

بررسی تنوع ژنتیکی کلزا (*Brassica napus* L.) با استفاده از نشانگرهای مولکولی SSR و ISJ

فاطمه درویش‌نیا^۱، براتعلی فاخری^{۲*}، فرهاد نظریان فیروزآبادی^۳ و ناصر پنجک^۴

۱ و ۲. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

۳. استادیار اصلاح نباتات، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان

۴. دانشیار بیماری‌های گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۷/۲۰ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۹/۲۷)

چکیده

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۲۱ رقم کلزا از ۲۰ جفت آغازگر اختصاصی SSR و نیمه‌تصادفی ISJ استفاده شد. آغازگرها در مجموع ۱۵۸ (۸۱/۰۵ درصد) باند چندشکل (۵۱ باند SSR و ۱۰۷ باند ISJ) تولید کردند. متوسط تعداد باند چندشکل برای آغازگرهای ISJ، SSR و ترکیب آنها به ترتیب ۱۰/۷، ۵/۱ و ۷/۹ عدد برآورد شد. میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) از ۰/۰۱۵ در آغازگر اختصاصی O110D08 تا ۰/۳۴۲۰ در آغازگر نیمه‌اختصاصی ET15-33 متغیر بود. بین آغازگرهای نیمه‌اختصاصی IT و ET برای میزان چندشکلی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. نمودار درختی حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA و ضریب تشابه دایس با استفاده از آغازگرهای ISJ، SSR و ترکیب آنها، ژنوتیپ‌های کلزا را به ترتیب در سه، شش و چهار گروه اصلی تقسیم کرد. تنوع ژنتیکی از الگوی جغرافیایی تبعیت نمی‌کند و ژنوتیپ‌های ایرانی و خارجی در گروه‌های مجزا طبقه‌بندی نشدند. این موضوع قرابت و خویشاوندی ژنوتیپ‌های ایرانی و خارجی را نشان داد. دو رقم Licord و SLM096 با اینکه دارای منشأ یکسانی بودند، دو گروه مجزا را به خود اختصاص دادند و فاصله ژنتیکی زیادی با سایر نمونه‌ها داشتند. بنابراین در برنامه‌های به‌نژادی آینده می‌توان از آنها استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، کلزا، ISJ، SSR.

مقدمه

گیاه دارای ۴۰ تا ۴۵ درصد روغن و ۲۵ تا ۲۶ درصد پروتئین است (Kimber & McGregor, 1995). در مقام مقایسه با روغن‌های حاصل از دانه‌های روغنی آفتابگردان، ذرت و سویا، روغن کلزا به دلیل برخورداری از اسیدهای چرب اشباع‌نشده و نداشتن کلسترول از کیفیت تغذیه‌ای مطلوبی برخوردار است (Thiyam-Holländer et al., 2012). به این دانه روغنی از این جهت کانولا گفته می‌شود که ارقام مختلف آن، اسید اروسیک و گلوکوسینولات کمی دارند (Kimber & McGregor, 1995). توانایی بذور کلزا برای جوانه‌زنی و رشدونمو در دمای کم، این گیاه را در زمرة معدود

دانه‌های روغنی پس از غلات دومین گروه ذخایر غذایی جهان به‌شمار می‌روند. این محصولات علاوه بر دارا بودن ذخایر غذایی اسیدهای چرب، حاوی پروتئین نیز هستند. کلزا (*Brassica napus* L.) پس از سویا و نخل روغنی سومین منبع تولید روغن نباتی جهان است (Thiyam-Holländer et al., 2012). سطح زیر کشت کلزا در جهان از ۸/۲ میلیون هکتار در سال ۱۹۷۰ به بیش از ۳۰/۲ میلیون هکتار تا سال ۲۰۰۷ افزایش یافته است (FAO, 2007). متوسط عملکرد این گیاه ۱ تا ۲ تن در هکتار است (Kimber & McGregor, 1995). این

خویشاوندان خیلی نزدیک نیز بسیار متنوع اند (Lit & Luty, 1989). نحوه توارث هم‌بازر، سطح بالای پلی‌مورفیسم حاصل و سادگی کار با این نشانگرها، آنها را به‌عنوان نشانگر بسیار مناسب برای تعیین سطوح متفاوت تنوع ژنتیکی، شناسایی و تفکیک ارقام و مدیریت مجموعه ذخایر توارثی مطرح کرده است (Kashi *et al.*, 1997).

در میان انواع نشانگرهای مولکولی، نشانگرهای نیمه‌تصادفی ISJ و اختصاصی SSR به‌طور گسترده‌ای در برآورد تنوع ژنتیکی گیاهان زراعی استفاده شده است (Senior & Heun, 1993; Rafalski *et al.*, 1997; Kashi *et al.*, 1997; Gawel *et al.*, 2002; Rafalski *et al.*, 2002; Hasan *et al.*, 2013; Salahvarzi *et al.*, 2006). تنوع ژنتیکی ۹۶ ژنوتیپ کلزای بهاره، پاییزه، علوفه‌ای و برگی را توسط ۳۰ نشانگر ریزماهواره مطالعه کرده‌اند. Qu *et al.* (2012) تنوع ژنتیکی و تجزیه ارتباطی بین ژرم‌پلاس *B.napus* را با استفاده از نشانگر SSR مطالعه کرده‌اند. در مطالعه‌ای تنوع ژنتیکی کلزا با استفاده از نشانگرهای RAPD، SSR و AFLP بررسی شد (Moghaieb *et al.*, 2014). Soengas *et al.* (2006) ارتباطات ژنتیکی ۳۵ جامعه کلزا را با استفاده از ۱۶ نشانگر SSR مطالعه کرده‌اند. Salahvarzi *et al.* (2013) تنوع ژنتیکی عدس را با استفاده از نشانگرهای ISJ مطالعه کرده‌اند.

نشانگرهایی که سطوح بالاتری از تنوع را نشان می‌دهند، کارایی بیشتری دارند. ترکیب آغازگرهای ISJ با آغازگرهای اختصاصی SSR برای رسیدن به چندشکلی بالا و برآورد تنوع ژنتیکی بسیار مفید است (Rafalski *et al.*, 1997). با وجود استفاده گسترده هر یک از نشانگرهای نیمه‌تصادفی ISJ و اختصاصی SSR (Plieske & Struss, 2001; Saal *et al.*, 2001; Uzunova & Ecke, 1999) در برآورد تنوع ژنتیکی کلزا، تا کنون گزارشی مبنی بر استفاده توأم آنها یافت نشده است. از این‌رو هدف از این مطالعه، بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های کلزای بهاره و پاییزه با استفاده از این نشانگرها، مقایسه نشانگرهای اینترونی و اگزونی در برآورد تنوع، تعیین فواصل ژنتیکی ارقام مورد مطالعه و تعیین گروه‌های هتروتیک با بیشترین فاصله ژنتیکی

دانه‌های روغنی مورد کشت‌وکار در آب‌وهوای معتدل (بهاره) و حتی در مناطق به‌نسبت سرد (پاییزه) قرار داده است (Thiyam-Holländer *et al.*, 2012).

در برنامه‌های به‌نژادی و حفظ ذخایر توارثی، اطلاع از سطح تنوع ژنتیکی از اهمیت بسزایی برخوردار است. اطلاعات تنوع ژنتیکی را می‌توان از خصوصیات مورفولوژیک، پروتئین، آیزوایم و نشانگرهای مولکولی به‌دست آورد (Pejic *et al.*, 1998). استفاده از نشانگرهای مبتنی بر DNA مناسب‌ترین روش برآورد تنوع ژنتیکی به‌شمار می‌رود (Odonougue *et al.*, 1999). این نشانگرها تحت تأثیر شرایط محیطی نیستند و در هر مرحله از رشد گیاه کاربرد دارند (Manifesto *et al.*, 2001). پیشرفت در ژنتیک سلولی و مولکولی به توسعه نشانگرهای DNA مبتنی بر PCR برای مطالعات ژنتیکی متفاوت در گونه‌های زراعی منجر شده است (Mohammadi & Prasanna, 2003). در شناسایی چندشکلی ژنتیکی گیاهان از دو نوع نشانگر مبتنی بر PCR استفاده می‌شود. در نوع اول، از آغازگرهای تصادفی RAPD (Random Amplified Polymorphic) و نیمه‌تصادفی ISJ (Intron-exon Splicing Junction) که تنوع ژنتیکی را بدون استفاده از اطلاعات اولیه ژنوم شناسایی می‌کنند (Weining & Langridge, 1991) و در نوع دوم، از آغازگرهای اختصاصی که قادر به شناسایی ژن‌های شناخته‌شده یا خانواده ژنی خاص هستند، استفاده می‌شود (Weining & Langridge, 1991; Devos & Gale, 1992). نشانگر نیمه‌تصادفی ISJ دارای توالی‌های ۱۰ تا ۱۸ نوکلئوتیدی است. چندشکلی به‌دست‌آمده از این نوع آغازگرها ناشی از تفاوت در تکثیر قطعاتی از ژنوم است که رونویسی می‌شوند. این آغازگرها شامل دو دسته از آغازگرهای ET (Exon targeting) و IT (Intron targeting) هستند. آغازگرهای ET، نواحی اگزون (مکان هدف اگزون) و آغازگرهای IT نواحی اینترون (مکان هدف اینترون) ژنوم را تکثیر می‌کنند (Rafalski *et al.*, 1997). نشانگر اختصاصی SSR (Simple Sequence Repeat) یا ریزماهواره‌ها شامل توالی‌های دوگانه تکراری کوتاه (۶-۲ جفت باز) از DNA هستند که در نتیجه جهش در تعداد واحدهای تکراری حاصل می‌شوند و حتی در میان

Dellaporta *et al.* ژنومی با استفاده از روش (1983) صورت گرفت. کمیت و کیفیت DNA با استفاده از دو روش اسپکتوفتومتری (Biophotometer- eppendorf 6131) و الکتروفورز ژل آگارز (۰/۸ درصد) تعیین شد. ده جفت آغازگر ISJ (Rafalski *et al.*, 1991; Weining *et al.*, 2002) (جدول ۲) و ده جفت آغازگر SSR (Uzunova & Ecke, 1999; Westman & Kresovich, 1999) (جدول ۳) براساس چندشکلی و تکرارپذیری آنها برای ارزیابی ارقام کلزا به کار گرفته شدند.

برای استفاده در هیبریداسیون، و مقایسه نشانگر ISJ و SSR در برآورد تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های کلزای بهاره و پاییزه بوده است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق ۲۱ ژنوتیپ کلزا (جدول ۱) از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد. ده عدد از بذره‌های هر رقم در گلدان‌های مجزا کاشته شد. به‌منظور استخراج DNA در مرحله شش‌برگی، برگ‌های جوان از هر رقم برداشت شد. برای هر ژنوتیپ استخراج

جدول ۱. ژنوتیپ‌های کلزای مورد مطالعه به‌همراه منشأ و تیپ رشد آنها

رقم	تیپ رشد	منشاء	رقم	تیپ رشد	منشاء	رقم	تیپ رشد	منشاء
PF	بهاره	آلمان	Modena	پاییزه	دانمارک	Zarfam	پاییزه	ایران
19-H	بهاره	پاکستان	Okapi	پاییزه	فرانسه	KS-11	پاییزه	ایران
RGS 003	بهاره	آلمان	Licord	پاییزه	آلمان	Kiloz	پاییزه	ایران
Option504	بهاره	آلمان	KS-7	پاییزه	ایران	SLM 096	پاییزه	آلمان
Sari gol	بهاره	فرانسه	Fornax	پاییزه	آلمان	Talaye	پاییزه	آلمان
Heros	بهاره	آلمان	Elvis	پاییزه	فرانسه	Opera	پاییزه	آلمان
Colvert	پاییزه	آلمان	Gerinimo	پاییزه	فرانسه	Orient	پاییزه	آلمان

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای ISJ مورد مطالعه (Rafalski *et al.*, 2002; Weining *et al.*, 1991)

ردیف	نام	توالی	دمای اتصال
۱	*IT18-2	5'-GCAGAGGGCCAGGTAAGT-3'	۵۸
۲	IT15-36	5'-ACCTACCTGGGGCTC-3'	۴۸
۳	IT15-34	5'-GCGGCATCAGGTAAG-3'	۴۸
۴	ISJ5	5' CAGGGTCCCACCTGCA-3'	۵۴
۵	ISJ3	5'-TGCAGGTCA-3'	۲۸
۶	*ET15-35	5'- ACTTACCTGCCGAG-3'	۴۸
۷	ET15-34	5'- ACTTACCTGGCCGAG-3'	۴۸
۸	ET15-33	5'- ACTTACCTGGCCGTG-3'	۴۸
۹	ET12-30	5'- AGCAGGTGGTAC-3'	۳۸
۱۰	ET12-28	5'- AGCAGGTGCAAG-3'	۳۸

* پیشوند IT مربوط به آغازگرهای اینترون و پیشوند ET مربوط به آغازگرهای اگزون است.

آغازگرهای F و R، ۵ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase و ۱۰ میلی‌مولار dNTPs تهیه شد. حجم کلی واکنش برای بسط DNA در نشانگر ISJ و SSR به ترتیب ۱۵ μ l و ۲۵ μ l بود. به‌منظور جلوگیری از تکثیرهای غیراختصاصی، از برنامه Touch down PCR (واسرشته‌سازی اولیه: ۱ چرخه ۳ دقیقه‌ای در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد؛ واسرشته‌سازی چرخه‌ای شامل ۱

محلول واکنش PCR برای نشانگرهای ISJ مطابق روش Yang *et al.* (2007) با کمی تغییر (۱۰ نانوگرم DNA، بافر PCR با غلظت پایه ۱۰x، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر، ۱۰۰ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۱۰ میلی‌مولار dNTPs، ۵ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase) و برای نشانگرهای SSR با اجزای ۵۰ نانوگرم از DNA ژنومی، بافر PCR با غلظت پایه ۱۰x، ۱۰ پیکومول از

در نهایت ژل‌ها با دستگاه ژل خوان عکس‌برداری شدند. اندازه قطعات تکثیری توسط دو نشانگر وزنی 100bp و DNA فاژ لامبدا برش داده شده با دو آنزیم *HindIII* و *EcoRI* تخمین زده شد. قطعات تکثیرشده توسط آغازگرهای اختصاصی و نیمه‌تصادفی بر اساس حضور و نبود باند به ترتیب به صورت (۱) و (۰) رتبه‌بندی شدند. باندهای چندشکل، واضح و تکرارپذیر برای تشکیل ماتریس داده‌ها استفاده شدند. به منظور بررسی کارایی آغازگرهای مورد استفاده از فرمول $PIC = [\sum 2P_i(1-P_i)]$ استفاده شد که در آن میانگین اطلاعات چندشکل هر آغازگر و P_i فراوانی باندهاست (Mohammadi & Prasanna, 2003). نمودار درختی با استفاده از ضریب تشابه دایس و الگوریتم UPGMA رسم شد. محاسبات آماری با نسخه ۲/۵ نرم‌افزار NTSYS-PC (Rohlf, 1998) انجام گرفت.

دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد؛ اتصال آغازگر، ۱۰ چرخه ۱ دقیقه‌ای در دمای ۶۵-۵۶ درجه سانتی‌گراد؛ بسط چرخه‌ای، ۱/۵ دقیقه؛ واسرشته‌سازی چرخه‌ای شامل ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد؛ اتصال آغازگر، ۳۰ چرخه ۱ دقیقه‌ای در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد؛ بسط چرخه‌ای، ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد؛ بسط نهایی، ۱ چرخه ۵ دقیقه‌ای در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد) استفاده شد. پس از اتمام چرخه‌ها، نمونه‌ها تا قبل از الکتروفورز در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. محصول PCR برای آغازگر نیمه‌تصادفی ISJ با الکتروفورز ژل آگارز ۱/۸ درصد تفکیک و با اتیدیوم بروماید ۰/۱ درصد رنگ‌آمیزی شد. محصول تکثیری نشانگر SSR با استفاده از ژل پلی‌اکریل آمید واسرشته‌ساز ۶ درصد تفکیک شد و رنگ‌آمیزی ژل‌ها با استفاده از روش نیترا نقره صورت گرفت.

جدول ۳. مشخصات آغازگرهای SSR مورد مطالعه (Uzunova & Ecke, 1999; Westman & Kresovich, 1999)

ردیف	نام	منشأ	موتیف	اندازه
۱	Na12A07	<i>B. napus</i>	GT ₁₁	۱۶۳-۷۰
۲	Na10D09	<i>B. napus</i>	(A) ₂₁ (T) ₁₄ (GT) ₆	۳۶۷-۲۷۵
۳	Na12A01	<i>B. napus</i>	CT(34)	۱۳۱-۱۱۰
۴	O10D08	<i>B. oleracea</i> (or rapa)	(CT) ₂₈	۲۲۷-۱۶۳
۵	Na10B11	<i>B. napus</i>	CT ₂₈	Nd
۶	Na12A08	<i>B. napus</i>	GA ₂₈	Nd
۷	Na12C06	<i>B. napus</i>	CT ₃₇	Nd
۸	Na12H04	<i>B. napus</i>	CT ₁₆	Nd
۹	Na14C12	<i>B. napus</i>	AG ₁₇	Nd
۱۰	Na14D07	<i>B. napus</i>	CCG ₃	Nd

نتایج و بحث

ژنوتیپ ۵/۵ عدد بود. متوسط تعداد باند چندشکل به‌زای هر آغازگر ۱۰/۷ عدد بود. در مطالعه‌ای بر روی تنوع ژنتیکی ارقام لوبیا با استفاده از آغازگرهای نیمه‌تصادفی متوسط تعداد باند به‌زای هر ژنوتیپ ۱۱/۵ عدد گزارش شد (Nowoseielski *et al.*, 2002). متوسط تعداد باند تولیدشده به‌زای هر یک از ژنوتیپ‌های چاودار ۸/۹ عدد برآورد شده است (Rafalski *et al.*, 2002). هر چه متوسط تعداد باند به‌زای هر آغازگر بیشتر باشد کارایی آن در گیاه مورد مطالعه بیشتر است. نتایج مطالعه ما بر روی کلزا به‌طور تقریبی در توافق با یافته‌های دیگران بود (Rafalski *et al.*, 2002; Siahshar *et al.*, 2010; Qu *et al.*, 2012; Moghaieb *et al.*, 2014).

به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۲۱ ژنوتیپ کلزا از ۱۰ آغازگر نیمه‌تصادفی ۹ تا ۱۸ نوکلئوتیدی (جدول ۴) استفاده شد (Rafalski *et al.*, 2002; Weining *et al.*, 1991). ده آغازگر در مجموع ۱۱۶ باند تولید کردند که ۱۰۷ باند چندشکل (۹۳/۶ درصد) بود. بیشترین تعداد باند تولیدی مربوط به آغازگر ET15-35 (شکل ۶) با ۱۶ باند و کمترین تعداد باند متعلق به آغازگر ISJ3 با ۵ باند بود. بیشترین کمترین تعداد باند چندشکل به ترتیب مربوط به آغازگر ET15-35 با ۱۶ باند (۱۰۰ درصد چندشکلی) و آغازگر ET12-28 با ۶ باند (۷۵ درصد چندشکلی) بود (جدول ۴). متوسط تعداد باند به‌زای هر آغازگر ۱۱/۶ عدد و برای هر

جدول ۴. تعداد باند تولیدشده، درصد چندشکلی و میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) هر کدام از آغازگرهای ISJ

PIC	درصد چندشکلی	قطعات یک‌شکل	قطعات چندشکل	قطعات تکثیرشده	نام آغازگر	ردیف
۰/۳۳۶۳	۱۰۰	۰	۱۴	۱۴	IT18-2	۱
۰/۳۳۲۲	۹۲/۸	۱	۱۳	۱۴	IT15-36	۲
۰/۳۱۸۶	۹۱/۶	۱	۱۱	۱۲	IT15-34	۳
۰/۲۸۶۵	۱۰۰	۱	۱۲	۱۳	ISJ5	۴
۰/۲۶۶۰	۹۲	۰	۵	۵	ISJ3	۵
۰/۲۲۹۱	۹۳	۱	۱۴	۱۵	ET15-34	۶
۰/۳۴۲۰	۱۰۰	۰	۱۰	۱۰	ET15-33	۷
۰/۱۵۲۵	۱۰۰	۲	۶	۸	ET12-30	۸
۰/۲۰۰۰	۶۶/۶	۳	۶	۹	ET12-28	۹
۰/۲۷۱۲	۱۰۰	۰	۱۶	۱۶	ET15-35	۱۰
۰/۲۷۳۵	۹۳/۶	۹	۱۰۷	۱۱۶	کل	

کد کردن ژن‌ها را ندارند (اینترون‌ها) بیش از ۹۵ درصد کل ژنوم یک گیاه را تشکیل می‌دهند (Erlich, 1989; Kumar, 1999; Weining & Langridge, 1991). به عبارت دیگر این نواحی بخش بیشتر ژن در ژنوم را نسبت به نواحی اگزونی تشکیل می‌دهند (Sharma *et al.*, 2002) و با توجه به اینکه آغازگرهای IT این نواحی را مورد هدف و تکثیر قرار می‌دهند، احتمال تکثیر قطعات بیشتر با طول بزرگتر در آنها بیشتر است. این نتایج مؤید این موضوع است که اندازه و تعداد قطعات بین ژنی (اینترون‌ها) در ژنوم کلزا زیاد است که همین عامل سبب اندازه بزرگتر و قطعات بیشتر تولیدشده توسط این دسته از آغازگرها شده است. یک آغازگر با وجود نقاط اتصال بیشتر بر روی ژن در ژنوم، احتمال بیشتری برای تکثیر قطعات DNA خواهد داشت و هر چه طول قطعه‌ای که آغازگر به‌عنوان مکان هدف انتخاب می‌کند بزرگتر باشد، احتمال تکثیر قطعات بیشتر با طول بزرگتر خواهد بود (Weining & Langridge, 1991). علاوه بر این، انتهای ۳' آغازگر مهم‌ترین قسمت برای اتصال مؤثر آن در واکنش PCR است. انتهای ۳' آغازگرهای گروه IT اختصاصی است و به نواحی حفاظت‌شده مکان برش اینترون-اگزون متصل می‌شود (Rafalski *et al.*, 1997; Gaweł *et al.*, 2002). مزید بر اینها، جهش‌ها مهم‌ترین عامل ایجاد چندشکلی در مطالعات تنوع ژنتیکی توسط نشانگرهای مولکولی‌اند. با توجه به اینکه نواحی اینترون از لحاظ تکاملی کمتر

در این تحقیق از ۵ آغازگر IT و ۵ آغازگر ET استفاده شد. از بین آغازگرهای IT، آغازگر ۱۸ نوکلئوتیدی IT18-2 (شکل ۵) بیشترین قطعه تکثیرشده را با ۱۴ باند تکثیر کرد. آغازگر IT، ۹ نوکلئوتیدی ISJ3 کمترین قطعه تکثیرشده را با ۵ باند تولید کرد. از بین آغازگرهای ET نیز آغازگر ۱۵ نوکلئوتیدی ET15-35 (شکل ۶) بیشترین قطعه تکثیرشده را با ۱۶ باند تکثیر کرد. آغازگرهای IT نسبت به آغازگرهای ET قطعات تکثیرشده بیشتری تولید کردند و وضوح بیشتری نشان دادند (شکل ۶). در مطالعه‌ای بر روی چاودار گزارش شد که آغازگرهای ۱۵ نوکلئوتیدی چندشکلی بیشتری داشتند و از بین آنها آغازگرهای IT قطعات چندشکل بیشتری تولید کردند (Rafalski *et al.*, 2002). محققان ضمن مقایسه دو آغازگر IT و ET مشاهده کردند که آغازگرهای ۱۸ نوکلئوتیدی فاقد چندشکلی‌اند و بهترین نتایج را آغازگرهای IT نشان دادند (Gaweł *et al.*, 2002). در مطالعه‌ای دیگر آغازگرهای ۱۸ نوکلئوتیدی الگوی باندهای پیچیده‌تری تولید کردند و درصد چندشکلی آنها بیشتر بود، ولی از لحاظ درصد چندشکلی تفاوت چندانی بین آغازگرهای IT و ET مشاهده نشد (Rafalski *et al.*, 1997). آغازگرهای گروه IT در تکثیر قطعات از دقت و کارایی بیشتری برخوردارند، چرا که این آغازگرها نواحی‌ای از ژنوم را تکثیر می‌کنند که قابلیت کد کردن ژن‌ها (اینترون‌ها) را ندارند. نواحی‌ای از ژنوم که قابلیت

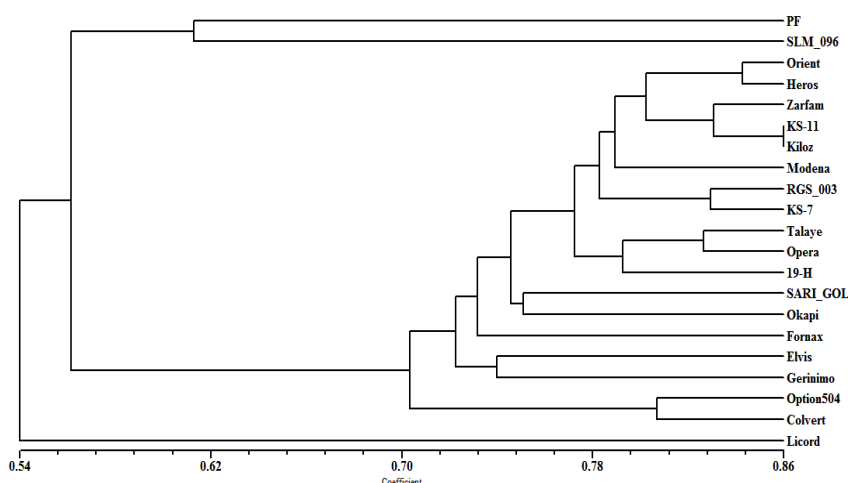
می‌شود. Zarfam با منشأ ایران سومین نمونه موجود در این گروه بود که با دو ژنوتیپ KS-11 و Kiloz (منشأ ایران) در یک خوشه قرار گرفتند. نمونه Zarfam پاییزه است. این نمونه بیشترین شباهت ژنتیکی را با نمونه Kiloz با ضریب تشابه ۰/۸۴ و کمترین شباهت ژنتیکی را با Licord با ضریب تشابه ۰/۵۴ داشت. Modena نمونه بعدی این گروه با منشأ دانمارک بود. این رقم به صورت پاییزه کشت می‌شود و برای کشت در مناطق سرد و معتدل مناسب است. این رقم به ترتیب دارای تشابه ژنتیکی ۰/۸۲ و ۰/۵۱ با رقم Orient و SLM 096 بود. ژنوتیپ بعدی RGS 003 بود که با KS-7 در یک خوشه قرار گرفت. منشأ RGS 003 آلمان است. در حالی که KS-7 منشأ ایرانی دارد. قرار گرفتن این دو ژنوتیپ در یک گروه احتمالاً به علت تشابه خصوصیات مورفولوژیک آنهاست. ژنوتیپ RGS 003 با ضریب تشابه ۰/۸۳ دارای بیشترین شباهت ژنتیکی با Kiloz بود. این ژنوتیپ کمترین شباهت ژنتیکی را با Licord (ضریب تشابه ۰/۵۳) داشت. Talaye و Opera دو نمونه بعدی این گروه بودند که در یک خوشه قرار گرفتند. منشأ Talaye و Opera آلمان است. Talaye رقمی پاییزه و دو صفر است. Opera نیز رقمی پاییزه است. رقم 19-H با منشأ پاکستان نمونه دیگر این گروه است که به صورت بهاره کشت می‌شود. این رقم با درصد تشابه ۰/۸۲ و ۰/۴۸ به ترتیب بیشترین شباهت ژنتیکی را با Talaye و کمترین شباهت را با Licord داشت. Sari gol ژنوتیپ بعدی این گروه با منشأ آلمان بود. Sari gol دارای بیشترین شباهت ژنتیکی با Zarfam (ضریب تشابه ۰/۷۹) و کمترین شباهت ژنتیکی با Licord (ضریب تشابه ۰/۵۲) بود. رقم Okapi با منشأ فرانسه دیگر نمونه این گروه بود که از ارقام مورد استفاده در ایران است. این رقم با Heros با ضریب تشابه ۰/۷۹ بیشترین شباهت و با SLM 096 با ضریب تشابه ۰/۴۲ کمترین شباهت را داشت. ژنوتیپ دیگر این گروه رقم Fornax با منشأ آلمان بود. Fornax رقمی پاییزه است که بیشترین شباهت ژنتیکی را با Kiloz (ضریب تشابه ۰/۷۹) و کمترین شباهت ژنتیکی را با SLM 096 (ضریب تشابه ۰/۵۱) داشت. Elvis ژنوتیپ دیگر این گروه بود که منشأ آن فرانسه بوده و رقمی پاییزه است. این رقم با ضریب

حفاظت شده‌اند و به بروز جهش‌های مختلف حساسیت بیشتری دارند (Erlich, 1989; Kumar, 1999)، چندشکلی بیشتر در نواحی اینترون که توسط آغازگرهای IT بروز یافته است، دور از انتظار نیست. میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) مهم‌ترین ابزار در مطالعه نشانگرهای مولکولی شناخته شده است (Junjian *et al.*, 2002). عملکرد PIC به تعداد جایگاه‌های چندشکل و تعداد کل جایگاه‌ها وابسته است. بنابراین آغازگرها با تعداد آلل بیشتر، PIC بزرگ‌تری دارند. دامنه مقدار PIC از ۰/۱۵۲۵ در آغازگر ET12-30 تا ۰/۳۳۶۳ در آغازگر IT18-2 متغیر بود.

نمودار درختی حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۲۱ ژنوتیپ کلزا با استفاده از آغازگرهای نیمه تصادفی ISJ در شکل ۱ نشان داده شده است. با قطع نمودار درختی در ضریب تشابه ۰/۶۱، سه گروه اصلی به دست آمد. گروه اول شامل دو ژنوتیپ PF و SLM-096 بود. منشأ این دو ژنوتیپ که با همدیگر ۶۱ درصد شباهت داشتند، آلمان بود. PF به صورت بهاره و SLM-096 به صورت پاییزه کشت می‌شود. گروه دوم شامل ۱۸ ژنوتیپ بود. منشأ ژنوتیپ‌های این گروه متفاوت بود. بیشترین ضریب تشابه مشاهده شده در بین ژنوتیپ‌های این گروه ۰/۸۶ بود و به دو ژنوتیپ KS-11 و Kiloz تعلق داشت. منشأ این دو ژنوتیپ ایران بود و دارای تیپ رشد پاییزه بودند. علت تشابه زیاد این دو ژنوتیپ احتمالاً منشأ جغرافیایی یکسان آنهاست. KS-11 کمترین شباهت را با رقم Licord با ضریب تشابه ۰/۵۹ داشت. ژنوتیپ Kiloz با رقم Licord نیز کمترین شباهت (ضریب تشابه ۰/۵۶) را داشت. اولین زیرنمونه موجود در این گروه رقم Orient با منشأ آلمان بود که با رقم Heros در یک خوشه قرار گرفتند. رقم Orient پاییزه بود. این رقم بیشترین شباهت را با ژنوتیپ Kiloz با ضریب تشابه ۰/۸۴ و کمترین شباهت را با ژنوتیپ SLM 096 با ضریب تشابه ۰/۵۳ داشت. دومین ژنوتیپ این گروه Heros با منشأ آلمان بود که ژنوتیپی بهاره است. این ژنوتیپ به ترتیب با ضریب تشابه ۰/۸۴ و ۰/۵۵ بیشترین شباهت ژنتیکی را با Talaye و کمترین فاصله ژنتیکی را با Licord داشت. احتمالاً علت تشابه ژنتیکی کم بین Heros و Licord نوع کشت آنهاست، چرا که Licord به صورت پاییزه کشت

۰/۴۳ کمترین شباهت ژنتیکی را داشت. گروه سوم در ضریب تشابه ۰/۶۱ به‌تنهایی یک ژنوتیپ (Licord) را به خود اختصاص داد. منشأ آلمان است که کمترین شباهت را با رقم Option504 با ضریب تشابه ۰/۳۷ و بیشترین شباهت را با Gerinimo با ضریب تشابه ۰/۶۳ داشت. رقم Licord پاییزه است. با توجه به نتایج بالا مشخص شد که بین تنوع ژنتیکی و تنوع جغرافیایی تطابق خوبی وجود ندارد. افزون‌بر این، ارقام مختلف پاییزه و بهاره در گروه‌های مجزا طبقه‌بندی نشده‌اند. گاهی تنوع ژنتیکی ممکن است نشان‌دهنده الگوی جغرافیایی آشکار نباشد، چرا که لاین‌های مختلف حاصل توازن بین فاکتورهای تکامل (انتخاب، مهاجرت و انحطاط ژنتیکی)، حالت‌های بسیار پیچیده از ناهمگنی‌های محیطی و عوامل تحمیلی انسان در حال و گذشته‌اند.

تشابه ۰/۸۲ دارای بیشترین شباهت ژنتیکی با KS-11 و با ضریب تشابه ۰/۵۴ دارای کمترین شباهت ژنتیکی با SLM 096 بود. رقم Gerinimo با منشأ فرانسه دیگر نمونه این گروه بود که به‌صورت پاییزه کشت می‌شود. این رقم دارای بیشترین شباهت ژنتیکی با Zarfam (ضریب تشابه ۰/۷۸) و کمترین شباهت ژنتیکی با Option504 (ضریب تشابه ۰/۶۱) بود. رقم Option504 با منشأ آلمان رقمی بهاره است، ولی در ایران به‌صورت پاییزه کشت می‌شود. Option504 بیشترین شباهت را با Colvert با ضریب تشابه ۰/۸۱ و کمترین شباهت را با Licord با ضریب تشابه ۰/۳۷ داشت. آخرین نمونه این گروه Colvert با منشأ فرانسه بود که به‌صورت پاییزه کشت می‌شود. این رقم با Option504 با ضریب تشابه ۰/۸۱ بیشترین شباهت و با Licord با ضریب تشابه



شکل ۱. نمودار درختی حاصل از تحزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های کلزا با استفاده از آغازگرهای نیمه‌تصادفی ISJ

Na12H04 و Na10D09 (شکل ۷) بود. دامنه اندازه آلل‌ها از ۳۶۷-۴۰ جفت باز بود. کوچک‌ترین قطعه مربوط به آغازگر Na14D07 با ۱۱۰-۴۰ جفت باز و بزرگ‌ترین قطعه مربوط به جایگاه Na10D09 با ۳۶۷-۲۷۵ جفت باز بود. سایر آغازگرها قطعاتی بین آغازگرهای Na14D07 و Na10D09 تکثیر کردند. ده آغازگر موجود در مجموع ۵۱ باند چندشکل (۷۰ درصد) تولید کردند. متوسط تعداد باند به‌ازای هر آغازگر ۷/۳ عدد و برای هر ژنوتیپ ۳/۵ عدد بود. متوسط تعداد باند چندشکل به‌ازای هر آغازگر ۵/۱ عدد بود. درصد چندشکلی از ۳۴ درصد برای آغازگر O110D08 با کمترین درصد چندشکلی تا ۱۰۰ درصد برای آغازگر

به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۲۱ ژنوتیپ کلزا از ۱۰ آغازگر (SSR) (Uzunova & Ecke, 1999; Westman & Kresovich, 1999) استفاده شد (جدول ۵). در میان نشانگرهای ریزماهوره مورد بررسی، یک آغازگر توالی تکراری تری‌نوکلئوتیدی و بقیه آغازگرها توالی تکراری دی‌نوکلئوتیدی داشتند. نه آغازگر از *B. napus* و یک آغازگر از *B. oleracea* (or *rapa*) جدا شده بودند. تعداد کل قطعات تکثیرشده حاصل از آغازگرهای SSR در جمعیت ۷۳ آلل و دامنه تعداد آلل‌ها بین ۵ تا ۱۱ بود. بیشترین تعداد آلل مربوط به آغازگرهای Na12A08 و Na10B11 و کمترین تعداد آلل مربوط به آغازگرهای

به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی ارقام کلزا صورت گرفت، در مجموع ۱۴۳ آلل با میانگین آللی ۱۱/۹۲ به‌ازای همه آغازگرها مشاهده شد (Moghaddam *et al.*, 2009). دامنه تغییرات PIC از ۰/۱۵ در آغازگر OI10D08 تا ۰/۳۳۸۱ در آغازگر Na10B11 متغیر بود. Na10B11 با بیشترین تعداد آلل (۱۱ آلل) دارای بالاترین PIC (۰/۳۳۸۱) بود.

Na10D09 با بیشترین درصد چندشکلی متغیر بود. میانگین میزان چندشکلی ۶۸/۵ درصد بود (جدول ۵). بیشترین تعداد باندهای چندشکل مربوط به آغازگر Na10B11 با ۱۱ باند (۱۰۰ درصد چندشکلی) و کمترین تعداد باند چندشکل متعلق به آغازگر OI10D08 با دو باند (۳۴ درصد چندشکلی) بود (جدول ۵). در مطالعه‌ای که

جدول ۵. تعداد باند تولیدشده، درصد چندشکلی و میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) هر یک از آغازگرهای SSR

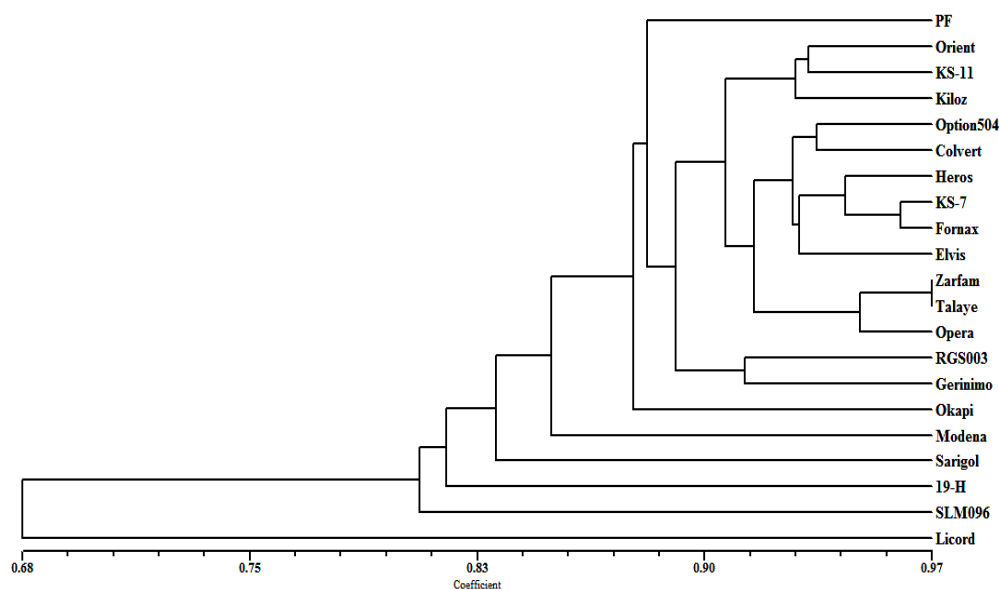
PIC	درصد چندشکلی	باندهای یک‌شکل	قطعات چندشکل	قطعات تکثیرشده	نام آغازگر	ردیف
۰/۱۸۲۸	۵۸	۳	۴	۷	Na12A07	۱
۰/۲۱۰۰	۱۰۰	۰	۵	۵	Na10D09	۲
۰/۱۷۵۰	۵۰	۳	۳	۶	Na12A01	۳
۰/۰۱۵۰	۳۴	۴	۲	۶	OI10D08	۴
۰/۳۳۸۱	۱۰۰	۰	۱۱	۱۱	Na10B11	۵
۰/۲۵۹۰	۹۱	۱	۱۰	۱۱	Na12A08	۶
۰/۰۵۵۰	۵۰	۴	۴	۸	Na12C06	۷
۰/۱۷۸۰	۱۰۰	۰	۵	۵	Na12H04	۸
۰/۰۹۶۷	۵۰	۳	۳	۶	Na14C12	۹
۰/۲۰۳۷	۵۰	۴	۴	۸	Na14D07	۱۰
۰/۱۷۱۴	۶۸/۵	۲۲	۵۱	۷۳	کل	

داشت. Option504 ژنوتیپ بعدی بود که با Colvert در یک خوشه قرار گرفت. Option504 دارای بیشترین شباهت ژنتیکی با Colvert و Heros با ضریب تشابه ۰/۹۴ و کمترین شباهت ژنتیکی را با Licord با ضریب تشابه ۰/۷۱ داشت. Colvert ژنوتیپ دیگر این زیرگروه بود که با ضریب تشابه ۰/۹۴ بیشترین شباهت ژنتیکی را با KS-7 و Fornax و کمترین شباهت ژنتیکی را با Licord با ضریب تشابه ۰/۶۶ داشت. Heros ژنوتیپ دیگر بود که بیشترین شباهت ژنتیکی را با KS-7 با ضریب تشابه ۰/۹۴ و کمترین شباهت ژنتیکی را با Licord با ضریب تشابه ۰/۶۸ دارا بود. KS-7 نمونه دیگر این زیرگروه بود که با ضریب تشابه ۰/۹۶ بیشترین شباهت ژنتیکی را با Heros و کمترین شباهت را با Licord با ضریب تشابه ۰/۶۸ داشت. ژنوتیپ بعدی Fornax بود که بیشترین شباهت ژنتیکی را با KS-7 (ضریب تشابه ۰/۹۶) و کمترین شباهت را با Licord (ضریب تشابه ۰/۶۴) داشت. رقم Elvis ژنوتیپ بعدی بود که با ضریب تشابه ۰/۹۴ بیشترین شباهت ژنتیکی را

نمودار درختی حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های کلزا با استفاده از آغازگرهای SSR در شکل ۲ نشان داده شده است. با قطع نمودار درختی در ضریب تشابه ۰/۸۶، شش گروه اصلی به‌دست آمد. گروه اول ۱۶ ژنوتیپ و گروه‌های دوم تا ششم هر کدام یک ژنوتیپ را به خود اختصاص دادند. گروه اول در ضریب تشابه ۰/۹۰ به چهار زیرگروه تقسیم شد. زیرگروه اول شامل ژنوتیپ PF بود که با ضریب تشابه ۰/۹۱ بیشترین شباهت ژنتیکی را با Orient و با ضریب تشابه ۰/۶۲ کمترین شباهت ژنتیکی را با Licord داشت. زیرگروه دوم خود شامل ۱۲ ژنوتیپ بود که اولین آنها رقم Orient بود. این رقم بیشترین شباهت ژنتیکی را با KS-11 (ضریب تشابه ۰/۹۴) و کمترین شباهت ژنتیکی را با Licord (ضریب تشابه ۰/۶۳) داشت. KS-11 ژنوتیپ دیگر این زیرگروه بود که نتایج مشابه با زیرگروه دوم داشت. Kiloژ ژنوتیپ بعدی این زیرگروه بود که بیشترین شباهت ژنتیکی را با KS-11 و Orient با ضریب تشابه ۰/۹۴ و کمترین شباهت ژنتیکی را با Licord با ضریب تشابه ۰/۶۶

سوم نیز در ضریب تشابه ۰/۸۶ به‌تنهایی یک ژنوتیپ (*Sari gol*) را به خود اختصاص داد. *Sari gol* با رقم Licord با ضریب تشابه ۰/۶۷ کمترین شباهت و با رقم RGS 003 با ضریب تشابه ۰/۸۹ بیشترین شباهت را دارا بود. گروه چهارم نیز تنها شامل 19-H بود که این ژنوتیپ با ضریب تشابه ۰/۸۶ بیشترین تشابه ژنتیکی را با Gerinimo و با ضریب تشابه ۰/۷۳ کمترین تشابه ژنتیکی را با Licord داشت. گروه پنجم شامل SLM 096 بود. این نمونه دارای بیشترین تشابه ژنتیکی با KS-11 با ضریب تشابه ۰/۸۶ و کمترین تشابه ژنتیکی با Licord با ضریب تشابه ۰/۶۳ بود. گروه ششم شامل نمونه Licord بود. این نمونه بیشترین تشابه ژنتیکی را با 19-H با ضریب تشابه ۰/۷۳ و کمترین تشابه ژنتیکی را با Orient با ضریب تشابه ۰/۷۴ داشت. گروه ششم (نمونه Licord) با نمونه‌های دیگر فاصله زیادی داشت. این مسئله در نشانگر ISJ نیز مشاهده شد. علت این فاصله زیاد را می‌توان تفاوت در سطح پلوئیدی این ژنوتیپ (این ژنوتیپ دیپلوئید (AA) و ژنوتیپ‌های دیگر آمفی دیپلوئید (AACC) هستند) دانست. *Dongre et al.* (2007) نشانگر ISSR را برای بررسی تنوع ارقام پنبه به‌کار بردند و ارقام پنبه را به دو گروه تتراپلوئید و دیپلوئید تفکیک کردند و دلیل این امر را به متفاوت بودن دو گونه و همچنین بزرگ‌تر بودن ژنوم ارقام تتراپلوئید نسبت به ارقام دیپلوئید نسبت دادند.

با Zarfam و کمترین شباهت را با Licord با ضریب تشابه ۰/۶۶ داشت. Zarfam و Talaye دو ژنوتیپ بعدی این زیرگروه بودند که با ضریب تشابه ۰/۹۷ دارای بیشترین تشابه ژنتیکی در بین تمامی ژنوتیپ‌ها بودند. هر دو ژنوتیپ یادشده دارای کمترین تشابه ژنتیکی با نمونه Licord (به‌ترتیب با ضریب تشابه ۰/۷۰ و ۰/۶۸) بودند. Opera آخرین ژنوتیپ این زیرگروه بود و بیشترین شباهت ژنتیکی را با Talaye با ضریب تشابه ۰/۹۵ داشت. این ژنوتیپ کمترین شباهت ژنتیکی را با Licord با ضریب تشابه ۰/۷۱ داشت. زیرگروه سوم شامل دو نمونه بود. RGS 003 اولین نمونه این زیرگروه بود که با ضریب تشابه ۰/۹۴ بیشترین شباهت ژنتیکی را با Fornax و کمترین شباهت ژنتیکی را با Licord با ضریب تشابه ۰/۷۱ داشت. دومین نمونه این زیرگروه Gerinimo بود که کمترین شباهت را با رقم Licord با ضریب تشابه ۰/۶۸ و بیشترین شباهت را با رقم Elvis با ضریب تشابه ۰/۹۲ داشت. زیرگروه آخر این گروه شامل یک ژنوتیپ (رقم Okapi) بود. رقم Okapi دارای بیشترین شباهت ژنتیکی با Elvis (ضریب تشابه ۰/۹۲) بود. این ژنوتیپ کمترین شباهت ژنتیکی را با Licord (ضریب تشابه ۰/۶۹) داشت. گروه دوم در ضریب تشابه ۰/۸۶ فقط شامل ژنوتیپ Modena بود. Modena بیشترین تشابه ژنتیکی را با RGS 003 با ضریب تشابه ۰/۸۹ و کمترین تشابه ژنتیکی را با Licord با ضریب تشابه ۰/۷۴ داشت. گروه

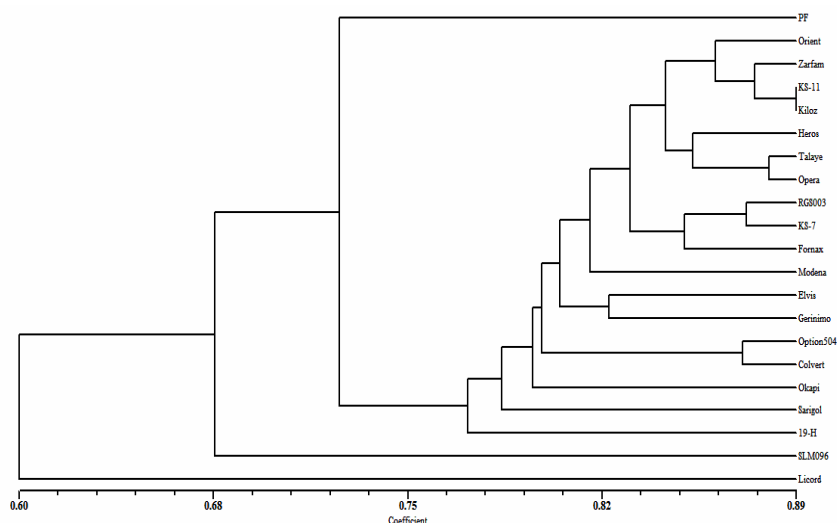


شکل ۲. نمودار درختی حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های کلزا با استفاده از آغازگرهای اختصاصی SSR

نیمه تصادفی ISJ، اختصاصی SSR و ترکیب آنها تبیین کردند که سهم مؤلفه اول به ترتیب ۱۷/۶، ۸۶/۵۵ و ۷۸/۴ درصد، سهم مؤلفه دوم به ترتیب ۹/۶، ۲/۷۸ و ۳/۱۹ درصد و سهم مؤلفه سوم ۹/۲۵، ۱/۸۲ و ۲/۱۶ درصد بود. سهم مؤلفه اول در توجیه تغییرات برای نشانگرهای SSR و ترکیب دو نشانگر تا حدودی زیاد بود. بنابراین تعدادی از آغازگرهای اختصاصی SSR در یک یا چند قسمت از ژنوم (نواحی ژن در ژنوم) تجمع یافته‌اند و در سطح ژنوم پراکنده نیستند. در داده‌های مورفولوژیک بر عکس داده‌های مولکولی، بهترین حالت زمانی است که بیشترین واریانس توسط تعداد کمی مؤلفه توجیه شود. در داده‌های مولکولی دو یا سه مؤلفه اول باید حدود ۲۰-۱۰ درصد از تغییرات مربوط به نشانگرها را توجیه کنند که از نظر آماری ممکن است برای نمایش گرافیکی مناسب نباشد، ولی از نظر ژنتیکی نشان‌دهنده نمونه‌برداری مطلوب نشانگرها از کل ژنوم است. به عبارت دیگر، زمانی که تعداد صفات یا باندها به تعداد کمی مؤلفه کاهش یابد، آغازگرهای مورد استفاده به‌طور صحیح انتخاب نشده‌اند و تعداد محدودی از کروموزوم‌ها را تحت پوشش قرار می‌دهند. در نتیجه نمی‌توانند افراد را از همدیگر به خوبی جدا کنند؛ اما اگر تعداد مؤلفه‌ها زیاد باشد، آغازگرهای مورد استفاده، کروموزوم‌های بیشتری را تحت پوشش قرار می‌دهند و نشانگر به خوبی تنوع ژنتیکی افراد را تعیین می‌کند (Siahsar *et al.*, 2010).

در این تحقیق به منظور فهم بهتر تنوع ژنتیکی از ترکیب داده‌های دو آغازگر نیز استفاده شد. بدین منظور اطلاعات حاصل از ۲۰ پرایمر موجود با هم ترکیب شدند و نمودار درختی حاصل از آنها ترسیم شد. ترکیب بیست آغازگر در مجموع ۱۸۹ باند تولید کرد که ۱۵۸ باند چندشکل (درصد چندشکلی ۸۱/۰۵) و ۳۱ باند یک‌شکل بودند. متوسط تعداد باند به‌ازای هر آغازگر، ۹/۴۵ باند و برای هر ژنوتیپ ۹ باند بود. متوسط تعداد باند چندشکل به‌ازای هر آغازگر ۷/۹ باند بود (جدول‌های ۵ و ۶). نمودار درختی حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های کلزا با استفاده از ترکیب آغازگرهای ISJ و SSR در شکل ۳ نشان داده شده است. با قطع نمودار درختی در ضریب تشابه ۰/۷۷ چهار گروه اصلی به دست آمد. PF تنها ژنوتیپ تشکیل‌دهنده گروه اول بود. گروه دوم با ۱۸ ژنوتیپ بیشترین زیرگروه را به خود اختصاص داد. SLM 096 و Licord به ترتیب ژنوتیپ‌های تشکیل‌دهنده گروه‌های سوم و چهارم بودند. بیشترین شباهت ژنتیکی مربوط به ژنوتیپ‌های KS-11 و Kiloz بود. ژنوتیپ‌های Licord و Option504 کمترین شباهت ژنتیکی (۰/۳۷) را به خود اختصاص دادند.

نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی ۲۱ ژنوتیپ کلزا با استفاده از آغازگرهای نیمه تصادفی ISJ، اختصاصی SSR و ترکیب آنها در جدول ۶ نشان داده شده است. سه مؤلفه اول در مجموع ۳۶/۴، ۹۱/۲ و ۸۳/۷۶ درصد از تغییرات کل داده‌ها را به ترتیب برای نشانگرهای



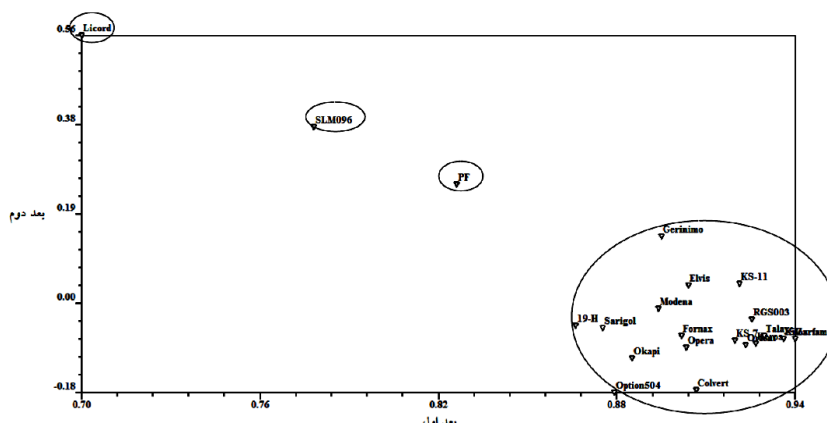
شکل ۳. نمودار درختی حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های کلزا با استفاده از ترکیب آغازگرهای نیمه تصادفی ISJ و اختصاصی SSR

جدول ۶. مقادیر ویژه، نسبت واریانس تبیین‌شده توسط هر مؤلفه و واریانس جمعی تبیین‌شده حاصل از تجزیه مؤلفه‌های اصلی نشانگرهای اختصاصی SSR و نیمه‌تصادفی ISJ و ترکیب آنها

مؤلفه	مقادیر ویژه	درصد واریانس تبیین‌شده	واریانس جمعی تبیین‌شده
مؤلفه اول ISJ	۱/۱	۱۷/۶	۱۷/۶
مؤلفه دوم ISJ	۰/۶	۹/۶	۲۷/۲
مؤلفه سوم ISJ	۰/۵۷	۹/۲۵	۳۶/۴
مؤلفه اول SSR	۱۸/۱۷	۸۶/۵۵	۸۶/۵۵
مؤلفه دوم SSR	۰/۵۸	۲/۷۸	۸۹/۳۴
مؤلفه سوم SSR	۰/۳۸	۱/۸۲	۹۱/۲
مؤلفه اول ISJ و SSR	۱۶/۴۶	۷۸/۴	۷۸/۴
مؤلفه دوم ISJ و SSR	۰/۶۶	۳/۱۹	۸۱/۶
مؤلفه سوم ISJ و SSR	۰/۴۵	۲/۱۶	۸۳/۷۶

خوشه‌ای بود و تفاوت‌های اندک مشاهده‌شده، به دلیل این است که دو یا سه مؤلفه اول نمی‌توانند نشان‌دهنده تنوع کل متغیرهای اولیه (تعداد کل باندها) باشند.

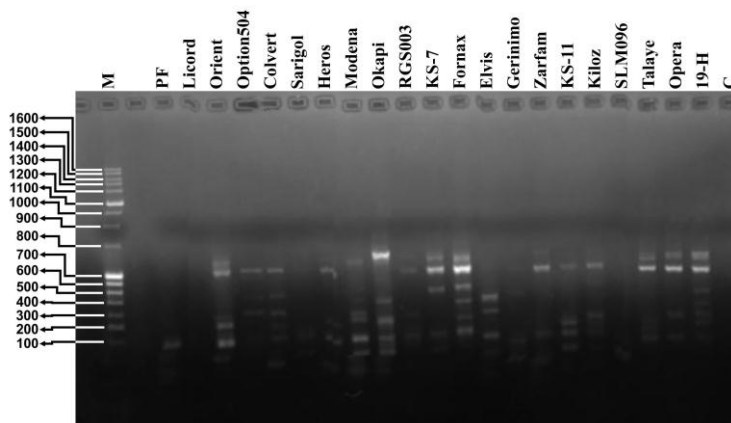
تجزیه به مؤلفه اصلی نتایج تجزیه خوشه‌ای را تأیید کرد (شکل ۴). گروه‌بندی براساس دو بردار اول تجزیه مؤلفه اصلی تا حد زیادی مشابه با گروه‌بندی تجزیه



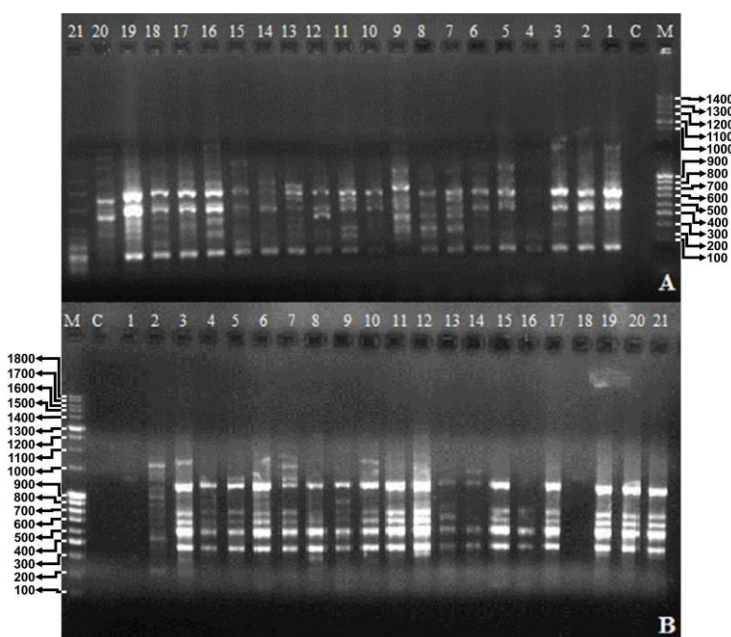
شکل ۴. نمودار دوبعدی مؤلفه اول و دوم حاصل از تجزیه مؤلفه‌های اصلی برای تلفیق دو آغازگر ISJ و SSR

درختی حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های کلزا با استفاده از ترکیب آغازگرهای ISJ و SSR ژنوتیپ‌ها را به چهار گروه اصلی تقسیم کرد (شکل ۳). در هر سه نمودار دو رقم Licord و SLM 096 با اینکه منشأ یکسانی دارند، دو گروه مجزا را به خود اختصاص دادند و فاصله ژنتیکی زیادی با سایر نمونه‌ها داشتند. از این‌رو در برنامه‌های به‌نژادی آینده می‌توان از آنها استفاده کرد؛ چرا که ارقامی که در کنار هم قرار گرفته‌اند قرابت ژنتیکی زیادی داشتند و آنهایی که گروه‌های مستقلی تشکیل داده‌اند فاصله ژنتیکی زیادی با دیگر ارقام داشتند. از این‌رو از این ارقام می‌توان در برنامه‌های هیبریداسیون برای تولید ارقام برتر (هیبرید) استفاده کرد.

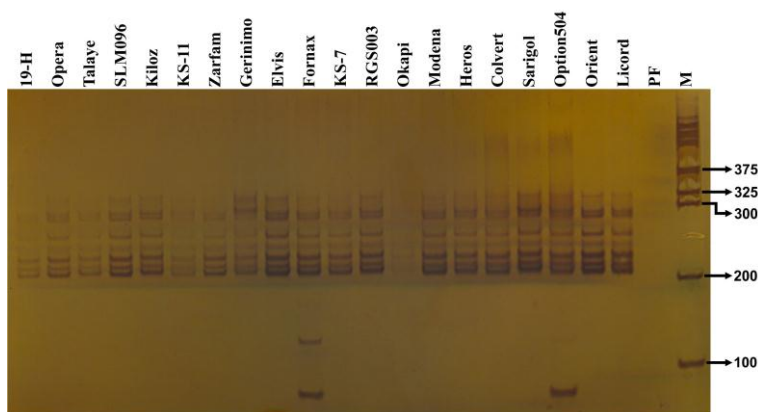
تنوع ژنتیکی زیادی بین ۲۱ رقم کلزای مورد مطالعه مشاهده شد. ده آغازگر ISJ و ده آغازگر SSR از مجموع ۱۸۹ باند تکثیرشده، ۱۵۸ باند چندشکل تولید کردند. دندروگرام حاصل از تلفیق آغازگر اختصاصی SSR با آغازگر تصادفی ISJ شباهت زیادی با دندروگرام جداگانه حاصل از هر یک آغازگرها داشت. با این حال گروه‌بندی ارقام با آغازگر اختصاصی SSR نسبت به آغازگر نیمه‌تصادفی ISJ شباهت بیشتری با دندروگرام حاصل از روش تلفیقی داشت. دندروگرام حاصل از داده‌های ISJ ژنوتیپ‌ها را به سه گروه اصلی دسته‌بندی کرد (شکل ۱). دندروگرام حاصل از نشانگرهای SSR ژنوتیپ‌ها را به شش گروه اصلی دسته‌بندی کرد (شکل ۲). نمودار



شکل ۵. الگوی تکثیر DNA در ژنوتیپ‌های مختلف کلزا با استفاده از آغازگر IT18-2 (M، نشانگر مولکولی وزنی؛ C، کنترل منفی).



شکل ۶. مقایسه الگوی تکثیر DNA ژنوتیپ‌های مختلف کلزا (۱ تا ۲۱ به ترتیب PF، Licord، Orient، Option 504، Sari gol، Talaye، SLM096، Kiloz، KS-11، Zarfam، Gerinimo، Elvis، Fornax، KS-7، RGS003، Okapi، Modena، Herros، Colvert، Opera و 19-H هستند) با استفاده از آغازگرهای نیمه‌تصادفی IT و ET (A، آغازگر IT15-36؛ B، آغازگر ET15-35؛ M، نشانگر مولکولی وزنی؛ C، کنترل منفی).



شکل ۷. الگوی تکثیر DNA ژنوتیپ‌های مختلف کلزا با استفاده از آغازگر اختصاصی Na12H04 (M، نشانگر مولکولی وزنی؛ C، کنترل منفی)

می‌شوند احتمالاً در ژن‌های رمزشونده برای خصوصیات مورفولوژیک قرار ندارند و بنابراین استفاده از آغازگرهایی که بر پایه نواحی رمزشونده طراحی شوند، پیشنهاد می‌شود. با توجه به اینکه آغازگرهای گروه ISJ برای کاهش حجم کار در مطالعات پژوهشی مناسب‌اند، پیشنهاد می‌شود که از آغازگرهای IT این گروه به‌علت دقت و کارایی بیشتر در این‌گونه مطالعات استفاده شود. قرار گرفتن ارقام با منشأ یکسان در گروه‌های مختلف نشان داد که تنوع ژنتیکی از الگوی جغرافیایی تبعیت نمی‌کند، چرا که ژنوتیپ‌های مختلف حاصل توازن بین عوامل تکامل (انتخاب، مهاجرت و انحطاط ژنتیکی)، حالت‌های بسیار پیچیده‌ای از ناهمگنی‌های محیطی و عوامل تحمیلی انسان در حال و گذشته‌اند.

مقایسه دو نشانگر اختصاصی SSR و نیمه‌تصادفی ISJ نشان داد که آنها ابزار مناسبی برای بررسی تنوع ژنتیکی ارقام کلزا هستند و دقت و کارایی زیادی دارند. با توجه به تأثیر نپذیرفتن این نشانگرها از عوامل محیطی می‌توان بدون توجه به مراحل رشد گیاه، آنها را در هر مرحله از رشد در آزمایشگاه بررسی کرد. استفاده از آغازگرهای نیمه‌تصادفی در مطالعه تنوع ژنتیکی ارقام کلزا مناسب بود و می‌توان از نتایج به‌دست‌آمده برای سایر مطالعات ژنتیکی و به‌نژادی کلزا استفاده کرد. از آنجا که آغازگرهای SSR از نواحی غیر رمزشونده طراحی شده‌اند درحالی‌که خصوصیات مورفولوژیک حاصل توالی‌های بیان‌شونده و برهم‌کنش آنهاست، قسمت‌هایی از ژنوم که به‌وسیله این آغازگرها تکثیر

REFERENCES

- Dellaporta, S. C., Wood, F. & Hicks, J. B. (1983). A Plant DNA miniprep. Version II. *Plant Mol Biol Rep*, 1(4), 19- 21.
- Devos, K. M. & Gale, M. D. (1992). The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theor Appl Genet*, 84, 567-572.
- Dongre, A. B., Bhandarkar, M. & Banerjee, Sh. (2007). Genetic diversity in tetraploid and diploid cotton (*Gossypium spp.*) using ISSR and microsatellite DNA markers. *Indian J Biotechnol*, 6, 349-353.
- Erlich, H. A. (1989). *PCR Technology: Principle and Applications for DNA Amplification*. Stockton Press, New York, USA.
- Gawel, M., Wisniewska, I. & Rafalski, A. (2002). Semi-specific PCR for evaluation of diversity among cultivars of Wheat and Triticale. *Cell Mol Biol Lett*, 7, 577- 582.
- Food and Agriculture Organization (FAO). (2007). Available at <http://www.faostat.fao.org/site/567/efault.aspx>. Last access on 01.12.2008.
- Hasan, M., Seyis, F., Badani, A. G., Pons-Kuhnemann, J., Friedt, W., Luhs, W. & Snowdon, R. J. (2006). Analysis of genetic diversity in the *Brassica napus* L. gene pool using SSR markers. *Genet Resour Crop Evol*, 53, 793- 802.
- Junjian, N., Colowit, P. M. & Mackill, D. (2002). Evaluation of genetic diversity in rice subspecies by microsatellite markers. *Crop Sci*, 42, 601-607.
- Kashi, Y., King, D. & Soller, M. (1997). Simple sequence repeats as a source of a quantitative genetic variation. *J Trends Genet*, 13(1), 74-78.
- Kimber, D. S. & McGregor, D. I. (1995). *Brassica Oilseed: Production and Utilization*. CAB Intl., UK.
- Kumar, L. S. (1999). DNA marker in plant improvement. *Biot Adv*, 17(2-3), 143-182.
- Lit, M. & Luty, J. A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actine gene. *American J Human Genet*, 44(3), 397-401.
- Manifesto, M. M., Schlatter, A. S., Hopp, H. E., Suarez, E. Y. & Dubcovky, J. (2001). Quantitative evaluation of genetic diversity germplasm using molecular markers. *Crop Sci*, 41, 682-690.
- Moghaddam, M., Mohammadi, S. A., Mohebalipour, N., Toorchi, M., Aharizad, S. & Javidfar, F. (2009). Assessment of genetic diversity in rapeseed cultivars as revealed by RAPD and microsatellite markers. *African J Biotech*, 8 (14), 3160-3167.
- Moghaieb, R. E. A., Mohammed, E. H. K. & Youssief, S. S. (2014). Genetic diversity among some canola cultivars as revealed by RAPD, SSR and AFLP analyses. *3 Biot*, 4, 403-410.
- Mohammadi, S. A. & Prasanna, B. M. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants: Salient statistical tools and consideration. *Crop Sci*, 43, 1235-1248.
- Nowoseiński, J., Podyma, W. & Sielska, D. N. W. (2002). Molecular research on the genetic diversity of Polish varieties and landraces of *Phaseolus cocclineus* L. and *Phaseolus vulgaris* L. using the RAPD and AFLP methods. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 7, 753-762.
- Odonougue, L. S., Souza, E., Tanksley, S. D. & Sorrell, M. E. (1999). Relationships among North American oat cultivars based on restriction fragment length polymorphism. *Crop Sci*, 34, 1251-1258.

19. Pejic, I., Ajmone-Marsan, P., Morgante, M., Kozumplick, V., Castiglioni, P., Taramino, G. & Motto, M. (1998). Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs and AFLPs. *Theor Appl Genet*, 97, 1248-1255.
20. Plieske, J. & Struss, D. (2001). Microsatellite markers for genome analysis in Brassica. I. Development in *Brassica napus* and abundance in Brassicaceae species. *Theor Appl Genet*, 102, 689- 694.
21. Qu, C., Hasan, M., Lu, K., Liu, L., Liu, X., Xie, J., Wang, M., Lu, J., Odat, N., Wang, R., Chen, L., Tang, Z. & Li, J. (2012). Genetic diversity and relationship analysis of the *Brassica napus* germplasm using simple sequence repeat (SSR) markers. *Afr J Biotechnol*, 11(27), 6923-6933.
22. Rafalski, A., Gidzinska, M. & Wisniewska, I. (1997). PCR-based system for evolution of relationships among Maize inbreeds. P: 106-111. Tsafarries, A. S. (ed). *Genetics and Biotechnology of Maize and Sorghom*. Society of Chemistry, Cambridge. UK.
23. Rafalski, A., Madej, L., Wisniewska, I. & Gawelo, M. (2002). The genetic diversity of components of rye hybrids. *Cell Mol Biol Lett*, 7, 471-475.
24. Rohlf, F. J. (1998). ntsys-pc. *Numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.5*. Exeter Software, Setauket, NY.
25. Saal, B., Plieske, J., Hu, J., Quiros, C. F. & Struss, D. (2001). Microsatellite markers for genome analysis in Brassica. II. Assignment of rapeseed microsatellites to the A and C genomes and genetic mapping in *Brassica oleracea* L. *Theor Appl Genet*, 102, 695-699.
26. Salahvarzi, E., Salahvarzi, A. & Drikvand, R. (2013). Assessment of genetic diversity in (*Lens culinaris* M.) using ISJ marker. *Ann Biol Res*, 4(7), 157-160.
27. Senior, M. L. & Heun, M. (1993). Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a CT primer. *Genome*, 36, 884-889.
28. Sharma, K. K., Crouch, J. H. & Hash, C. T. (2002). Application of Biotechnology for crop improvement prospect and constraints. *J. Plant Sci*, 163(3), 381-395.
29. Siahshar, B. A., Allahdoo, M. & Shahsavand Hasani, H. (2010). Evaluation of Genetic Diversity of Tritipyrum, Triticale and Wheat Lines through RAPD and ISJ Markers. *Iran J Ffield Crop Sci*, 41(3), 555-568.
30. Soengas, P., Velasco, P., Padilla, G. & Ordás, A. (2006). Genetic relationships among *Brassica napus* crops based on SSR markers. *Hort Sci*, 41(5), 1195-1199.
31. Thiyam-Holländer, U., Eskin, N. A. M. & Matthäus, B. (2012). *Canola and Rapeseed: Production, Processing, Food Quality, and Nutrition*. CRC Press. 374 P.
32. Uzunova, M. I. & Ecke, W. (1999). Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellite in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Breed*, 118, 323-326.
33. Weining, S. & Langridge, P. (1991). Identification and mapping of polymorphism in cereals based on polymerase chain reaction. *Theor Appl Genet*, 82, 209-216.
34. Westman, A. & Kresovich, S. (1999). Simple sequence repeat (SSR)-based marker variation in *Brassica nigra* genebank accessions and weed populations. *Euphytica*, 109, 85-92.
35. Yang, Y. X., Wu, W., Zheng, Y. L., Chen, L., Liu, R. J. & Huang, C. Y. (2007). Genetic diversity and relationship among safflower (*Carthamus tinctorius* L.): Analysis by intersimple sequence repeats (ISSR). *Genet Resour Crop Evol*, 54, 1043-1051.