ژنتیک نوین
دوره نهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۳
صفحه ۱۸۸-۱۷۹

تجزیه ارتباطی صفات مورفولوژیک با نشانگرهای ریز ماهواره در گونه‌های جنس براسیکا

Association analysis for morphological traits in *Brassica* species using microsatellite markers

یوسف شرفی[۱]، محمدمهدی مجیدی*[۱]

۱- به ترتیب کارشناس ارشد و دانشیار، دانشگاه صنعتی اصفهان

Sharafi Y[1], Majidi MM*[1]

1. MSc Student and Associate Professor, Isfahan University of Technology, Isfahan

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: majidi@cc.iut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۲۸- تاریخ پذیرش: ۹۲/۹/۲۴)

چکیده

روش تجزیه ارتباطی (Association analysis) امکان شناسایی اولیه و سریع ژن‌های کنترل کننده صفات کمی را میسر می‌سازد. در این پژوهش ارتباط ۲۷ جفت آغازگر ریزماهواره با ۱۶ صفت مورفولوژیک در ۳۶ نمونه از ۷ گونه جنس براسیکا توسط رگرسیون مرحله‌ای و با استفاده از نرم‌افزار SAS مورد ارزیابی قرار گرفت. ۲۷ جفت آغازگر مورد مطالعه، ۱۳۰ الل تولید کردند که ۱۲۷ الل آن چند شکل بودند. میانگین تعداد الل‌ها ۴/۸ الل برای هر مکان ریزماهواره بود. میزان محتوای اطلاعات چند شکلی (PIC) برای جایگاه‌ها از ۰/۱۶ تا ۰/۴۹ متغیر بود. نتایج تجزیه رگرسیون گام به گام نشان داد که بین همه مکان‌های ژنی و حداقل یکی از ۱۶ صفت مورفولوژیک ارتباط معنی-داری وجود دارد. بنابراین احتمالا بتوان از این مکان‌ها همراه با اطلاعات مربوط به صفات مورفولوژیک در اصلاح کلزا جهت شناسایی والدین مناسب به ویژه در جمعیت‌های در حال تفرق استفاده کرد. مقدار قابل توجهی از تغییرات مورفولوژیک توسط نشانگرهای BRMS-008 و BRMS-024 توجیه شد که نشان می‌دهد احتمالا ژن‌های مربوط به این صفات در مکان‌های کروموزومی نزدیک به هم قرار دارند. همچنین بیشترین تغییرات مربوط به صفت درصد روغن (۰/۹۹۲) توسط نشانگرهای BRMS-001، BRMS-005، BRMS-007، BRMS-008، BRMS-029، BRMS-031، BRMS-040، Ni4-D09، Na14-G06، Na12-F03، Na12-D04، O113-D02a، Ra2-E12 و Ni2-F02 تبیین شد. در این پژوهش مکان‌های مورد مطالعه در اطراف صفات مورد بررسی توزیع یکنواختی داشتند، بنابراین در مطالعات بعدی می‌توان با توالی‌یابی مکان‌هایی که R^2 بالایی دارند ژن‌های کدکننده صفات مهم زراعی را شناسایی کرد. از نشانگرهایی که دارای ارتباط قوی‌تر با صفات خاص هستند می‌توان در اشباع نقشه‌های لینکاژی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی

کلزا
صفات مورفولوژیک
تجزیه ارتباط
نشانگر ریزماهواره
DNA

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.2.7.8]

مقدمه

گونه‌های روغنی جنس براسیکا سومین منبع مهم روغن گیاهی (بعد از سویا و نخل روغنی) در دنیا می‌باشند که دارای صفات مثبت زراعی از قبیل تحمل به سرما، کم آبی و شوری، بی تفاوتی نسبی به بافت خاک، قابلیت رقابت با علف‌های هرز و وجود تیپ‌های بهاره و زمستانه هستند (Ashraf et al. 2001). کلزا با نام علمی *Brasica napus* یکی از مهم‌ترین گونه‌های زراعی جنس براسیکا است که در حدود ۱۲ درصد از میزان کل تولید جهانی دانه‌های روغنی را به خود اختصاص داده است (FAO 2007). موفقیت کلزا به عنوان یک گیاه دانه روغنی عمدتا در ارتباط با درصد روغن و عملکرد دانه می‌باشد با این حال تنوع ژنتیکی در ارقام زراعی کم است. بیشترین تنوع ژنتیکی یک گونه‌ی گیاهی را می‌توان در نژادهای بومی و همینطور در گونه‌های وحشی و خویشاوند آن مشاهده کرد (Clegg 1997). این مجموعه‌های ژرم-پلاسمی، منابع ژنتیکی ارزشمندی هستند که مواد ژنتیکی متنوعی را برای بهبود و اصلاح ارقام در اختیار می‌گذارند و باعث افزایش تولیدکنندگی زراعی می‌شوند. برآورد تنوع ژنتیکی در گیاهان، نقش بسیار مهمی در پیشبرد برنامه‌های اصلاحی و ژنتیکی از جمله گروهبندی لاین‌ها و جمعیت‌ها، مطالعه تکامل خویشاوندان وحشی، بهبود شجره‌ها، بررسی تغییرات فراوانی آلل‌ها و حفاظت از منابع ژنتیکی دارد. تنوع ژنتیکی را می‌توان با روش‌های مختلف و با مطالعه ویژگی‌های متفاوت بررسی کرد که از جمله آنها می-توان به بررسی صفات مورفولوژیک، آناتومیک، مارکرهای بیوشیمیایی و مارکرهای DNA اشاره کرد (Semagn et al. 2006). پیش از شناسایی و کاربرد نشانگرهای مولکولی، محققان و پژوهشگران اغلب از صفات مورفولوژیک در ارزیابی‌های تنوع ژنتیکی و ارتباط بین ژنوتیپ‌های یک گونه خاص استفاده می-کردند. دو نقیصه، محدود بودن تعداد نشانگرهای مورفولوژیک و متاثر بودن آنها از عوامل محیطی سبب شد کاربرد اینگونه نشانگرها محدود شود. پیشرفت علوم بیوتکنولوژی و شناسایی نشانگرهای مولکولی به ویژه نشانگرهای مبتنی بر DNA سبب ایجاد تعداد نامحدودی نشانگر و حذف اثرهای ناشی از عوامل محیطی شد که توانست بسیاری از مشکلات مربوط به نشانگرهای مورفولوژیک را برطرف کند و تکمیل‌کننده نشانگرهای مورفولوژیک باشد. در سال‌های اخیر نشانگرهای پیوسته با صفات مطلوب زراعی و کاربرد آنها در تجزیه وراثت صفات در گیاهان زراعی و ساختار و سازمان‌دهی ژنوم مشخص شده است. با توجه به اینکه نشانگرهای مولکولی و صفات مورفولوژیک مکمل یکدیگر بوده و نمی‌توانند به تنهایی ابزار مفید و سودمندی در روش‌های مختلف اصلاحی باشند (Martinez et al. 2003; Macharo et al. 2004)، بنابراین مطالعه رابطه بین نشانگرهای مولکولی و صفات زراعی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است که دارای کاربردهای متعددی از جمله امکان بررسی پتانسیل ژنتیکی ژنوتیپ‌های خاص پیش از ارزیابی فنوتیپی، شناسایی آلل-های صفت مطلوب در مجموعه‌های ژرم پلاسم، تسهیل مکان‌یابی دقیق QTLها و تایید ژن‌های کاندیدای مسئول صفات کمی می-باشد (Gebhardt et al. 2004).

مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده (QTL mapping) صفات مورفولوژیک در گونه‌های مختلف جنس براسیکا با استفاده از نشانگرهای مولکولی انجام گرفته است (Rezaizad et al. 2011; Cai et al. 2012; Yadava et al. 2012). فاصله زیاد نشانگرها با صفات مورد مطالعه و استفاده از تعداد محدودی ژنوتیپ به عنوان والدین جمعیت در حال تفرق، گزینش به کمک نشانگر و همچنین جداسازی و همسانه‌سازی بر اساس این نوع نقشه‌ها را محدود می‌کند. در سال‌های اخیر برای غلبه بر این محدودیت‌ها روش مکان‌یابی ارتباطی (Association mapping) یا تجزیه ارتباطی (Association analysis) معرفی شده است (Gupta et al. 2005) که نه تنها امکان مکان‌یابی دقیق و مطمئن ژن‌ها و مکان‌های کنترل‌کننده صفات کمی را فراهم می‌کند، بلکه امکان شناسایی نواحی کروموزومی و نشانگرهایی دیگری که در مطالعات مبتنی بر پیوستگی (Linkage- based analysis) امکان-پذیر نیستند را نیز میسر می‌سازد (Powell et al.1996; Musial et al. 2008). همچنین در این روش نیازی به تهیه جمعیت در حال تفرق که نیاز به زمان زیادی دارد نمی‌باشد. کارایی این روش در انسان برای شناسایی و مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات مندلی تایید شده است (Crossa et al. 2007; Jun et al. 2009). در علوم گیاهی نیز استفاده از این روش رو به گسترش است. Roy et al. (2006) به بررسی ارتباط ۵۵ نشانگر SSR، ۳۸ نشانگر

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.2.7.8]

SAMPL و ۵۴ نشانگر AFLP با ۱۴ صفت زراعی در ۵۵ لاین گندم پرداختند و نشانگرهای مورد مطالعه حداقل با یکی از ۱۴ صفت زراعی ارتباط نشان دادند و همچنین بیان کردند این نوع نشانگرها می‌توانند به عنوان نشانگرهای مثبت برای برنامه‌های گزینش به کمک نشانگر معرفی شوند. Neale and Savolainen (2004) نشان دادند که مکان‌های ژنی انتخاب شده به کمک روش تجزیه ارتباطی دارای مزایای مهمی از قبیل داشتن سطوح مناسب از تنوع نوکلئوتیدی و همچنین امکان ارزیابی دقیق فنوتیپ نتاج می‌باشد که می‌توانند در برنامه‌های گزینش به کمک نشانگر مورد استفاده قرار گیرند.

با توجه به اهمیت و کاربرد نشانگرهای آگاهی بخش در برنامه-های اصلاحی گیاهان زراعی و بخصوص کلزا و گونه‌های وحشی آن و اینکه هنوز استفاده از تجزیه ارتباط در کلزا و گونه‌های وحشی برای شناسایی نشانگرهای مثبت مرتبط با صفات مورفولوژیک گزارش نشده است، این تحقیق با هدف شناسایی نشانگرهای مثبت مرتبط با صفات مورفولوژیک با استفاده از روش تجزیه ارتباط در گونه‌های مختلف جنس براسیکا انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

مواد گیاهی مورد استفاده در این مطالعه شامل ۳۶ نمونه از ۷ گونه *B. napus*, *B. rapa*, *B. juncea*, *B. oleracea*, *B. carinata*, *B.nigra*, *B. fruticulosa* بودند (جدول۱). همه مواد گیاهی مورد مطالعه از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج و بانک ژن مرکز USD کانادا و IPK آلمان تهیه شدند.

آزمایش مزرعه‌ای

آزمایش مزرعه‌ای در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه صنعتی اصفهان واقع در لورک نجف آباد صورت گرفت. تعداد ۳۶ نمونه ژنتیکی براسیکا در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با ۴ تکرار در مهر ماه ۱۳۸۹ کشت شدند و مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای تعیین اجزای عملکرد و اندازه‌گیری صفات مورد بررسی هر بوته به صورت جداگانه انتخاب شد و صفات روز تا گلدهی، روز تا رسیدگی، قطر طوقه (میلی‌متر)، تعداد شاخه فرعی، ارتفاع (سانتی‌متر)، ارتفاع اولین غلاف از سطح زمین (سانتی‌متر)، تعداد غلاف در شاخه اصلی، تعداد غلاف در کل بوته، طول غلاف (سانتی‌متر)، عملکرد بذری هر بوته (گرم)، شاخص برداشت (درصد)، درجه مقاومت به شته مومی کلزا، میزان ریزش بذر، تعداد دانه در غلاف، وزن هزاردانه (گرم) و درصد روغن (درصد) محاسبه شدند.

آزمایش مولکولی

بذور ۳۶ نمونه کلزا از گونه‌های مختلف در گلدان کشت شد. نمونه‌های برگی از برگ‌های جوان بوته‌هایی که به اندازه کافی رشد کرده بودند تهیه شد و پس از نمونه‌گیری در نیتروژن مایع منجمد و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. استخراج DNA ژنومی با استفاده از روش (Murray and Thompson 1980) صورت گرفت. تخمین کمیت و کیفیت DNA استخراجی با کمک ژل ۰/۷ درصد آگارز و اسپکتروفتومتری انجام گرفت و سپس به غلظت ۲۵ نانوگرم در میکرولیتر برای انجام واکنش پلی‌مراز رقیق سازی شد. ۲۷ جفت آغازگر که از نواحی ژنومی گونه‌های مختلف به دست آمده بودند جهت بررسی تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفتند. واکنش زنجیره‌ای پلی مراز در دستگاه ترموسایکلر Peq lab در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. واکنش پلی‌مراز شامل ۱۲/۵ نانوگرم DNA ژنومی، ۱/۵ میکرولیتر بافر، ۰/۳ میکرولیتر 10 mM dNTPs، ۰/۴ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای رو به جلو و رو به عقب، ۱/۵ واحد آنزیم Taq پلی‌مراز، ۰/۵ میکرولیتر از کلرید منیزیم ۵۰ میلی مولار و ۱۴/۶ میکرولیتر آب دو بار تقطیر شده بود. چرخه حرارتی شامل یک چرخه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴°C به مدت ۴ دقیقه، ۳۰ چرخه با واسرشته‌سازی در دمای ۹۴°C به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر بسته به آغازگر به مدت یک دقیقه و بسط در دمای ۷۲°C به مدت یک دقیقه و در نهایت یک چرخه بسط نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲°C بود. پس از پایان واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، جهت جداسازی محصولات تکثیری و تعیین ژنوتیپ افراد مورد ارزیابی از الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید ۱۲ درصد با استفاده از دستگاه PAGE ساخت شرکت ATTO استفاده شد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.2.7.8]

جدول۱- مشخصات ۳۶ نمونه از ۷ گونه و زیر گونه جنس *Brassica* در بررسی مورد مطالعه

کد اصلی	منشا	کد اولیه	گونه و زیر گونه
B.N-1	Russia	Modena	*Brassica napus*
B.N-2	Hungary	Likord	*Brassica napus*
B.N-3	Hungary	RGS	*Brassica napus*
B.N-4	France	S.L.M 046	*Brassica napus*
B.N-5	Hungary	Hayola	*Brassica napus*
B.N-6	Germany	Opera	*Brassica napus*
B.N-7	France	Okapi	*Brassica napus*
B.N-8	France	Ella	*Brassica napus*
B.N-9	Russia	Lilian	*Brassica napus*
B.R.D-10	Great Britain	CR3421	*Brassica rapa* l. subsp. *Dichotoma* (Roxb.) hanelt
B.J.J-11	Soviet Union	CR2692	*Brassica juncea* (L.) Czern. Subsp. *juncea*
B.J.J-12	-	CR2676	*Brassica juncea* (L.) Czern. Subsp. *juncea*
B.J.J-13	Romania	CR2630	*Brassica juncea* (L.) Czern. Subsp. *juncea*
B.J-15	Italy	CR2496	*Brassica juncea* (L.) Czern.
B.J-16	Korea	CR2476	*Brassica juncea* (L.) Czern.
B.J-I-17	-	CR3470	*Brassica juncea* (L.) Czern. Subsp. Integrifolia (West) Thell.
B.C.B-18	Ethiopia	BRA927	*Brassica carinata* A. Braun
B.C.B-19	Ethopia	BRA1196	*Brassica carinata* A. Braun
B.C.B-22	Ethiopia	BRA1178	*Brassica carinata* A. Braun
B.N-27	Greece	CR2108	*Brassica nigra* (L.) W.D.J.Koch
B.N.N-28	-	CR2724	*Brassica nigra* (L.) W.D.J.Koch subsp. *nigra* var. *nigra*
B.N.N-29	Italy	CR2717	*Brassica nigra* (L.) W.D.J.Koch subsp. *nigra* var. *nigra*
B.R.R-30	Sweden	BRA2249	*Brassica rapa* L. subsp. *rapa*
B.R.O-31	Germany	CR2929	*Brassica rapa* L. em. Metzg. subsp. *oleifera* (DC.) Metzg.
B.R.C-32	China	BRA77	*Brassica rapa* L. subsp. *chinensis* (L.) Hanelt var. *rosularis* (N.Tsen and S.N.Lee) Hanelt
B.F.F-34	Spain	BRA1810	*Brassica fruticulosa* cirillo subsp. *fruticulosa*
B.R.C-35	China	BRA117	*Brassica rapa* L. subsp. *chinensis* (L.) Hanelt var. *communis* (N. Tsen and S.N.Lee) hanelt
B.J.J-36	Belgium	CR2695	*Brassica juncea* (L.) Czern. Subsp. juncea
B.O.V-41	Hungary	-	*Brassica olreacea* var.*viridis*
B.O.G-44	Iran	-	*Brassica olreacea* var.*gongylodes*
B.O.A-45	Thailand	-	*Brassica olreacea* var.*alboglabra*
B.O.C-47	Turkey	-	*Brassica olreacea* var.*capitata*
B.O.C-52	Iran	-	*Brassica olreacea* var.*capitata*
B.O.B-58	India	-	*Brassica olreacea* var.*botrytis*
B.R.P-61	China	-	*Brassica rapa* subsp.*pekinensis*
B.R.P-64	China	-	*Brassica rapa* subsp.*pekinensis*

تجزیه و تحلیل آماری

بعد از انجام واکنش با آغازگر SSR و الکتروفورز و رنگ آمیزی محصولات تکثیر یافته، وجود و عدم وجود باند بصورت صفر و یک در ناحیه تکثیر امتیازدهی شد و ماتریس داده‌های اولیه تشکیل شد. محتوای اطلاعات چند شکلی از فرمول $PIC = 1 - \left(\sum_{i=1}^{n} P_i^2 \right)$ محاسبه شد. در این رابطه Pi فراوانی الل i ام در یک مکان مشخص می باشد. PIC در حقیقت احتمال جداسازی چند شکلی توسط یک ترکیب نشانگر، بین دو ژنوتیپ تصادفی را اندازه‌گیری می‌کند (Reddy et al. 2002). جهت شناسایی نواحی ژنومی دخیل در کنترل صفات مورفولوژیک اندازه‌گیری شده در نمونه‌های گونه‌های مختلف جنس براسیکا از روش رگرسیون گام به گام که در آن آلل‌های نشانگرهای مورد ارزیابی به عنوان متغیرهای مستقل و صفات مورد نظر به عنوان متغیر وابسته در نظر گرفته شدند استفاده شد. جهت تجزیه آماری از نرم‌افزار SPSS version 20 استفاده شد.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.2.7.8]

نتایج و بحث

اطلاعات مربوط به باندهای حاصل از تکثیر نشانگرهای SSR در جدول ۲ نشان داده شده است. از تعداد ۲۷ آغازگر مورد استفاده در مجموع ۱۳۰ باند حاصل شد که از این تعداد ۱۲۷ باند چند شکل بودند. از تعداد ۲۷ جفت آغازگر تنها دو جفت آغازگر دارای درصد چند شکلی ۵۰ درصد و بقیه آغازگرها دارای درصد چندشکلی ۱۰۰ درصد بودند. متوسط درصد چند شکلی برای آغازگرهای مورد مطالعه برابر با ۹۴/۴۴ درصد بود. تعداد کل باند تکثیر شده برای هر آغازگر از دو تا ۱۲ باند متغیر بود و بطور متوسط ۴/۸ باند به ازای هر آغازگر تکثیر شد. این باندها در محدوده‌ی ۱۲۹ تا ۳۰۱ جفت باز قرار داشتند. آغازگر BRMS-007 با تعداد ۱۲ باند چند شکل و آغازگر Na10-C06 با یک باند چند شکل به ترتیب بیشترین وکمترین چند شکلی را نشان دادند. تولید باند زیاد و درصد چند شکلی بالا حاکی از کارایی این نشانگرها در آشکارسازی تنوع بین نمونه‌های جنس براسیکا می‌باشد. وجود تنوع باندی آغازگرها حاکی از تنوع ژنتیکی بالا بین ژنوتیپ‌ها می‌باشد. در مطالعه‌ای با استفاده از ۶۹ جفت آغازگر SSR بر روی ۹۶ ژنوتیپ از گونه‌ی *B. juncea* از ۵۴۲ باند تکثیر شده تعداد ۴۷۹ باند چند شکل حاصل شد. همچنین تعداد باند چند شکل تکثیر شده به ازای هر آغازگر ۶/۶ باند بود (Yao et al.2012). Louran et al. (2007) نیز با استفاده از ۱۱ جفت آغازگر نشانگر SSR تنوع ژنتیکی ۵۹ ژنوتیپ گونه *B. oleracea* را بررسی کردند. این آغازگرها در مجموع ۴۷ باند چند شکل ایجاد کردند. در واقع به ازای هر آغازگر ۴/۲۷ باند چند شکل مشاهده شد.

محتوی اطلاعات چند شکلی (PIC) برای هر آغازگر در جدول۲ آورده شده‌است. مطابق با جدول محدوده‌ی (PIC) از ۰/۱۶ تا ۰/۴۹ متغییر بود که کمترین میزان PIC مربوط به آغازگر BRMS-040 با ۰/۱۶ و بیشترین آن مربوط به آغازگرهای O113-D02a و Ra2-E12 با ۰/۴۹ بود. متوسط شاخص برای نشانگر SSR در مطالعه حاضر برابر با ۰/۳۵ بود.

محتوی اطلاعات چند شکلی در حقیقت احتمال جداسازی چند شکلی را توسط یک ترکیب نشانگر، بین دو ژنوتیپ تصادفی را اندازه‌گیری می‌کند. حداکثر مقدار این شاخص برای نشانگر هم بارز، یک و برای نشانگر غالب، ۰/۵ است (Reddy et al.2002). در مطالعه‌ی حاضر نشانگر O113-D02a و Ra2-E12 بهتر از سایر نشانگرهای به کار برده شده توانست فاصله ژنتیکی نمونه‌های مورداستفاده را در این تحقیق مشخص کند. در بررسی تنوع ژنتیکی ۳ گونه جنس براسیکا با استفاده از نشانگر SSR متوسط میزان شاخص PIC ۰/۴۶ برآورد شد (Turi et al. 2012). میزان شاخص PIC به عوامل متعددی مانند تعداد آلل در هر جایگاه، فراوانی آلل‌ها محتوی نوکلئوتیدهای G و T در نواحی تکرار شده و تعداد ژنوتیپ وابسته می‌باشد (Roder et al.1998). در این مطالعه به احتمال زیاد دو عامل تعداد الل در هر جایگاه و تعداد ژنوتیپ بیشترین نقش را در میزان شاخص PIC داشته باشند. نتایج تجزیه ارتباط (Association analysis) بین داده‌های مورفولوژیک و مولکولی که به ترتیب به عنوان صفات وابسته و مستقل در نظر گرفته شدند، نشان داد که مکان‌های ریز ماهواره‌ای BRMS-008، BRMS-007 و BRMS-024 با بیشترین تعداد صفات مورفولوژیک در ارتباط بودند (جدول۳). همچنین ۳ مکان Na12-H02، O113-E08 و Na14-F11 هر کدام به ترتیب با صفات مقاومت به شته مومی کلزا، روز تا رسیدگی و تعداد دانه در غلاف در ارتباط بودند. بیشترین توجیه تغییرات مربوط به صفت درصد روغن (۰/۹۹ درصد) توسط مکان‌های ریزماهواره‌ای BRMS-001، BRMS-005، BRMS-007، BRMS-008، BRMS-029، BRMS-031، BRMS-040، Ni4-D09، Na14-G06، Na12-F03، Na12-D04، O113-D02a، Ra2-E12 و Ni2-F02 تبیین شدند. دو مکان BRMS-005 و BRMS-024 دارای کمترین ضریب تبیین (۰/۶۲) و در ارتباط با صفت تعداد غلاف در بوته بودند. همچنین بیشترین و کمترین R^2 max به ترتیب مربوط به صفات طول غلاف (۰/۸۴) و قطر طوقه (۰/۲۹) بود (جدول۳).

با توجه به نتایج حاصل از تجزیه ارتباط، مشخص شد که مکان ژنی BRMS-008 بیشترین درصد از تغییرات صفات روز تا گلدهی (۰/۵۱)، تعداد شاخه فرعی (۰/۵۶)، تعداد غلاف در شاخه اصلی (۰/۳۰) و شاخص برداشت (۰/۴۷) را توجیه می‌نماید. مکان ژنی Na12-A02 دارای بیشترین R^2 با مقدار ۰/۵۹ درصد بود که تغییرات صفت روز تا رسیدگی را توجیه کرد. همچنین

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.2.7.8]

جدول۲- اطلاعات نشانگرهای مورد مطالعه در ارزیابی تنوع ژنتیکی ژرم پلاسم *Brassica*

شماره	آغازگر	Reference	اندازه قطعه تکثیر شده (bp)	تعداد آلل	تعداد باند های چند شکل	PIC	درصد چند شکلی (٪)
۱	O110-B06	Lowe et al (2003)	۲۱۶	۴	۴	۰/۴۵	۱۰۰
۲	O113-D02a	Lowe et al (2003)	۲۸۱	۵	۵	۰/۴۹	۱۰۰
۳	Ra2-E12	Lowe et al (2003)	۱۸۹	۶	۶	۰/۴۹	۱۰۰
۴	Na10-C06	Lowe et al (2003)	۲۷۸	۲	۱	۰/۱۷	۵۰
۵	Na12-D04	Lowe et al (2003)	۲۸۱	۴	۴	۰/۴۲	۱۰۰
۶	Na12-E05	Lowe et al (2003)	۱۵۶	۵	۵	۰/۲۷	۱۰۰
۷	Na12-F03	Lowe et al (2003)	۳۰۱	۵	۵	۰/۳۹	۱۰۰
۸	Na12-H02	Lowe et al (2003)	۲۰۲	۲	۲	۰/۳۶	۱۰۰
۹	Na14-G06	Lowe et al (2003)	۱۸۴	۵	۵	۰/۴۱	۱۰۰
۱۰	Na14-H12	Lowe et al (2003)	۲۰۹	۲	۲	۰/۲۱	۱۰۰
۱۱	Ni2-F02	Lowe et al (2003)	۲۲۶	۶	۶	۰/۳۳	۱۰۰
۱۲	O113-E08	Lowe et al (2003)	۱۷۱	۵	۵	۰/۳۲	۱۰۰
۱۳	Na12-A02	Lowe et al (2003)	۱۹۰	۸	۸	۰/۳۳	۱۰۰
۱۴	Na12-D10	Lowe et al (2003)	۱۷۰	۴	۲	۰/۱۹	۵۰
۱۵	Na14-F11	Lowe et al (2003)	۲۴۰	۲	۲	۰/۳۸	۱۰۰
۱۶	Ni4-D09	Lowe et al (2003)	۲۰۶	۳	۳	۰/۳۲	۱۰۰
۱۷	O110-F07	Lowe et al (2003)	۱۷۵	۳	۳	۰/۳۸	۱۰۰
۱۸	Ra2-E11	Lowe et al (2003)	۱۹۸	۴	۴	۰/۳۳	۱۰۰
۱۹	Na10-C01	Lowe et al (2003)	۲۵۱	۸	۸	۰/۳۳	۱۰۰
۲۰	BRMS-001	Suwabe et al (2002)	۱۳۹	۴	۴	۰/۳۰	۱۰۰
۲۱	BRMS-005	Suwabe et al (2002)	۱۶۲	۴	۴	۰/۳۱	۱۰۰
۲۲	BRMS-007	Suwabe et al (2002)	۱۵۲	۱۲	۱۲	۰/۴۳	۱۰۰
۲۳	BRMS-040	Suwabe et al (2002)	۲۸۳	۳	۳	۰/۱۶	۱۰۰
۲۴	BRMS-008	Suwabe et al (2002)	۱۴۵	۱۰	۱۰	۰/۳۳	۱۰۰
۲۵	BRMS-024	Suwabe et al (2002)	۱۲۹	۵	۵	۰/۳۳	۱۰۰
۲۶	BRMS-029	Suwabe et al (2002)	۲۳۲	۴	۴	۰/۳۴	۱۰۰
۲۷	BRMS-031	Suwabe et al (2002)	۲۳۸	۵	۵	۰/۳۸	۱۰۰
کل				۱۳۰	۱۲۷		
میانگین	-			۴/۸۱	۴/۷	۰/۳۵	۹۴/۴۴

مکان ژنی BRMS-024 بیشترین R^2 را برای صفات قطر طوقه (۰/۲۹) و عملکرد دانه (۰/۴۸) توجیه کرد. بیشترین R^2 برای صفات ارتفاع (۰/۳۵) و تعداد غلاف در بوته (۰/۴۹) مربوط به مکان ژنی BRMS-005 بود. مکان ژنی BRMS-031 دارای بیشترین R^2 با مقدار ۰/۴۴ درصد بود که تغییرات مرتبط با صفت ارتفاع اولین غلاف از سطح زمین را توجیه کرد. همچنین مکان-های ژنی BRMS-029، Na10-C01، Na12-D04 و Na10-C06 بیشترین R^2 را به ترتیب برای صفات درصد روغن، طول غلاف، مقاومت به شته مومی کلزا و مقاومت به ریزش داشتند. مکان ژنی O110-F07 بیشترین R^2 برای صفات وزن هزار دانه (۰/۶۱) و تعداد دانه در غلاف (۰/۴۶) را توجیه کرد (جدول۳).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.2.7.8]

جدول۳- نتایج تجزیه ارتباطی با استفاده از رگرسیون گام به گام برای صفات مورفولوژیک و داده‌های مولکولی در گونه‌های جنس براسیکا

صفت	تعداد نشانگر	نشانگر های مرتبط	R^2 Max	R^2 تصحیح شده	سطح معنی داری
روز تا گلدهی	۱۳	BRMS-008, BRMS-007, BRMS-040, BRMS-024, Na10-C06, Na12-F03, Na14-G06, Ni4-D09, Na12-E05, Na10-C01, Na12-A02, Ra2-E11, Ra2-E12	۰/۵۱۱	۰/۹۸۱	۰/۰۰۱
روز تا رسیدگی	۴	Na12-D10 O113-E08, Na12-A02, BRMS-024,	۰/۵۸۵	۰/۹۴۸	۰/۰۱۴
قطر طوقه (سانتی متر)	۱۲	BRMS-024, BRMS-005, BRMS-008, BRMS-007, BRMS-040, Na12-A02, Na14-G06, Na12-F03, Ra2-E11, O110-B06, Na10-C01, Na10-C06	۰/۲۸۶	۰/۹۶۴	۰/۰۰۷
تعداد شاخه فرعی	۴	BRMS-007, BRMS-008, Ra2-E12, O110-F07	۰/۵۵۶	۰/۸۷۱	۰/۰۱۸
ارتفاع (سانتی متر)	۳	BRMS-005, BRMS-008, Na12-D04	۰/۳۵۵	۰/۶۵۶	۰/۰۰۸
ارتفاع اولین غلاف از سطح زمین	۸	BRMS-001, BRMS005, BRMS-031, O113-D02a, Na12-D04, Na12-E05, Na14-H12, Ni2-F02	۰/۴۳۵	۰/۹۰۷	۰/۰۴۸
تعداد غلاف در شاخه اصلی	۶	BRMS-008, BRMS-040, BRMS-007, Na14-H12, Na12-F03, O110-B06	۰/۳۰۴	۰/۸۲۹	۰/۰۲۵
تعداد غلاف در بوته	۲	BRMS-005, BRMS-024	۰/۴۹۷	۰/۶۱۹	۰/۰۱۶
طول غلاف	۵	BRMS-007, BRMS-024, Na10-C01, O110-F07, Na14-G06	۰/۸۳۹	۰/۹۸۱	۰/۰۰۵
عملکرد دانه (گرم)	۱۱	BRMS-007, BRMS-008, BRMS-029, BRMS-024, BRMS-040, O110-B06, Ra2-E12, Na12-D04, Na12-D10, O110-F07, Na10-C01	۰/۴۸۸	۰/۹۵۹	۰/۰۱۲
شاخص برداشت	۳	BRMS-008, Ni4-D09, Na12-A02	۰/۴۶۶	۰/۸۳۶	۰/۰۲۲
وزن هزاردانه (گرم)	۱۳	BRMS-001, BRMS-007, BRMS-008, BRMS-029, BRMS-040, O110-F07, Na12-E05, Ra2-E12, O113-D02a, Na12-F03, Na14-G06, Ni2-F02, Ni4-D09	۰/۶۱۵	۰/۹۷۳	۰/۰۲۱
تعداد دانه در غلاف	۵	BRMS-024, Na12-D04, Na12-E05, Na14-F11, O110-F07	۰/۴۵۷	۰/۹۲۱	۰/۰۳۳
مقاومت به آفت شته مومی کلزا	۱۰	BRMS-005, BRMS-007, BRMS-040, Na10-C01, Na12-H02, Na12-E05, Na12-D04, Na10-C06, O113-D02a, O110-B06	۰/۷۶۶	۰/۹۵۲	۰/۰۲۵
مقاومت به ریزش	۳	BRMS-001, Na10-C06, Na12-F03	۰/۳۵۵	۰/۶۷۲	۰/۰۰۸
درصد روغن	۱۴	BRMS-001, BRMS-005, BRMS-008, BRMS-024, BRMS-029, BRMS-031, BRMS-040, Ra2-E12, O113-D02a, Na12-D04, Na12-F03, Na14-G06, Ni2-F02, Ni4-D09	۰/۵۲۰	۰/۹۹۲	۰/۰۰۴

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.2.7.8]

با توجه به نتایج این تحقیق، مکان‌های ریزماهواره‌ای BRMS-008، BRMS-024، Na12-A02، BRMS-005، BRMS-031، BRMS-029، Na10-C01، Na12-D04، Na10-C06 و O110-F07 تغییرات بیشتری از صفات مورفولوژیک مورد مطالعه را توجیه کردند و می‌توان گفت این آغازگرهای ریزماهواره‌ای بیش از سایر آغازگرها مورد مطالعه در نواحی کدکننده صفات مورفولوژیک حضور داشتند. در این پژوهش وجود مکان‌های مشترک برای برخی صفات، احتمالا بدلیل پیوستگی و یا پلیوتروپی مکان‌های کروموزومی باشد که وجود همبستگی معنی-دار بین صفات مورفولوژیک با همدیگر می‌تواند دلیلی بر این واقعیت باشد. به عنوان مثال مکان ریز ماهواره‌ای BRMS-008 بر اساس نقشه ژنوم AA گونه *B. rapa* در انتهای گروه لینکاژی یکم قرار دارد (Suwabe et al. 2006) که با بسیاری از صفات مورد مطالعه از جمله روز تا گلدهی، تعداد شاخه فرعی، تعداد غلاف در شاخه اصلی، قطر طوقه، ارتفاع، عملکرد دانه، شاخص برداشت، وزن هزاردانه و درصد روغن مرتبط بود. همچنین همبستگی دو به دو این صفات (به جز صفت روز تا گلدهی) نیز در سطح یک و پنج درصد معنی‌دار بود. در این مطالعه آغازگر BRMS-008 مقدار قابل توجهی از تغییرات صفات را توجیه کرد. احتمالا ژن‌های مربوط به این صفات، ژن‌های نزدیک به هم در مکان‌های کروموزومی باشند و ممکن است در فراهم آوردن اطلاعات اولیه در خصوص انتخاب غیرمستقیم صفات از طریق نشانگرهای مرتبط مفید باشند. البته برای درک و اطمینان از وجود ارتباط پیوسته بین نشانگرها و صفات مختلف زراعی و همچنین شناسایی محل مکان‌های کنترل کننده این صفات بر روی کروموزوم‌ها نیاز به تهیه جمعیت‌های در حال تفرق (F_2، RIL، DH) می‌باشد (Naghavi et al. 2007). با توجه به مفید بودن اطلاعات نشانگری بدست آمده از نقشه‌های پیوستگی، محدودیت‌هایی همچون در دسترس نبودن جمعیت‌های در حال تفرق، عدم وجود لینکاژ مناسب بین صفات زراعی و نشانگرهای مولکولی و زمان کافی کارایی این نقشه‌ها را در زمینه شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات زراعی پایین می‌آورد (Gupta et al.2005).

در این مطالعه توزیع یکنواختی برای نشانگرهای مورد مطالعه در اطراف صفات زراعی مشاهده‌شد، که با توالی‌یابی نشانگرهای دارای R^2 بالا (Na10-C01، Na12-D04 و O110-F07) می‌توان به یافتن ژن‌های کدکننده صفات زراعی و همچنین نشانگرهایی که دارای ارتباط فراوان با آن صفات هستند، جهت اشباع نقشه‌های لینکاژی امیدوار بود. مکان‌های کروموزومی اکثر نشانگرهای مورد مطالعه که مرتبط با صفات زراعی مهم بودند، توسط بیشتر محققین مشخص شده که در نهایت می‌توان از آنها در تولید لاین‌های با جایگزینی از طریق تلاقی استفاده کرد. Rezaizad et al. 2011) در مطالعه مکان‌یابی ژن‌های کمی عملکرد و اجزای عملکرد کلزا در شرایط نرمال و تنش خشکی با استفاده از نشانگرهای آیزوزایم، SSR، RFLP، RAPD، NSP و AFLP توانستند مکان‌های ژنی این صفات را مشخص کنند و ارتباط نشانگرها را با صفات زراعی شناسایی کنند که با نتایج این مطالعه مشابه بود. به عنوان مثال نشانگر Na10-C06 با صفت روز تا گلدهی ارتباط داشت که مشابه با نتایج این مطالعه بود. همچنین آنها همپوشانی زیادی بین QTLهای صفات ارتفاع بوته، ارتفاع اولین غلاف از سطح زمین، عملکرد، روز تا گلدهی، وزن هزردانه و طول غلاف مشاهده کردند که حاکی از همبستگی و اثر پلیوتروپی ژن‌های کد کننده این صفات با همدیگر بود. با توجه به محدودیت‌هایی از قبیل در دسترس نبودن جمعیت‌های در حال تفرق، عدم وجود لینکاژ مناسب بین صفات زراعی و مولکولی و زمان کافی، که در شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات مختلف زراعی که در تهیه نقشه‌های پیوستگی بکار می-روند، وجود دارد روش تجزیه ارتباطی با از بین بردن این محدودیت‌ها اطلاعات نشانگری مناسبی را در اختیار محققان قرار می‌دهد. علاوه بر آن می‌توان باند نشانگرهای مرتبط با صفات مهم زراعی را که R^2 بالا دارند از روی ژل جدا و همسان‌سازی کرد سپس توالی شناسایی شده را در پایگاه‌های اطلاعاتی با توالی‌های موجود هم ردیفی (Alignment) کرد. همچنین با استفاده از روش اصلاحی انتخاب به وسیله نشانگر (MAS) می‌توان از نشانگرهای مولکولی مرتبط با صفات مورفولوژیک مهم در شناسایی ژن‌های مهم و ایجاد آغازگرها (SCAR) جهت مطالعه ساختار جمعیت‌ها

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.2.7.8]

استفاده کرد (Rashidimonfared et al. 2006). با توجه به اینکه همه‌ی مکان‌های مورد بررسی بر روی صفات مورفولوژیک مورد مطالعه موثر بودند بنابراین احتمال دارد بتوان از این مکان‌های ریز ماهواره در برنامه‌های اصلاحی برای شناسایی والدین مناسب جهت تهیه جمعیت‌های نقشه‌یابی و ارقام هیبرید استفاده کرد. (Jun et al. 2010) در مطالعه‌ای که به بررسی مکان‌یابی ارتباطی درصد روغن بذری در گونه *B. napus* و مقایسه آن با مکان‌یابی صفات کمی شناسایی شده در نقشه های لینکاژی پرداختند و بیان کردند که بیش از نیمی از مکان های ژنتیکی که با نشانگرهای مرتبط همبستگی داشتند در فواصل مکان‌های ژنی صفات کمی که قبلا در نقشه‌های لینکاژی شناسایی شده‌اند قرار گرفتند که نشان از کارایی تجزیه ارتباطی می‌باشد. Honsdorf et al. 2010 در مطالعه‌ی مکان‌یابی ارتباطی صفات کیفی، مورفولوژیک و فنولوژیک کلزای پاییزه بیان کردند که مکان‌یابی ارتباطی می‌تواند روشی جایگزین برای نقشه‌یابی ژنتیکی در جمعیت‌های در حال تفرق می‌باشد. در نهایت می‌توان گفت که تجزیه مکان‌یابی ارتباطی می‌تواند روشی کارآمد، کم هزینه و سریع در شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات زراعی باشد.

منابع

Ashraf M, Nazir N, Neilly TM (2001) Comparative salt tolerance of amphidiploid and diploid *Brassica* species. Plant Science 160:683-689.

Cai, G, Yang Q, Yang Q, Zhao ZH, Chen H, Wu J, Fan Ch, Zhou Y (2012) Identification of candidate genes of QTLs for seed weight in *Brassica napus* through comparative mapping among *Arabidopsis* and *Brassica* species. BMC Genetics 13:105-122.

Clegg MT (1997) Plant genetic diversity and the struggle to measure selection. Journal of Heredity 88:1-70.

Crossa J, Burguen J, Dreisigacker S, Vargas M, Herrera-Foessel SA, Lillemo M, Singh RP, Trethowan R, Warburton M, Franco J, Reynolds M, Crouch JH, Ortiz R (2007) Association analysis of historical bread wheat germplasm using additive genetic covariance of relatives and population structure. Genetics 177:1889-1913.

FAO (2007) Food outlook. Global Market Analysis. Available at: http://www.fao.Food outlook.com.

Gebhardt C, Ballvora A, Walkemeier B, Oberhagemann P, Schuler K (2004) Assessing genetic potential in germplasm collections of crop plants by marker-trait association: A case study for potatoes with quantitative variation of resistance to late blight and maturity type. Molecular Breeding 13: 93-102.

Gupta PK, Rustgi S, Kulwal PL (2005) Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. Plant Molecular Biology 57: 461-485.

Honsdorf N, Becker HC, Ecke W (2010) Association mapping for phenological, morphological, and quality traits in canola quality winter rapeseed (*Brassica napus* L.). Genome 53: 899-907.

Jun TH, Van K, Kim MY, Lee SH, Walker DR (2008) Association analysis using SSR markers to find QTL for seed protein content in soybean. Euphytica 62:179-191.

Jun Z, Congcong J, Zhengying C, Ruiyuan L, Yan L, Sheng C, Jinling M (2010) Association mapping of seed oil content in *Brassica napus* and comparison with quantitative trait loci identified from linkage mapping. Genome 53: 908-916.

Louran S, Torp AM, Holme IB, Andersen SB, Jensen BD (2007) Database derived microsatellite markers (SSRs) for cultivar differentiation in *Brassica oleracea*. Genetic Resources and Crop Evolution 54:1717-1725.

Martinez L, Caragnaro P, Masuekki R, Rodriguez J (2003) Evaluation of diversity among argentine grapevine (Vitis vinifera L.) varieties using morphological data and AFLP markers. Journal of Biotechnology 6: 241-250.

Mcharo M, Labonte DR, Oard JH, Kays SJ, Mclaurin WJ (2004) Linking quntitative traits with AFLP markers in sweet potatoes using discriminate analysis, Acta Horticulturae 637:285-293.

Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8:4321-4325.

Musial JM, Mackie JM, Armour JD, Phan TTH, Ellwood ES (2008) Identify of QTL for resistance and susceptibility to Stagonospora meliloti in autotetrapioid Lucern. Applied Genetic 1148: 1427-1435.

Naghavi MR, Mardi M, Pirseyedi SM, Kazemi M, Potki P, Ghaffari MR (2007) Comparison of genetic variation among accessions of *Aegilops tauschii* using AFLP and SSR markers. Genetic Resources and Crop Evolution 54:237-240.

Neale DB, Savolainen O (2004) Association genetic of complex traits in conifers. Trend Plant Science 9:325-330.

Powell W, Morgante M, Ander C, Hanafey M, Vogel J, Tingy S, Rafalaski A (1996) The comparision of RFLP, APD, AFLP and SSR (microsatellite) marker for germplasm analysis. Journal of Molecular Breeding 2:225-238.

Rashidimonfarad S, Mardi M, Hosseinzade A, Naghavi MR (2006) Association analysis between important agronomy traits and SSAP retrotransposon markers in accessions of durum wheat. Modern Genetics Journal 2:29-36 (In Farsi).

Reddy MP, Sarla N, Siddiq EA (2002) Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euphytica 128:9-17.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.2.7.8]

Roder MS, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier MH, Leroy P, Ganal MW (1998) A microsatellite map of wheat. Genetics 149:2007-2023.

Roy JK, Bandopadhyay R, Rustgi S, Balyan HS, Gupta PK (2006) Association analysis of agronomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. Current Science 90:5-10.

Rezaezad A, Mohammadi V, Zali AA, Zeynali H, Mardi M (2011) Mapping QTLs Controlling Yield and Yield Components of Oilseed Rape under Normal Irrigation and Drought Stress Conditions. Seed and Plant Improvement Journal 2: 199-218 (In Farsi).

Semagn K, Bjornstad A, Ndjiondjop MN (2006) An overview of molecular market methods for plants. African Journal of Biotechnology 5: 2540-2568.

Suwabe K, Tsukazaki H, Iketani H, Hatakeyama K, Kondo M, Fuiimura M, Nunome T, Fukuoka H, Hirai M, Matsumoto S (2006) Simple sequence repeat-based comparative genomics between *Brassica rapa* and *Arabidopsis* thaliana: the genetic origin of clubroot resistance. Genetics 173: 309-319.

Turi NA, Ullah F, Rabbani MA, Shinwari ZK (2012) Genetic Diversity in the Locally Collected *Brassica* species of pakistan based on microsatellite markers. Pakistan Journal of Botany 44:1029-1035.

Yadava SK, Arumugam N, Mukhopadhyay A, Sodhi YS, Gupta V, Pental D, Pradhah Ak (2012) QTL mapping of yield-associated traits in *Brassica juncea*: meta-analysis and epistatic interactions using two different crosses between east European and Indian gene pool lines. Theoretical and Applied Genetics 125: 1553-1564.

Yao QL, Chen FB, Fang P, Zhou GF, Fan YH, Zhang ZR (2012) Genetic diversity of Chinese vegetable mustard (*Brassica juncea* Coss) landraces based on SSR data. Biochemical Systematics and Ecology 45:41-48.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-07-02]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.2.7.8]