ارزیابی تنوع ژنتیکی برخی ارقام کلزا با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR

Evaluation of Genetic Variation in some Canola Cultivars Using ISSR Markers

الهه میرزائی دلبری[۱]، حمیدرضا نوریزدان[۲]*، جعفر وطن‌دوست[۳]، فرشته بیات شاه‌پرست[۴] و محمد آرمین[۵]

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۹/۲۵

چکیده

بررسی تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی بین و درون جمعیت‌ها، گونه‌ها و افراد مختلف یکی از اهداف اصلی بسیاری از تحقیقات به‌نژادی است. بدین منظور نشانگرهای مولکولی به‌طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در این مطالعه برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در بین ۲۰ رقم کلزا، از ۹ آغازگر ISSR استفاده گردید. از بین این آغازگرها، ۸ آغازگر ISSR بیش‌ترین چندشکلی را ایجاد نمودند. متوسط تعداد باند چندشکل به ازای هر آغازگر و هر رقم، به‌ترتیب، ۸/۷۷ و ۳/۹۵ عدد برآورد شد. هم‌چنین بیش‌ترین محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) مربوط به آغازگر MM6 (۰/۷۸) بود. نمودار درختی حاصل از تجزیه خوشه‌ای با نرم‌افزار NTSYS به روش UPGMA و ماتریس ضریب تشابه ساده رسم شد. بر این اساس رقم‌ها در شش گروه مجزا قرار گرفتند. هم‌چنین نمودار دو بعدی با استفاده از روش تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (PCA) ترسیم و نتایج حاصل از گروه‌بندی آن با روش تجزیه خوشه‌ای مقایسه شد. گروه‌بندی دو روش تطابق زیادی با یکدیگر داشتند. بیش‌ترین تشابه ژنتیکی بین دو رقم Elite و Rinbow مشاهده شد. تنوع ژنتیکی بین ارقام کلزا از الگوی جغرافیایی آن‌ها تبعیت نمی‌کرد.

واژه‌های کلیدی: کلزا، محتوای اطلاعات چندشکلی، تجزیه خوشه‌ای، ISSR

---

[۱]، [۲] و [۴]. به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد و استادیاران گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر

[۳]. استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار

[۵]. دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار، سبزوار

*: نویسنده مسوول Email: hrnooryazdan@pgu.ac.ir

مقدمه

کلزا با نام علمی .*Brassica napus* L از خانواده چلیپیان می‌باشد که معمولاً به‌صورت پاییزه و بهاره کشت می‌گردد. این گیاه خودگشن است که میزان خودگشنی در آن ۶۷ تا ۷۸ درصد می‌باشد (قدمی، ۱۳۸۹). کلزا پس از سویا و پنبه دانه، رتبه سوم را از نظر تولید دانه روغنی را به خود اختصاص داده است *باراک* (Barrak, 2006)، که حدود ۱۳ درصد روغن خوراکی جهان را تأمین می‌کند *کاکایی* و همکاران (Kakaei *et al.*, 2009) کلزا به‌دلیل کشت و کار آسان، مقاومت به کم‌آبی، مقاومت به سرما، تحمل شوری و عملکرد مطلوب در مقایسه با سایر محصولات، صفات زراعی ویژه و ثبات نسبی عملکرد، قابلیت جایگزینی در تناوب کشت به‌صورت پائیزه و بهاره، توقع اندک نسبت به مواد غذایی موجود در خاک، سازگاری با شرایط اقلیمی مناطق مختلف کشور، توانایی بالقوه بالایی برای تأمین قسمت عمده روغن مورد نیاز کشور را دارا است (آلیاری و همکاران، ۱۳۷۹؛ رامئه، ۱۳۸۳). همگام با رشد جمعیت و بهبود سطح زندگی به خصوص در کشورهای در حال توسعه، تقاضا برای روغن‌ها و پروتئین‌های گیاهی که از محصولات فرعی دانه‌های روغنی می‌باشد، افزایش یافته است و از این‌رو یکی از مهم‌ترین مسائل مورد بحث در کشاورزی و صنعت کشورها تولید دانه‌های روغنی می‌باشد (*کاکایی* و همکاران، 2009). با توجه به اهمیت گیاه کلزا، انجام اقدامات اصلاحی مانند مطالعه تنوع ژنتیکی و بررسی نقش آن در پیشبرد برنامه‌های آتی اصلاح نباتات مانند افزایش روغن و مقاومت به آفات و بیماری‌های این گیاه بسیار مهم می‌باشد (غفاری‌پور، ۱۳۸۳). تنوع، اساس اکثر برنامه‌های اصلاح نباتات می‌باشد و میزان موفقیت، به وجود تنوع ژنتیکی قابل قبول و متعاقب آن گزینش وابسته است. لذا وجود تنوع ژنتیکی بالا برای هر صفتی از این نظر یک اصل مهم در اصلاح نباتات تلقی می‌شود *کومار* (Kumar, 1999). تنوع ژنتیکی گیاهان طی هزاران سال ایجاد شده و در طبیعت به‌صورت پایدار باقی مانده است. توده‌های بومی یک گیاه، ژرم‌پلاسم مناسبی برای برنامه‌های اصلاحی می‌باشند. بانک‌های ژن با جمع‌آوری، شناسایی، ارزیابی دقیق و حفاظت از ذخایر توارثی و توده‌های بومی گیاه، اطلاعات مورد نیاز محققان را تأمین می‌کنند. کشاورزی و تولید غذا نیز بستگی به استفاده از ژنوتیپ‌های گیاهی پر محصول دارد. روش‌های متداول اصلاح گیاهان زراعی بر اساس گزینش ژنوتیپ‌های مطلوب از بین جوامع با تنوع ژنتیکی می‌باشد. بنابراین آگاهی از تنوع ژنتیکی جمعیت‌ها پیش شرط اصلی و اولین گام در اصلاح گیاهان به‌شمار می‌رود *فارسی* و همکاران (Farsi *et al.*, 1998). موفقیت برنامه‌های اصلاحی بستگی به درک کامل از تنوع ژنتیکی درون و بین منابع ژنتیکی یا ژرم‌پلاسم موجود دارد. این اطلاعات اصلاح‌گران را قادر می‌سازد که جمعیت‌های مختلف، والدینی را انتخاب کنند *اسمایل* و همکاران (Esmail *et al.*, 2008).

در اکثرجمعیت‌های طبیعی تنوع ژنتیکی برای بیشتر صفات مورد مطالعه وجود دارد، در صورت عدم وجود تنوع متخصصان اصلاح نباتات با انجام تلاقی‌های هدفمند تنوع مورد نظر را به‌وجود می‌آورند (غفاری‌پور، ۱۳۸۳). نشانگرهای مولکولی به واسطه‌ی مستقل بودن از عوامل محیطی می‌توانند روش مناسبی برای ارزیابی تنوع در گیاهان باشند *گوپتا* و همکاران (Gupta *et al.*, 2000). روش‌های بررسی تنوع ژنتیکی بر پایه‌ی PCR از جمله نشانگرهای RAPD، AFLP، SSR و ISSR به دلیل سهولت، هزینه پائین، سرعت و عدم نیاز به کاوشگرهای رادیواکتیو امروزه به‌طور گسترده‌ای در بررسی تنوع و فاصله ژنتیکی در بین ارقام مختلف گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند *سیکارد* و همکاران (Sicard *et al.*, 2005). ISSR اولین بار توسط *زتکیوویچ* و همکاران (Wang *et al.*, 2008) ارائه گردید. این نشانگر قابلیت تکثیر بین جایگاه‌های ریزماهواره را داشته و به اطلاعات قبلی از توالی ژنوم موردنظر، نیاز ندارد. این تکنیک بیشتر مزایای AFLP و ریزماهواره را با جامعیت RAPD ترکیب کرده است *مورینو* و همکاران (Moreno *et al.*, 1998). هدف از این پژوهش بررسی تنوع ژنتیکی ارقام کلزا با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: بذر ۲۰ رقم اصلاح شده کلزای بهاره و پاییزه (جدول ۱) از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی تهیه گردید. به‌منظور کشت بذر ارقام کلزا گلدان‌ها به نسبت مساوی ۱:۱:۱ از شن، ماسه و کود دامی پر شدند. در هر گلدان ۱۰ تا ۱۵ بذر کلزا در عمق ۲ سانتی‌متری قرار گرفت و روی بذرها به‌وسیله‌ی ماسه‌ی نرم پوشانده شد.

استخراج DNA

بعد از کشت بذور در گلخانه و گذشت حدود دو هفته، دو برگ- تازه و جوان از ۳ گیاه مربوط به یک رقم جهت استخراج DNA استفاده شد. برای استخراج DNA از کیت استخراج DNA، تهیه شده از شرکت سیناکلون، استفاده شد و کمیت و کیفیت DNA استخراج شده با دو روش نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز تعیین گردید.

جدول ۱: مشخصات ارقام کلزای مورد استفاده در آزمایش

Table 1: Characteristics of Canola varieties used in the experiment

مبدأ Origin	نوع Type	رقم Cultivar	ردیف Row	مبدأ Origin	نوع Type	رقم Cultivar	ردیف Row
آلمان Germany	پاییزه Autumn	اس ال ام ۰۴۶ SLM046	11	استرالیا Australia	پاییزه Autumn	هایلولا۳۰۸ Hyola308	1
آلمان Germany	پاییزه Autumn	لیکورد Licord	12	کانادا Canada	بهاره Spring	هایلولا۴۳۲ Hyola432	2
فرانسه France	پاییزه Autumn	اکاپی Okapi	13	فرانسه France	پاییزه Autumn	الیت Elite	3
فرانسه France	پاییزه Autumn	الوایز Elvise	14	استرالیا Australia	پاییزه Autumn	رینبو Rinbow	4
ناشناس Unknown	بهاره Spring	ظفر Zafar	15	کانادا Canada	بهاره Spring	هایلولا۵۰ Hyola50	5
آلمان Germany	پاییزه Autumn	ارینت Orient	16	ناشناس Unknown	بهاره Spring	هایسان ۱۱۰ Hysyn110	6
ناشناس Unknown	بهاره Spring	دلگان Delgan	17	آلمان Germany	بهاره Spring	آرجی اس۰۰۳ RGS003	7
آلمان Germany	بهاره Spring	ساری گل Sari gol	18	دانمارک Denmark	پاییزه Autumn	اسوچوت شات Swchot shot	8
ناشناس Unknown	بهاره Spring	اس یو ان ۱۴ SUN14	19	سوئد Sweden	پاییزه Autumn	اوپرا Opera	9
فرانسه France	پاییزه Autumn	ان کا.اکتانس Nk.oktans	20	کانادا Canada	بهاره Spring	هایلولا۴۲۰ Hyola420	10

تکثیر قطعات DNA

جهت انجام PCR و بررسی تنوع ژنتیکی ارقام مختلف کلزا از ۹ آغازگر ISSR استفاده شد که مشخصات آن‌ها در جدول ۲ قابل مشاهده است. درصد GC، دمای اتصال آغازگرها با نرم‌افزار Gene runner بررسی شد. بنابراین از بین ده ها آغازگر این ۹ آغازگر انتخاب شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر DNA (۴۰ng)، ۲ میکرولیتر آغازگر، ۱ میکرولیتر dNTP (10mM)، ۱/۵میکرولیتر کلریدمنیزیم (50Mm)، ۰/۲ میکرولیتر Taq پلیمراز (500unit)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10x) و ۱۶ میکرولیتر آب دیونیزه بود. تکثیر در دستگاه ترموسایکلر شامل مراحل واسرشتگی مقدماتی به‌مدت ۲ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، واسرشتگی به‌مدت ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال به‌مدت ۴۵ ثانیه که دمای اتصال با توجه به نوع پرایمر از ۴۰ تا ۵۴ درجه سانتی‌گراد متفاوت بود، گسترش به‌مدت ۹۰ ثانیه در ۷۲ درجه و گسترش نهایی به‌مدت ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. مراحل واسرشتگی تا گسترش ۳۰ مرتبه تکرار و در نهایت DNAی ارقام مورد بررسی با استفاده از آغازگرهای ISSR تکثیر گردیدند. الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TAE ۰/۵x و با ولتاژ ثابت ۹۰ به‌مدت ۱۲۰ دقیقه انجام شد. مشاهده و عکسبرداری ژل متأثر شده از رنگ اتیدیوم بروماید در زیر نور UV به کمک دستگاه ژل‌نگار صورت گرفت.

آنالیز آماری

پس از ثبت اطلاعات، باندهای حاصل از هر آغازگر بر روی ژل براساس هم‌ردیفی باندها و به‌صورت صفر (عدم وجود باند) و یک (وجود باند) امتیازدهی شدند. از ضریب تشابه تطابق ساده برای محاسبه تشابه بین رقم‌ها استفاده گردید و گروه‌بندی رقم‌ها با استفاده ازتجزیه خوشه‌ای بر مبنای میانگین حسابی فاصله‌ها UPGMA با نرم‌افزار NTSYSpc ver. 2.02 محاسبه و نمودار خوشه‌ای آن ترسیم گردید. تجزیه به مولفه‌های اصلی PCA و رسم نمودار دوبعدی بای پلات براساس دو مولفه اول و دوم برای ماتریس تشابه با استفاده از نرم‌افزار NTSYS رسم شد. میزان اطلاعات چندشکلی PIC از طریق فرمول $PIC=\Sigma\ [2\ pi\ (1-pi)]/n$ صورت گرفت *پوول* و همکاران (Powell *et al.*, 1996). که در آن، pi فراوانی باند iام تقسیم بر تعداد ژنوتیپ‌هاست، n تعداد نوارهای ایجاد شده (محمدی، ۱۳۸۱) و شاخص نشانگری (MI= Marker Index) برای هر آغازگر با استفاده از رابطه MI=PIC×EMR محاسبه گردید (*پوول* و همکاران، 1996) که EMR از نسبت نشانگرهای چند شکل به کل نشانگرها، به‌دست آمد.

نتایج

از تعداد ۹ آغازگر ISSR که در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده گردید، ۸ آغازگر ISSR بیش‌ترین چندشکلی را ایجاد نمودند. ۸ آغازگر ISSR در مجموع ۷۹ باند چندشکل تولید نمودند که تقریباً ۸۰ درصد از کل ۹۹ باند تولید شده را شامل گردید (شکل ۱).

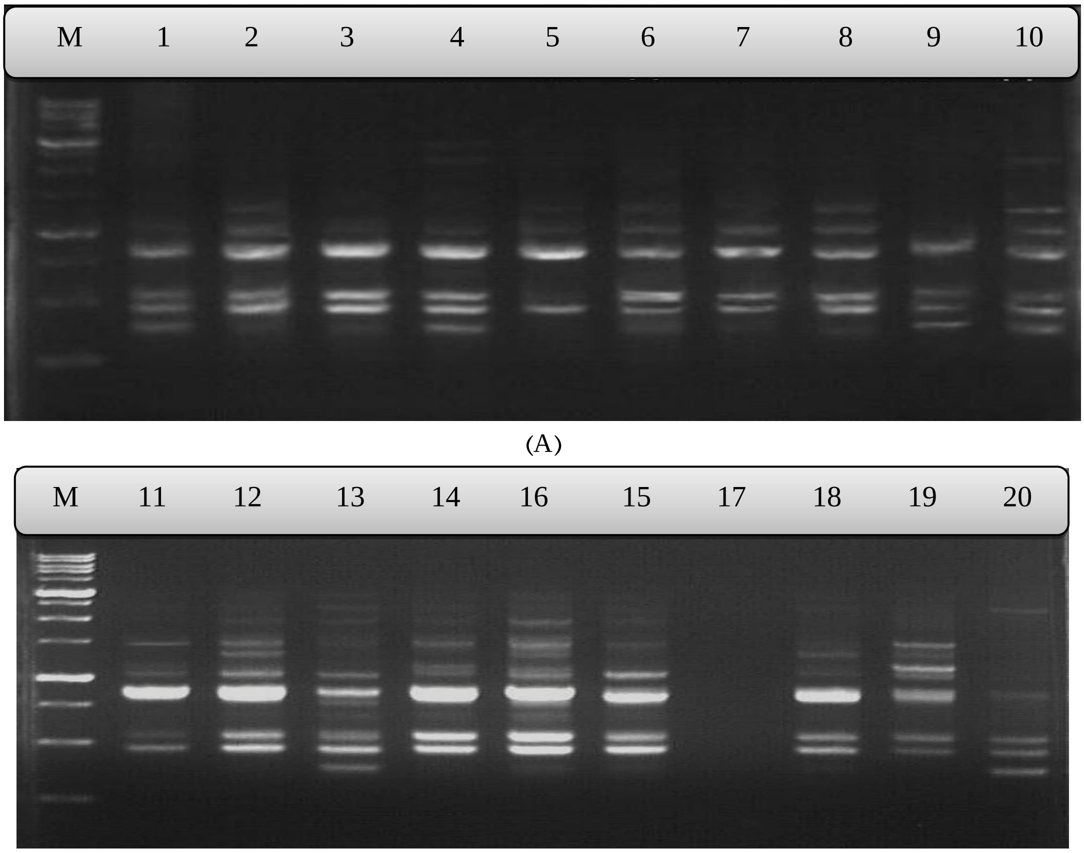
در این مطالعه متوسط تعداد باند به ازای هر آغازگر ۱۱ و برای هر رقم ۴/۹۵ بود (جدول ۴-۱). هم‌چنین متوسط تعداد باند چندشکل به ازای هر آغازگر ۸/۷۷ و به ازای هر رقم ۳/۹۵ بود، که بیانگر کارآیی مناسب آغازگرهای ISSR به‌کار رفته می‌باشد. در این تحقیق محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) برای هر آغازگر ISSR نیز محاسبه شد (جدول ۴-۱). میانگین PIC برای کل آغازگرها (۰/۵۴) بود (جدول ۴-۱).

شاخص نشانگر (MI) معیاری برای تعیین کارآیی نشانگر در تخمین چندشکلی می‌باشد (اشرف مهرابی و همکارن، ۱۳۹۳). بیش‌ترین مقدار شاخص نشانگر مربوط به آغازگر HB10 (۱۰/۴۷) بود که نشان‌دهنده قدرت تفکیک بالای این آغازگر در مقایسه با سایر آغازگرها می باشد و کم‌ترین مقدار آن مربوط به آغازگر HB13 (صفر) بود. میانگین شاخص نشانگر ۵/۴۱ محاسبه شد (جدول ۳).

جدول ۲: مشخصات آغازگرهای ISSR مورد استفاده در آزمایش و متغیرهای وابسته

Table 2: Characteristics of ISSR primers used in the experiment and the dependent variables

ردیف Row	نام آغازگر Primer name	توالی آغازگر Primer sequence	دمای اتصال (سانتی‌گراد) TM (°C)	تعداد باندها Total bands	باندهای چندشکلی Poly Morphic bands	تعداد باندهای مونومورف Mono Morphic bands	درصد چندشکلی Poly Morphic (%)	اطلاعات چندشکلی (PIC)	شاخص نشانگر (MI)
1	Hb09	5`-GTG TGT GTG TGT GG-3`	42	10	9	1	99	0.63	5.69
2	Hb10	5`-GAG AGA GAG AGA CC-3`	44	14	14	0	100	0.74	10.47
3	Hb11	5`-GTG TGT GTG TGT CC-3`	44	13	10	3	76.9	0.33	3.34
4	Hb12	5`-CAC CAC CAC GC-3`	40	12	8	4	66.6	0.47	3.82
5	Hb13	5`-GAC GAC GAC GC-3`	40	11	0	11	0	0	0
6	Hb14	5`-CTC CTC CTC GC-3`	40	12	12	0	100	0.64	7.76
7	MM3	5`-CTC TCT CTC TCT CTC TG-3`	52	11	11	0	100	0.59	6.54
8	MM5	5`-GTG TGT GTG TGT GTG TT-3`	54	6	5	1	83.3	0.64	3.2
9	MM6	5`-TCT CTC TCT CTC TCT CG-3`	48	10	10	0	100	0.78	7.87
مجموع Total				99	79	20	-	4.86	48.71
میانگین Mean				11	88.77	2.22	79.6%	0.540	5.41



(A)

(B)

شکل ۱: الگوهای باندی حاصل از الکتروفورز DNAهای تکثیر شده ۲۰ – ۱ ارقام مختلف کلزا با آغازگر Hb14 در ژل آگارز ۱/۵درصد، M: بیانگر نشانگر اندازه ۱kb

Fig. 1: Bands patterns obtained based on electrophoresis of duplicated DNAs 1-20 different cultivars using *Hb14* Primer on 1.5% Agarose gel, M: Represents 1kb primer

جدول ۳: ضریب همبستگی کوفنتیک برای الگوریتم‌های UPGMA، Single و Complete

Table 3: Cophenetic correlation coefficient for UPGMA, Single and Complete algorithms

الگوریتم Algorithm	تطابق ساده Simple matching	جاکارد Jacad	دایس Dice
UPGMA	0.76	0.76	0.75
Single	0.67	0.71	0.70
Complete	0.72	0.69	0.68

جدول ۴: مقادیر ویژه، نسبت واریانس توجیه شده توسط هر مولفه و واریانس تجمعی حاصل از تجزیه به مولفه‌ها بر اساس نشانگرهای ISSR

Table 4: Eigenvalues, the proportion of variance explained by each component and cumulative variance obtained from principle component analysis based on ISSR primers

مولفه اصلی Principal components	مقادیر ویژه Eigenvalues	درصد واریانس Variance (%)	واریانس تجمعی Cumulative variance
مولفه اول First component	0.92	15.07	15.07
مولفه دوم Second component	0.68	11.22	26.29
مولفه سوم Third component	0.63	10.30	36.60

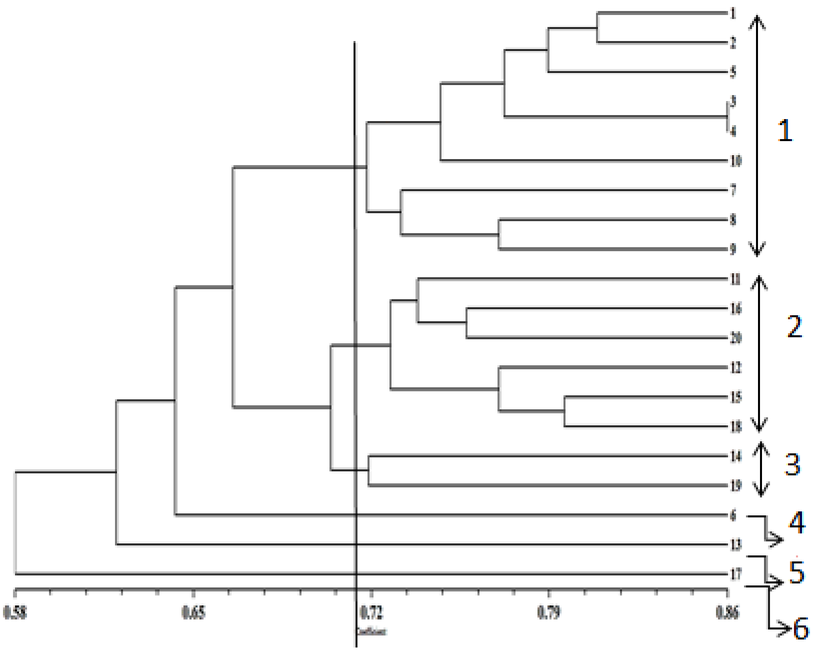
تجزیه خوشه‌ای

در این تحقیق به‌منظور گروه‌بندی ارقام کلزا بر اساس آغازگرهای ISSR، دندروگرام با استفاده از نرم‌افزار NTSYS (2.02) ترسیم شد. هم‌چنین سه ضریب تشابه دایس، جاکارد و ضریب تطابق ساده برای ارقام محاسبه گردید. در انتخاب دندروگرام از بین روش‌های مختلف، ابتدا براساس بالاترین

ضریب همبستگی و در صورت شباهت شکل دندروگرام و نزدیک بودن ضریب همبستگی، دندروگرامی انتخاب گردید که در دامنه تشابه خود، درصد تشابه بالاتری را نشان می‌داد. براساس نتایج حاصله، ضریب همبستگی کوفنتیک مربوط به ضریب تشابه تطابق ساده و جاکارد از ضریب تشابه دایس بیشتر بود (جدول ۴). دامنه ضریب تشابه در ماتریس شباهت داده‌ها براساس ضریب تشابه تطابق ساده بیشتر از جاکارد بود و به‌دلیل اینکه اختلاف چندانی بین مقدار ضریب همبستگی کوفنتیک آن‌ها نبود، لذا ماتریس تشابه حاصل از ضریب تشابه تطابق ساده و دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA مبنای انتخاب قرار گرفت.

براساس نتایج به‌دست آمده ضریب همبستگی کوفنتیک r=۰/۷۶ به‌دست آمد که نشان‌دهنده برازش نسبتاً خوب و همبستگی متوسط بین ماتریس‌های تشابه و نمودار خوشه‌ای نهایی براساس ضریب تشابه تطابق ساده می‌باشد.

برای بررسی میزان شباهت بین رقم‌های مختلف و گروه‌بندی آن‌ها، با استفاده از داده‌های حاصل از ماتریس فاصله براساس عدم تشابه تطابق ساده، دندوگرام رقم‌های مختلف در برنامه NTSYS ترسیم شد. طبق این نتایج، دندگرام حاصل، ژنوتیب‌ها را دقیقاً با منشأ آن‌ها گروه‌بندی نکرد. دندوگرام به‌دست آمده از ۹۹ آلل تکثیر شده با ۹ آغازگر، با استفاده از ماتریس فاصله تطابق ساده ،این ارقام را به شش گروه اصلی تقسیم نمود. بیش‌ترین تعدادارقام مربوط به گروه ۱ بود. در گروه‌های ۲ و ۳ به‌ترتیب هرکدام ۶ و ۲ رقم قرار گرفت. گروه‌های ۴ و ۵ و ۶ هر کدام به تنهایی یک رقم در خود جای دادند (شکل ۲).



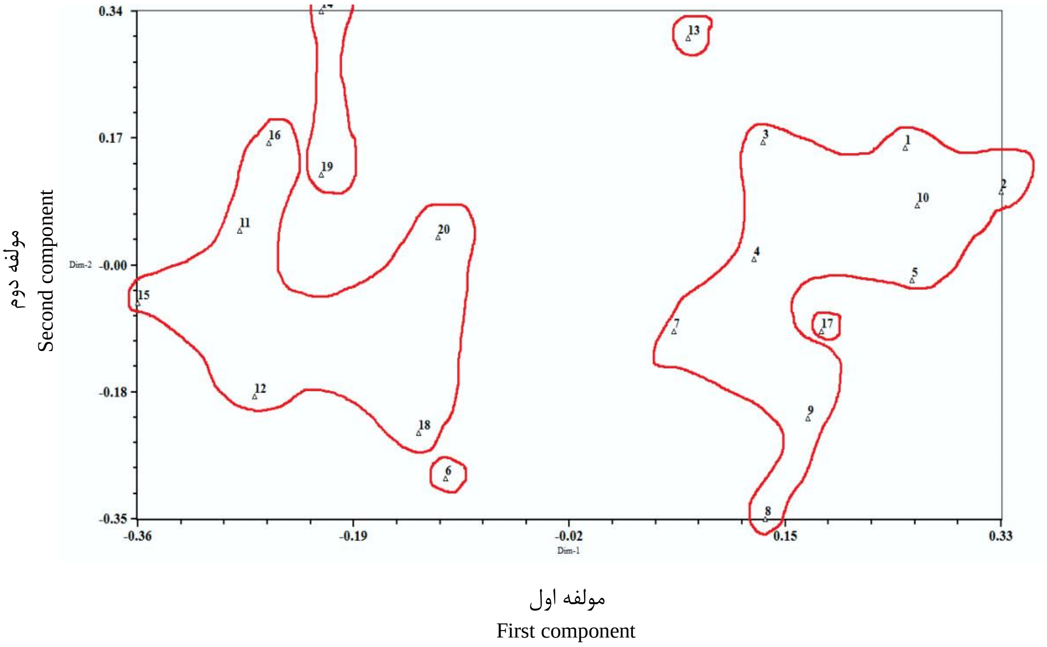
شکل ۲: دندروگرام برای ۲۰ رقم کلزا حاصل از الگوی پلی‌مورفیسم با آغازگرهای ISSR با نرم‌افزار NTSYS

Fig. 2: Dendrogram for the 20 Canola cultivars obtained from the polymorphism pattern based on ISSR primers using NTSYS Software

در این تحقیق برای تعیین نحوه پراکنش نشانگر ISSR در ارقام کلزا، آزمون تجزیه به مولفه‌های اصلی انجام گرفت. در این مطالعه سهم مولفه‌ی اول به تنهایی ۱۵/۰۷درصد بود، مولفه دوم ۱۱/۲۲ درصد و مولفه سوم ۱۰/۳۰ درصد از کل تغییرات را توجیه می‌کند، این مقدار نشان می‌دهد دو مولفه‌ی اول نتوانسته‌اند همه‌ی اطلاعات به‌دست آمده را در برگیرند (جدول ۴). لذا این اطلاعات نشان‌دهنده‌ی پراکنش گسترده‌ی این نشانگرها روی ژنوم کلزا می‌باشد.

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و رسم نمودار بای پلات رقم‌ها

به‌منظور بررسی پراکندگی رقم‌ها و هم‌چنین فاصله و تنوع ژنتیکی بین آن‌ها، نمودار بای پلات بین ۲۰ رقم مختلف کلزا با استفاده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی براساس دو مؤلفه اصلی اول و دوم با استفاده از برنامه NTSYS ترسیم شد (شکل ۳).



شکل ۳: نمودار دوبعدی داده‌های حاصل از تجزیه به مولفه‌های اصلی براساس ماتریس تشابه تطابق ساده برای ۲۰ رقم کلزا
Fig. 3: Biplot diagram of the data obtained from the principle component analysis based on the simple matching similarity matrix for the 20 Canola cultivars

بحث

نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان داد که نشانگرهای ISSR به‌خوبی در سطح ژنوم پراکنده شده‌اند و کارآیی مناسبی در ارزیابی تنوع ژنتیکی ارقام مختلف کلزا را دارند. تولید تعداد باند زیاد و میزان چندشکلی بالا در ارقام مورد مطالعه نشان‌دهنده کارآیی بالای نشانگرهای ISSR در ارزیابی تنوع ژنتیکی ارقام مختلف کلزا بود.

در این تحقیق بیش‌ترین تعداد باند چندشکل مربوط به آغازگر HB10 با ۱۴ باند (۱۰۰ درصد چندشکلی) و کم‌ترین تعداد باند چندشکل مربوط به آغازگر MM5 با ۶ باند بود که ۸۳/۳ درصد چندشکلی نشان داد. هرچه عدد تعداد باند چندشکل به ازای هر آغازگر بیشتر باشد کارآیی آن نشانگر در گیاه مورد مطالعه بالاتر است (گنج خانلو و همکاران، ۱۳۹۱). *هاولیکوا* و همکاران (Havlickova *et al.*, 2014) در بررسی تنوع ژنتیکی ۹۴ ژنوتیپ کلزا از مارکر ISSR استفاده کردند که این نشانگر در کل ۵۳ باند تشکیل داد و میانگین درصد چندشکلی ۹۰ درصد بود. *عبدالمجید* و همکاران (Abdelmigid *et al.*, 2011) بررسی تنوع ژنتیکی ۱۰ رقم کلزا با استفاده از ۵ آغازگر ISSR را انجام دادند. این نشانگر در کل ۹۴ باند تشکیل داد که ۷۶ تای آن چندشکل بودند. دامنه‌ی باندهای چندشکل از ۴ تا ۳۲ متغیر بود که میانگین آن‌ها برابر با ۱۵/۸ باند بود. *مقدم* و همکاران (Moghaddam *et al.*, 2009) نشان دادند که در بررسی تنوع ژنتیکی ارقام کلزا با استفاده از تعداد ۳۸ آغازگر RAPD مجموعاً ۲۵۰ باند چندشکل گزارش نمودند. در نتایج *محمود احمد* (Mahmoud Ahmed, 2012) در بررسی تنوع ژنتیکی ارقام مختلف کلزا با استفاده از تعداد ۶ آغازگر RAPD و تعداد ۴ آغازگر ISSR به ترتیب ۴۲ باند و ۲۳ باند چندشکل مشاهده نمودند. در این تحقیق بیش‌ترین PIC مربوط به آغازگر MM6 (۰/۷۸) بود. کم‌ترین PIC مربوط به آغازگر HB13 (صفر) بود. هرچه میزان محتوای اطلاعات چندشکلی بالاتر باشد نمایانگر قدرت تفکیک بیشتر نشانگر می‌باشد (*رودر* و همکاران، 1998). *صفری* و همکاران (Safari *et al*,. 2013) با استفاده از مارکر مولکولی ISSR تنوع ژنتیکی ارقام مختلف کلزا مورد بررسی قرار دادند. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) در این تحقیق از ۰/۱۸ تا ۰/۴۶ متغیر بود. میانگین PIC برای کل آغازگرها برابر ۰/۳۵ بود که این نتایج حاکی از کارآمد بودن نشانگرها بود. *طالبی* و همکاران (Talebi *et al.*, 2011) تنوع ژنتیکی ۴۷ ژنوتیپ کلزا را با استفاده از ۱۲ آغازگر ISSR بررسی نمودند، میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی برابر با ۰/۴۹ بود که بیانگر کارآیی بالای آغازگرهای مورد استفاده بود.

بنابراین از آنجا که آغازگرهای به‌کار رفته در این تحقیق از PIC خوبی (میانگین ۰/۵۴) برخوردار بودند، می‌توان از این آغازگرها برای بررسی سایر رقم‌های گیاه کلزا استفاده نمود.

به‌طورکلی در این تحقیق چون سهم سه مولفه در مجموع ۳۶/۶۰ درصد از کل تغییرات رادر ژنوم کلزا توجیه کرد و دو مولفه‌ی اول نتوانسته‌اند همه‌ی اطلاعات به‌دست آمده را در

برگیرند، لذا این اطلاعات نشان‌دهنده‌ی پراکنش گسترده‌ی این نشانگرها روی ژنوم کلزا می‌باشد.

نتیجه‌گیری کلی

در این مطالعه نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای براساس ضریب تشابه تطابق ساده و ماتریس تشابه، نشان داد که دو رقم Elite و Rinbow که هر دو بهاره بودند، از نظر ژنتیکی فاصله زیادی با هم داشته و بنابراین، احتمالاً می‌توان جهت تولید نتاج، در برنامه‌های اصلاحی به‌عنوان والدین مورد تلاقی در ایجاد هتروزیس بالاتر از آن‌ها استفاده کرد. نتایج به‌دست آمده از این تحقیق نشان داد که نشانگرهای ISSR کارآیی مناسبی در ارزیابی تنوع ژنتیکی ارقام مختلف کلزا دارند. با توجه به این‌که آغازگرهای HB10، MM6 و HB14 دارای بیش‌ترین محتوای اطلاعات چندشکلی و شاخص نشانگر بودند، علاوه‌بر آن چندشکلی بسیار بالایی (۱۰۰ درصد) نشان دادند، بنابراین می‌توان آن‌ها را به‌عنوان آغازگرهای مفید و کارآمد برای بررسی تنوع ژنتیکی ارقام مختلف کلزا معرفی و انتخاب کرد. با توجه به تحقیقات انجام شده در ایران بهترین کاربرد در این زمینه با استفاده از تنوع وسیع مشاهده شده براساس نتایج گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها و یا ارقام، آن‌هایی که فاصله ژنتیکی زیادتری از همدیگر دارند را انتخاب و در دورگه‌گیری از آن‌ها جهت اهداف اصلاحی خاص استفاده نمود. مسلماً با این کار درنتاج، هتروزیس و تفکیک زیادتری مشاهده خواهد شد که موجب تسریع در روند اصلاحی می‌شود. به‌منظور بررسی بیشتر در مورد تنوع ژنتیکی بین ارقام کلزا، پیشنهاد گردید تا در برنامه‌های آتی از رقم‌های متنوع و نیز اطلاعات مورفولوژیک استفاده گردد.

منابع

جهت مطالعه منابع به صفحه‌های ۱۶-۱۷ متن انگلیسی مراجعه شود.