پژوهش‌های علوم کشاورزی پایدار/جلد ۲/شماره ۲/تابستان ۱۴۰۱/ ص ۱۴-۱
https://www.sarj.iauk.ac.ir

ارزیابی تنوع ژنتیکی بعضی از ارقام کلزا با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی–زراعی و مولکولیRAPD

منصور سلجوقیان پور*[۱]، سید مهدی جوادزاده[۲]، محسن محسنی[۳]

۱- استادیار، گروه مهندسی کشاورزی، واحد ایرانشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، ایرانشهر، ایران

۲- استادیار، گروه مهندسی کشاورزی، واحد ایرانشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، ایرانشهر، ایران

۳- استادیار، گروه مهندسی کشاورزی، واحد شهید سلیمانی، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

* ایمیل نویسنده مسئول: m.saljooghian.p@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۳۰- تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۳۱)

چکیده

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ارقام کلزا، آزمایشی به صورت بلوک‌های کامل تصادفی با ۹ رقم کلزا در ۳ تکرار در شهرستان ایرانشهر اجرا شد. پس از کشت، استخراج DNA با استفاده از روش CTAB یا دلاپورتا با کمی تغییرات انجام گرفت و برای تکثیر از ٦ جفت آغازگر RAPD استفاده شد. همچنین در پایان فصل رشد گیاهان، صفاتی همچون صفات ارتفاع گیاه، وزن تر بوته، وزن خشک بوته، مقدار عملکرد و درصد روغن دانه اندازه گیری شدند. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که ارقام اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ دارند. همچنین بین صفات مورد مطالعه همبستگی مثبت و معنی داری وجود داشت به‌طوری که با افزایش هر متغیر، متغیر دیگر نیز افزایش می‌یابد. تجزیه خوشه‌ای داده‌های مورفولوژیکی-زراعی ارقام کلزا را در چهار گروه اصلی و تجزیه خوشه‌ای داده‌های مولکولی ارقام کلزا را در سه گروه اصلی قرار داد. ارقام قرار گرفته در هر گروه دارای مشابهت ژنومی بیشتر و ارقام قرار گرفته در گروه‌های مختلف دارای اختلافات بیشتر ژنتیکی هستند. در تجزیه به مؤلفه‌های اصلی داده‌های مولکولی دو مولفه اول نتوانستند همه اطلاعات به دست آمده را در برگیرند لذا این اطلاعات نشان‌دهنده پراکنش گسترده این نشانگرها روی ژنوم کلزا می‌باشند و می‌توانند سطح وسیعی از آن را پوشش دهند. نتایج این تحقیق نشان داد که با توجه به تنوع مشاهده شده در ارقام و براساس نتایج گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها می‌توان ژنوتیپ‌هایی از گروه‌هایی که با همدیگر فاصله ژنتیکی زیادتری دارند را انتخاب و از آنها جهت اهداف اصلاحی خاص استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: کلزا، تنوع ژنتیکی، نشانگر مورفولوژیکی-زراعی، نشانگر مولکولی RAPD

مقدمه

تنوع ژنتیکی به عنوان مهم‌ترین عامل بقاء موجودات از جمله گیاهان در برابر تغییرات شرایط محیطی و آفات است. تعیین سطح تنوع ژنتیکی گونه‌های گیاهی و خویشاوندان وحشی آنها، نقش اساسی در اصلاح موفقیت‌آمیز ارقام زراعی دارای مقاومت پایدار به تنش‌های زیستی و متحمل به تنش‌های غیرزیستی، ایفا می کند. تنوع ژنتیکی معمولاً با محاسبه فاصله ژنتیکی یا شباهت ژنتیکی که دلالت بر تفاوت ها یا از ارزیابی صفات مختلف یا بررسی مولکول های زیستی که شباهت هایی در سطح ژنتیکی دارد، بر اساس داده های حاصل سنجیده می شود(Amini *et al.*, 2008; Cavalieri *et al.*, 2016) جهت بررسی تنوع و ساختار ژنتیکی ژنوتیپ‌های گیاهی از نشانگرهای متفاوتی از جمله نشانگرهای مورفولوژیک استفاده می‌شود. اما با توجه به اینکه تعداد صفات مورفولوژیک محدود بوده و تحت تأثیر سن گیاه و محیط قرار دارند، امروزه از روش‌های مطمئن‌تری مانند نشانگرهای مولکولی در کنار نشانگرهای مورفولوژیک استفاده می‌شود (Fares *et al.*, 2009). استفاده از این روش‌ها، نه تنها دقت، قدرت، سرعت اندازه‌گیری و برآوردها را افزایش داده، بلکه موجب تولید حجم عظیم داده‌ها شده است (Mohammadi *et al.*, 2003). با توجه به اهمیت گیاه کلزا، انجام اقدامات اصلاحی مانند مطالعه تنوع ژنتیکی و بررسی نقش آن در پیشبرد برنامه‌های آتی اصلاحی مانند افزایش روغن و مقاومت به آفات و بیماری‌های این گیاه بسیار مهم می باشد (Kakaei *et al.*, 2014 & Braatz *et al.*, 2018). در تحقیقی تنوع ژنتیکی ارقام و لاین‌های زمستانه کلزا با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD و SSR با ترکیب داده‌های حاصل از این دو نشانگر، ۲۰ ژنوتیپ مورد بررسی را در ۵ گروه قرار دادند (Hedayati & Samiezadeh, 2016). در تحقیقی دیگر برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در بین ارقام کلزا، از ۹ آغازگر ISSR استفاده کردند. از بین این آغازگرها، ۸ آغازگر ISSR بیشترین چندشکلی را ایجاد نمودند. تنوع ژنتیکی از الگوی جغرافیایی تبعیت نمی‌کرد و ژنوتیپ‌های ایرانی و خارجی در گروه‌های مجزا طبقه‌بندی نشدند. این موضوع قرابت و خویشاوندی ژنوتیپ‌های ایرانی و خارجی را نشان داد (Mahjoob *et al.*, 2014). در پژوهشی روی ارزیابی تنوع ژنتیکی میان لاین‌های خالص کلزا نشان داده شد که نشانگر SSR قادر به جداسازی لاین‌ها بر اساس رنگ پوسته دانه است و رنگ پوسته یکی از مهم‌ترین صفات برای اصلاح بهبود کیفیت کلزا است (Hu *et al.*, 2012). همچنین نتایج ارزیابی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های کلزا بر اساس نشانگرهای فنوتیپی و مولکولی حاکی از آن است که دندروگرام بدست آمده برای صفات مورفوبیوشیمیایی و نتایج RAPD برای هر دو مورد به مقدار جزئی ژنوتیپ‌ها را بر اساس منشاء جغرافیایی‌شان گروه‌بندی می نماید (Marjanovic *et al.*, 2009). در تحقیقی به منظور بررسی تنوع ژنتیکی در ۲۴ ژنوتیپ کلزا، از ۱۰ جفت آغـازگر ریزماهوارهای با توجه به مطالعات قبلی استفاده کردند. نتایج حاصل نشان داد که متوسط محتـوای 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 ۰/٤۱ محاسبه شد. تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های مولکولی با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA، ارقام کلزا را در ۳ گروه اصلی قرار داد. 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(Vigoruroux *et al.*, 2005). در تحقیقی به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۱۰ رقم کلزا با استفاده از ۲ پرایمر اختصاصی ISSR در مجموع تعداد ۱۱٤ قطعه DNA بدست آمد. با توجه به اهداف این تحقیق می‌توان به این نتایج رسید که بررسی تنوع ژنتیکی ارقام مختلف کلزا با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR امکان‌پذیر بوده و با استفاده از این نشانگر می‌توان ارقام مورد بررسی را به گروه‌های مختلف تقسیم بندی کرد. همچنین به وسیله فاصله ژنتیکی به دست آمده بین ارقام، با توجه به درصد تشابه آن ها می‌توان ارقام با فاصله ژنتیکی بیشتر را جهت استفاده در مراکز تحقیقاتی به عنوان ارقام والدی، جهت تولید بذور هیبرید با هتروزیس مطلوب استفاده نمود (Cunmin *et al.*, 2012). تنوع ژنتیکی بین ۲۵ رقم کلزا با استفاده از آغازگر تصادفی RAPD در پژوهشی مورد بررسی قرار گرفت. آنها از ۱۹ آغازگر استفاده کردند و ٦ عدد را به عنوان بهترین آغازگرها جهت تشخیص ارقام معرفی کردند. آنها توانستند تشابه و تنوع بین ارقام را به خوبی نشان دهند به گونه‌ای که ارقامی که در یک گروه قرار گرفتند دارای صفات زراعی مشابه بودند. آنها بیان کردند که نشانگر RAPD با صفات ویژه‌ای در ارتباط بوده و می‌تواند در برنامه‌های به‌نژادی برای گزینش ژنوتیپ مطلوب به‌کار گرفته شود (Fazeli et al., 2008). در بررسی تنوع ژنتیکی ارقام کلزا با استفاده از صفات مورفولوژیکی-زراعی و نشانگرهای مولکولی، تفاوت‌های معنی‌داری بین ارقام مورد نظر در همه صفات مورد مطالعه، مشاهده شد. استفاده از تجزیه خوشه‌ای ارقام را در سه گروه قرار داد. نتایج این تحقیق نشان داد که تنوع بالایی درون و بین ارقام وجود دارد (Asghari *et al.*, 2011). در تحقیقی دیگر نشانگر RAPD را جهت شناسایی نشانگرهایی که بتواند برای گزینش مقادیر اندک اسید لینولنیک در گیاه کلزا مورد استفاده قرار گیرد را بر روی ۱۱۹ لاین دابل‌هاپلوئید حاصل از کشت میکروسپور بررسی کردند و از این بین توانستند ۵ آغازگر RAPD مرتبط با صفت اسید لینولنیک را شناسایی کنند (Javidfar et al., 2003). در مطالعه دیگری بر روی ارقام کلزا همبستگی مثبت و معنی‌دار درصد روغن با وزن هزار دانه را گزارش کردند در حالی که این صفت با صفات عملکرد دانه، تعداد خورجین در بوته، عملکرد بیولوژیکی، تعداد شاخه های فرعی و قطر ساقه همبستگی منفی و معنی‌داری داشت. همچنین نتایج اثر مستقیم و بالای وزن هزار دانه را بعد از درصد روغن بر روی عملکرد نشان داد در حالی که همبستگی آن با عملکرد منفی و ناچیز بود و بنابراین وزن هزار دانه به عنوان یک معیار انتخاب معرفی شد (Majidi *et al.*, 2016). به هر حال هدف از این مطالعه ارزیابی تنوع ژنتیکی بعضی از ارقام مختلف

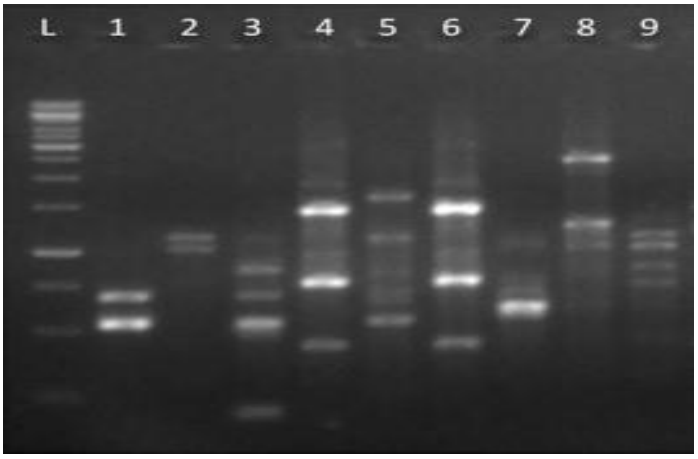
زراعی کلزا با استفاده از نشانگرهای مورفولوژیکی-زراعی و نشانگر مولکولی RAPD و به‌دست آوردن بهترین ارقام مناسب کلزا در منطقه ایرانشهر می‌باشد. آگاهی از جنبه‌های مختلف مولکولی و مورفولوژیکی-زراعی، ما را در تعیین استراتژی‌های بهره‌برداری، اصلاح و اهلی‌سازی یاری می‌کند.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی برخی از ارقام زراعی کلزا، بذور تعداد ۹ رقم کلزای زراعی شامل ارقام Option500، Karaj1، Nafis، Zafar، Sarigol، Delgan، Hyola401، RGS003 و Hyola420 در آزمایشی به‌صورت بلوک‌های کامل تصادفی در ۳ تکرار در سال زراعی ۹۹-۹۸ در مزرعه‌ای در شهرستان ایرانشهر کشت شدند. پس از کشت بذور ارقام مختلف، بعد از ۲۰ تا ۲۵ روز در مرحله ۸ برگی، استخراج DNA با استفاده از روش CTAB یا (Dellaporta *et al.*, 1993) با کمی تغییرات انجام شد در این روش تغییر یافته، از پلی ونیل پرولیدین (PVP) و از NACL 5M استفاده شد. کمیت و کیفیت نمونه‌ها با روش الکتروفورز ژل آگارز ۸ درصد و اسپکتروفتومتری تعیین شد. رقیق سازی لازم با توجه به غلظت هر نمونه جهت استفاده در واکنش‌های PCR انجام گردید. در مرحله بعد، واکنش زنجیره ای پلیمراز PCR با استفاده از آغازگرهای RAPD مطابق با دستورالعمل‌های موجود انجام شد. استفاده از نشانگر RAPD در این مطالعه به دلیل عدم نیاز به اطلاعات اولیه در مورد ردیف‌های DNA برای طراحی و ساخت آغازگرها و امکان بررسی همزمان چندین جایگاه در ژنوم نمونه ها و همچنین عدم نیاز به کاوشگر مورد استفاده قرار گرفت. بنابراین بعد از تعیین کیفیت DNA های استخراج شده، تنها نمونه‌های باکیفیت خوب انتخاب و رقیق‌سازی لازم با توجه به غلظت هر نمونه جهت استفاده در واکنش‌های PCR انجام گردید. برای تکثیر PCR از ٦ جفت آغازگر RAPD تهیه شده از شرکت فرمنتاز استفاده گردید (Powell *et al.*, 1996). این آغازگرها قادر به تکثیر ژنوم ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بودند (جدول ۱). هر واکنش تکثیر ۱۵ میکرولیتری عبارت بود از ۸/٤ µL آب مقطر استریل، ۱/۵ µL بافر واکنش، ۰/۳٤ µL کلرید منیزیم ۵۰ میلی مولار، ۰/۳ µL مخلوط نوکلئوتیدی ۱۰ میلی مولار، ۱ µL آغازگر ۱۰ میکرومولار، یک واحد تک پلیمراز و ۲ µL DNA با غلظت ۱۲۰ نانوگرم که با استفاده از دستگاه ترموسایکلر عمل PCR انجام شد.

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای RAPD مورد استفاده

ردیف	نام پرایمر	توالی پرایمر (′3 → ′5)	اندازه قطعات تکثیری (bp)
۱	RABD-06	GAGACGCACA	۱۲۵۰-۳۰۰
۲	RABD-09	AGCGTCACTC	۱۶۰۰-٤۰۰
۳	RABD-10	GCTGAGGTCA	۱۵۰۰-۳۰۰
٤	RABD-13	CCCAAGGTCC	۲۰۰۰-۵۰۰
۵	RABD-15	TCAGGGAGGT	۱۳۰۰-۵۰۰
٦	RABD-18	CTTCACCCGA	۱۲۰۰-۵۰۰



شکل ۱- الگوی باندی آغازگر RABD-13

محصولات PCR توسط الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد و بافر TAE 0.5 X تحت ولتاژ ۹۰v به مدت ۳ ساعت جداسازی شده و باندهای تکثیر شده با محلول اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و توسط دستگاه مستندسازی ژل تصویربرداری شد (شکل ۱). به منظور تجزیه داده‌ها، در ابتدا برای تشکیل ماتریس فاصله، باندهای حاصل از تکثیر قطعات ژنوم ژنوتیپ‌ها با استفاده از هر آغازگر بعنوان داده‌های اولیه تشکیل شد و سپس مورد بررسی قرار گرفتند. بنابراین برای 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. برای بررسی کارایی نشانگر مولکولی RAPD بکار گرفته شده در این تحقیق، از پارامترهای تنوع ژنتیکی بدست آمده از جمله میزان کل تنوع بدست آمده (PIC) شاخص چند شکلی اطلاعات بدست آمده، تعداد کل باندهای تکثیر شده توسط هر نشانگر و درصد پلی‌مورفیسم و تحلیل دندروگرام بدست آمده باندها استفاده شد. به منظور تجزیه داده‌ها، در ابتدا برای تشکیل ماتریس فاصله، باندهای حاصل از تکثیر ژنوتیپ‌ها با استفاده از هر آغازگر بعنوان داده‌های اولیه با اعداد یک برای وجود باند و صفر برای عدم وجود باند تشکیل شد و سپس مورد بررسی قرار گرفتند. داده‌های بدست آمده از این نشانگر مولکولی با استفاده از نرم افزار NTSYS تجزیه شدند. در این راستا روش‌های آماری چند متغیره از قبیل تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مؤلفه‌های اصلی از متداول‌ترین روش‌های آماری مورد استفاده می‌باشد.

همچنین در پایان فصل رشد گیاهان، صفاتی همچون صفات ارتفاع گیاه، وزن تر بوته, وزن خشک بوته، مقدار عملکرد و درصد روغن دانه به عنوان صفات مورفولوژیکی-زراعی اندازه‌گیری و مورد ارزیابی قرار گرفتند. پس از جمع آوری کلیه داده‌های مورد بررسی، قبل از انجام تجزیه‌های آماری آزمون نرمال بودن داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد. همچنین با استفاده از نرم‌افزار SPSS اقدام به تجزیه‌ی واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها گردید. مقایسات میانگین داده‌ها با استفاده آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد. به کمک آزمون همبستگی پیرسون ضرایب همبستگی بین صفات محاسبه گردید. علاوه بر این، عمل تجزیه خوشه‌ای (به روش وارد Ward) نیز با استفاده از نرم‌افزار SPSS برای داده‌های آزمایش انجام شد. جداول و نمودارها به کمک نرم افزارهای Word و Excel ترسیم گردید.

نتایج

تجزیه مورفولوژیکی-زراعی

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که ژنوتیپ‌های مورد مطالعه براساس صفات مورفولوژیکی-زراعی اندازه‌گیری شده از روی ژنوتیپ‌ها ، اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۱٪ دارند (جدول ۲). همچنین آزمون مقایسات میانگین‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن بر روی میانگین ژنوتیپ‌ها بر اساس صفات مختلف مورفولوژیکی-زراعی انجام شد. آزمون چند دامنه‌ای دانکن روی ژنوتیپ‌ها برای هر صفت مورد مطالعه بصورت جداگانه در همان سطح معنی‌دار بودن آزمون F یعنی ۱٪ انجام گرفت.

بـر اسـاس ایـن مطالعـات رقـم‌هـای Sarigol، Hyola401 و Hyola420 بیشترین مقدار طول گیاه، وزن تـر، وزن خشـک، عملکـرد دانـه و روغـن را نسبت به سایر ارقام داشـتند و ارقـام Option500 و Zarfam کمترین مقدار این صفات را دارا بودند. در تحقیقـاتی مشـاهده شـد کـه رقـم Hyola401 و Sarigol داری بیشترین میزان عملکـرد دانـه و رقـم زرفـام کمتـرین عملکـرد دانـه را در بـردارد کـه در پژوهش حاضر نیز دیده شد همین ارقام نسـبت بـه دیگـر ارقـام برتـری دارنـد (Roostabaghi *et al.*, 2012).

جدول ۲- تجزیه واریانس ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بر اساس صفات مختلف مورفولوژیکی-زراعی

درجه آزادی	طول گیاه (سانتی‌متر)	وزن تر (گرم)	وزن خشک (گرم)	روغن (درصد)	عملکرد دانه (کیلوگرم در هکتار)
۲	۱۰/۰۲**	۱/٤٤**	۰/۹۸*	۱۵/۰۵**	٤٥٦٥١/٤٦**
۸	٤٧٦/۲۱**	٤۳۸/۳٤**	۱۹/٦٤**	٦۷/۷٤**	۷٥٦٥٤۰/۹٥**
۱٦	۲/٥۰**	۰/۸۱**	۰/٤۳**	۰/۸۳**	۹۷۸۲/٥۸**

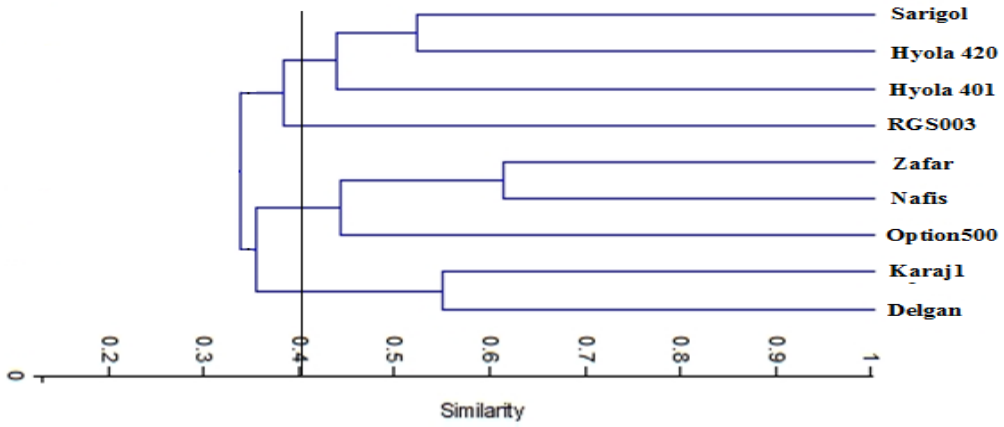
ns و * ،** به‌ترتیب عدم معنی‌دار، ۵ درصد معنی‌دار و ۱ درصد معنی‌دار

همبستگی ساده فنوتیپی بین صفات مورد مطالعه روی ژنوتیپ‌های کلزا از همبستگی مثبت و معنی‌داری برخوردار بود (جدول ۳). به‌طوری که با افزایش هر متغیر، متغیر دیگر نیز افزایش می‌یابد. عملکرد که یکی از شاخص‌های حائز اهمیت در تولید است، در پژوهش حاضر ژنوتیپ‌هایی که بیشترین مقدار عملکرد را داشتند از بالاترین ارتفاع، درصد روغن دانه، وزن تر و خشک همراه بودند زیرا زمانی که گیاه از رشد رویشی خوبی برخوردار باشد، در اثر افزایش فعالیت‌های گیاه همچون فتوسنتز، ساخت قند، ماده خشک گیاه و ... کیفیت و عملکرد گیاه نیز افزایش می‌یابد در واقع یکی از علل افزایش عملکرد، افزایش رشد اندام‌های هوایی، استفاده مفید از نور خورشید و مواد فتوسنتزی در طول دوره رشد می‌باشد (Gulden *et al.*, 2017 & Rahimi *et al.*, 2016 & Liu *et al.*, 2016).

جدول ۳- ضرایب همبستگی ساده فنوتیپی بین صفات مورد مطالعه روی ژنوتیپ‌های کلزا

متغیرها	طول گیاه	وزن تر	وزن خشک	روغن دانه	عملکرد دانه
طول گیاه	۱				
وزن تر	۰/۸۸**	۱			
وزن خشک	۰/۸۹**	۰/۹۳**	۱		
روغن دانه	۰/۹۱**	۰/۹۰**	۰/۹۱**	۱	
عملکرد دانه	۰/۹٤**	۰/۸۷**	۰/۸۹**	۰/۹۰**	۱

ns و * ،** به‌ترتیب عدم معنی‌دار، ۵ درصد معنی‌دار و ۱ درصد معنی‌دار



شکل ۲- دندروگرام ارقام کلزا مورد مطالعه بر اساس صفات مورفولوژیکی-زراعی

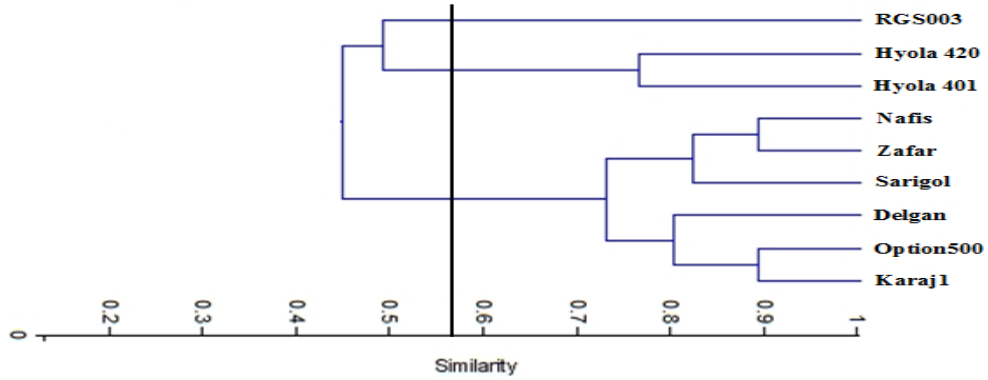
از تجزیه خوشه‌ای برای گروه‌بندی ارقام کلزا با استفاده از صفات مورفولوژیکی-زراعی استفاده شد (شکل ۲). گروه‌بندی این ژنوتیپ‌ها بر اساس پیوستگی میانگین بین گروه‌ها انجام شد. قرارگیری ژنوتیپ‌ها در یک گروه در تجزیه خوشه‌ای بیانگر شباهت این ژنوتیپ‌ها به همدیگر است. بر این اساس ارقام مورد مطالعه کلزا در چهار گروه اصلی قرار گرفتند بطوری‌که در گروه اول ارقام Sarigol، Hyola401 و Hyola420 و در گروه دوم رقم RGS003 و در گروه سوم ارقام Zafar، Nafis و Option500 و نهایتاً در گروه چهارم ارقام Delgan و Karaj1 وجود داشتند. نکته قابل توجه قرار گرفتن ژنوتیپ‌های Sarigol، Hyola401 و Hyola420 در یک خوشه مجزا است که این نشان دهنده شباهت بین این ژنوتیپ‌ها است نکته دیگر اینکه ژنوتیپ RGS003 در یک گروه جداگانه قرار گرفته است که نشان دهنده تفاوت زیاد این رقم با دیگر ژنوتیپ‌ها است. و دلیل دیگر اینکه می‌تواند منشأ متفاوت این ژنوتیپ باشد. نکته مهم اینکه ارقام ایرانی بیشتر در دو گروه سوم و چهارم قرار گرفتند و ارقام غیر ایرانی در دوگروه اول و دوم و بالاتر از ارقام ایرانی در خوشه‌ها قرار گرفتند. بطور کل ژنوتیپ‌های قرار گرفته در هر گروه یا گروه های نزدیک به هم دارای تشابهات ژنومی بیشتر و ژنوتیپ‌های قرارگرفته در گروه‌های دورتر دارای اختلافات بیشتر ژنتیکی هستند. این اطلاعات را می‌توان در بررسی و برنامه‌های بعدی اصلاح کلزا مورد توجه قرار داد. مشابه این نتایج را محققان دیگری در پژوهش‌های خود بدست آورده‌اند (Moghaddam *et al.*, 2009). همچنین در پژوهشی برای بررسی تنوع ژنتیکی ۱۸ رقم کلزای بهاره و زمستانه از طریق ویژگی‌های مورفولوژیکی، ژنوتیپ‌ها را به سه گروه و از طریق نشانگر رپید به هفت گروه دسته‌بندی نمودند .آنها تنوع زیادی را بر اساس این ویژگی‌ها در داخل و بین ژنوتیپ ها مشاهده کردند (Asghari *et al.*, 2011). در پژوهش دیگری بر روی ۹۰ لاین کلزا از وجود تنوع وسیع بین لاین‌های مورد مطالعه گزارش شد (Cunmin *et al.*, 2012).

تجزیه مولکولی

از تعداد ٦ آغازگر RAPD که در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده گردید در مجموع ٤٥ باند امتیازدهی شد که از بین آنها ۳۹ باند چندشکل بودند. از بین آغازگرهای مورد استفاده، آغازگر RABD-09 با ۹ نوار بیشترین تعداد باند و آغازگر RABD-13 کمترین تعداد باند یعنی ۳ باند را دارا بودند. همچنین در این مطالعه به طور متوسط آغازگر RABD-09 بیشترین تعداد باند چندشکلی (۸ باند) و آغازگر RABD-13 کمترین تعداد باند چندشکلی (۵ باند) را دارا بودند. بنابراین متوسط تعداد باند به ازای هر آغازگر ۷/۵ و برای هر رقم ۵ بود (جدول ٤). همچنین متوسط تعداد باند چندشکل به ازای هر آغازگر ٦/۵ و به ازای هر رقم ٤/۳ بود. اطلاعات چندشکلی به عنوان یکی از ویژگی‌های مهم نشانگرهای مولکولی در نظر گرفته شده و می‌تواند برای ارزیابی تمایز نشانگرها از هم به کار رود (Vigoruroux *et al.*, 2005). محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) برای هر آغازگر RAPD نیز محاسبه شد. میانگین PIC برای کل آغازگرها ۰/۵۳ بود. بیشترین مقدار PIC مربوط به آغازگر RABD-18 و کمترین آن مربوط به آغازگر RABD-10 بود. نتایج مطالعه مقدم و همکارانش تا حدودی با نتایج این تحقیق هم‌خوانی دارد (Moghaddam *et al.*, 2009). به طورکلی آغازگرهای مورد استفاده در این آزمایش از PIC بالایی برخوردار بودند که نشان دهنده چندشکلی و کارآیی مناسب آغازگرهای RAPD به کار رفته در این تحقیق می‌باشد. شاخص نشانگر (MI) معیاری برای تعیین کارآیی نشانگر در تخمین چندشکلی می‌باشد (Hedayati & Samiezadeh, 2016). بیشترین مقدار شاخص نشانگر مربوط به آغازگر RABD-18 بود که نشان‌دهنده قدرت تفکیک بالای این آغازگر در مقایسه با سایر آغازگرها می‌باشد و کمترین مقدار آن مربوط به آغازگر RABD-10 بود. میانگین شاخص نشانگر ۰/٥٤ محاسبه شد. این نتایج تا حدودی با یافته‌های (Moghaddam *et al.*, 2009) مطابقت داشت.

جدول ٤- اطلاعات مربوط به تعداد باندهای مشاهده شده، باندهای چندشکل و درصد چندشکلی آغازگرهای RAPD روی ۹ ژنوتیپ کلزا

ردیف	نام آغازگر	تعداد کل باند	تعداد باندهای چند شکل	درصد باندهای چند شکل (٪)
۱	RABD-06	۸	۷	۸۷/۵
۲	RABD-09	۹	۸	۸۸/۸۹
۳	RABD-10	۷	۷	۱۰۰
٤	RABD-13	٦	۵	۸۳/۳۳
۵	RABD-15	۸	٦	۷۵
٦	RABD-18	۷	٦	۸۵/۷۱
مجموع	٦ آغازگر	٤٥	۳۹	۸٦/٦۷



شکل ۳- دندروگرام برای ارقام کلزا مورد مطالعه با نشانگر RAPD

به منظور گروه‌بندی ارقام کلزا از تجزیه خوشه‌ای بر اساس داده‌های مولکولی بدست آمده استفاده شد (شکل ۳). در این تجزیه افرادی که در گروه‌های مختلف قرار می‌گیرند دارای فاصله ژنتیکی بیشتری نسبت به افراد داخل یک گروه هستند و می‌توان از آنها برای دورگ‌گیری، ایجاد هتروزیس و تفکیک متجاوز و بطور کلی کارهای اصلاحی استفاده کرد. به منظور تجزیه خوشه‌ای از ضرایب تشابه مختلفی استفاده شد که ضریب تشابه جاکارد با استفاده از روش دسته‌بندی UPGMA بالاتر از بقیه ضرایب بود و تجزیه‌های بعدی بر روی داده‌های بدست آمده از این روش انجام گرفت. برای تعیین میزان همبستگی بین ماتریس‌های تشابه و کوفنتیک از تست مانتل استفاده شد و r=۰/۸۷ بدست آمد که نشان‌دهنده برازش خوب و همبستگی بالا بین ماتریس‌های تشابه و نمودار خوشه‌ای نهایی بر اساس ضریب تشابه جاکارد می‌باشد.

دندروگرام به دست آمده حاصل از تجزیه خوشه‌ای داده‌های مولکولی، ارقام مورد مطالعه را به ۳ گروه اصلی تقسیم نمود. بطوری‌که در گروه اول رقم RGS003 و در گروه دوم ارقام Hyola401 و Hyola420 و در گروه سوم ارقام Sarigol، Delgan، Zafar، Nafis، Karaj1 و Option500 وجود داشتند که بیشترین تعداد ارقام مربوط به همین گروه ۳ بود.

ارقام گروه سوم که عمدتاً از ایران جمع‌آوری شده بودند به نظر می‌رسد از نظر ژنتیکی بیشترین شباهت را به هم دارند نکته قابل توجه اینکه قرار گرفتن ژنوتیپ‌های هیبرید Hyola401 و Hyola420 در یک خوشه مجزا است که این نشان می‌دهد که تنوع بین ژنوتیپ‌های داخلی و خارجی وجود دارد که دلیل آن می‌تواند منشأ متفاوت این ژنوتیپ‌ها باشد. نکته دیگر اینکه ژنوتیپ RGS003 در گروه جداگانه قرار گرفته است که نشان دهنده تفاوت زیاد این ژنوتیپ با دیگر ژنوتیپ‌ها است. با توجه به اینکه ژنوتیپ‌های قرار گرفته در هر گروه دارای مشابهت ژنومی بیشتر و ژنوتیپ‌های قرارگرفته در گروه‌های دورتر دارای اختلافات بیشتر ژنتیکی هستند می توان چنین برداشت کرد که ٦ نشانگر بکار رفته در این تحقیق دارای قابلیت خوبی برای شناسایی تنوع موجود در ژنوتیپ‌های مورد بررسی می‌باشند. این نتایج با نتایج محققان دیگری هم‌خوانی دارد (Mahjoob *et al.*, 2014).

برای داشتن دیدگاه بهتر و کامل‌تر در مورد فواصل ژنتیکی بین ارقام مورد استفاده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی استفاده شد. تجزیه به مؤلفه‌های اصلی به عنوان روشی مکمل برای تجزیه خوشه‌ای منجر به استفاده بهینه و استخراج حداکثر اطلاعات از داده‌های مولکولی خواهد شد (Zali *et al.*, 2016). در تجزیه مؤلفه‌های اصلی هر چه همبستگی بین داده‌های اولیه کمتر باشد چند مؤلفه اول سهم کمتری از تغییرات را به خود اختصاص می‌دهند. این موضوع بیانگر توزیع مناسب نشانگرهای مورد استفاده در طول ژنوم است. بر اساس جدول شماره ۵ سهم دو مؤلفه اصلی اول و دوم به‌ترتیب برابر با ۲۸/۲۵ و ۱۶/۱۳ درصد تغییرات و مجموعاً ٤٤/۳۸ درصد از تغییرات کل را در بردارد. اما دو مولفه سوم و چهارم کمترین مقدار واریانس را دارا بودند. این مقادیر نشان می‌دهد دو مولفه اول نتوانسته‌اند همه اطلاعات به دست آمده را در برگیرند. لذا این اطلاعات نشان‌دهنده پراکنش گسترده این نشانگرها روی ژنوم کلزا می‌باشند و می‌توانند سطح وسیعی از آن را پوشش دهند (Mahjoob *et al.*, 2014).

جدول ۵- تجزیه به مؤلفه‌های اصلی مربوط به نشانگر RAPD

بردار	مقادیر ویژه	درصد واریانس	واریانس تجمعی
اول	۱/٦۸	۲۸/۲۵	۲۸/۲۵
دوم	۱/۱۷	۱٦/۱۳	٤٤/۳۸
سوم	۰/٦۳	۱۲/۵۲	۵٦/۹۰
چهارم	۰/۵٤	۷/۱۵	٦٤/۰۵

نتیجه‌گیری

در این تحقیق با توجه به نتایج بدست آمده مشخص شد که روش RAPD یک ابزار سریع، قدرتمند و مؤثر است که نیاز به اطلاعات و کار اولیه اندکی دارد. پیشنهاد می‌گردد از این تکنیک در ارزیابی و شناسایی گونه‌های وحشی براسیکا در ایران استفاده شود. همچنین می‌توان با ترکیب و مقایسه نتایج به‌دست آمده از نشانگر مولکولی با نشانگرهای مورفولوژیکی-زراعی در خصوص بررسی تنوع این ارقام به اطلاعات ارزشمندی برای کمک به اصلاح ارقام کلزا در ایران دست یافت. همچنین نتایج مختلف این تحقیق نشان داد که ارقام مختلف کلزا از لحاظ صفات مورد مطالعه با یکدیگر متفاوت بودند. با توجه به تنوع مشاهده شده و براساس نتایج گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها می‌توان ژنوتیپ‌های از گروه‌هایی که با همدیگر فاصله ژنتیکی زیادتری دارند را انتخاب و در دورگه گیری از آن‌ها جهت اهداف اصلاحی خاص استفاده نمود. مسلما با این‌کار 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-زراعی و در راستای اهداف اصلاحی نیز صورت بگیرد به افزایش کارآیی و موفقیت بیشتر برنامه اصلاحی کمک خواهد نمود.

REFRENCES

Amini, F., Saeidi, G. and Arzani, A. 2008. Study of genetic diversity in safflower genotypes using agro-morphological traits and RAPD markers. *Euphytica*. 163(1): 21-30.

Asghari, A., Shokrpour, M., Mohammaddoust Chamanabad, H. and Sofalian, O. 2011. Evaluating genetic diversity of canola cultivars using morphological traits and molecular markers. *Romanian Biotechnological Letters,* 16: 6305-6312.

Braatz, J., Harloff, H. J. and Jung, C. 2018. EMS-induced point mutations in ALCATRAZ homoeologs increase silique shatter resistance of oilseed rape (Brassica napus). *Euphytica,* 214(2): 1-9.

Cavalieri, A., Harker, K. N., Hall, L. M. and Gulden, R. H. 2016. Evaluation of the causes of on-farm harvest losses in canola in the Northern Great Plains. *Crop Science*, 56(4): 2005-2015.

Cunmin, Q., Fuyou, F., Liezhao, L., Kun, L., Jieheng, H., Xiaolan, L., Jingmei, X., Li, C., Rui, W., Zhanglin, T. and 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.

Dellaporta, S.L., Wood, J. and Tickes, J.B. 1993. A plant molecular DNA mini preparation. Version Π. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1:19-21.

Fares, K., Guasmi, F., Touil, L., Triki, T. and Ferchichi, A. 2009. Genetic diversity of Pistachio tree using Inter-Simple Sequence markers (ISSR) supported by morphological and chemical markers. *Biotechnology Journal,* 8(1): 24-34.

Fazeli, E., Shahriari, F., Samizadeh, H., Bagheri, A. and Farsi, M. 2008. Evaluation of genetic diversity among different genotypes of Brassica napus using Random Amplified Polymorphic DNA markers. *Pakistan Journal of Biological Sciences,* 11: 2629-2633.

Gulden, R. H., Cavalieri, A., Syrovy, L. D. and Shirtliffe, S. J. 2017. Pod drop in Brassica napus is linked to weight-adjusted pod-retention resistance. *Field Crops Research,* 205: 34-44.

Hedayati-Marzoni, H. and Samiezadeh-Lahiji. H.A. 2016. Genetic diversity assessment of lines and varieties in winter Rapeseed (*Brassica napus* L.) using RAPD and SSR molecular markers. *Journal of Crop Breeding,* 8:131-139 (In Farsi).

Hu, Z., Hua, W., Huang, S., Yang, H., Zhan, G., Wang, X., Liu, G. and Wang, H. 2012. Discovery of pod shatter-resistant associated SNPs by deep sequencing of a representative library followed by bulk sergeant analysis in rapeseed. *PLoS One,* 7(4): e34253.

Javidfar, F., Elmira, J.Y. and Mirza, M.Y. 2003. Relationship among yield components and selection criteria for yield improvement in winter rapeseed (Brassica napus L.). *Pakistan Journal of Botany,* 35 (2): 167-174.

Kakaei, M., Zebarjadi, A., Mostafaie, A. and Rezaeizad, A. 2014. Genetic variation and traits interrelationship in some rapeseed genotypes using multivariate techniques under two moisture conditions. *Journal of Applied Crop Breeding*, 2: 31 - 45 (In Farsi).

Liu, J., Wang, J., Wang, H., Wang, W., Zhou, R., Mei, D. and Hu, Q. 2016. Multigenic control of pod shattering resistance in Chinese rapeseed germplasm revealed by genome-wide association and linkage analyses. *Frontiers in Plant Science*, 7: e1058.

Mahjoob, B., Najafi-Zarini, H. and Hashemi, S.H.R. 2014. Assessment of genetic relationships among 36 Brassica genotypes using ISSR molecular markers. *Journal of Crop Breeding*, 6: 96-106.

Majidi, M.M., Jafarzadeh-Ghahdarijani, M., Rashidi, F. and Mirlohi. A. 2016 Relationship of different traits in rapeseed (Brassica napus L.) cultivars under normal and drought conditions. *Journal of Crop Breeding*, 8: 55 - 65 (In Farsi).

Marjanovic-Jerome, A., Kondic-Spika, A., Saftic-Pankovic, D., Marinkovic R. and Hristov. N. 2009. Phenotyping and molecular evaluation of genetic diversity of rapeseed (*Brassica napus* L.) genotypes. *African Journal of Biotechnology*, 8: 4835-4844.

Moghaddam, M., Mohammmadi, S.A., Mohebalipour, N., Toorchi, M., Aharizad, S. and Javidfar, F. 2009 Assessment of genetic diversity in rapeseed cultivars as revealed by RAPD and microsatellite markers. *African Journal of Biotechnology*, 8: 3160-3167.

Mohammadi, S.A. and Prasanna, B.M. 2003. Analysis of Genetic diversity in crop plants: Salient statistical tools and consideration. *Crop Science*, 43: 1235-1248.

Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Vogel, J., Tingey, S. and Rafalski, A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2: 225-238.

Rahimi, M., Ramezani, M. and Ozoni Davaji, A. 2016. Investigation of path and correlation analysis of pattern and plant densities effect on two rapeseed cultivars. *Journal of Crop Breeding*, 8: 218 - 227.

Roostabaghi, B., Dehghan, H., Alizadeh, B. and Sabaghnia, N. 2013. Study of diversity and evaluation of relationships between yield and yield components of rapeseed via multivariate methods. *Journal of Crop production and processing*, 2: 53 - 63 (In Farsi).

Vigoruroux, Y., Mitchell, S., Matsuoka, Y., Hamblin, M., Kresovich, S., Smith, J.S.C., Jaqueth, J., Smith, O.S. and Doebley, J. 2005. An analysis of genetic diversity across the maize genome using microsatellite. *Genetics Journal*, 169: 1617-1630.

Zali, H., Sofalian, O., Hasanloo, T., Asghari, A. and Zeinalabedini, M. 2016. Appropriate strategies for selection of drought tolerant genotypes in canola. *Journal of Crop Breeding*, 78:77-90. (In Farsi)

Sustainable Agricultural Science Research /Vol. 2/No. 2/Summer 2022/P: 1-14

https://www.sarj.iauk.ac.ir

Evaluation of Genetic Diversity in Some of Canola Cultivars (*Brassica napus* L.) Using Morphological-agronomic and RAPD Molecular Markers

Mansoor Saljooghianpour[*1], Seyed Mahdi Javadzadeh[2], Mohsen Mohseni[3]

[1]Assistant Professor, Department of Agricultural Engineering, Iranshahr Branch, Islamic Azad University, Iranshahr, Iran

[2]Assistant Professor, Department of Agricultural Engineering, Iranshahr Branch, Islamic Azad University, Iranshahr, Iran

[3]Assistant Professor, Department of Agricultural Engineering, Shahid Soleimani Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran

Corresponding Author's Email: m.saljooghian.p@gmail.com

(Received: August. 21, 2022– Accepted: September. 22, 2022)

ABSTRACT

In order to investigate the genetic diversity of canola cultivars, an experiment was conducted in the form of randomized complete blocks with 9 rapeseed cultivars in 3 replications in Iranshahr region. After culture, DNA extraction was done using CTAB or Dellaporta method with some modifications and 6 pairs of RAPD primers were used for amplification. Also, at the end of the growing season, traits such as plant height, plant fresh weight, plant dry weight, yield and seed oil percentage were measured. The results of the analysis of variance showed that the cultivars have a significant difference at the 1% probability level. Also, there was a positive and significant correlation between the studied traits. Cluster analysis of morphological-agronomical data of rapeseed cultivars in four main groups and cluster analysis of molecular data of rapeseed cultivars in three main groups. Cultivars placed in each group have more genomic similarity and cultivars placed in different groups have more genetic differences. In the analysis of the main coordinates of the molecular data, the first two components could not include all the information obtained, so this information indicates the wide distribution of these markers on the rapeseed genome and can cover a wide area of it. The results of this research showed that according to the diversity observed in the cultivars and based on the results of the grouping of genotypes, it is possible to select genotypes from groups that have a greater genetic distance from each other and use them for specific breeding purposes.

Keywords: Canola, Genetic diversity, Morphological-agronomic marker, RAPD molecular marker