دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

بررسی تنوع ژنتیکی لاین‌ها و ارقام زمستانه کلزا (*Brassica napus* L.) با استفاده از نشان‌گرهای مولکولی RAPD و SSR

حسن هدایتی مرزونی[1] و حبیب‌اله سمیع‌زاده لاهیجی[2]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه گیلان، (نویسنده مسوول: h.hedayati66@yahoo.com)
۲- دانشیار، دانشگاه گیلان

تاریخ دریافت: ۹۲/۴/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱/۳۱

چکیده

به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی و تعیین ارتباط ژنتیکی بین ۲۰ ژنوتیپ کلزای زمستانه از ۱۵ آغازگر RAPD و ۸ آغازگر SSR استفاده شد. از ۲۳ آغازگر مورد استفاده ۱۶۴ باند حاصل شد که ۱۵۴ باند آن چند شکل بودند. آغازگر Oligo-670 از نشان‌گر RAPD با ۱۶ باند بیشترین تعداد باند چند شکل را داشت. بالا بودن معیارهای تنوع ژنی نی، شاخص شانون و میزان PIC برای آغازگرهای Na12-B02، Ni4-B03، OL10-G04، Oligo-543 و Oligo-670 نشان‌دهنده کارایی بالای این آغازگرها در ارزیابی تنوع ژنتیکی در این تحقیق می‌باشد. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA با استفاده از ترکیب داده‌های نشان‌گرهای RAPD و SSR، ۲۰ ژنوتیپ مورد مطالعه را در ۵ گروه قرار داد، گروه‌ها به‌ترتیب شامل ۲، ۷، ۵، ۴ و ۲ ژنوتیپ بود. تجزیه تابع تشخیص به روش خطی فیشر نشان داد که روش UPGMA ژنوتیپ‌ها را با دقت ۷۰ درصد جداسازی کرد.

واژه‌های کلیدی: **تنوع ژنتیکی، کلزای زمستانه، نشان‌گرهای مولکولی، تجزیه خوشه‌ای، تجزیه تابع تشخیص**

مقدمه

کلزا یکی از مهم‌ترین گیاهان روغنی در جهان می‌باشد، که به‌عنوان منابع روغن گیاهی است که برای صنایع غذایی و تأمین پروتئین خوراک دام مورد استفاده قرار می‌گیرد. هم‌چنین، امروزه یک گیاه کلیدی برای تأمین ماده اولیه در صنعت بیودیزل (دیزل سبز) نیز در نظر گرفته می‌شود (۲۲). از طرفی، کشت و تولید با عملکرد بالای این گیاه به علت وجود دمای پایین در کشت‌های پاییزه و اوایل بهار با محدودیت همراه است. بنابراین شناسایی و گروه‌بندی ارقام مقاوم به سرما و استفاده از آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی و به‌نژادی در این گیاه از اهمیت بالایی برخوردار است (۶). موفقیت در برنامه‌های اصلاحی در گونه‌های زراعی ارتباط زیادی به وجود تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاسم و آگاهی در مورد ویژگی‌های ژنوتیپ‌ها و ارتباط ژنتیکی آن‌ها دارد (۱).

تکنیک‌های مختلفی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی گیاهان زراعی مانند اندازه‌گیری صفات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و نشان‌گرهای مولکولی وجود دارد. نشان‌گرهای مولکولی، به دلیل مزایای زیادی که نسبت به روش‌های دیگر (مستقل از محیط و مرحله رشد گیاه، تعداد نامحدود و غیره) دارند، از آن‌ها برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی استفاده می‌شود (۲۵). در سال‌های اخیر، نشان‌گرهای مولکولی زیادی بر اساس آگاهی بیشتری از ساختار ژنوم گسترش یافته‌اند، که اهمیت قابل توجهی در استفاده از نشان‌گرهای مولکولی در کارهای اصلاحی و شناسایی ژنوتیپ داشته است (۱۹). یکی از نشان‌گرهای مولکولی پرکاربرد در زمینه تنوع ژنتیکی، چندشکلی ناشی از تکثیر تصادفی DNA (RAPD) می‌باشد (۳۱). نشان‌گر RAPD به دلیل سادگی کار با آن و سریع بودن ابزار مناسبی برای ارزیابی روابط ژنتیکی و الگوی تنوع در میان ژرم‌پلاسم کلزا می‌باشد (۲۳،۱۶). نشان‌گرهای ریزماهواره یا توالی تکراری ساده (SSR) یکی دیگر از تکنیک‌های مبتنی بر PCR می‌باشد که به دلیل ماهیت هم‌بارزی، تکرارپذیری خوب، قوی بودن نشان‌گر و مقرون به صرفه بودن آن در مقایسه با دیگر نشان‌گرها مورد توجه قرار گرفته است (۱۵). این نشان‌گر به‌طور معمول برای شناسایی ژن‌ها و ارزیابی تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد، اما به رغم اهمیت این نشان‌گر، تعداد آغازگرهای SSR در دسترس برای گیاه کلزا محدود است (۱۳). نتایج نشان می‌دهد که نشان‌گر SSR می‌تواند برای غربال‌گری و گروه‌بندی‌ها مورد استفاده قرار گیرد (۳۲).

چارترز و همکاران (۱۲) نشان دادند که تعدادی از نشان‌گرهای ریزماهواره قادر هستند ژنوتیپ‌ها را بر اساس عادت رشدی بهاره و زمستانه، مقدار بالای گلوکوزینولات و مقدار پایین گلوکوزینولات و هم‌چنین بر اساس مناطق جغرافیایی از هم جدا کنند. کیو و همکاران (۲۶)

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-02-13]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.139]

با ارزیابی تنوع ژنتیکی میان لاین‌های خالص کلزا نشان دادند که نشان‌گر SSR قادر به جداسازی لاین‌ها بر اساس رنگ پوسته دانه است و رنگ پوسته یکی از مهم‌ترین صفات برای اصلاح بهبود کیفیت *B. napus* است.

مطالعات نشان دادند که تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های حاصل از نشان‌گرهای RAPD می‌تواند ژنوتیپ‌های کلزای بهاره و زمستانه را از هم جدا کند (۳۱،۲۳،۱۱). ما و همکاران (۲۱) تنوع ژنتیکی را در مجموعه‌ای از ۵۰ رقم کلزای استحصالی از چین، ژاپن، کره، کانادا و اروپا را با استفاده از نشان‌گرهای RAPD مورد تجزیه و تحلیل قرار دادند. تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی بر اساس ۱۸۱ باند چند شکل به دست آمده از ۲۱ آغازگر تصادفی، اکثرگونه‌های ژاپنی را در یک گروه قرار داد. رقم‌های ژاپنی و چینی با توجه به زمینه ژنتیکی مشابه از ژنوتیپ اروپایی جدا شدند. در میان ژنوتیپ‌های اروپایی، ارقام زمستانه از ارقام بهاره از هم جدا شدند. هو و همکاران (۱۷) تنوع ژنتیکی و روابط بین ژرم‌پلاسم را در یک مجموعه ۵۰ رقمی کلزا از چین، چک، آلمان، فرانسه و انگلستان با استفاده از نشان‌گرهای RAPDمورد مطالعه قرار دادند. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ۱۰ آغازگر تصادفی چند شکل، گونه‌ها را به سه گروه شامل گروه چینی، اروپایی و مخلوطی از گروه چینی و اروپایی جداسازی نمود. نتیجه تجزیه و تحلیل گروه‌بندی ارقام بر اساس تجزیه خوشه‌ای مطابق با اطلاعات شناخته شده و منشأ جغرافیایی ارقام بود. مقدم و همکاران (۲۳) با استفاده از ۳۸ آغازگر RAPD و ده جفت آغازگر SSR، ۳۲ رقم کلزا را مورد بررسی قرار دادند که ۲۵۰ باند چند شکل برای RAPD و ۱۴۳ آلل برای نشان‌گر SSR به دست آمد. تجزیه خوشه‌ای حاصل از این داده‌ها با روش نزدیک‌ترین همسایه‌ها، ارقام زمستانه را از ارقام بهاره جدا کرد، که نشان‌دهنده تفاوت در زمینه ژنتیکی ارقام بهاره و زمستانه کلزا است. هدف از این تحقیق استفاده از نشان‌گرهای SSR و RAPD پیوسته با مقاومت به سرما برای مطالعه تنوع ژنتیکی بین ۲۰ رقم زمستانه کلزا و تعیین کارایی این نشان‌گرها است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی در این تحقیق شامل ۲۰ ژنوتیپ زمستانه (مقاوم به سرما) کلزا (جدول ۱) که از مؤسسه تحقیقات نهال و بذر کرج تهیه شد. بذرهای هر ژنوتیپ در گلدان‌های پلاستیکی کشت شده، سپس در گلخانه، با دوره روشنایی ۱۰/۱۴ ساعت (روز/ شب) و دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در روز و ۱۵-۱۲ درجه سانتی‌گراد در شب به مدت ۴ هفته نگهداری شدند.

جدول ۱- اسامی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه کلزا

ردیف	نام ژنوتیپ	ردیف	نام ژنوتیپ	ردیف	نام ژنوتیپ	ردیف	نام ژنوتیپ
۱	Eldo	۶	Olpop	۱۱	Nk.karabik	۱۶	Nk.Oktans
۲	Licord	۷	Okapi	۱۲	Cooper	۱۷	ES.Betty
۳	SLM-046	۸	Lilian	۱۳	Zarfam	۱۸	Billy
۴	Adriana	۹	Na.Aviator	۱۴	Lioness	۱۹	Tassillo
۵	Savannah	۱۰	Karun	۱۵	RNX	۲۰	GKH.Olivia

استخراج DNA

به‌منظور استخراج DNA، زمانی که بوته‌ها به مرحله ۸-۶ برگی رسیدند، از برگ‌های جوان هر گیاه نمونه برگی برداشته، بلافاصله در ازت مایع قرارداده و تا انجام مراحل بعدی به فریزر ۸۰- منتقل شدند. جهت استخراج DNA از روش CTAB استفاده شد (۲۸). برای تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده، از ژل آگارز یک درصد و دستگاه اسپکتروفوتومتر (Eppendorf Biophotometra Plus) استفاده شد و پس از تعیین غلظت DNA نمونه‌ها، جهت انجام PCR ، غلظت به ۵۰ نانوگرم تعدیل شد.

ارزیابی ژنتیکی

در این تحقیق از ۸ جفت آغازگر SSR و ۱۵ آغازگر RAPD مطالعه شده توسط اصغری و همکاران (۷،۵) برای ارزیابی تنوع بین ارقام زمستانه استفاده شده است. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای نشان‌گر SSR با حجم کلی ۱۰ میکرولیتر شامل ۵۰ نانوگرم DNA الگو، ۳ میلی‌مولار $MgCl_2$، یک میلی‌مولار dNTP، ۰/۴ میکرومولار برای هر آغازگر، یک واحد آنزیم Taq و بافر ۱x انجام شد. برنامه حرارتی در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به‌صورت ۳ دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ چرخه به‌صورت یک دقیقه واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، یک دقیقه مرحله اتصال آغازگر در دمای TM (۶۵- ۵۵ درجه سانتی‌گراد)، ۲ دقیقه مرحله بسط در دمای۷۲ درجه سانتی‌گراد و ۵ دقیقه بسط انتهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. محصول PCR با ژل آگارز ۳ درصد و با رنگ‌آمیزی اتیدیوم‌بروماید آشکارسازی شد.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-02-13]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.139]

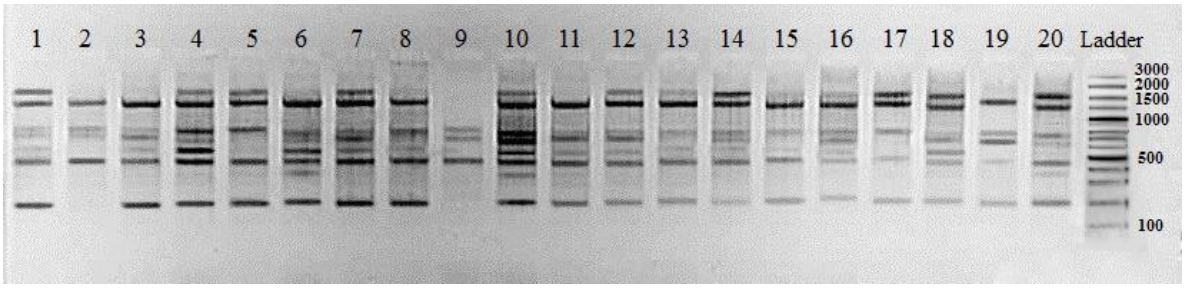
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای نشان‌گر RAPD با حجم کلی ۱۵ میکرولیتر شامل ۵۰ نانوگرم DNA الگو، ۲ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۲ میلی‌مولارdNTP، ۰/۳ میکرومولار برای هر آغازگر، یک واحد آنزیم Taq و بافر ۱x انجام شد. برنامه حرارتی به‌صورت ۳ دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ چرخه به‌صورت یک دقیقه واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، یک دقیقه مرحله اتصال آغازگر در دمای TM (بسته به دمای هر آغازگر)، ۲ دقیقه مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و ۵ دقیقه بسط انتهایی در دمای ۷۲ می‌باشد. محصول PCR با ژل آگارز ۲ درصد و با رنگ‌آمیزی اتیدیوم‌بروماید آشکارسازی شد. الگوی نواری بر اساس وجود (یک) و عدم وجود (صفر) نوارها نمره‌دهی شدند (شکل ۱).

در این تحقیق رسم دندوگرام با استفاده از نرم‌افزار NTSYS 2.02e، تجزیه تابع تشخیص و تجزیه به مختصات اصلی به‌ترتیب با استفاده از نرم‌افزار SPSS 21.0 و GENSTAT 12.1 و تعیین تنوع ژنی نی و شاخص شانون با استفاده از نرم‌افزار POPGENE 1.31 انجام شد. تعداد آلل‌های مؤثر از فرمول (۱) با استفاده از نرم‌افزار POPGENE 1.31 و مقدار PIC از فرمول (۲) برای آغازگر RAPD و برای آغازگر SSR از فرمول (۳) با نرم‌افزار Excel محاسبه شد.

۱) $A_e = ne = \frac{1}{1-H}$ در این فرمول H تنوع ژنی نی می‌باشد (۱۴).

۲) $PIC = 2f_i(1-f_i)$ که در این رابطه f_i، فراوانی آلل‌های تکثیر شده (باندها) می‌باشد (۲۹).

۳) $PIC = 1 - \sum_{i=1}^{n} p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^{n} 2p_i^2 p_j^2$ که در این رابطه Pi فراوانی آلل iام، pj فراوانی آلل jام و n تعداد آلل‌هاست (۱۰).



شکل ۱- الگوی باندی RAPD حاصل از تکثیر تصادفی ۲۰ ژنوتیپ کلزا با استفاده از آغازگر Oligo-430.

نتایج وبحث

در این پژوهش با استفاده از ۲۳ آغازگر RAPD و SSR در مجموع ۱۶۴ باند ایجاد شد که ۱۴۴ باند به وسیله‌ی ۱۵ آغازگر RAPD و ۲۰ باند توسط ۸ آغازگر SSR ایجاد شد. از کل باندهای به دست آمده، ۱۵۴ باند چند شکل ایجاد شد که ۱۳۴ باند مربوط به آغازگرهای RAPD بود (به‌طور میانگین ۹/۵). میانگین تعداد باندهای گزارش شده برای آغازگر RAPD در بررسی‌های انجام شده روی ژنوم کلزا از ۲/۵ تا ۱۳/۴ متغیر بود (۳۱،۲۳،۹،۵،۱). آغازگر Oligo-670 با تعداد ۱۶ باند و بعد از آن، آغازگرهای Oligo-463 و Oligo-536 با تعداد ۱۴ باند، Oligo-474 و Oligo-597 با ۱۳ باند، بیش‌ترین تعداد باند و آغازگر Oligo-535 با تعداد ۴ باند کمترین تعداد باند چند شکل را در بین آغازگرهای RAPD داشتند. آغازگرهای Na14-E11، Na12-G04، Na12-A08 و Na10-B08 در بین آغازگرهای SSR، با سه باند و بقیه آغازگرها دارای ۲ باند بودند (جدول ۲). تعداد باند زیاد برای هر آغازگر نشان‌دهنده تنوع ژنتیکی بیشتر آن آغازگر در میان ژنوتیپ‌های مورد مطالعه است (۲). نشان‌گرهایی که تعداد باند چند شکل بالاتری دارند در مطالعه تنوع ژنتیکی دارای کارایی بیشتری هستند (۲۷). درصد چندشکلی به دست آمده از ۷۷/۷۷ درصد برای آغازگر Oligo-430 تا ۱۰۰ درصد در آغازگرهای RAPD متغیر بود (جدول ۲). اما آغازگر Oligo-455 در این مطالعه بین ارقام زمستانه هیچ چندشکلی نشان نداد، در صورتی که در مطالعات انجام شده بر روی ارقام بهاره و زمستانه چندشکلی قابل توجهی نشان داده بود (۸). از طرفی درصد چندشکلی در تمامی آغازگرهای SSR، ۱۰۰ درصد به دست آمد. میانگین درصد چندشکلی در این تحقیق برای آغازگرهای RAPD، ۹۴ درصد به دست آمده، که نشان دهنده وجود تنوع بین ژنوتیپ‌هاست.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-02-13]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.139]

جدول ۲- آغازگرهای مورد استفاده، تعداد باند، تعداد باندهای چندشکل، درصد چندشکلی و توالی آن‌ها

نوع نشان‌گر	نام نشان‌گر	تعداد باند	تعداد باند چندشکل	درصد چندشکلی	توالی	
RAPD	Oligo-608	۶	۵	۸۳/۳۳	5′-GAG CCC GAA A -3′	
	Oligo-650	۱۰	۱۰	۱۰۰	5′-AGT ATG CAG C-3′	
	Oligo-430	۹	۷	۷۷/۷۷	5′-ATG CGG CAC C-3′	
	Oligo-543	۸	۸	۱۰۰	5′-CGC TTC GGG T -3′	
	Oligo-528	۸	۸	۱۰۰	5′-GGA TCT ATG C -3′	
	Oligo-463	۱۴	۱۱	۷۸/۵۷	5′-AGG CGG AAG C -3′	
	Oligo-535	۴	۴	۱۰۰	5′-CCA CCA ACA G -3′	
	Oligo-474	۱۳	۱۱	۸۴/۶۱	5′-AGG CGG GAA C -3′	
	Oligo-536	۱۴	۱۳	۹۲/۸۵	5′-GCC CCT CGT C-3′	
	Oligo-670	۱۶	۱۶	۱۰۰	5′-CCC TTG AGA C-3′	
	Oligo-547	۷	۷	۱۰۰	5′-TAT GAC CTG G -3′	
	Oligo-505	۱۱	۱۱	۱۰۰	5′-CCC TTT ACA C -3′	
	Oligo-597	۱۳	۱۳	۱۰۰	5′-TGG TTC CCG A -3′	
	Oligo-417	۱۰	۱۰	۱۰۰	5′-GAC AGG CCA A -3′	
	Oligo-455	۱	۰	–	5′- AGC AAG CCG G -3′	
SSR	Na12-D08	۲	۲	۱۰۰	F 5′-ACG ACG ATT CAA CTC ATC TTC -3′	
					R 5′-TTA ACC AAC TTC GCT TTT TG -3′	
	Na14-E11	۳	۳	۱۰۰	F 5′-TCA TCC TTC TCA CAC CAA AAT C -3′	
					R 5′-CCT CGA AAT AGC TCC AAC CC -3′	
	Na12-G04	۳	۳	۱۰۰	F 5′-CGA ATT GAA GGA TGA GTT TGG -3′	
					R 5′-CACATGTTTTATCATTCACAAGTCC-3′	
	Na12-A08	۳	۳	۱۰۰	F 5′-AAC ACT TGC AAC TTC ATT TTC C -3′	
					R 5′-CAT TGG TTG GTG AAT TGA CAG -3′	
	Na10-B08	۳	۳	۱۰۰	F 5′-AGA GAA AAA CAC TTC CCG CC -3′	
					R 5′-GTG AGC TTT GCG AAA CAC G -3′	
	Na12-B02	۲	۲	۱۰۰	F 5′-CGCGTTGTAACTCCAAGACC -3′	
					R 5′-TTTTCTAAATCATCCACTGTATCC -3′	
	OL10-G04	۲	۲	۱۰۰	F 5′-GACAAGTTCCCTTGTAATGGC -3′	
					R 5′- TGTAATCATCACACATTTTGGG-3′	
	Ni4-B03	۲	۲	۱۰۰	F 5′-ACTTTCTTTACATTCTAATCGC -3	
					R 5′-GCTGTTTCTGTGGAATTGTCG -3′	

محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) یکی از معیارهای مهم نشان‌گرهای مولکولی در نظر گرفته شده و می‌تواند برای ارزیابی توانایی نشان‌گرها در نشان دادن تفاوت‌ها استفاده شود (۱۸). میزان PIC بین ۰/۱۷ تا ۰/۵۴ بود. بالاترین میزان PIC از نشان‌گر SSR به‌ترتیب در آغازگر Na14-E11 و Na12-G04، Na12-B02 و Ni4-B03 به میزان ۰/۵۴ و ۰/۳۷ بود، که بیان‌گر کارایی بالای این آغازگرها در تمایز ژنوتیپ‌ها می‌باشد. از بین نشان‌گرهای RAPD آغازگرهای Oligo-417، Oligo-543، Oligo-670 و Oligo-536 به میزان ۰/۴۳، ۰/۳۹ و ۰/۳۸ بیشترین میزان PIC را دارند. میانگین PIC برای آغازگرهای SSR و RAPD به‌ترتیب ۰/۳۷ و ۰/۳۴ بود. در جدول ۳ مهم‌ترین شاخص‌های ارزیابی تنوع در بین ژنوتیپ‌ها آورده شده است. تعداد آلل‌های مؤثر در بین آغازگرهای RAPD به طور تقریبی مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین مقدار مربوط به آغازگر Oligo-535، Oligo-543 و Oligo-528 با مقدار تقریبی ۱/۸۷، ۱/۸۵ و ۱/۸۳ بود. از بین آغازگرهای SSR آغازگرهای Na12-B02، OL10-G04 و Ni4-B03 با مقدار ۱/۷۰ بیشترین مقدار را داشتند. میانگین تعداد آلل‌های مؤثر در کل جمعیت ۱/۶۱ به دست آمد و از ۱/۴۱ تا ۱/۸۷ متغیر بود. یکی از شاخص‌های مهم دیگر برای ارزیابی تنوع ژنی در بین ژنوتیپ‌ها، شاخص تنوع ژنی نی می‌باشد (۲۴). از بین نشان‌گرهای SSR بیشترین میزان تنوع ژنی نی به‌ترتیب مربوط به آغازگرهای Na12-B02، Ni4-B03، OL10-G04 و Na12-D08 به‌ترتیب با مقدار ۰/۴۱، ۰/۴۰ و ۰/۳۶ و از بین نشان‌گرهای RAPD، آغازگرهای Oligo-535، Oligo-528، Oligo-543 و Oligo-670 به‌ترتیب با مقدار ۰/۴۶، ۰/۴۵ و ۰/۴۳ بیشترین مقدار تنوع ژنی را داشتند. میانگین تنوع ژنی برای نشان‌گرهای SSR و RAPD به‌ترتیب ۰/۳۴ و ۰/۳۶است. از شاخص‌هایی که بیان‌گر میزان چندشکلی در بین ژنوتیپ‌ها می‌باشد، شاخص شانون است (۳۰). میانگین شاخص شانون برای نشان‌گرهای SSR و RAPD مورد مطالعه به‌ترتیب ۰/۵۲و ۰/۵۳ است. آغازگرهای

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-02-13]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.139]

Oligo-535، Na12-B02 و Ni4-B03 بیشترین مقدار این شاخص را دارند. این آغازگرها تنوع ژنتیکی درون جمعیتی را بهتر توجیه می‌کنند. اطلاعات حاصل از باندها برای انجام گروه‌بندی و تجزیه تابع تشخیص به ماتریسی از اعداد شامل یک (حضور باند) و صفر (عدم حضور باند) تبدیل شدند. جهت گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها ابتدا تفاوت و مشابهت‌های ارقام بر اساس روش تطابق ساده، جاکارد و دایس انجام گرفته و گروه‌بندی ارقام با استفاده از روش‌های مختلف حداقل واریانس وارد، دورترین همسایه‌ها، UPGMA، متوسط فاصله بین و درون کلاسترها، مرکزی، میان‌های و نزدیک‌ترین همسایه‌ها رسم شد. در نهایت مشخص شد گروه‌بندی بر اساس روش UPGMA و ضریب تطابق ساده با ضریب کوفنتیک ۰/۶۳ بهترین روش مورد بررسی می‌باشد و با ترسیم خط برش، در ناحیه ۰/۶۱، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در ۵ گروه قرار گرفتند (شکل ۲). گروه‌ها به‌ترتیب شامل ۲، ۷، ۵، ۴ و ۲ ژنوتیپ هستند.

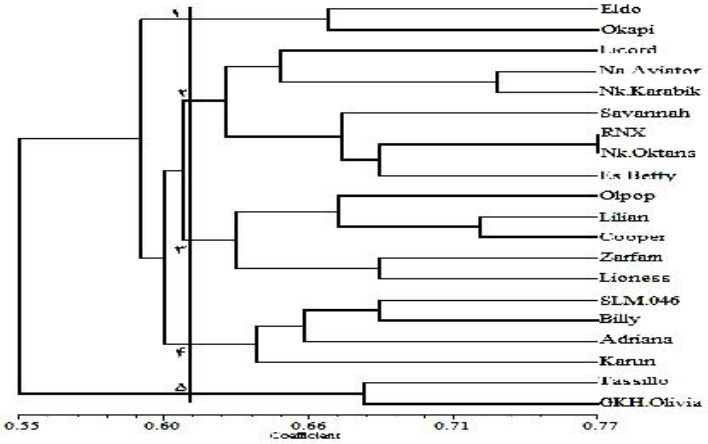
جدول ۳- تعداد آلل مؤثر، تنوع ژنی نی، شاخص شانون و محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) مربوط به نشان‌گرهای SSR و RAPD مورد مطالعه

ردیف	نوع آغازگر	نام آغازگر	تعداد آلل موثر	تنوع ژنی نی	شاخص شانون	PIC
۱		Na12-D08	۱/۶۵	۰/۳۶	۰/۵۴	۰/۳۰
۲		Na14-E11	۱/۴۱	۰/۲۷	۰/۴۴	۰/۵۴
۳		Na12-G04	۱/۴۳	۰/۲۹	۰/۴۶	۰/۵۴
۴	SSR	Na12-A08	۱/۴۲	۰/۲۶	۰/۴۲	۰/۱۷
۵		Na10-B08	۱/۶۷	۰/۳۵	۰/۵۲	۰/۳۶
۶		Na12-B02	۱/۷۰	۰/۴۱	۰/۶۰	۰/۳۷
۷		OL10-G04	۱/۷۰	۰/۴۰	۰/۵۹	۰/۳۶
۸		Ni4-B03	۱/۷۰	۰/۴۱	۰/۶۰	۰/۳۷
میانگین			۱/۵۸	۰/۳۴	۰/۵۲	۰/۳۷
۹		Oligo-608	۱/۵۹	۰/۳۱	۰/۴۵	۰/۲۹
۱۰		Oligo-650	۱/۶۲	۰/۳۴	۰/۵۱	۰/۳۷
۱۱		Oligo-430	۱/۵۷	۰/۳۱	۰/۴۵	۰/۲۸
۱۲		Oligo-543	۱/۸۵	۰/۴۵	۰/۶۴	۰/۳۹
۱۳		Oligo-528	۱/۸۳	۰/۴۵	۰/۶۴	۰/۳۷
۱۴		Oligo-463	۱/۴۸	۰/۲۷	۰/۴۰	۰/۲۸
۱۵	RAPD	Oligo-535	۱/۸۷	۰/۴۶	۰/۶۵	۰/۳۴
۱۶		Oligo-474	۱/۵۰	۰/۳۰	۰/۴۵	۰/۳۵
۱۷		Oligo-536	۱/۵۳	۰/۳۲	۰/۴۸	۰/۳۸
۱۸		Oligo-670	۱/۷۹	۰/۴۳	۰/۶۲	۰/۳۸
۱۹		Oligo-547	۱/۷۸	۰/۴۲	۰/۶۱	۰/۳۴
۲۰		Oligo-505	۱/۴۲	۰/۲۷	۰/۴۳	۰/۳۰
۲۱		Oligo-597	۱/۷۲	۰/۴۱	۰/۵۹	۰/۳۵
۲۲		Oligo-417	۱/۶۸	۰/۳۹	۰/۵۸	۰/۴۳
میانگین			۱/۶۵	۰/۳۶	۰/۵۳	۰/۳۴

برای آزمون صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای و برآورد میزان انتساب اشتباه ارقام به گروه‌ها از تجزیه تابع تشخیص استفاده شد. به این ترتیب که گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای و ژنوتیپ‌های موجود در هر گروه به‌عنوان گروه‌بندی اولیه در نظر گرفته شد و با استفاده از تجزیه تابع تشخیص به روش خطی فیشر، صحت گروه‌بندی اولیه مورد آزمون قرار گرفت. این روش نشان داد که دقت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای در انتساب افراد به گروه‌های واقعی ۷۰ درصد بوده است. از این‌رو، می‌توان نتیجه گرفت که تجزیه تابع تشخیص تقسیم ژنوتیپ‌ها را در پنج گروه تأیید می‌کند. آزمایشات نشان دادند که گروه‌بندی بر اساس ترکیب داده‌های حاصل از نشان‌گرهای SSR و RAPD نتیجه مطلوب‌تری می‌دهد (۲۳). داده‌های هر گروه از نشان‌گرها به تنهایی نمی‌تواند توجیه درستی از گروه‌بندی داشته باشد، بنابراین شاید تعداد کم آغازگرها به خصوص SSR مورد استفاده در این مطالعه می‌تواند دلیل توجیه نامناسب از گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه باشد. ژانگ و همکاران (۳۴) نشان دادند حداقل ۴۰۰-۳۰۰ آلل SSR برای گروه‌بندی مناسب ژنوتیپ‌ها نیاز است. آن‌ها اظهار داشتند که تعداد آلل اهمیت بیشتری نسبت به تعداد نشان‌گر برای گروه‌بندی مواد گیاهی دارند.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-02-13]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.139]



شکل ۲- دندروگرام روابط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها با ضریب تشابه ساده به روش UPGMA با استفاده از آغازگرهای RAPD و SSR.

تجزیه به مختصات اصلی در بیان تنوع ژنتیکی بر اساس صفات کیفی کاربرد زیادی دارد و با استفاده از آن می‌توان الگوهای تنوع را به صورت چند بعدی نشان داد و اجازه تفسیر بیشتری در مورد ارتباط بین افراد را فراهم کرد (۲۰). در بررسی تنوع ژنتیکی از طریق داده‌های مولکولی، باید نشان‌گرها توزیع یکنواخت و مناسب در سطح ژنوم داشته باشند، تا بتوانند کل ژنوم را تا حدودی پوشش دهند. بنابراین اگر نشان‌گر از بخش‌های مختلف ژنوم انتخاب شده باشد، همبستگی بین آن‌ها کم خواهد بود و در نتیجه تعداد بیشتری مؤلفه برای توجیه تغییرات کل آن‌ها لازم است (۳). میزان واریانس نسبی هر بردار نشان‌دهنده اهمیت آن مؤلفه در واریانس کل است و به صورت درصد بیان می‌شود. در این بررسی ۱۲ بردار اول توانستند ۸۲ درصد از واریانس کل را توجیه کنند (جدول ۴). دو بردار اول مجموعاً ۲۱/۵۱ درصد از واریانس کل را توجیه نمودند که سهم بردار اول ۱۱/۱۳ درصد و سهم بردار دوم ۱۰/۳۸ درصد بود که این نشان‌دهنده نمونه-برداری مطلوب نشان‌گرها از کل ژنوم می‌باشد.

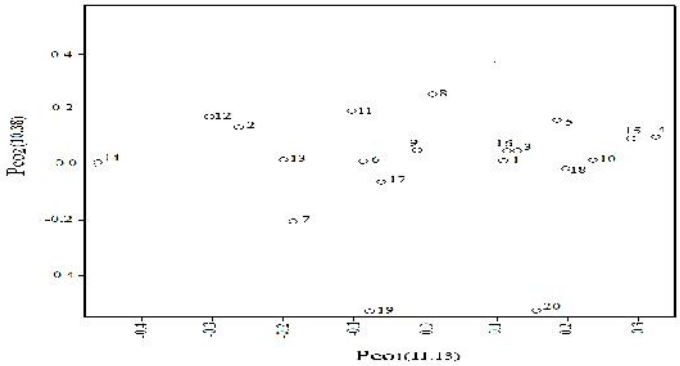
جدول ۴- درصد واریانس و درصد تجمعی برای ۱۲ مؤلفه اول

بردار	ریشه مشخصه	سهم واریانس توجیه شده	سهم تجمعی واریانس توجیه شده
۱	۰/۸۵	۱۱/۱۳	۱۱/۱۳
۲	۰/۷۹	۱۰/۳۸	۲۱/۵۱
۳	۰/۶۷	۸/۷۵	۳۰/۲۶
۴	۰/۶۳	۸/۲۱	۳۸/۴۷
۵	۰/۵۷	۷/۵۰	۴۵/۹۷
۶	۰/۵۱	۶/۷۱	۵۲/۶۸
۷	۰/۴۵	۵/۹۱	۵۸/۵۹
۸	۰/۴۲	۵/۵۷	۶۴/۱۶
۹	۰/۳۸	۴/۹۸	۶۹/۱۴
۱۰	۰/۳۴	۴/۴۶	۷۳/۶
۱۱	۰/۳۳	۴/۳۹	۷۷/۹۹
۱۲	۰/۳۱	۴/۰۶	۸۲/۰۵

بر اساس دو بردار مختصات اصلی نمودار الگوی تنوع میان ژنوتیپ‌ها رسم شد (شکل ۳). در نمودار الگوی تنوع اکثر ارقامی که در یک نقطه متمرکز شده‌اند، در یک گروه قرار گرفته‌اند. گریک و همکاران (۱۶) با تجزیه به مختصات اصلی نشان دادند که، دو بردار اول ۱۷ درصد از کل تنوع مشاهده شده را توجیه می‌کند و سهم بردار اول و دوم به ترتیب ۱۰/۲ و ۶/۸ درصد بود.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-02-13]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.139]



شکل ۳- الگوی تنوع ۲۰ ژنوتیپ کلزای مورد مطالعه بر اساس اولین و دومین مؤلفه اصلی.

بالا بودن معیارهای تنوع‌ژنی نی، شاخص شانون و میزان PIC برای آغازگرهای Na12-B02، Ni4-B03 و OL10-G04 از نشان‌گر SSR و آغازگرهای Oligo-543 و Oligo-670 از نشان‌گرهای RAPD نشان‌دهنده کارایی بالای این آغازگرها در این تحقیق می‌باشد و می‌توان از این آغازگرها برای گروه‌بندی و جداسازی ارقام استفاده کرد. نتایج حاصل از تجزیه به مختصات اصلی نشان داد که تعداد مؤلفه‌های زیادی بیان‌گر درصد کمی از تغییرات کل می‌باشند، در نتیجه این آغازگرها ناحیه کروموزومی بیشتری را تحت پوشش قرار دادند و نشان‌گرهای SSR و RAPD مورد مطالعه در قسمت‌های مختلف ژنوم پراکنده هستند که می‌تواند برای مطالعه تنوع مفید باشند.

از بررسی انجام شده برای گروه‌بندی و جداسازی لاین‌ها و ارقام زمستانه کلزای موجود چنین استنباط می‌گردد که تنوع ژنتیکی مناسب در آن‌ها وجود دارد، به‌طوری‌که با مطالعات بیشتر، شناسایی و معرفی ارقام با اختلاف ژنتیکی بالا می‌توان از آن‌ها مانند والد استفاده کرد و با بهره‌گیری از پدیده هتروزیس در هیبریدها در جهت افزایش مقاومت به این تنش و در نتیجه افزایش عملکرد اقدام نمود.

منابع

1. Abdelmigid, H. 2012. Efficiency of random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter-simple sequence repeats (ISSR) markers for genotype fingerprinting and genetic diversity studies in canola (*Brassica napus* L.). African Journal of Biotechnology, 11: 6409-6419.
2. Agrama, H.A. and M.R. Tuinstra. 2003. Phylogenetic diversity and relationships among sorghum accessions using SSRs and RAPDs. African Journal of Biotechnology, 2: 334-340.
3. Ahkami, A.M., M.R. Naghavi, M. Mardi, A. Hossienzadeh, M. pirsayedi, P. Petki, M. Kazemi Alamoti, I. Hashempour and M.A. Omidbakhsh. 2007. Study of genetic relatively in durum wheat (*Triticum durum*) using AFLP markers. Iran Journal Agriculture Science, 1: 25-35 (In Persian).
4. Ana, M.J., K.S. Ankica, S.P. Dejana, M. Radovan and H. Nikola. 2009. Phenotypic and molecular evaluation of genetic diversity of rapeseed (*Brassica napus* L.) genotypes. African Journal of Biotechnology, 8: 4835-4844.
5. Asghari, A., S.A. Mohammadi, M. Moghaddam and A.A. Shokuhian. 2008. Identification of SSR and RAPD markers associated with QTLs of winter survival and related traits in *Brassica napus* L. African Journal of Biotechnology, 7: 897-903 (In Persian).
6. Asghari, A., S.A. Mohammadi, M. Moghaddam, M. Toorchi and A. Dabagh-Mohammadi Nassab. 2005. Mapping of cold resistance genes in rapeseed (*Brassica napus* L.) using microsatellite markers. Iranian Journal of Crop Sciences, 7: 202-211 (In Persian).
7. Asghari, A., S.A. Mohammadi, M. Moghaddam, M. Toorchi and A.D. Mohammadi Nasab. 2008. Analysis of quantitative trait loci associated with freezing tolerance in rapeseed (*Brassica napus* L.). Biotechnol and Biotechnol, 548-552.
8. Asghari, A., S.A. Mohammadi, M. Moghaddam, M. Toorchi and H.R. Mohammaddoost. 2007. QTL analysis for cold resistance-related traits in *Brassica napus* using RAPD Markers. Journal of Food, Agriculture and Environment, 5: 188-192.
9. Asghari, A., M. Shokrpour, H. Mohammaddoust Chamanabad and O. Sofalian. 2011. Evaluating genetic diversity of canola cultivars using morphological traits and molecular markers. Romanian Biotechnological Letters, 16: 6305-6312.
10. Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics, 32: 314-331.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-02-13]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.139]

11. Chao-Zhi, M., F. Ting-Dong, S. Tuevesson and B. Gertsson. 2003. Genetic diversity of Chinese and Swedish rapeseed (*Brassica napus* L.) analyzed by Inter-Simple Sequence Repeats (ISSRs). Agricultural science, 2: 137-143.
12. Charters, Y.M., A. Robertson, M.J. Wilkinson and G. Ramsay. 1996. PCR analysis of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L. *Oleifera*) using 5′-anchored simple sequence repeat (SSR) primers. Theoretical and Applied Genetics, 92: 442-447.
13. Cheng, X., J. Xu, S. Xia, J. Gu, Y. Yang, J. Fu, X. Qian, S. Zhang, J. Wu and K. Liu. 2009. Development and genetic mapping of microsatellite markers from genome survey sequences in *Brassica napus*. Theoretical and Applied Genetics, 118: 1121-1131.
14. Crow, J.F and M. Kimura. 1964. The number of alleles that can be maintained in finit population. Genetics, 49: 725-738.
15. Farooq, S. and F. Azam. 2002. Molecular markers in plant breeding. II. Some pre-requisites for use. Pakistan J Biological Science, 5: 1141-1147.
16. Girke, A., A. Schierholt and H.C. Becker. 2012. Extending the rapeseed genepool with resynthesized *Brassica napus* L. I: Genetic diversity. Genetic Resources and Crop Evolution, 59: 1441-1447.
17. Hu, S., J. Ovesna, L. Kucera, V. Kucera and M. Vyvadilova. 2003. Evaluation of genetic diversity of *Brassica napus* germplasm from China and Europe assessed by RAPD markers. Plant Soil Environ, 49: 106-113.
18. Jaroslava, A., K. Polakova and L. Leisova. 2002. DNA analysis and their application in plant breeding. Czech Journal Genetics Plant Breeding, 38: 29-40.
19. Junjian, N., P.M. Colowit and D. Mackill. 2002. Evaluation of genetic diversity in rice subspecies by microsatellite markers. Crop Science, 42: 601-607.
20. Khayam Nekouei, M., R. Jahantighi, M. Solouki, R. Mohammadi and A.A. Emamjomeh. 2009. Study on genetic diversity of tall fescue (*Festuca arundinacea Schreb*.) genotypes using AFLP marker. Journal Agricultural Sciences and Natural Resource, 16 (Special issue 1-b) (In Persian).
21. Ma, C., Y. Kimura, H. Fujimoto, T. Sakai, J. Imamura, C.Z. Ma and T.D. Fu. 2000. Genetic diversity of Chinese and Japanese rapeseed (*Brassica napus* L.) varieties detected by RAPD markers. Breeding Science, 50: 257-265.
22. Mabel, J.M. and J.W. Kamundia. 2007. Cluster analysis in rapeseed (*Brassica napus* L.). African Journal of Agricultural Research, 2: 409-411.
23. Moghaddam, M., S.A. Mohammmadi, 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: 3160-3167 (In Persian).
24. Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. The American Naturalist, 106: 283-292.
25. Prasad, M., R.K. Varshney, J.K. Roy, H.S. Balyan and P.K. Gupta. 2000. The use of microsatellites for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat. Theoretical and Applied Genetics, 100: 584-592.
26. Qu, C., F. Fu, L. Liu, K. Lu, J. Huang, X. Liu, J. Xie, L. Chen, R. Wang, Z. Tan and J. Li. 2012. Simple sequence repeat (SSR) markers analysis of genetic diversity among Brassica napus inbred lines based on correlation between seed quality traits and seed pigments content. African Journal of Biotechnology, 11: 8202-8211.
27. Rahaei, M., B.A. Sayyed Tabatabiei, A.A. Shah Nejat Boshehri, S. Abde Mishani and M.A. Melbobi. 2004. Study of genetic diversity in canola (*Brassica napus* L.) using AFLP technique. Seed and Plant Journal, 19: 469- 481 (In Persian).
28. Saghai-Maroof, M.A., K. Soliman, R.A. Jorgensen and R.W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mandelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proceedings of the National Academy of Sciences, 81: 8014-8018.
29. Saxena, R. and A. Chandra. 2010. Isozyme, ISSR and RAPD profiling of genotypes in marvel grass (*Dichanthium annulatum*). Journal of Environmental Biology, 31: 883-890.
30. Shannon, C.E. 1948. A mathematiacal theory of communication. AT and TTechnical Journal, 27: 379-423.
31. Shiran, B., R. Azimkhani, M.R. Ahmadi and S. Mohammadi. 2004. Assessment of genetic diversity among rapeseed (*Brassica napus* L.) cultivars using random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Proceedings of the Fourth International Iran & Russia Conference. Moscow, Russia, pp: 20-25.
32. Tommasini, L., J. Batley, G.M. Arnold, R.J. Cooke, P. Donini, D. Lee, J.R. Law, C. Lowe, C. Moule, M. Trick and K.J. Edwards. 2003. The development of multiplex simple sequence repeats (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus* L.) varieties. Theoretical and Applied Genetics, 106: 1091-1101.
33. Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, 18: 6531-6536.
34. Zhang, X.Y., C.W. Li, L. Wang and H.M. Wang. 2002. An estimation of the minimum number of SSR alleles needed to reveal genetic relationships in wheat varieties. I: Information from large-scale planted varieties and cornerstone breeding parents in Chinese wheat improvement and production. Theoretical and Applied Genetics, 106: 112-117.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-02-13]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.139]

Genetic Diversity Assessment of Lines and Varieties in Winter Rapeseed (*Brassica napus* L.) using RAPD and SSR Molecular Markers

Hassan Hedayati Marzoni[1] and Habib Alah Samiezadeh lahiji[2]

1- M.Sc. Student, University of Guilan, (Corresponding author: h.hedayati66@yahoo.com)
2- Associate Professor, University of Guilan
Received: July 11, 2013 Accepted: April 20, 2014

Abstract

The eight SSR′s and 15 RAPD′s primers were used to investigate of genetic diversity and relationship between 20 winter rapeseed genotype. Totally 164 bands were detected from Which 154 were polymorphic. The RAPD primers namely Oligo-670 with 16 bands showed the highest number of detected bands. The mount of Nei′s, Shanon and PIC index for Na12-B02, Ni4-B03, OL10-G04, Oligo-543 and Oligo-670 indicated that theses SSR and RAPD markers could be used to assessment of genetic variation. The result of cluster analysis using UPGMA algorithms clustered 20 studied genotype in 5 distinct groups with 2, 7, 5, 4 and 2 genotype in respected group. Discriminant function analysis using the Fisher′s linear method showed that the UPGMA method separated the genotypes with 70 percent accuracy.

Keywords: Genetic diversity, Winter Rapeseed, Molecular Markers, Cluster Analysis, Discriminant Analysis

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2026-02-13]

[DOI: 10.18869/acadpub.jcb.8.17.139]