



بررسی تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ‌های کلزا با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

زهرا برزن^۱، مسعود دهداری^{۲*}، رضا امیری فهلیانی^۲

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج
^۲ دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج
^۳ استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۲۷، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۶/۲۳

چکیده

گیاهان دانه روغنی نظیر کلزا نقش مهمی در تولید روغن و انرژی مورد نیاز انسان دارند. اطلاع از وجود تنوع ژنتیکی بر پایه نشانگرهای گوناگون بخصوص نشانگرهای مولکولی در برنامه‌های به‌نژادی نقش کلیدی در طراحی برنامه‌های اصلاحی دارد. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی در ۲۴ ژنوتیپ کلزا، از ۱۰ جفت آغازگر ریزماهواره‌ای با توجه به مطالعات قبلی استفاده گردید. نتایج حاصل نشان داد که متوسط محتوای اطلاعات چند شکلی برای آغازگرهای مورد ارزیابی ۰/۵۵ بود و میانگین عدم خلوص مشاهده شده و مورد انتظار برای تمامی آغازگرها به ترتیب ۰/۳۵ و ۰/۴۱ محاسبه شد. بیشترین میزان شاخص شانون که نشان دهنده تنوع بین جمعیتی است، مربوط به مکان ژنی NA12-E09 به میزان ۱/۰۸۹۳ بود، درحالی که مکان‌های ژنی RA2-A11 و OL10-G06 دارای کمترین میزان شاخص شانون بودند. تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های مولکولی با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA، ارقام کلزا را در ۳ گروه اصلی قرار داد. بر این اساس، رقم CR3133 با منشأ کانادا در یک گروه جداگانه قرار گرفته است که نشان می‌دهد این رقم تشابه کمتری با دیگر ارقام دارد. به طور کلی نتایج این پژوهش حاکی از تنوع وسیع بین ژنوتیپ‌های کلزا بر اساس نشانگرهای ریزماهواره مورد استفاده بود که نشان می‌دهد می‌توان از آنها در برنامه‌های اصلاحی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: کلزا، تنوع ژنتیکی، نشانگر ریزماهواره.

مقدمه

ناهمگنی و عدم خلوص را به خوبی آشکار کنند (Teklu et al., 2007). از نشانگرهای مولکولی در گونه‌های براسیکا به منظور: الف) استفاده در اصلاح از طریق دورگ‌گیری، ب) شناسایی ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها، ج) مطالعه ژنتیک صفات کنترل‌کننده کیفیت دانه و کنجاله و د) شناسایی QTL های کنترل‌کننده صفات مورفولوژیک و مرتبط با عملکرد دانه استفاده شده است (Snowdon and Friedt, 2004). محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) به عنوان یکی از ویژگی‌های مهم نشانگرهای مولکولی در نظر گرفته شده و می‌تواند برای ارزیابی قدرت تمایز نشانگرها بکار رود (Junjian et al., 2002). برای ارزیابی وضعیت تنوع زیستی، از شاخص شانون استفاده می‌شود. شاخص شانون نشان‌دهنده میزان چند شکلی تمام آغازگرها در ارقام است (Sourour and Amara Hajer, 2009). مکان‌های ژنی که میزان شاخص تنوع شانون آن‌ها بالاتر باشد قادرند سطح تنوع بین ژنوتیپ‌ها را نشان دهند. در مطالعه‌ای ۵۴ آغازگر SSR در گیاه کلزا مورد استفاده قرار گرفت و ۱۲۲ نوار قابل نمره‌دهی مشاهده شد. تعداد ۷۷ نوار از این ۱۲۲ نوار، چند شکلی نشان دادند. درصد چند شکلی ۷۱/۰۸ بود که بیانگر تنوع ژنتیکی بالا در میان ژنوتیپ‌ها می‌باشد (Moghaddam et al., 2009). مقدار محتوای اطلاعات چندشکلی تابعی از تعداد فراوانی آلل‌هاست. دلیل بیشتر بودن این مقدار ممکن است به علت نرخ جهش کمتر در

دانه‌های روغنی و از جمله کلزا پس از غلات دومین ذخیره غذایی جهان را تشکیل می‌دهند. این محصولات علاوه بر دارا بودن ذخائر غنی اسید چرب، حاوی پروتئین نیز می‌باشند (Latifi et al., 2004). کلزا (*Brassica napus* L.) از تیره چلیپائی‌ان می‌باشد که یک گونه آمفی دیپلوئید طبیعی حاصل از تلاقی گونه شلغم روغنی (*B. rapa*) با کلم وحشی (*B. oleracea*) و دو برابر شدن کروموزوم‌های هیبرید حاصل می‌باشد (Shamsodin Saeed and Farahbakhsh, 2008). تجزیه و تحلیل مولکولی در سطح DNA روشی مناسب برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و اطلاع از خاستگاه اولیه گیاه می‌باشد (Chowdhury and Slinkard, 2000). شناخت و آگاهی از الگوهای تنوع شرایط لازم برای درک بهتر روابط تکاملی میان ژنوتیپ‌ها را فراهم می‌کند (Bretting and Widrechner, 1995). روش‌های متفاوتی برای بررسی تنوع در سطح DNA مانند چندشکلی ناشی از طول قطعات برش‌یافته (RFLP)، چند شکلی ناشی از طول قطعات تکثیر شده (AFLP)، رپید و ریزماهواره‌ها (SSR) وجود دارند. ریزماهواره‌ها شامل واحد های تکی، دوتایی، سه تایی، چهارتایی، پنج تایی و یا شش تایی تکرار شونده هستند که در ژنوم بیشتر یوکاریوت‌ها پراکنده‌اند. نشانگرهای SSR همباز بوده و جایگاه ویژه‌ای بر روی کروموزوم‌ها دارند و می‌توانند چند شکلی،

نتیجه‌گیری می‌شود که تنوع ژنتیکی هم در بین و هم در داخل گونه‌های براسیکا وجود دارد. همانگونه که مشاهده می‌شود نتایج اینگونه مطالعات بستگی به نوع ژنوتیپ و نشانگرهای مورد استفاده دارد. در حال حاضر ژنوتیپ‌های زیادی در سطح کشور و دنیا معرفی شده‌اند که اطلاعاتی از میزان تنوع ژنتیکی بین آنها وجود ندارد به همین دلیل این مطالعه با بکارگیری ژنوتیپ‌های مورد کشت و کار در ایران، ژنوتیپ‌های در حال معرفی و برخی ژنوتیپ‌های ارسالی از IPK^۲ طراحی گردید. در صورت وجود تنوع از این مواد گیاهی می‌توان در برنامه‌های آتی اصلاحی از آنها استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش ژنوتیپ‌های کلزا شامل: کبری، طلایه، اکاپی، CR3189، CR3133، CR679، CR3250، CR677، CR3248، CR3141، CR3189، CR3152، CR3195، CR3186، H1750، H4722، H4815، H6059، H6486، H9209، H6018، H609، Q6501، Oct06 و SWK5380 مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول ۱). ابتدا بذور با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به مدت ۵ دقیقه ضد عفونی و تعداد ۷ الی ۸ عدد بذر از هر ژنوتیپ در گلدان‌های کوچک کشت شدند. به منظور استخراج DNA در مرحله شش تا هشت برگگی نمونه برگگی برداشت شد. نمونه‌های برگگی پس از انجماد در ازت مایع به

توالی‌های تکراری دی نوکلئوتیدی باشد (Vigoruroux *et al.*, 2005). نتایج مشابهی نیز توسط برخی از محققان (Vaz Patto *et al.*, 2004; Agrama, and Tuinstra 2003) گزارش شده است. در مطالعه‌ای نشانگر Na12-E09 دارای بیشترین تعداد آلل و بالاترین PIC (۰/۹۱) بود (Moghaddam *et al.*, 2009). به‌علاوه آغازگر NA11-C12 کمترین تعداد نوار را تکثیر کرد. در حالی‌که آغازگر RA2-E11 دارای بیشترین تعداد نوار تکثیرشده^۱ بود. طبق همین گزارش آغازگر NA10E02 کمترین درصد چندشکلی را نشان داده (۳۰ درصد)، در حالی که نشانگرهای NA12C08، NA14C12، OL12E03، OL12F11 و RA2E03 بیشترین درصد چندشکلی را داشتند (Moghaddam *et al.*, 2009). این نتایج با یافته‌های Agrama and Tuinstra (2003) مطابقت داشت که نشان داد نشانگرهای SSR بسیار چندشکل هستند. درصد چندشکلی در آغازگر RAPD در گیاه کلزا ۱۴ درصد گزارش شده است (Roman, *et al.*, 2004). محققان دیگری میانگین تعداد آلل‌ها را به ازای هر مکان ژنی ۲ آلل گزارش کردند (Rudolph *et al.*, 2000). این گزارشات اطلاعاتی بدست آورد که برای مطالعات و تحقیقات آینده در جهت اثبات شایستگی آغازگرها برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و ارتباط بین گونه‌ای در مجموعه‌ی ژرم‌پلاسمی مفید واقع می‌شود. به طور کلی با توجه به این گزارش‌ها

^۲ . Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research

^۱ . Amplified

۹۴ درجه به مدت سی ثانیه، ۶۶-۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت سی ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و نهایتاً مرحله بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه انجام شد. محصول حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز (۱/۵ درصد) Top vision آشکار سازی شد. رنگ آمیزی ژل‌ها با اتیدیوم بروماید (1µg/ml) صورت گرفت. مرحله آخر عکس‌برداری از ژل با اشعه UV و توسط دستگاه ژل‌داک (Gel Logic QUANTUM ST4, Germany) صورت گرفت.

تجزیه آماری

به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها، عدم وجود و وجود نوار با اعداد صفر و یک و داده‌های گم شده (آل‌های تهی^۳) با عدد ۹ مشخص شدند (Askari *et al.*, 2001). تجزیه و تحلیل‌ها با استفاده از نرم افزار NTSYS PC 2.02 و Popgene32 صورت پذیرفت (Francis *et al.*, 1999). شاخص محتوای اطلاعات چند شکلی PIC با استفاده از فرمول $PIC = 1 - \sum P_i$ محاسبه شد (Botstein *et al.*, 1980). در این فرمول P_i فراوانی آلل i م در یک مکان مشخص میباشد. جهت مقایسه دندروگرام‌های به دست آمده از روش‌های مختلف از جمله ضریب همبستگی و ضریب کوفتیک استفاده گردید. این ضرایب نشان دادند که دندروگرام و ماتریس تشابه تا چه حد مشابه بودند و هر کدام که دارای بیشترین

فریزر ۲۰- درجه منتقل گردیدند و تا زمان استخراج DNA در این دما نگهداری شدند. استخراج DNA با استفاده از روش CTAB تغییر یافته انجام گرفت (Saghai-Marooft *et al.*, 1984). کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA با استفاده از روش اسپکتوفوتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ در صد تعیین شد (Asghari *et al.*, 2006). نمونه‌های DNA پس از تعیین غلظت، به غلظت ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شدند و DNAهای ژنومی با کیفیت مطلوب برای انجام واکنش‌های PCR مورد استفاده قرار گرفتند. تکثیر DNA ژنومی با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و با دستگاه ترموسایکلر PCR-MJ Mini-BIO (RAD, Germany) انجام شد برای ارزیابی تنوع ژنتیکی از ۱۰ جفت آغازگر ریز ماهواره با مشخصات موجود در جدول ۲ استفاده شد. این آغازگرها طبق مطالعات قبلی انتخاب و توسط شرکت Oligo-Macrogen مشهد، سنتز شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با اجزای ۵۰ نانوگرم DNA الگو، ۱/۵ میلی‌مول $MgCl_2$ ، ۰/۶۳ میلی‌مول dNTP، ۰/۶ میلی‌مول از هر آغازگرهای رفت^۱ و برگشت^۲، ۰/۳ میلی‌مول DNA Polymerase Taq (تهیه شده از شرکت سپاهان طب اصفهان) و بافر PCR 1x تهیه شده از شرکت سپاهان طب اصفهان، انجام شد. برنامه تکثیر به صورت ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه برای واسرشته سازی اولیه و به دنبال آن ۳۵ چرخه شامل سه مرحله:

^۱ . Forward Primer

^۲ . Backward Primer

^۳ . Null Allele

مقدار ضریب کوفتتیکمی بود جهت خوشه‌بندی
ژنوتیپ‌ها استفاده شد.

جدول ۱- فهرست ژنوتیپ‌های کلزای مورد استفاده.

Table 1- Description of rapeseed genotypes.

Collection rejoin	محل جمع‌آوری	Origin منشأ	ژنوتیپ Genotype	No. ردیف
IPK		Canada	CR3198	1
IPK		Canada	CR3133(Nugget)	2
IPK		Germany	CR679(Kroko)	3
IPK		Poland	CR3250	4
IPK		Germany	CR677(Kosa)	5
IPK		Pakistan	CR3248	6
IPK		Canada	CR3141(Golden)	7
IPK		Romania	CR3189	8
IPK		Canada	CR3152(Regent)	9
IPK		Australia	CR3195(Marnoo)	10
IPK		Germany	CR3186(Callypso)	11
Iran		---	H1750J	12
Iran		---	H4722	13
Iran		---	H4815	14
Iran		---	H6059	15
Iran		---	H6486	16
Iran		---	K9209	17
Iran		---	W6018	18
Iran		---	H609	19
Iran		---	Q6501	20
Iran		---	SWK5380	21
Iran		---	Okapi	22
Iran		---	Talaei	23
Iran		---	Tasillo	24

جدول ۲- توالی های رفت و برگشت ده جفت آغازگر ریزماهواره مورد استفاده.

Table 2- Backward and forward sequences of the 10 studied SSR markers.

نام آغازگر Primers	توالی آغازگر رفت Forward sequences	توالی آغازگر برگشت Forward sequences
Na10-B08	AGAGAAAAACACTTCCCGCC	GTGAGCTTTGCGAAACACG
Na12-C08	GCAAACGATTTGTTTACCCG	CGTGTAGGGTGATCTAGATGGG
Na12-E09	CATGAGAACAAGATGGGTTCG	CTGAAACTTGAGCAAAGCCC
Na14-C12	CACATTTTGGTTCAATTCGG	TACGACGCTGGTTTCGATTC
O110-G06	GACAAGTTCCCTTGTAAATGGC	TGTAATCATCACACATTTTGGG
Ra2-A11	GACCTATTTTAATATGCTGTTT	ACCTCACCGGAGAGAAATCC
Ra2-D04	TGGATTCTCTTTACACACGCC	CAAACCAAATGTGTGAAGCC
Ra2-E07	ATTGCTGAGATTGGCTCAGG	CCTACACTTGCATCTTCACC
Ra2-D04	TGGATTCTCTTTACACACGCC	CAAACCAAATGTGTGAAGCC
Ra2-E11	GGAGCCAGGAGAGAAGAAGG	CCCAAACCTTCCAAGAAAAGC

۲۱ نوار تولید کردند که ۸۰ درصد نوارها چندشکلی نشان دادند. این نتایج تا حدودی مشابه نتایج (Kimura et al(2000) بود، به طوریکه این محققان از بین ۲۱ آغازگر اختصاصی، ۱۸ باند چندشکل مشاهده کردند. در جدول ۳ انواع شاخص ها و اطلاعات بدست آمده از تجزیه مشاهدات مربوط به نشانگرها آورده شده اند. تعداد آلل ها در هر جایگاه ژنی از ۱ تا ۴ آلل با میانگین ۲/۲ آلل متغیر بود. حداقل تعداد آلل مشاهده شده مربوط به مکان های ژنی OL10- G06 و RA2-A11 (یک آلل) و حداکثر تعداد آلل مشاهده شده مربوط به مکان ژنی Na10-B08 (۴ آلل) بود. تعداد آلل های موثر در مکانهای ژنی در محدوده ۱ تا ۲/۹۴ با میانگین ۱/۹ بود. تعداد آلل موثر در نشانگر NA12-E09 بیشتر از سایر نشانگرها بود که احتمالاً نشان دهنده وجود تنوع بیشتر در این نشانگر است. از ۱۰ مکان ژنی تکثیر شده بیشترین میزان عدم خلوص مشاهده شده

به منظور گروه بندی ارقام براساس داده های SSR، با استفاده از نرم افزار NTSYS V.PC 2/02 ابتدا ضریب تشابه دایس، جاکارد و تطابق ساده برای ارقام مورد مطالعه محاسبه گردید، بعد از آن با مقایسه ضریب تشابه هر سه ماتریس با ضریب کوفتتیک مربوطه، ضریب تشابه جاکارد (ضریب ۰/۷۵) و روش^۱ UPGMA به عنوان مناسب ترین روش برای ترسیم دندروگرام انتخاب گردید.

نتایج و بحث

با بررسی تعداد نوارهای چند شکل، ۱۰ جفت آغازگر SSR مطلوب شناسایی و برای کلیه نمونه ها مورد استفاده قرار گرفتند. الگوهای نواری آغازگر RA2-E07 در برخی از ژنوتیپ های مورد مطالعه در شکل ۱ نشان داده شده است. آغازگرهای مورد استفاده در مجموع

¹ . Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

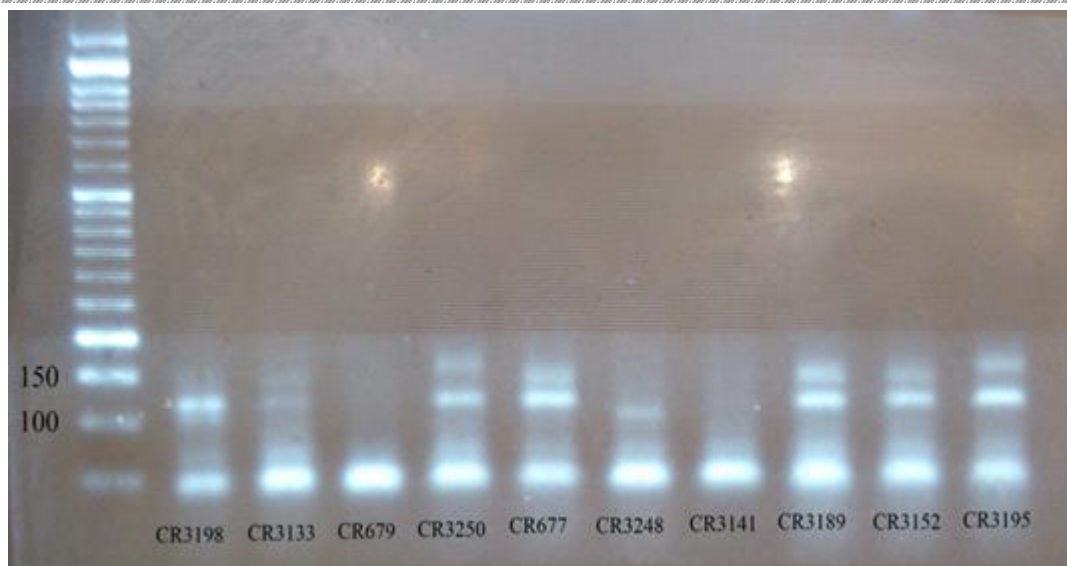
مکانهای ژنی برابر ۰/۳۵ بود. در مطالعه دیگری نیز نشانگر NA12-E09 بیشترین تعداد آلل را در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه نشان داده است (Moghaddam *et al.*, 2009).

مربوط به مکان ژنی RA2-E11 و معادل ۰/۸۲ و کمترین میزان عدم خلوص مشاهده شده مربوط به مکان‌های ژنی Na14-C12، RA2-A11، OL10-G06 و RA2-G08 (معادل صفر) بود. میانگین عدم خلوص مشاهده شده در تمام

جدول ۳- شاخص‌های تنوع ژنتیکی به دست آمده در ژنوتیپ‌های کلزا با استفاده از ۱۰ مکان ژنی SSR.

Table 3- Genetic diversity indices of SSR markers analysis in rapeseed genotypes.

آغازگر Primer	مشاهده‌شده Observed homozygosity	هتروزیگوسیتی مشاهده شده Observed heterozygosity	هموزیگوسیتی مورد انتظار Expected homozygosity	هتروزیگوسیتی مورد انتظار Expected heterozygosity	محتوای اطلاعاتی چندشکلی Polymorphism content information	Number of total alleles	تعداد آلل‌های موثر Number of effective allele	شاخص شانون Shannon index
NA10-B08	0.5217	0.4783	0.3826	0.6174	0.89	4	2.5251	1.0632
NA12-C08	0.4545	0.5455	0.3774	0.6226	0.87	3	2.5541	1.0059
NA12-E09	0.3333	0.6667	0.3007	0.6993	0.77	2	2.9455	1.0893
NA14-C12	1.0000	0.0000	0.8406	0.1594	0.79	2	1.1803	0.2868
RA2-A11	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.30	1	1.0000	0.0000
RA2-D04	0.7778	0.2222	0.5111	0.4889	0.53	2	1.9059	0.6682
RA2-E07	0.1905	0.8095	0.4878	0.5122	0.37	2	2.0000	0.6931
RA2-E11	0.1739	0.8261	0.4928	0.5072	0.31	2	1.9850	0.6894
RA2-G08	1.0000	0.0000	0.4993	0.5007	0.68	2	1.9514	0.6806
OL10-G06	1.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.00	1	1.0000	0.0000
میانگین Average	0.6452	0.3548	0.5892	0.4108	0.55	2.2 00 0	1.9047	0.6177



شکل ۱- الگوی نواری ۱۰ رقم کلزا با آغازگر RA2-E07 (آگارز ۱/۵ درصد از نوع Top Vision پس از نیم ساعت برقراری جریان).

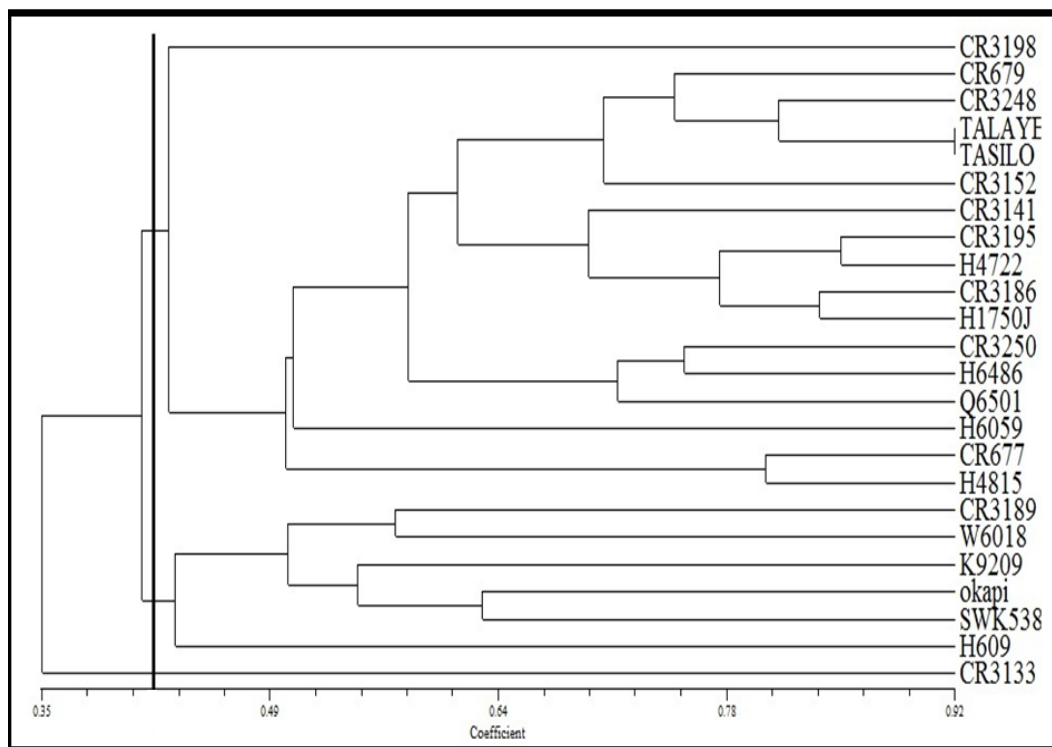
Figure 1- The roll pattern of 10 Rapeseed primer RA2-E07 (agarose 1/5 percent of Top Vision after half-time flow) the first left column is related to marker and other columns are related to genotypes.

کمتر بودن این مقدار در این دو نشانگر، ممکن است به علت نرخ جهش بالاتر در توالی‌های تکراری دی نوکلئوتیدی باشد (Vigoruroux *et al.*, 2005). نتایج مشابهی نیز توسط برخی از محققان (Vaz Patto *et al.*, 2005) گزارش شده است. بیشترین میزان شاخص شانون مربوط به مکان ژنی NA12-E09 و کمترین میزان مربوط به مکان‌های RA2-A11 و OL10-G06 بود.

بر اساس دندروگرام حاصل از داده‌های آغازگر SSR و آزمون T^2 و کاذب هوتلینگ، ۲۴ ژنوتیپ کلزا در ۳ گروه متفاوت قرار گرفتند (شکل ۲). نتایج حاصل نشان داد که ژنوتیپ‌های CR3189، W601، K9209، اکاپی، SWK538 و H609 در یک خوشه قرار گرفتند که در این میان ۵ ژنوتیپ W601، K9209، اکاپی، SWK538 و

بیشترین میزان محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) مربوط به مکان‌های NA14-C12، NA12- Na12-E09، Na10-B08 و NA12-C08 و کمترین میزان PIC مربوط به مکان‌های ژنی RA2-A11 و OL10-G06 بود. این نتایج با یافته‌های Liu and Muse (2005)، مطابقت داشت. محتوای اطلاعات چند شکلی به عنوان یکی از ویژگی‌های مهم نشانگرهای مولکولی در نظر گرفته شده و می‌تواند برای ارزیابی تمایز نشانگرها از هم بکار رود (Vigoruroux *et al.*, 2005). مقدار PIC در نشانگرهای NA12-E09 و RA2-G05، ۰/۱۹ بود که کمترین میزان را در بین سایر نشانگرهای مورد مطالعه دارا بود. این در حالی است که در مطالعه دیگر NA12-E09 بیشترین مقدار PIC را نشان داده است (Moghaddam *et al.*, 2009). دلیل

H609 در ایران مورد کشت و کار قرار می‌گیرند و با توجه به نزدیکی و تشابه اقلیمی ژنوتیپ‌ها و تشابه ژنومی این ژنوتیپ‌ها قابل توجیه و قابل انتظار بود.



شکل ۲- گروه‌بندی ارقام کلزای مورد مطالعه بر اساس مشاهدات مولکولی نشانگر SSR به روش UPGMA.

Figure 2- Classification of rapeseed genotypes based on SSR markers using UPGMA method.

تنهایی قرار گرفته است. نکته قابل توجه قرار گرفتن ژنوتیپ‌های IPK در سه خوشه مجزا است که این نشان می‌دهد که تنوع بین ژنوتیپ‌های ارسالی از IPK بیشتر از ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده از ایران می‌باشد. دلیل آن می‌تواند منشأ متفاوت این ژنوتیپ‌ها باشد (جدول ۱). نکته دیگر اینکه ژنوتیپ CR3133 از آلمان در یک گروه جداگانه قرار گرفته است که نشان دهنده تفاوت زیاد با دیگر ژنوتیپ‌ها است. در خوشه دوم ژنوتیپ CR3189 از IPK در کنار ۵ ژنوتیپ

در گروه دوم ژنوتیپ‌های CR3198، CR679، CR3248، TALAYE، TASILO، CR3152، CR3141، CR3195، H4722، CR3186، H1750J، CR3250، H6486، Q6501، H6059، CR677، H4815 قرار گرفتند که ۹ ژنوتیپ ارسالی از IPK و ۸ ژنوتیپ از ایران جمع‌آوری شده بودند. به نظر می‌رسد این ژنوتیپ‌ها که از نظر ژنتیکی بیشترین شباهت را به هم دارند، در اصل بومی یک منطقه بودند و در گروه سوم ژنوتیپ CR3133 از IPK به

نشان داده‌اند (Stephanie et al. 2009). و یا در گزارش دیگر ژنوتیپ‌های سه گونه *B. B. rapa* و *B. juncea* و *B. nupus* به دو گروه اصلی و نه زیرگروه تفکیک شدند به نحوی که تنوع ژنتیکی و تنوع جغرافیایی از هم تبعیت نمودند (Alituri et al., 2012). تمامی این گزارش‌ها حاکی از کارایی بالای نشانگرهای SSR در بررسی تنوع ژنتیکی جنس براسیکا می باشند.

با توجه به تنوع وسیع مشاهده شده و بر اساس نتایج گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها می‌توان ژنوتیپ‌های از گروه‌هایی که با همدیگر فاصله ژنتیکی زیادتری دارند را انتخاب و در دورگه‌گیری از آنها جهت اهداف اصلاحی خاص استفاده نمود. مسلماً با این کار در نتایج هتروزیس و تفکیک زیادتری مشاهده خواهد شد که موجب تسریع در روند اصلاحی می‌شود. لازم به ذکر است در صورتی که انتخاب این ژنوتیپ‌ها بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی و در راستای اهداف اصلاحی نیز صورت بگیرد به کارآ تر و موفقیت بیشتر برنامه اصلاحی کمک خواهد نمود.

سپاسگزاری

نگارندگان مقاله مراتب سپاسگزاری خود را از مرکز تحقیقات IPK در آلمان و ایستگاه تحقیقات دیم کشاورزی گچساران بدلیل در اختیار گذاشتن مواد گیاهی بعمل می‌آورند.

از ایران قرار گرفتند که حاکی از تشابه بالای این ژنوتیپ با ژنوتیپ‌هایی که در ایران کشت و کار می‌شوند، است.

در مطالعه‌ای تجزیه و تحلیل خوشه‌ای به کمک آغازگر RAPD ژنوتیپ‌های کلزا را در چهار گروه اصلی جای داد، بر اساس این تجزیه و تحلیل، ارقام زمستانه از ارقام بهاره جدا شدند و هرکدام در گروه‌های جداگانه قرار گرفتند (Moghaddam et al., 2009). طبق گزارش دیگر ارقام CR3152، CR3248، CR3152 و CR3141 در یک گروه قرار گرفتند (Ren et al. 1995). در پژوهشی Asghari et al. (2011) در بررسی تنوع ژنتیکی ۱۸ رقم کلزای بهاره و زمستانه از طریق ویژگی‌های مورفولوژیکی ژنوتیپ‌ها را به سه گروه و از طریق نشانگر رپید و به کمک روش UPGMA به هفت گروه دسته‌بندی نمودند. آنها تنوع زیادی را بر اساس این ویژگی‌ها در داخل و بین ژنوتیپ‌ها مشاهده کردند. در پژوهش دیگر بر روی ۹۰ لاین کلزا از طریق نشانگرهای SSR تنوع وسیعی گزارش شد و بین گروه‌بندی حاصل از نشانگر SSR و گروه‌بندی حاصل از ویژگی‌های بذری ارتباط مناسبی مشاهده شد (Cunmin et al. 2012). محققین دیگری از نشانگرهای SSR و به روش UPGMA گونه‌های مختلف جنس براسیکا را گروه‌بندی و تنوع بین و داخل گونه‌ها را ارزیابی نموده‌اند بعنوان مثال در یک مطالعه سه گونه *B. rapa* Chines، *B. rapa* ParaChines و *B. oleracea* تنوع وسیعی در داخل و بین گونه‌ها

- Agrama HA, Tuinstra MR (2003). Phylogenetic diversity and relationships among sorghum accessions using SSRs and RAPDs. *African Journal of Biotechnology* 2: 334-340.
- Alituri M, Farhatullah M, Rabbani MA, Shinvari ZK (2012). Genetic diversity in the locally collected Brassica species of Pakistan based on microsatellite markers. *Pakistanian Journal of Botany* 44: 1029-1035.
- Asghari A, Shokrpour M, Mohammaddoust Chamanabad H, Sofalian O (2011). Evaluating genetic diversity of canola cultivars using morphological traits and molecular markers. *Romanian Biotechnological Letters* 16: 6305-6312.
- Asghari A, Mohammadi S, Moghaddam A, Thurchi M, Dabage M, Mohammadinasab A (2006). Identification RAPD markers linked to cold resistance QTLs in canola. *Journal of Agricultural Science* 16: 213-223(In Farsi).
- Askari Nia P, Samadi Khouzani F, Ismail zade Moghaddam M, Seyyed Tabatabayi BA, Mirlohi A (1390). Review of the relationship between the two glume species, with some di, tetra and hexaploid wheat by SSR marker. 12th Iranian Genetics Congress. Shahid Beheshti University, Tehran, Iran (In Farsi).
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW (1980). Construction of genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetic* 32: 314-331.
- Bretting PK, Widrechner MP (1995). Genetic markers and plant genetic resources. *Plant Breeding Review* 13: 11-86.
- Chowdhury MA, Slinkard AE (2000). Genetic diversity in grasspea (*Lathyrus sativus* L.). *Genetic Resources Crop* 47: 163-169.
- Cunmin Q, Fuyou F, Liezhao L, Kun L, Jieheng H, Xiaolan L, Jingmei X, Li C, Rui W, Zhanglin T, Li J (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.
- FAO (2008). [http:// FAO. org](http://FAO.org). FAOSTATE. Agriculture statistics.
- Francis CY, Cai Yang R (1999). Popgene version 1.31. A joint Project Development by University of Alberta and Tim Boyle, Centre for International [http://ftp microsoft .com/Softlib/Mslfiles](http://ftp.microsoft.com/Softlib/Mslfiles) .
- Junjian N, Colowit PM, Mackill DJ (2002). Evaluation of genetic diversity in rice subspecies by microsatellite markers. *Crop Science* 42: 601-607.
- Kimura Y, Fujimoto H, Sakai T, Imamura J, Ma CZ, Fu TD (2000). Genetic diversity of Chinese and Japanese rapeseed (*Brassica napus* L.) varieties detected by RAPD markers. *Breeding Science* 50: 265-257.
- Latifi N, Soltani A, Spanner D (2004). Effect of temperature on germination components in canola cultivars. *Iranian Journal of Agriculture Science* 35: 313-321 (In Farsi).
- Liu K, Muse SV (2005). Powermarker: Integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics* 21: 2128-2129.
- Moghaddam M, Mohammadi SA, Mohebalipour N, Toorchi M, Aharizad S, Javidfar F (2009) Assessment of genetic diversity in rapeseed cultivars as revealed by RAPD and microsatellite markers.. *African Journal of Biotechnology* 8: 3160-3167.
- Ren J, Mcferson JR, Li R, Kresovich S, Lamboy WF (1995). Identities and relationship among Chinese vegetable brassicas as determined by random amplified polymorphic DNA markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 120: 548 – 555.

- Roman S, Lenka D, Vladislav C, Jaroslava O (2004). Fluorescence based AFLPs occur as the most suitable marker system for oilseed rape cultivar identification. *Journal of Applied Genetic* 45: 161-173.
- Rudolph B, Uzunova MI, Ecke W (2000). Development of microsatellite markers for the analysis of genetic diversity in rapeseed (*Brassica napus* L.). 3rd ISHS International Symposium on Brassica, Horticulture Research International, Wellesbourne, 5-9.
- Saghai-Marouf, MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc Natl Acad Science USA* 81: 8014-8018.
- Shamsodin Saeed, M, Farahbakhsh H (2008). Evaluation of quantitative and qualitative characteristics of Canola under salty conditions for identifying the best resistance index. *Journal of Agriculture and Natural Resources Science and Technology* 12: 65-77. (In Farsi).
- Snowdon R, Friedt W (2004). Molecular markers in brassica oilseed breeding: current status and future possibilities. *Plant Breeding* 123: 1-8.
- Sourour A, Amara Hajer S (2009). Distribution and phenotypic variability aspects of some quantitative traits among durum wheat accessions. *African Crop Science Journal* 16: 219 – 224.
- Stephanie UC, de la Peña Robert C, Neilyn OV (2009). Genetic characterization of *Brassica rapa chinensis* L., *B. rapa parachinensis*(L. H. Bailey) Hanelt, and *B. oleracea alboglabra* (L. H. Bailey) Hanelt using simple sequence repeat markers. *Philippine Journal of Science* 138 : 141-152.
- Teklu Y, Hammer K, Röder MS (2007). Simple sequence repeats marker polymorphism in emmer wheat (*Triticum dicoccon* Schrank): Analysis of genetic diversity and differentiation. *Genetic Resour. Crop Evolution* 54: 543-554.
- Vaz Patto MC, Satovic Z, Pego S, Feveireiro P (2004). Assessing the genetic diversity of Portuguese maize germplasm using microsatellite markers. *Euphytica* 137: 63-72.
- Vigoruroux Y, Mitchell S, Matsuoka Y, Hamblin M, Kresovich S, Smith JSC, Jaqueth J, Smith OS, Doebley J (2005). An analysis of genetic diversity across the maize genome using microsatellite. *Genetics* 169: 1617-1630.

Study of genetic diversity in rapeseed (*Brassica napus* L.) genotypes using microsatellite markers

Barzan Z.¹, Dehdari M.*², Amiri Fahliani R.³

¹ Graduate student of plant breeding, University of Yasouj, Iran.

² Associate Professor, Faculty of Agriculture, University of Yasouj, Iran.

³ Assistant Professor, Faculty of Agriculture, University of Yasouj, Iran.

Abstract

Oilseed crops such as canola have important role to produce oil and energy needed for human. Information about genetic variability based on different markers, particularly molecular markers has played a key role in designing breeding programs. To study the genetic diversity in 24 genotypes of rapeseed, the 10 microsatellite primers were used according to previous studies. The results showed that the average polymorphic information content for assessing primers was 0.55 and the mean observed and expected heterozygosity for all primers, were 0.35 and 0.41 respectively. NA12-E09 locus had the highest rate (1.0893) of Shannon diversity index, which represents diversity among the population, whereas loci RA2-A11 and OL10-G06 had the lowest Shannon index. Cluster analysis based on molecular data using Jaccard's similarity coefficient and UPGMA method, grouped rapeseed varieties into the third major group. Accordingly, CR3133 variety of Canada origin which is located in a separate group showed lower similarity compared with other varieties. In general, rapeseed genotypes showed intra-species diversity based on microsatellite markers could be used in plant breeding programs.

Key words: *Rapeseed, genetic diversity, microsatellite markers.*

* Corresponding Author: Dehdari M.

Tel: 09171432037

Email: adehdari@yu.ac.ir

