بسم الله الرحمن الرحیم

دانشکده علوم کشاورزی
گروه زراعت و اصلاح نباتات
(اصلاح نباتات)

عنوان:

مطالعه کارایی نشانگرهای مولکولی در انتخاب ژنوتیپ‌های متحمل به سرمای کلزا (*Brassica napus* L.)

از:
حسن هدایتی مرزونی

استاد راهنما:
دکتر حبیب الله سمیع‌زاده لاهیجی

اسفند ۱۳۹۲

اگر در خور تقدیم باشد به رسم ادب تقدیم به:

بزرگ حامیان و آموزگاران زندگی‌ام

پدربزرگوار و مادر عزیزم

آنان که نه می‌توانم موهایشان را که در راه عزت من سفید شده، سیاه کنم

و نه برای دست‌های پینه بسته‌شان که ثمره تلاش برای افتخار من است،

مرهمی گذارم.

سپاس بیکران خداوند یکتا را که هستی‌مان بخشید و به طریق علم و دانش رهنمونمان شد و به همنشینی رهروان علم و دانش مفتخرمان نمود و خوشه چینی از علم و معرفت را روزیمان ساخت.

ابتدا از خانواده‌ی عزیزم که مرا همواره مورد لطف‌خودشان قرار داده و در تمام مقاطع تحصیلی‌ام پشتیبانم بوده‌اند، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از استاد بزرگوارم جناب آقای دکتر حبیب ا... سمیع زاده که مسئولیت راهنمایی این پایان نامه را بر عهده گرفته‌اند و در تمامی مراحل تحقیق مرا مرهون راهنمایی‌های عالمانه خود قرار داده‌اند، صمیمانه تقدیر و تشکر می‌کنم.

از داوران ارجمند، جناب آقای دکتر بابک ربیعی و جناب آقای دکتر علی اعلمی که زحمت بازخوانی این پایان نامه را برعهده داشتند، تشکر و قدر دانی می‌نمایم.

از آقای مهندس محمد محسن‌زاده که مانند مشاوری در کنارم بوده و از کمک‌ها و رهنمودهای بی‌چشمداشت-شان بهره برده‌ام، سپاسگزارم و آرزوی موفقیت برایشان خواستارم.

از مسئولین محترم آزمایشگاه های ژنومیکس و بیوتکنولوژی آقایان مهندس سیدحسام‌الدین حسینی و مهندس محمد حسین رضادوست به پاس کمک‌های بی‌دریغشان کمال تنشکر را دارم.

و در پایان از دوستان و همکلاسی‌های خوبم آقایان و خانم‌ها:

مجتبی رضایی، ابراهیم شیرزادی، علی عمیدفر، سید رضا خیام نکویی، مصطفی مهدی‌زاده، مجید قنبری، سمیه طایفه، محبوبه الوانچی، راویه حیدری، رقیه تولی، پیمان منبری، محسن صفایی، فرهاد معصومی، تشکرمی‌کنم و برای همه‌ی عزیزان آرزوی موفقیت دارم.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

چکیده فارسی ..... خ
چکیده انگلیسی ..... د
مقدمه ۲

فصل اول- کلیات و بررسی منابع

۱-۱- کلزا ۵
۱-۱-۱- تاریخچه کلزا ۵
۱-۱-۲- سطح زیر کشت، تولید و عملکرد کلزا در ایران و جهان ۶
۱-۱-۳- مشخصات گیاه‌شناسی کلزا ۷
۱-۲- تنش ۸
۱-۲-۱- تنش سرما ۸
۱-۲-۲- اثرات تنش سرما بر گیاهان ۹
۱-۲-۳- مقاومت به سرما در کلزا ۱۰
۱-۳- نشانگرهای ژنتیکی ۱۰
۱-۳-۱- نشانگرهای ریخت شناسی ۱۰
۱-۳-۲- نشانگرهای سیتولوژیکی ۱۱
۱-۳-۳- نشانگرهای مولکولی ۱۱
۱-۳-۳-۱- نشانگرهای پروتئین ۱۱
۱-۳-۳-۲- نشانگرهای DNA ۱۲
۱-۴- ردیف‌های تکراری ۱۲
۱-۵- توالی های تکراری ساده یا ریزماهواره‌ها (SSR) ۱۳
۱-۶- چند شکلی حاصل از تکثیر تصادفی (RAPD) ۱۴
۱-۷- گزینش به کمک نشانگر(MAS) ۱۵
۱-۷-۱- مراحل توسعه نشانگر جهت استفاده در MAS ۱۶
۱-۷-۱-۱- نقشه‌یابی دقیق QTL ۱۶
۱-۷-۱-۲- کارایی نشانگر ۱۶
۱-۷-۱-۳- تبدیل نشانگر ۱۷
۱-۷-۲- الزامات مهم برای MAS ۱۷
۱-۷-۳- ارتباط بین ژن و نشانگر ۱۷
۱-۷-۴- مزایای MAS ۱۸
۱-۸- مروری بر پژوهش‌های انجام شده ۱۸

فصل دوم- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد گیاهی ۲۴
۲-۲- مراحل اجرا وکاشت گیاه ۲۴
۲-۳- صفات مورد مطالعه در بررسی تنوع ژنتیکی ۲۵
۲-۳-۱- اندازه‌گیری طول ساقه‌چه و ریشه‌چه ۲۵

۲-۳-۲- اندازه‌گیری وزن تر و وزن خشک گیاهچه ۲۵
۲-۳-۳- درصد جوانه‌زنی ۲۵
۲-۳-۴- متوسط زمان جوانه زنی (MGT) ۲۶
۲-۳-۵- سرعت جوانه‌زنی ۲۶
۲-۳-۶- ضریب سرعت جوانه زنی (CVG) ۲۶
۲-۳-۷- شاخص جوانه زنی ۲۶
۲-۳-۸- شاخص بنیه بذر ۲۷
۲-۳-۹- ضریب آلومتری ۲۷
۲-۳-۱۰- ضریب یکنواختی جوانه‌زنی (CUG) ۲۷
۲-۳-۱۱- کاهش درصد جوانه‌زنی ۲۷
۲-۳-۱۲- اندازه‌گیری محتوای نسبی آب بافت (RWC) ۲۷
۲-۳-۱۳- شاخص تحمل به تنش (STI) ۲۸
۲-۳-۱۴- اندازه‌گیری درصد بقاء ۲۸
۲-۴- محاسبات آماری داده‌های مورفولوژیکی ۲۸
۲-۴-۱-تجزیه واریانس ۲۸
۲-۴-۲- ضریب همبستگی فنوتیپی ۲۹
۲-۴-۳- تجزیه خوشه‌ای ۲۹
۲-۴-۴- تجزیه تابع تشخیص ۲۹
۲-۵- نمونه‌برداری از برگ برای استخراج DNA ۲۹
۲-۶- استخراج DNA ۳۰
۲-۷- تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده ۳۱
۲-۸- رقیق سازی DNA ژنومی استخراج شده ۳۲
۲-۹- شرایط واکنش PCR ۳۳
۲-۱۰- آشکارسازی DNA تکثیر شده ۳۵
۲-۱۱- تجزیه و تحلیل داده‌ها و محاسبات آماری داده‌های مولکولی ۳۶
۲-۱۱-۱- امتیازدهی باندها ۳۶
۲-۱۱-۲- برآورد فاصله ژنتیکی ۳۶
۲-۱۱-۳- تجزیه خوشه‌ای ۳۶
۲-۱۱-۲- برآورد فاصله ژنتیکی ۳۶
۲-۱۱-۳- تجزیه خوشه‌ای ۳۶
۲-۱۱-۴- ضریب همبستگی کوفنتیک ۳۶
۲-۱۱-۵- انجام تجزیه تابع تشخیص به منظور بررسی صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۳۷
۲-۱۱-۶- تجزیه به مختصات اصلی ۳۷
۲-۱۱-۷- معیارهای تنوع ۳۷
۲-۱۱-۷-۱- محاسبه درصد جایگاه‌های چند شکل در هر آغازگر ۳۷
۲-۱۱-۷- ۲- محتوای اطلاعات چندشکل ۳۷
۲-۱۱-۷- ۳- شاخص شانون ۳۸

۲-۱۱-۷- ۴- تنوع ژنی نی ۳۸
۲-۱۱-۷- ۵- تعداد آلل مؤثر ۳۸
۲-۱۱-۸- آزمون مانتل ۳۹

فصل سوم- نتایج و بحث

۳-۱- تجزیه واریانس داده‌های مورفولوژیک ۴۱
۳-۲- دامنه تغییرات و ضریب تغییرات فنوتیپی صفات مورد مطالعه ۴۲
۳-۳- ضرایب همبستگی فنوتیپی بین صفات مورد مطالعه ۴۵
۳-۴- تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بر مبنای کلیه صفات ۵۲
۳-۵- تجزیه تابع تشخیص ۵۶
۳-۶- گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر مبنای تنش ۶۱
۳-۷- بررسی مولکولی ۶۳
۳-۷-۱- تعداد باند مشاهده شده و درصد چندشکلی آغازگرهای مورد مطالعه ۶۳
۳-۷-۲- محتوای اطلاعات چندشکل (PIC)، تعداد آلل مؤثر، تنوع ژنی نی و شاخص شانون ۶۶
۳-۸- تجزیه خوشه‌ای و فاصله ژنتیکی ۶۸
۳-۹- تجزیه تابع تشخیص ۷۲
۳-۱۰- تجزیه به مختصات اصلی ۷۴
۳-۱۱- مقایسه نتایج خوشه‌ای حاصل از نشانگر مولکولی و تجزیه خوشه‌ای حاصل از صفات مرفولوژیکی ۷۶
۳-۱۲- بررسی توانایی نشانگرها در برنامه انتخاب به کمک نشانگر(MAS) ۷۷
۳-۱۳- نتیجه‌گیری کلی ۸۵
پیشنهادها ۸۶
منابع ۸۸

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول۲-۱- اسامی ژنوتیپ‌های کلزای مورد استفاده ۲۴
جدول ۲-۲- ترکیب بافرهای مورد نیاز جهت استخراج DNA ۳۱
جدول ۲-۳- مقادیر مواد تشکیل دهنده بافر TBE ۳۲
جدول ۲-۴- غلظت مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش PCR ۳۳
جدول۲-۵- مشخصات آغازگرهای SSR مورد استفاده ۳۴
جدول۲-۶- مشخصات آغازگرهای RAPD مورد استفاده ۳۵
جدول ۲-۷- اجزای تشکیل دهنده بافر بارگذاری ۳۵
جدول ۳-۱- خلاصه تجزیه واریانس صفات مورفولوژیکی بررسی شده دربین ژنوتیپ‌های کلزای مورد مطالعه ۴۱
جدول ۳-۲- مقادیر آماره‌های توصیفی صفات برای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در حالت بدون تنش ۴۳
جدول ۳-۳- مقادیر آماره‌های توصیفی صفات برای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در دمای صفر درجه سانتی‌گراد ۴۳
جدول ۳-۴- مقادیر آماره‌های توصیفی صفات برای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد ۴۴
جدول ۳-۵- مقادیر آماره‌های توصیفی صفات برای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در دمای ۸- درجه سانتی‌گراد ۴۴
جدول ۳-۶- مقادیر آماره‌های توصیفی صفات برای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در دمای ۱۲- درجه سانتی‌گراد ۴۵
جدول۳-۷- ضرایب همبستگی فنوتیپی بین صفات مختلف در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در حالت بدون تنش ۴۷
جدول۳-۸- ضرایب همبستگی فنوتیپی بین صفات در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه دمای صفر درجه سانتی‌گراد ۴۸
جدول۳-۹- ضرایب همبستگی فنوتیپی بین صفات در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه دمای ۴- درجه سانتی‌گراد ۴۹
جدول۳-۱۰- ضرایب همبستگی فنوتیپی بین صفات در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه دمای ۸- درجه سانتی‌گراد ۵۰
جدول۳-۱۱- ضرایب همبستگی فنوتیپی بین صفات در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه دمای ۱۲- درجه سانتی‌گراد ۵۱
جدول ۳-۱۲- توابع تشخیص کانونی حاصل از تجزیه تشخیص خطی فیشر براساس گروه‌بندی اولیه حاصل از تجزیه خوشه‌ای (بدون تنش) ۵۶
جدول ۳-۱۳- نسبت موفقیت گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها درون گروه‌ها با تابع تشخیص (بدون تنش) ۵۶
جدول ۳-۱۴- توابع تشخیص کانونی حاصل از تجزیه تشخیص خطی فیشر براساس گروه‌بندی اولیه حاصل از تجزیه خوشه‌ای (صفر درجه سانتی‌گراد) ۵۸
جدول ۳-۱۵- نسبت موفقیت گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها درون گروه‌ها با تابع تشخیص (صفر درجه سانتی‌گراد) ۵۸
جدول ۳-۱۶- توابع تشخیص کانونی حاصل از تجزیه تشخیص خطی فیشر براساس گروه‌بندی اولیه حاصل از تجزیه خوشه‌ای (۴- درجه سانتی‌گراد) ۵۹
جدول ۳-۱۷- نسبت موفقیت گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها درون گروه‌ها با تابع تشخیص (۴- درجه سانتی‌گراد) ۵۹
جدول ۳-۱۸- توابع تشخیص کانونی حاصل از تجزیه تشخیص خطی فیشر براساس گروه‌بندی اولیه حاصل از تجزیه خوشه‌ای (۸- درجه سانتی‌گراد) ۵۹
جدول ۳-۱۹- نسبت موفقیت گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها درون گروه‌ها با تابع تشخیص (۸- درجه سانتی‌گراد) ۵۹
جدول ۳-۲۰- توابع تشخیص کانونی حاصل از تجزیه تشخیص خطی فیشر براساس گروه‌بندی اولیه حاصل از تجزیه خوشه‌ای (۱۲- درجه سانتی‌گراد) ۶۰
جدول ۳-۲۱- نسبت موفقیت گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها درون گروه‌ها با تابع تشخیص (۱۲- درجه سانتی‌گراد) ۶۰
جدول ۳-۲۲- توابع تشخیص کانونی حاصل از تجزیه تشخیص خطی فیشر با گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر مبنای تنش ۶۲
جدول ۳-۲۳- نسبت موفقیت افراد درون گروه‌ها با تابع تشخیص (بر مبنای تنش) ۶۲
جدول ۳-۲۴- آغازگرهای مورد استفاده، تعداد باند، تعداد باندهای چندشکل و درصد چندشکلی ۶۶

جدول ۳-۲۵- تعداد آلل موثر، تنوع ژنی نی، شاخص شانون و PIC نشانگرهای SSR و RAPD مورد مطالعه ۶۷
جدول ۳-۲۶- توابع تشخیص کانونی حاصل از تجزیه تابع تشخیص خطی براساس گروه‌بندی اولیه تجزیه خوشه‌ای ۷۲
جدول ۳-۲۷- نسبت موفقیت افراد درون گروه‌ها با تابع تشخیص ۷۲
جدول ۳-۲۸- صحت گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها براساس داده‌های حاصل از نشانگرهای SSR ۷۳
جدول ۳-۲۹- صحت گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها براساس داده‌های حاصل از نشانگرهای RAPD ۷۵
جدول۳- ۳۰- درصد واریانس و درصد تجمعی برای ۱۶ مؤلفه اول ۷۴
جدول ۳-۳۱- خلاصه تجزیه واریانس باندهای بررسی شده در ارزیابی صفات بر روی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه ۷۸
جدول ۳-۳۲- میانگین صفات اندازه‌گیری شده بر مبنای وجود یا عدم وجود باند در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه..... ۸۰

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل۱-۱- روابط ژنومی گونه‌های براسیکا ۵
شکل ۲-۱- نمونه‌های قرار داده شده در ژرمیناتور ۲۵
شکل ۳-۱- گروه‌بندی ارقام بر اساس صفات مورفولوژی به روش Ward در شرایط بدون تنش.. ..... ۵۳
شکل ۳-۲- گروه‌بندی ارقام بر اساس صفات مورفولوژی به روش متوسط فاصله بین گروه‌ها و معیار فاصله اقلیدوسی در دمای صفر سانتی‌گراد ۵۴
شکل ۳-۳- گروه‌بندی ارقام بر اساس صفات مورفولوژی به روش متوسط فاصله بین گروه‌ها و معیار فاصله اقلیدوسی دمای ۴- درجه سانتی‌گراد ۵۴
شکل ۳-۴- گروه‌بندی ارقام بر اساس صفات مورفولوژی به روش Ward در دمای ۸- درجه سانتی‌گراد ۵۵
شکل ۳-۵- گروه‌بندی ارقام بر اساس صفات مورفولوژی به روش Ward در دمای ۱۲- درجه سانتی‌گراد ۵۵
شکل ۳-۶- گروه‌بندی ژنوتیپ‌های کلزای مورد مطالعه بر اساس تابع تشخیص (بدون تنش) ۵۷
شکل ۳-۷- گروه‌بندی ارقام بر اساس تابع تشخیص (صفر درجه سانتی‌گراد) ۵۸
شکل ۳-۸- گروه‌بندی ارقام بر اساس تابع تشخیص (۱۲- درجه سانتی‌گراد) ۶۱
شکل۳-۹- گروه‌بندی ارقام بر اساس تابع تشخیص بر مبنای سطح تنش..... ۶۳
شکل۳-۱۰- الگوی نواری حاصل از تکثیر ژنوتیپ‌های کلزا با استفاده از نشانگر Na14-E11 ..... ۶۴
شکل۳-۱۱- الگوی نواری حاصل از تکثیر ژنوتیپ‌های کلزا با استفاده از نشانگر Oligo-430 ..... ۶۴
شکل ۳-۱۲- دندروگرام نشانگرهای RAPD و SSR به روش UPGMA و ماتریس تشابه تطابق ساده برای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه ۶۹
شکل ۳-۱۳- دندروگرام نشانگرهای RAPD به روش UPGMA و ماتریس تشابه تطابق ساده برای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه ۷۰
شکل ۳-۱۴- دندروگرام نشانگرهای SSR به روش UPGMA و ماتریس تشابه تطابق ساده برای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه ۷۱
شکل۳-۱۵-گروه‌بندی ارقام براساس تابع تشخیص حاصل از داده‌های RAPD و SSR ۷۴

چکیده

مطالعه کارایی نشانگرهای مولکولی در انتخاب ژنوتیپ‌های متحمل به سرمای کلزا (*Brassica napus* L.)

حسن هدایتی مرزونی

در این تحقیق کارایی ۸ نشانگر SSR و ۱۵ نشانگر RAPD مرتبط با QTLهای کنترل کننده مقاومت به سرما، در۲۰ ژنوتیپ زمستانه کلزا، مورد ارزیابی قرار گرفتند. از ۲۳ آغازگر تعداد ۱۵۴ نوار چند شکل به‌دست آمد. آغازگر Oligo-670 از نشانگر RAPD با ۱۶ باند بیشترین تعداد باند چند شکل را داشت و آغازگر Oligo-535 با ۴ نوار کمترین تعداد نوار چندشکل را ایجاد نمود. درصد چندشکلی بدست آمده ۷۷/۷۷ درصد برای Oligo-430 تا ۱۰۰ درصد در نشانگرهای RAPD و درصد چندشکلی در آغازگرهای SSR، ۱۰۰ درصد بدست آمد. بالا بودن معیارهای تنوع ژنی نی، شاخص شانون و میزان PIC برای آغازگرهای Na12-B02، Ni4-B03، OL10-G04، Oligo-543 و Oligo-670 نشان دهنده کارایی بالای این آغازگرها در ارزیابی تنوع ژنتیکی در این تحقیق می‌باشد. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA با استفاده از ترکیب داده‌های نشانگرهای RAPD و SSR، ۲۰ ژنوتیپ مورد مطالعه را در ۵ گروه قرار داد، گروه‌ها به ترتیب شامل ۲، ۷، ۵، ۴ و ۲ ژنوتیپ بود. تجزیه تابع تشخیص به روش خطی فیشر نشان داد که روش UPGMA ژنوتیپ‌ها را با دقت ۷۰ درصد جداسازی کرد. خصوصیات جوانه‌زنی ژنوتیپ‌های کلزا در سطوح مختلف تنش شاهد (۲۰ درجه سانتی-گراد) صفر، ۴-، ۸- و ۱۲- درجه سانتی‌گراد در طرح فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی ارزیابی شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین ارقام، سطوح تنش و اثر متقابل رقم × تنش از نظر تمامی صفات مورفولوژیکی اندازه‌گیری شده وجود دارد. بالاترین ضریب همبستگی بین صفات مورد مطالعه در سطح شاهد (۲۰ درجه سانتی‌گراد) بین سرعت جوانه‌زنی و شاخص جوانه‌زنی، در دمای صفر درجه سانتی‌گراد بین شاخص تحمل به تنش و درصد جوانه‌زنی و در دماهای ۴-، ۸- و ۱۲- درجه سانتی‌گراد بین درصد جوانه‌زنی و شاخص جوانه‌زنی بود. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای به دو روش حداقل واریانس وارد و متوسط فاصله بین گروه‌ها با معیار فاصله اقلیدوسی بر اساس صفات مورفولوژیک ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را در سطح شاهد (۲۰ درجه سانتی‌گراد)، صفر، ۴-، ۸- و ۱۲- درجه سانتی‌گراد به ترتیب به ۳، ۴، ۳، ۳ و ۳ گروه مجزا قرار داد. نتایج حاصل از تجزیه تابع تشخیص نشان داد که صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای در سطوح شاهد و صفر درجه سانتی‌گراد ۹۵ درصد و در تنش دمایی۴-، ۸- و ۱۲- درجه سانتی‌گراد ۱۰۰ درصد می‌باشد. تجزیه و تحلیل روش انتخاب به کمک نشانگر نشان داد باندهایی که موجب افزایش میانگین صفات مرتبط با تحمل به تنش سرما می‌شوند، می‌توان برای شناسایی ژنوتیپ‌های مقاوم استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: کلزا، کارایی نشانگر، QTLهای مقاومت به سرما، RAPD، SSR.

Abstract

The investigation of molecular markers efficiency to select cold tolerance canola gynotypes (*Brassica napus* L.)

Hassan Hedayati Marzoni

In the present study, 8 SSR and 15 RAPD markers associated with QTL's controlling cold tolerance were evaluated among 20 genotypes of winter rapeseed. 154 polymorphic bands were Produced From 23 primers. The maximum band numbers of RAPD markers were produced by Oligo-670 primer with 16 bands and The minimum number of bands produced by Oligo-535 with 4 bands. percentage of polymorphism were varied from 77.77 percent for Oligo-430 to 100 percent in RAPD marker and percentage of polymorphism for SSR perimers was obtained 100 percent.The mount of Nei′s, Shanon and PIC index for Na12-B02, Ni4-B03, OL10-G04, Oligo-543 and Oligo-670 indicated that theses SSR and RAPD markers could be used to assessment of genetic variation. The result of cluster analysis using UPGMA algorithms, clustered 20 studied genotype in 5 distinct groups with 2, 7, 5, 4 and 2 genotype in respected group. Discriminant function analysis using the Fisher′s linear method showed that the UPGMA method separated the genotypes with 70 percent accuracy. Germination chracteristics of genotype were evaluated in a completely randomized design with factorial arrangements whit two factors, The first factor were cold stress treatments at 20 (check), 0, -4, -8 and -12 degree of centigrade and the secend factors was genotypes. ANOVA showed significant differences among varieties and interaction of cultivar × stress for all measured morphological traits. The highest correlation coefficients between traits in the check treatment was obtained between germination rate and germination index, at zero temperature between STI and percentage germination and at -4, -8 and -12 °C between the percentage germination and germination index. The cluster analysis based on Ward′s method and UPGMA clustered genotype at different cold stress treatment of 20 (check), 0, -4, -8 and -12 in 3, 4, 3, 3 and 3 clusters respectively, and the accuracy of cluster analysis revealed by discriminant analysis was 100% for all cold stress treatment. Analysis using marker-assisted selection of bands that enhance cold tolerance traits mean they can be used to identify resistant genotypes.

Key words: Rapeseed, Marker efficiency, Cold resistance QTL, RAPD, SSR.

مقدمه

با توجه به افزایش قابل ملاحظه جمعیت کشور در سه دهه اخیر همراه با افزایش مصرف سرانه روغن از ۲/۵ کیلوگرم در سال ۱۳۴۰ به ۱۶/۷ کیلوگرم، که سه تا چهار کیلوگرم از مصرف سرانه روغن نباتی جهانی بیشتر است (سرانه جهانی ۱۲ کیلوگرم می‌باشد)، معضل بزرگی از نظر وابستگی به روغن خوراکی درکشور ایجاد نموده، لازم است توجه بیشتری به گیاهان روغنی گردد. عدم افزایش تولید روغن داخلی متناسب با رشد جمعیت و همچنین مصرف بالای روغن نباتی در سال‌های اخیر موجب واردات بیش از پیش روغن شده، که میزان شدید نیاز کشور به واردات و کاهش درصد سهم خودکفایی در کشور را نشان می‌دهد [شهرکی، ۱۳۹۰].

دانه روغنی کلزا از سال‌های گذشته وارد کشور شده و تحقیقات متعددی بر روی آن انجام گرفته است. ویژگی‌های خاص گیاه کلزا، خصوصاً از لحاظ سازگار نمودن آن با شرایط مختلف آب و هوایی اهمیت این محصول را برای کشت در ایران بیشتر نموده است. یافتن روش‌های مناسب برای پرورش این گیاه در نواحی مختلف و تولید ارقام اصلاح شده مناسب با هر اقلیم می‌تواند وابستگی شدید کشور را به واردات روغن از بین ببرد [شیرانی‌راد و دهشیری، ۱۳۸۱].

در زمینه اصلاح کلزا به تنش‌های غیر زیستی اقدامات زیادی انجام گرفته است، اما آنچه حائز اهمیت می‌باشد این است که زیان‌های اقتصادی سرما و یخبندان به محصولات کشاورزی کشور به مراتب بیشتر از زیان‌های سایر پدیده‌های مخرب جوی و حتی گاهی بیشتر از خسارت‌هایی است که توسط بیماری‌ها و آفات به گیاهان وارد می‌آید [امیرقاسمی، ۱۳۸۱]. بنابراین، می‌توان با پیشبرد برنامه‌های اصلاحی در جهت شناسایی ارقام و ژن‌های متحمل به سرما و یخبندان، سهم چشم-گیری از این زیان‌ها را کاهش داد.

به منظور بررسی تحمل به سرما[1] و بقاء در زمستان[2] روش‌های ارزیابی مقاومت به سرما و تعیین سودمندی آنها برای صفات فیزیولوژیک، مورفولوژیک و بیوشیمیایی ارزیابی شدند [اصغری و همکاران، ۱۳۸۴]. پیشرفت‌های اخیر در استفاده از نشانگرهای مولکولی و ابداع و توسعه آنها، به‌نژادگران را به استفاده از این نشانگرها به عنوان ابزاری قدرتمند برای گروه-بندی ژنوتیپ‌ها و انتخاب والدین متنوع از این گروه‌ها واداشته است. امروزه نشانگرهای DNA به عنوان روش‌های سریع و مکمل روش‌های اصلاحی کلاسیک و نیز به دلیل داشتن قدرت تمایز، قطعیت و فراوانی بالای آن‌ها در بسیاری از گونه‌های جانوری و گیاهی، به‌طور گسترده‌ای در کشاورزی استفاده می‌شود [زر و همکاران، ۱۳۸۹]. نشانگرهای مولکولی با داشتن تعداد و مزایای بسیار، به‌عنوان یک ابزار تکمیلی، همراه نشانگرهای مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی در بررسی روابط فیلوژنتیکی

[1]- Cold tolerance

[2]-Winter survival

گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند، زیرا تحت تاثیر شرایط محیطی نبوده و در هر مرحله از نمو گیاه قابل استفاده هستند [Manifesto *et al*., 2001].

برای مقاومت به سرما نقشه پیوستگی زیادی برای صفات مختلف با استفاده از نشانگرهای مولکولی تهیه شده است. نقشه‌ها ابتدا با استفاده از نشانگرهای RFLP و سپس از نشانگرهای SSR، RAPD و AFLP به‌طور گسترده برای تهیه نقشه‌های پیوستگی، شناسایی ارقام، تجزیه تنوع ژنتیکی و مکان‌یابی ژن‌های کنترل کننده صفات مختلف در کلزا مورد استفاده قرار گرفته است [اصغری و همکاران، ۱۳۸۴].

در مقایسه با سایر تکنیک‌های نشانگر مولکولی، نشانگرهای SSR در ژنوم موجودات به طور فراوان وجود دارند و به‌علت ماهیت هم بارزی، امتیازبندی آسان، محل ژنومی مشخص، ارزان بودن آن در زمان در دسترس بودن اطلاعات آغازگر و تکرار پذیری بالا ابزار مناسبی برای تعیین سطح تنوع ژنتیکی، شناسایی و تفکیک ارقام، مدیریت مجموعه‌های ذخایر توارثی، نقش یابی ژنتیکی و انتخاب به کمک نشانگر محسوب می‌شوند. علاوه بر این، نشانگرهای SSR اغلب در مناطق ژنومی غنی از ژن رخ می‌دهند، که موجب افزایش ارتباط بالقوه آنها برای مطالعات مربوط به آلل- صفت در مناطق ژنومی شناخته شده شامل مکان کنترل کننده صفات کمی می‌شوند [Hasan *et al*., 2005; Gupta and Varshney., 2000]. از طرفی تجزیه و تحلیل نشانگرهای DNA چند شکل حاصل از تکثیر تصادفی (RAPD) ابزار مفیدی برای شناسایی گونه‌ها، مدیریت بانک ژن، طبقه‌بندی مطالعات و شناسایی تنوع ژنتیکی در میان جمعیت نزدیک به هم را فراهم می‌کند [Okumus and Balkaya., 2007].

با توجه به اهمیت موضوع مقاومت گیاهان به تنش‌های غیر زیستی به خصوص تنش سرما، این تحقیق به دنبال تعیین تنوع و جداسازی ۲۰ ژنوتیپ متحمل به سرمای کلزا با استفاده از نشانگرهای مولکولی پیوسته با سرما و صفات مورفولوژیکی و تعیین کارایی نشانگرهای مولکولی معرفی شده مرتبط با سرما می‌باشد. آگاهی از وجود تنوع در ژرم پلاسم و ارتباط ژنتیکی در میان ژنوتیپ‌ها کمک بزرگی در استراتژی‌های توسعه محصولات به شمار می‌رود، علاوه بر این تعیین و تشخیص ژنوتیپ‌هایی که هیبرید آنها هتروزیس بالایی دارد برای اصلاحگر از اهمیت بسزایی برخوردار خواهد بود.

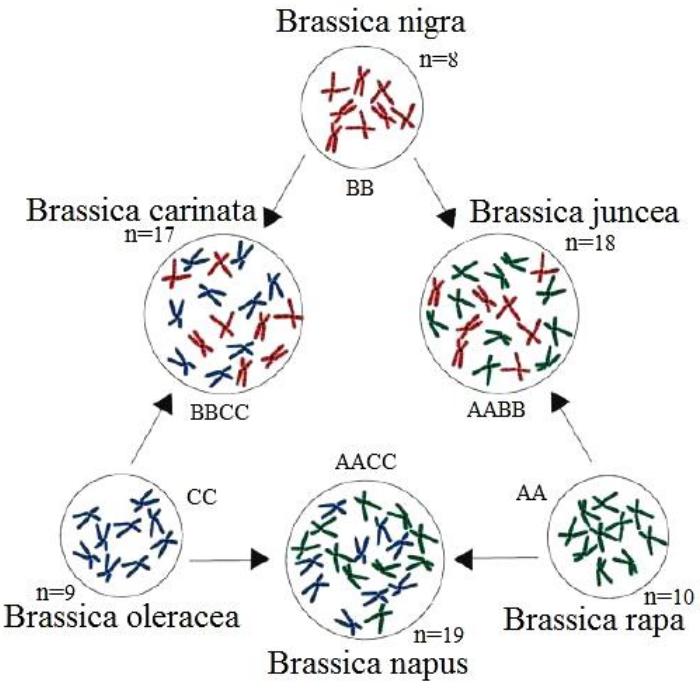
فصل اول

کلیات و بررسی منابع

۱-۱-کلزا

۱-۱-۱-تاریخچه کلزا

کلزای روغنی(*Brassica napus* L.) مهم‌ترین گونه زراعی جنس براسیکا بوده و به احتمال قوی فرم وحشی آن به اروپا و آفریقای شمالی محدود می‌شود. محتمل‌ترین موطن آن ناحیه‌ای است که درآن شلغم روغنی (*Brassica rapa*) و کلم روغنی (*Brassica oleracea*) در مجاورت هم روییده‌اند، زیرا کلزا از تلاقی این دو گونه و دو برابر شدن کروموزوم-های هیبرید حاصل به‌وجود آمده است (شکل۱-۱). در آثار به‌جا مانده از دوران نوسنگی در مصر، در نوشته‌های هندوها که از سال‌های ۱۵۰۰ تا ۲۰۰۰ قبل از میلاد به دست آمده و به‌ویژه در کتیبه‌های یونانی، رومی و چینی باقی‌مانده از سال‌های ۲۰۰ تا ۵۰۰ قبل از میلاد به گیاهان روغنی جنس براسیکا و ارزش دارویی آن اشاره شده است [شیرانی‌راد و دهشیری، ۱۳۸۱].



شکل۱-۱-روابط ژنومی گونه‌های براسیکا [U, 1935]

اعتقاد بر این است که کشت و کار گونه‌های کلزا در اروپا در اوایل سده‌های میانی رواج یافته است. در نیمه دوم قرن ۱۷، گونه براسیکا در اسکاتلند کشت شده و با جو و کنجاله یولاف به مصرف می‌رسیدند [عزیزی و همکاران، ۱۳۸۵] و ظاهراً در قرن ۱۸ نیز به آسیا و سایر نقاط جهان گسترش یافتند [خواجه‌پور، ۱۳۸۶]. به نظر می‌رسد ابتدا از قسمت‌های رویشی گیاه برای مقاصد پزشکی و به صورت سبزی استفاده می‌شده است و استفاده از بذر برای مصرف روغن آن بعدها رخ داده است [عزیزی و همکاران، ۱۳۸۵]. در سال ۱۹۴۲ از روغن کلزا به‌عنوان منبع تأمین کننده روغن روان‌ساز در جنگ جهانی دوم استفاده می‌گردید اما به‌دلیل قحطی و گرسنگی و کمبود منابع روغن خوراکی مقداری از آن به مصرف غذایی رسید، تا اینکه امکان استفاده از روغن کلزا برای مصارف خوراکی در سال ۱۹۴۸ مورد توجه قرار گرفت و منجر به استخراج روغن خوراکی از کلزا در سال‌های ۵۷-۱۹۵۶ شد [دهشیری، ۱۳۷۸].

۱-۱ -۲- سطح زیر کشت، تولید و عملکرد کلزا در ایران و جهان

بر اساس آخرین آمار منتشر شده از سوی وزارت جهاد کشاورزی [آمارنامه کشاورزی ،۱۳۹۰] سطح زیر کشت کلزا در حدود ۹۳ هزار هکتار برآورد شده که استان مازندران با ۲۷/۴ درصد سطح برداشت کلزا، بیشترین سطح را داراست و استان‌های گلستان، همدان، کرمانشاه، اردبیل و لرستان به ترتیب ۱۷/۳، ۵/۹، ۵/۶، ۵/۴ و ۵/۲ درصد از سطح زیر کشت کلزای کشور مقام‌های دوم تا ششم را به خود اختصاص داده‌اند.

میزان تولید کلزا کشور حدود ۱۹۰ هزار تن برآورد شده است. استان مازندران با ۲۶/۵ درصد تولید کلزا کشور همانند سطح تولید در جایگاه نخست تولیدکنندگان این محصول قرار گرفته است و استان‌های گلستان، همدان، اردبیل و کرمانشاه به ترتیب با۱۵/۹، ۸/۳، ۷/۸ و ۷/۳ درصد تولید کلزا در مقام‌های دوم تا پنجم قرار گرفته‌اند.

براساس آمار منتشر شده از سوی سازمان خوار و بار و کشاورزی جهانی [FAO, 2010] سطح زیر کشت کلزا در جهان در سال ۲۰۱۰ ، ۳۱۶۸۰۹۴۵ هکتار، میزان تولید آن ۵۹۰۶۷۵۹۷ تن و متوسط عملکرد آن ۱۸۶۴/۵کیلوگرم در هکتار بوده است که بیشترین سطح زیر کشت و میزان تولید کلزا در سال ۲۰۱۰ به کشور چین و بیشترین عملکرد به کشور هلند اختصاص داشته است.

۱-۱-۳- مشخصات گیاه‌شناسی کلزا

کلزا با نام علمی *Brassica napus L.* و با اسامی همچون Rapeseed (به انگلیسی)، Raps (به آلمانی) و به فرانسه Colza نیز نامیده می‌شود. کلزا گیاهی یک‌ساله از تیره چلیپائیان خردل[1] از جنس براسیکا و یک گونه آلوتتراپلوئید (۲n=۳۸,AACC) طبیعی حاصل تلاقی *B.rapa* (۲n=۲۰, AA) و *B.olerasea* (۲n=۱۸,CC) و دو برابر شدن کروموزوم هیبرید حاصل، می‌باشد [شیرانی‌راد و دهشیری، ۱۳۸۱؛ خواجه‌پور، ۱۳۸۶].

کلزا گیاهی است خودگشن[2] و میزان خود باروری در آن به طور معمول بیش از ۷۰ درصد است. وجود درصدی از دگرگشنی[3] (۳۰-۲۰ درصد)، زمینه کاربرد حشرات را در کلزا توجیه می‌کند [آلیاری و همکاران، ۱۳۷۹].

دانه کلزا دارای حدود ۴۰ درصد روغن و۴۳-۳۸ درصد پروتئین در کنجاله است و میزان رطوبت دانه در حدود ۵ درصد می‌باشد. نسبت اسید لینولئیک به لینولنیک در روغن کلزا تقریباً برابر ۱:۲ است که برای مصرف انسان نسبت متعادلی به شمار می‌رود. روغن کلزا در مقایسه با روغن‌های حاصل از دانه‌های آفتابگردان، ذرت و سویا به دلیل حضور اسیدهای چرب اشباع نشده و فاقد کلسترول از کیفیت تغذیه‌ای بالایی برخوردار است [شیرانی‌راد و دهشیری، ۱۳۸۱].

طیف سازگاری اقلیمی کلزا نسبتاً وسیع بوده و از عرض جغرافیایی نزدیک به ۴۰ درجه جنوبی (در قاره اقیانوسیه) تا بیش از ۶۰ درجه شمالی (در نروژ و کانادا) مورد کشت و کار قرار می‌گیرد. در ایران نیز می‌تواند تا ارتفاع کمتر از ۲۵۰۰ متر از سطح دریا (بسته به عرض جغرافیایی) تولید شود [خواجه‌پور، ۱۳۸۶].

کلزا دارای دو تیپ رشد بهاره و پاییزه (زمستانه) می‌باشد. از نظر حرارت مطلوب رشد در گروه گیاهان سرما دوست قرار دارد. وجود مرحله نموی روزت درگیاه گویای آن است که گیاه در اصل پاییزه بوده و از آن ژنوتیپ‌های بهاره به وجود آمده‌اند [خواجه‌پور، ۱۳۸۶؛ عزیزی و همکاران، ۱۳۸۵]. کلزای نوع زمستانه نسبت به تیپ بهاره مزایایی دارد که می‌توان به نیاز آبیاری کم و امکان استفاده از نزولات آسمانی زمستانه و بهاره، داشتن عملکرد بیشتر نسبت به نوع بهاره به‌علت دوره رشد بیشتر، متفاوت بودن فصل رشد کلزای پاییزه با سایر دانه‌های روغنی معمول از جمله پنبه، سویا و آفتابگردان و برداشت در زمانی که ظرفیت واحدهای روغن‌کشی خالی است، تولید گل‌های زرد رنگ بسیار جذاب برای زنبور عسل در مواقعی که گلی در منطقه نیست، تولید مقدار قابل توجه علوفه از کلزای پاییزه در زمان کمبود علوفه در بهار و غنا بخشیدن به تناوب زراعی هنگام قرار گرفتن در تناوب با غلات به‌ویژه گندم، اشاره نمود[دهشیری، ۱۳۷۸]. در اروپا و چین

[1]-Crusiferae
[2]- Autogam
[3]- Allogam

اغلب از ارقام زمستانه برای کشت استفاده می‌شود. همچنین در سال‌های اخیر ارقام زمستانه در شرق کانادا و بخش‌هایی از آمریکا، به ویژه شمال شرق آن کشت می‌گردد [عزیزی و همکاران، ۱۳۸۵].

۱-۲- تنش[1]

تنش در شرایط فیزیکی به‌عنوان نیروی مکانیکی وارد شده در واحد سطح یک جسم تعریف می‌شود که در پاسخ به این تنش‌ها جسم متحمل تغییراتی در ابعاد می‌شود. اما در شرایط بیولوژیکی تعریف تنش متفاوت است. تنش در شرایط بیولوژیکی، یک نیروی مخالف یا شرایطی است که از عملکرد طبیعی سیستم‌های زیستی مثل گیاهان جلوگیری می‌کند [Jones *et al*., 1989]در صورتی که این تغییرات شدت و سرعت زیادی داشته باشد تنش تلقی خواهد شد [Ciarmiello *et al*., 2011].

گیاهان همواره در معرض طیف وسیعی از تنش‌های محیطی هستند که این تنش‌ها چه زیستی و چه غیرزیستی به‌شدت بر میزان رشد وتولید آنها اثر می‌گذارد. پاسخ گیاهان به این تنش‌ها، پیچیده و قابل بازگشت یا غیرقابل بازگشت بوده و به نوع بافت یا ارگانی که تحت تنش قرار گرفته، بستگی دارد [Cramer *et al*., 2011]. مکانیسم‌های مولکولی و فیزیولوژیکی زیادی در تحمل گیاهان به تنش‌های محیطی نقش دارند که شناسایی آنها می‌تواند گام مهمی برای مقابله با خسارات مخرب این تنش‌ها باشد [محسن‌زاده و همکاران، ۱۳۸۹].

۱-۲-۱- تنش سرما

سرما یکی از تنش‌هایی است که همه ساله خسارات قابل توجهی را به اقتصاد و چرخه تولید کشور تحمیل می‌کند. زیان‌های اقتصادی سرما و یخبندان به محصولات کشاورزی کشور به مراتب بیشتر از زیان‌های سایر پدیده‌های مخرب جوی و گاهی فراتر از خسارت‌هایی است که در اثر بیماری‌ها و آفات به گیاهان وارد می‌آید [امیرقاسمی، ۱۳۸۱]. از نظر کشاورزی در نتیجه وقوع دماهای تنش‌زای سرد در منطقه بسته به میزان سردی هوا، مدت زمان و فراوانی آنها نتایج زیانباری در گیاه موجب می‌شود و بلافاصله بعد از وقوع تنش سرما، در صورت افزایش دما، به‌ندرت گیاهان صدمه دیده بهبود می‌یابند. تابش شدید در طول یا بلافاصله بعد از دوره سرما، موجب افزایش خسارات شده و بهبود گیاه را به تاخیر می‌اندازد یا متوقف می‌کند[میرمحمدی میبدی، ۱۳۸۴]. گیاهان عمدتاً توانایی بقاء در دماهای پایین متفاوتی دارند. ماکزیمم تحمل به سرما در

[1]- Stress