورد بررسی در ۴۱ لاین و ژنوتیپ کلزا

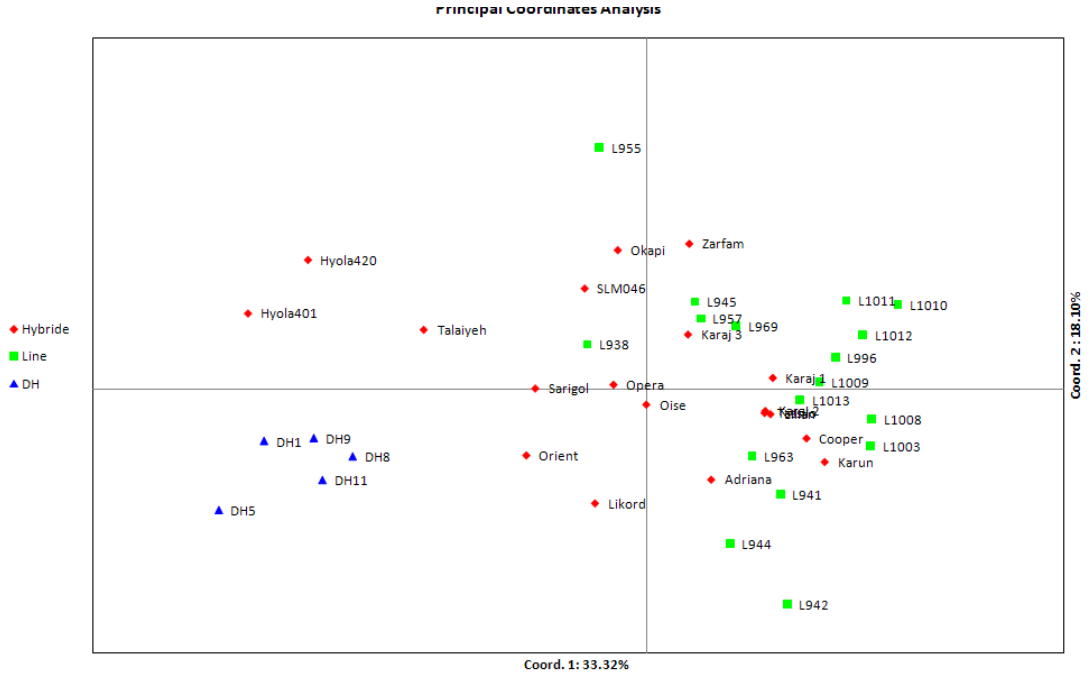
Table 3. Genetic diversity different indices of primers under study in 41canola lines and genotypes

نشانگر	تعداد آلل	تعداد نوارهای چندشکل	چندشکلی (٪)	PIC	فراوانی نوار	Pi	Ne	I	He
Ol10-B02	۳	۲	۶۷	۰/۰۶۹	۰/۳۷۴	۰/۳۵۴	۱/۰۴۳	۰/۰۸۸	۰/۰۴۰
BRAS041	۳	۳	۱۰۰	۰/۳۱۷	۰/۷۲۴	۰/۴۷۶	۱/۹۸۲	۰/۶۸۹	۰/۴۹۶
BRAS084	۲	۲	۱۰۰	۰/۱۹۸	۰/۸۱۷	۰/۶۳۰	۱/۶۵۱	۰/۵۵۶	۰/۳۷۵
CB10234	۶	۶	۱۰۰	۰/۲۱۶	۰/۳۲۱	۰/۲۰۳	۱/۳۸۳	۰/۳۶۸	۰/۲۳۶
CB10597	۳	۳	۱۰۰	۰/۲۷۳	۰/۷۳۲	۰/۵۰۷	۱/۸۲۴	۰/۶۴۱	/۴۵۰
Na10E02b	۳	۳	۱۰۰	۰/۱۳۶	۰/۱۰۶	۰/۰۵۶	۱/۷۲۶	۰/۱۸۲	۰/۰۹۹
BRMS-036	۷	۷	۱۰۰	۰/۲۴۱	۰/۵۷۱	۰/۴۱۳	۱/۵۰۸	۰/۴۸۶	۰/۳۱۷
BRAS074a	۳	۳	۱۰۰	۰/۲۱۸	۰/۱۴۶	۰/۰۷۶	۱/۱۶۴	۰/۲۶۸	۰/۱۴۰
Na12-A08a	۵	۵	۱۰۰	۰/۲۲۱	۰/۳۷۶	۰/۲۴۶	۱/۴۳۳	۰/۴۰۱	۰/۲۵۹
Ol12-F11a	۳	۳	۱۰۰	۰/۲۲۹	۰/۱۹۵	۰/۱۰۵	۱/۳۴۰	۰/۳۰۵	۰/۱۷۹
CB10526	۴	۴	۱۰۰	۰/۱۸۷	۰/۵۳۰	۰/۳۸۵	۱/۴۹۰	۰/۴۴۱	۰/۲۹۲
Na10-C01f	۸	۵	۶۲/۵	۰/۲۱۰	۰/۸۲۹	۰/۷۴۸	۱/۴۵۷	۰/۳۷۹	۰/۲۶۱
CB10003b	۴	۲	۵۰	۰/۲۱۹	۰/۵۷۳	۰/۵۳۸	۱/۰۸۲	۰/۱۳۵	۰/۰۷۰
Ol11-H06	۳	۳	۱۰۰	۰/۲۰۹	۰/۴۲۳	۰/۲۸۸	۱/۴۴۲	۰/۴۱۶	۰/۲۷۰
FITO133	۲	۲	۱۰۰	۰/۰۴۶	۰/۹۷۶	۰/۸۴۴	۱/۳۵۸	۰/۴۳۳	۰/۲۶۴
SR94102	۵	۵	۱۰۰	۰/۲۹۰	۰/۴۱۵	۰/۲۵۲	۱/۵۷۶	۰/۴۸۷	۰/۳۲۵
sORF73b	۶	۶	۱۰۰	۰/۳۰۱	۰/۳۹۰	۰/۲۳۵	۱/۵۰۸	۰/۴۷۷	۰/۳۱۱
BRAS100	۶	۶	۱۰۰	۰/۱۵۴	۰/۷۳۲	۰/۵۶۰	۱/۶۰۹	۰/۵۰۵	۰/۳۴۳
CB10159b	۹	۹	۱۰۰	۰/۲۵۱	۰/۵۴۲	۰/۳۷۵	۱/۵۷۳	۰/۵۰۴	۰/۳۳۴
CB10081c	۶	۶	۱۰۰	۰/۲۳۱	۰/۳۷۴	۰/۲۴۰	۱/۴۵۹	۰/۴۱۱	۰/۲۶۷
Na14-096	۳	۳	۱۰۰	۰/۱۶۱	۰/۶۶۷	۰/۵۷۹	۱/۲۸۶	۰/۲۷۳	۰/۱۷۵
BRAS072a	۶	۶	۱۰۰	۰/۲۴۸	۰/۷۹۳	۰/۵۶۳	۱/۸۵۸	۰/۶۵۲	۰/۴۶۰
CB10143	۲	۲	۱۰۰	۰/۳۰۸	۰/۲۵۶	۰/۱۳۸	۱/۳۱۱	۰/۴۰۰	۰/۲۳۷
NA10-E02b	۲	۲	۱۰۰	۰/۲۶۴	۰/۷۴۴	۰/۵۲۲	۱/۸۰۰	۰/۶۳۶	۰/۴۴۴
BRMS030	۶	۵	۸۳/۳	۰/۲۲۹	۰/۷۲۰	۰/۵۶۵	۱/۵۶۳	۰/۴۵۳	۰/۳۰۹
BRMS-031	۳	۳	۱۰۰	۰/۲۲۷	۰/۳۳۳	۰/۲۱۱	۱/۴۲۳	۰/۳۸۷	۰/۲۴۵
BRMS-024	۳	۳	۱۰۰	۰/۳۲۷	۰/۴۲۳	۰/۲۵۰	۱/۵۸۸	۰/۵۲۰	۰/۳۴۶
BRMS-096	۳	۳	۱۰۰	۰/۱۴۵	۰/۷۱۰	۰/۷۱۰	۱/۶۲۷	۰/۵۵۱	۰/۳۶۹
BRMS-030	۳	۳	۱۰۰	۰/۲۰۵	۰/۶۳۲	۰/۶۳۲	۱/۸۱۹	۰/۶۳۲	۰/۴۴۲
CB10502	۲	۲	۱۰۰	۰/۱۲۶	۰/۷۲۹	۰/۷۲۹	۱/۶۵۲	۰/۵۸۴	۰/۳۹۵
CB10010	۸	۸	۱۰۰	۰/۱۶۹	۰/۰۹۱	۰/۰۹۱	۱/۲۰۹	۰/۲۴۲	۰/۱۴۲
MR013c	۶	۶	۱۰۰	۰/۲۲۷	۰/۴۵۲	۰/۴۵۲	۱/۵۷۱	۰/۵۱۳	۰/۳۴۰
Pmr52	۳	۳	۱۰۰	۰/۰۷۴	۰/۵۲۴	۰/۵۲۴	۱/۳۵۸	۰/۳۷۴	۰/۲۳۸
Na12-B05	۱۰	۱۰	۱۰۰	۰/۲۱۲	۰/۵۴۲	۰/۵۴۲	۱/۶۳۳	۰/۵۵۸	۰/۳۷۵
CB10504	۶	۶	۱۰۰	۰/۲۳۷	۰/۵۸۲	۰/۵۸۲	۱/۸۴۶	۰/۶۴۵	۰/۴۵۴
NA14-E08a	۷	۷	۱۰۰	۰/۲۴۰	۰/۴۷۱	۰/۴۷۱	۱/۶۴۸	۰/۵۵۸	۰/۳۷۶
مجموع	۱۶۴	۱۵۷	—	—	—	—	—	—	—
میانگین	۴/۴۸۶	۴/۲۴۳	۹۶/۲۹	۰/۲۱۲	—	—	۱/۵۰۸	۰/۴۴۹	۰/۲۹۸
جمعیت									
ارقام هیبرید							۱/۴۷۳	۰/۴۱۷	۰/۲۷۷
لاین امیدبخش							۱/۴۲۴	۰/۳۷۴	۰/۲۴۹
لاین‌های دابل هاپلوئید							۱/۲۵۶	۰/۲۲۱	۰/۱۴۹

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

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). به‌طوری‌که، لاین‌های هاپلوئید مضاعف شده در یک گروه مجزا قرار گرفتند ولی کمی تداخل بین ارقام هیبرید و لاین‌های امیدبخش وجود داشت. بالا 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.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1397.10.26.16.9]
[DOI: 10.29252/jcb.10.26.65]



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

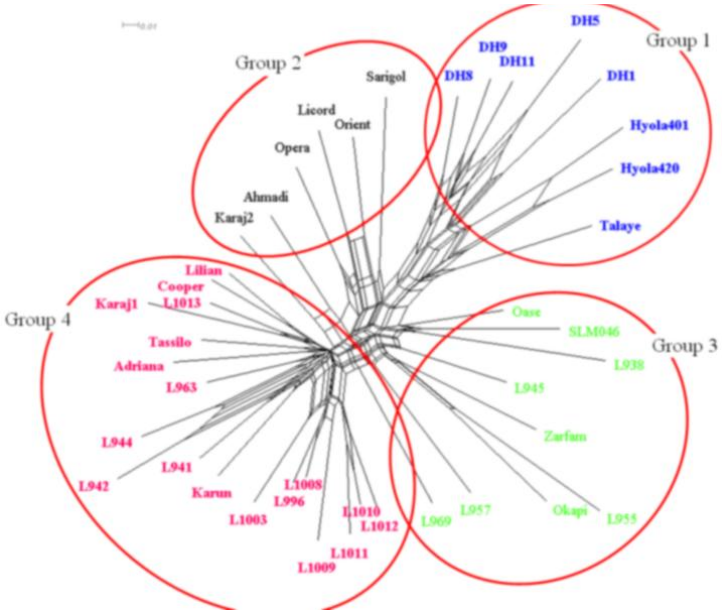
Table 4. Molecular variance analysis based on SSR data in 41 canola lines and genotypes

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات	اجزاء واریانس	درصد واریانس
بین جمعیت	۲	۶۳/۲۸۴**	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 Hyola401، Hyola420 و Talaye (رقم پاییزه) بود. در واقع این گروه، شامل ارقام بهاره می‌باشد. گروه دوم شامل دو زیرگروه بود. ژنوتیپ‌های Opera، Orient، Licord و Sarigol در زیرگروه اول و ژنوتیپ‌های Karaj 2 و Ahmadi در زیرگروه دوم قرار گرفتند. گروه سوم شامل ژنوتیپ‌های SLM046، Oase، Zarfam و Okapi و لاین‌های L938، L945، L955، L957 و L969 بود. گروه چهارم به دو زیرگروه تقسیم شد. زیرگروه اول شامل ژنوتیپ‌های Karaj 1، Karun، Adriana، Lilian، Cooper، Tassilo و Zarfam و هم‌چنین لاین‌های L1013، L963، L944، L942 و L941 بود. در این زیرگروه هیبریدهای پاییزه پرمحصول قرار گرفته بودند. زیر گروه دوم شامل لاین‌های L1003، L996، L1008، L1011، L1010 و L1012 بود (شکل ۲). با توجه به‌این‌که، 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.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1397.10.26.16.9]
[DOI: 10.29252/jcb.10.26.65]



شکل ۲- خوشه‌بندی شبکه‌ای برای ۴۱ لاین و ژنوتیپ مورد مطالعه کلزا با استفاده از۳۶ نشانگر SSR
Figure 2. Network clustering for 41 lines canola lines and genotypes using 36 SSR markers

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 خوشه ای با استفاده از روش مبتنی بر مدل، برنامه با فرض اینکه مدل تبار[1] 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 برمبنای احتمالات Ln(PD) و ΔK به 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=۲ 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 (زیرجمعیت ها 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 نمونه ها مشاهده نمی‌شود (شکل ۴).

با توجه به اینکه مقدار حداکثر ΔK در K=۲ بدست آمده (شکل ۳) می‌توان گفت که ارقام و لاین‌ها به دو زیرجمعیت، ارقام بهاره و پاییزه تقسیم شده‌اند. ژنوتیپ‌های Talaye، Hyola420، Hyola401 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 L955، L938 و ژنوتیپ‌های Sarigol، Orient، SLM046، Okapi و Opera، علاوه بر زیرجمعیت دوم در بخش‌هایی از ژنوم خود با زیرجمعیت اوّل مشابهت داشتند اما با این وجود میزان شباهت‌شان به زیرجمعیت دوم بیش‌تر بود. هم‌چنین ژنوتیپ‌های Zarfam، Ahmadi، Oase و لاین‌های L957 و L945 در بخش کمی از ژنوم خود با زیرجمعیت یک مشترک بودند. در مجموع در K=۲ از بین ۱۹ ژنوتیپ، ۲۶/۳ درصد در زیر جمعیت یک و ۷۳/۷ درصد در زیرجمعیت دوّم قرار گرفتند. از بین ۱۷ لاین امیدبخش ۹۳/۷ درصد در زیرجمعیت دوّم 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 به‌دلیل وجود جریان ژنی به ارقام اصلاحی طی انجام برنامه‌های اصلاحی باشد.

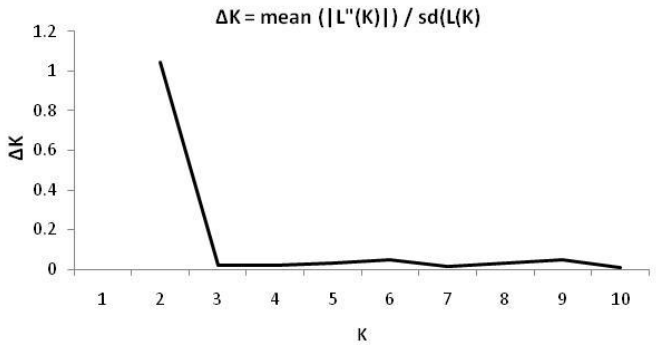
دییرز و اسبورن (۶) تنوع ژنتیکی ۸۳ لاین کلزا با منشاء اروپایی، آسیایی، آمریکایی و استرالیا از انواع بهاره و پاییزه را با استفاده از نشانگرهای RFLP بررسی کردند و مشاهده نمودند ارقام و لاین‌ها در دو گروه قرار گرفتند. باس و همکاران (۱) تنوع ژنتیکی ۵۰۹ لاین خالص کلزا را با استفاده از ۸۹ نشانگر SSR بررسی کردند. 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)

1- Ancestry model

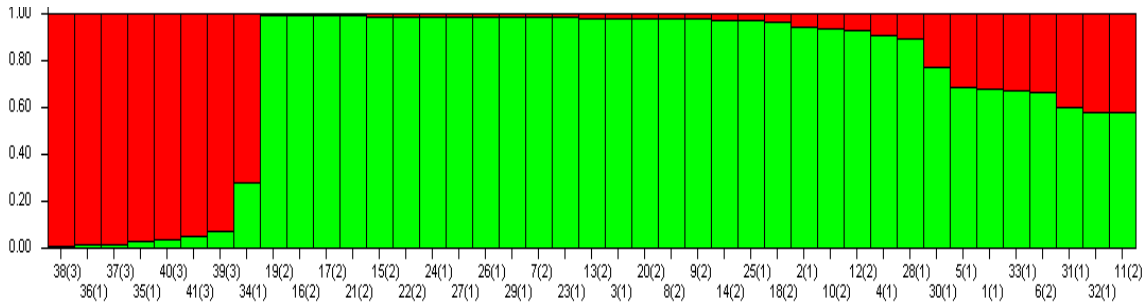
[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1397.10.26.16.9]
[DOI: 10.29252/jcb.10.26.65]

الگوی تنوع آللی 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 گروهای 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 به‌جزء 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، مربوط به نشانگرهای BRMS-024، BRAS041، sORF73 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 مضاعف‌شده 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 به‌نظر 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.



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: Karaj1، ۴: Ahmadi، ۵: Okapi، ۶: L938، ۷: L941، ۸: L942، ۹: L944، ۱۰: L945، ۱۱: L955، ۱۲: L957، ۱۳: L963، ۱۴: L969، ۱۵: L996، ۱۶: L1003، ۱۷: L1008، ۱۸: L1009، ۱۹: L1010، ۲۰: L1011، ۲۱: L1012، ۲۲: L1013، ۲۳: Lilian، ۲۴: Cooper، ۲۵: Adriana، ۲۶: Tassilo، ۲۷: Karun، ۲۸: Zarfam، ۲۹: Karaj2، ۳۰: Opera، ۳۱: Orient، ۳۲: Sarigol، ۳۳: Licord، ۳۴: Talaye، ۳۵: Hyola420، ۳۶: Hyola401، ۳۷: DH1، ۳۸: DH5، ۳۹: DH8، ۴۰: DH9، ۴۱: DH11

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1397.10.26.16.9]
[DOI: 10.29252/jcb.10.26.65]

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. Fakheri, 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 Π. 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 andJ. 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.
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.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1397.10.26.16.9]
[DOI: 10.29252/jcb.10.26.65]

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. Siahsar, 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. Ingvardsen, 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. Pakestanian 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.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1397.10.26.16.9]
[DOI: 10.29252/jcb.10.26.65]

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

Hassan Zali[1], Omid Sofalian[2], Mehrshad Zeinalabedini[3], Tahereh Hasanloo[4], Ali Asghari[2] and Bahram Alizadeh[5]

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

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1397.10.26.16.9]
[DOI: 10.29252/jcb.10.26.65]