

بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف *Brassica spp.* با استفاده از نشانگرهای NBS-LRR

مهسا محمدجانی اسرمی^{*}، حمید نجفی زربینی^۲ و سید حمیدرضا هاشمی^۳

۱ و ۲. کارشناس ارشد و استادیار، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۳. دانشجوی دکتری پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۱ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۵/۴)

چکیده

بیماری‌های زیادی در دنیا، بسته به شرایط اقلیمی، گیاه کلزا را تهدید می‌کند و موجب وارد آمدن خسارت اقتصادی به آن می‌شود. چنانچه توارث ژنتیکی کافی موجود باشد، مؤثرترین روش برای کنترل بیماری، ایجاد ژنوتیپ مقاوم است بنابراین، بررسی تنوع ژنتیکی ژرم پلاسما موجود، یکی از روش‌های مناسب مدیریت منابع ژنتیکی است. روش نمایه‌برداری NBS موتیف‌های محافظت‌شده در دمین‌های عملکردی خانواده ژنی را مشخص می‌کند، بنابراین بررسی تنوع ژنتیکی، در داخل یا اطراف ژن‌های عملکردی انجام می‌گیرد. در این مطالعه، تنوع ژنتیکی ۴۶ ژنوتیپ از جنس *Brassica* با استفاده از هشت ترکیب آغازگری نشانگر NBS ارزیابی شد. در مجموع ۷۹۰ مکان نشانگری مشاهده شد که از این تعداد، ۷۰۸ مکان چندشکل بود. ضرایب تشابه در دامنه ۰/۷۹ تا ۰/۵۴ با متوسط ۰/۶۶۵ متغیر بود. دندروگرام‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای با روش UPGMA و همچنین تجزیه به مؤلفه‌های اصلی، ژنوتیپ‌ها را از یکدیگر تفکیک کرد. نتایج تجزیه خوشه‌ای نشان داد که ژنوتیپ‌ها در شش گروه قرار می‌گیرند. در مجموع، این نتایج نشان می‌دهد که نمایه‌برداری NBS یک ابزار معتبر طبقه‌بندی برای بررسی تنوع ژنتیکی است.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، کلزا، نمایه‌برداری NBS

مقدمه

و اهمیت زیاد غذایی، از اولویت خاصی برخوردارند. روغن‌های نباتی یکی از منابع مهم انرژی برای انسان به‌شمار می‌روند. کلزا یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی در جهان است که برای استخراج روغن کشت می‌شود و پس از سویا و نخل روغنی در جایگاه سوم تولید قرار دارد (Al-Barrak, 2006).

بیماری‌های زیادی در دنیا، بسته به شرایط اقلیمی گیاه کلزا را تهدید می‌کند و سبب وارد آمدن خسارت اقتصادی به آن می‌شود. یکی از مهم‌ترین بیماری‌های کلزا در چین و نیز عامل اصلی مرگ گیاه در فرانسه و آلمان پوسیدگی اسکروتینایی ساقه است. در ایران، این بیماری از استان‌های گلستان، مازندران، گیلان و اردبیل

با توجه به رشد بی‌رویه جمعیت، زیست‌فناوری کشاورزی به‌عنوان ابزاری توانمند در کنار سایر علوم قادر است نیازهای غذایی این جمعیت عظیم را رفع کند. این امر دانشمندان و محققان را واداشته است که به‌دنبال روش‌های نوین و مؤثر برای افزایش تولید مواد غذایی باشند. در این زمینه منابع تولید و ظرفیت ژنتیکی ارقام گیاهی حائز اهمیت‌اند، ولی به‌لحاظ محدودیت منابع تولید، توجه بیشتری به افزایش کمی و کیفی محصولات زراعی از طریق تغییر ساختار ژنتیکی گیاهان معطوف شده است (Ahmadi *et al.*, 1999). در میان محصولات غذایی، روغن‌های خوراکی با توجه به بازار وسیع مصرف

تولید و استفاده از ارقام مقاوم یکی از راهکارهای اصلی و عملی کنترل بیماری‌ها در گیاهان زراعی و کاهش خسارات ناشی از آنها است، البته اگر کنترل ژنتیکی با وراثت‌پذیری بالا برقرار باشد (Bai *et al.*, 1994). بررسی تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم موجود، یکی از روش‌های مناسب مدیریت منابع ژنتیکی است (Clark *et al.*, 1997). لازمهٔ چنین عملی، شناسایی، مکان‌یابی و جداسازی ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها برای استفاده از آنها در برنامه‌های اصلاحی است (Dejestan *et al.*, 2010). پیشرفت‌های اخیر در زمینهٔ بیولوژی مولکولی ابزارهای مناسب و مکمل را برای روش‌های کلاسیک اصلاحی برای تولید ارقام مقاوم فراهم کرده است (van der Linden *et al.*, 2004). Rimmer (2007) گزارش کرد که چهارده ژن مقاومت به بیماری ساق‌سیاه در گونه‌های مختلف براسیکا شناسایی شده است که عبارتند از LepR1 تا LepR4 و Rlm1 تا Rlm10 از نژادهای مختلف بیماری که به‌طور تئوری ۱۶۳۸۴ نژاد می‌تواند باشد. بیشترین منبع دارای ژن‌های مقاومت در ژنوم B، *B. nigra*، *B. carinata* یا *B. juncea* است که مقاومت کامل به بیماری ساق‌سیاه ایجاد می‌کنند (Balestend *et al.*, 2001).

با مقایسهٔ توالی‌های اسیدهای آمینه پروتئین‌های رمز شده توسط ژن‌های مقاومت همسانه‌شده در گیاهان با منشأ تکاملی مختلف مشخص شده است که ژن‌های مقاومت براساس مشابهت‌های ساختاری تولیدات پروتئینی، به گروه‌های NBS-LRR (تکرارهای غنی از لوسین در جایگاه‌های اتصال اسید نوکلئیک (Nucleotide Binding Site-Leucine Rich Repeats)، LRR خارج‌سلولی، LRR-kinase و گیرندهٔ کینازی طبقه‌بندی می‌شوند (Dangl, 1995). مطالعات ژنومی آشکار کرده است که گروه‌های NBS-LRR، LRR خارج‌سلولی و LRR-kinase در سرتاسر ژنوم گیاهان وجود دارند. ژن‌های مقاومت گروه NBS-LRR متداول‌ترین گروه ژن‌های مقاومت‌اند (Hulbert *et al.*, 2001). تا کنون، تنها تأثیر ثابت‌شده برای ژن‌های رمزکنندهٔ پروتئین‌های دارای NBS-LRR در گیاهان، مقاومت به بیماری‌ها یا آفات بوده است (Michelmore, 2000). ژن‌های NBS-LRR در ژنوم‌های گیاهی

گزارش شده است (Afshari azad, 2001; Afshari azad & Chegini, 2005; Barari *et al.*, 2000; Salati & Afshari azad, 2002). شدت خسارت بیماری اسکروتینایی در قریب به ۷۰ هزار هکتار از مزارع زیر کشت کلزا در استان گلستان (به‌عنوان قطب تولید این محصول در کشور) در طی سال‌های زراعی ۱۳۸۴-۱۳۸۵ و ۱۳۸۵-۱۳۸۶ به‌ترتیب تا ۸۲ و ۷۸ درصد برآورد شده است که بیانگر شدت بیماری‌زایی و اهمیت بیماری است (Aghajani *et al.*, 2008). پوسیدگی اسکروتینایی ساقه، در تمام مناطقی از دنیا که کلزا کاشت می‌شود، مانند هندوستان، چین، کانادا، ایالات متحدهٔ آمریکا، برزیل، فرانسه، آلمان، انگلستان، ایتالیا، سوئد، فنلاند و دانمارک گزارش شده است (Chegini & Afshari Azad, 2005; Bhowmik, 2003; Natti, 1971). در مناطقی از آلمان که تحت تناوب‌های کوتاه‌مدت زراعی قرار داشتند، میزان وقوع بیماری تا حدود ۷۰ درصد ثبت شد که به کاهش ۲۰ تا ۳۰ درصدی عملکرد محصول کلزا منجر شد (Koch *et al.*, 2007).

یکی دیگر از بیماری‌های مهم در گونه‌های *Brassica juncea* و *Brassica rapa* زنگ سفید (*Albugo candida*) است که با توجه به تنوع مطلوب گونه‌های مذکور، انتخاب واریته‌های متحمل یکی از روش‌های مدیریت این بیماری است (Azizi *et al.*, 2000). در زمینهٔ به‌کارگیری روش‌های به‌نژادی در جنس براسیکا در چین علیه بیماری‌های ویروسی مانند ویروس موزائیک شلغم (TMV) پیشرفت‌هایی مشاهده شده است (Azizi *et al.*, 2000). عامل شانکر ساقهٔ کلزا (*Leptosphaeria maculans*) مهم‌ترین قارچ بیماریارگر کلزا در اغلب کشورها است. در مطالعات انجام‌گرفته در زمینهٔ اهمیت جهانی بیماری ساق‌سیاه مشخص شد که این بیماری سبب آسیب جدی در اروپا-استرالیا و شمال آمریکا است (Fitt *et al.*, 2006; West *et al.*, 2001). این بیماری در سال ۱۳۸۴ به‌صورت شایان توجه در منطقهٔ کلالهٔ استان گلستان مشاهده شد و به‌نظر می‌رسد عامل بیماری طی چند سال اخیر در مناطق مزبور مستقر شده و در حال گسترش است (Afshari azad *et al.*, 2005). شکل جنسی قارچ مزبور در سال ۲۰۰۸ از استان‌های گلستان و مازندران گزارش شد (Mirabadi *et al.*, 2008).

مشخص کردن مقاومت در ژرم پلاسماهای مختلف استفاده شود. احتمال تولید کارآمد نشانگرهای مولکولی از خود و اطراف ژن‌های مقاومت می‌تواند در شناسایی لوکوس‌های مقاومت در منابع ژنتیکی و متعاقب آن کلونینگ ژن‌های مقاومت جدید بسیار مفید باشد (van der Linden *et al.*, 2004) بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف *Brassica spp.* با استفاده از نشانگرهای مولکولی و دسته‌بندی ارقام و گونه‌های مختلف کلزا بر مبنای ژن‌های مقاومت است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

۴۶ ژنوتیپ براسیکا در این تحقیق از مرکز تحقیقات کاربردی دانه‌های روغنی شمال کشور در ساری انتخاب و در همان محل کاشته شد و استخراج DNA از برگ ژنوتیپ‌ها انجام گرفت (جدول ۱).

فراوانند و در حدود ۱۵۰ ژن در اکوتیپ آرابیدوبسیس کلمبیایی شناسایی شده‌اند (Meyers *et al.*, 2003).

روش نمایه‌برداری هدفمند موتیف (Directed-Motif Profiling) که موتیف‌های محافظت‌شده در دمین‌های عملکردی خانواده ژنی را مشخص می‌کند اولین بار توسط Van der linden (2004) ارائه شد که امکان بررسی تنوع ژنتیکی در داخل یا اطراف ژن‌های عملکردی را فراهم می‌کند. روش نمایه‌برداری NBS (NBS Profiling) نمونه‌ای از (PMD) است که ژن‌های مقاومت (R-gene) و آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت (RGA) را با استفاده از آغازگرهای دژنره بر مبنای توالی محافظت‌شده در دمین NBS از کلاس NBS-LRR ژن‌های مقاومت (R-gene) مشخص می‌کند. روش نمایه‌برداری NBS می‌تواند الگوی چندشکلی ژن‌های مرتبط با مقاومت به بیماری را ارائه کند. بنابراین روش نمایه‌برداری NBS می‌تواند در اصلاح به‌کمک نشانگر و

جدول ۱. ژنوتیپ‌های براسیکا در این مطالعه

ردیف	ژنوتیپ	جنس و گونه	منشأ	ردیف	ژنوتیپ	جنس و گونه	منشأ
۱	<i>Librator</i>	<i>B.napus</i>	آلمان	۲۴	<i>Gommenz1</i>	<i>B.carinata</i>	هلند
۲	<i>Westar</i>	<i>B.napus</i>	آلمان	۲۵	<i>Grommenez2</i>	<i>B.carinata</i>	هلند
۳	<i>Quinta</i>	<i>B.napus</i>	آلمان	۲۶	<i>Zambia</i>	<i>B.carinata</i>	آلمان
۴	<i>Britta</i>	<i>B.napus</i>	سوئد	۲۷	<i>Malekberger</i>	<i>B.rapa</i>	آلمان
۵	<i>Savvana</i>	<i>B.napus</i>	آلمان	۲۸	<i>Emma</i>	<i>B.rapa</i>	آلمان
۶	<i>PF</i>	<i>B.napus</i>	آلمان	۲۹	<i>Falo</i>	<i>B.rapa</i>	آلمان
۷	<i>Okapi</i>	<i>B.napus</i>	فرانسه	۳۰	<i>Sombock</i>	<i>B.rapa</i>	آلمان
۸	<i>Chamlanhar</i>	<i>B.napus</i>	فرانسه	۳۱	<i>Cavo</i>	<i>B.oleracea</i>	هلند
۹	<i>Glacier</i>	<i>B.napus</i>	هلند	۳۲	<i>Sel Mars</i>	<i>B.oleracea</i>	هلند
۱۰	<i>Line</i>	<i>B.napus</i>	سوئد	۳۳	<i>Tronchoda Portugnes</i>	<i>B.oleracea</i>	هلند
۱۱	<i>Hyola38</i>	<i>B.napus</i>	سوئد	۳۴	<i>Negro Roman</i>	<i>B.oleracea</i>	هلند
۱۲	<i>lobalG</i>	<i>B.napus</i>	سوئد	۳۵	<i>Alsaska</i>	<i>B.nigra</i>	آلمان
۱۳	<i>Topas</i>	<i>B.napus</i>	سوئد	۳۶	<i>Balcan</i>	<i>B.nigra</i>	آلمان
۱۴	<i>Hanna</i>	<i>B.napus</i>	سوئد	۳۷	<i>Gibera</i>	<i>B.nigra</i>	آلمان
۱۵	<i>Cooper</i>	<i>B.napus</i>	آلمان	۳۸	<i>Sizaja</i>	<i>B.nigra</i>	آلمان
۱۶	<i>RGS003</i>	<i>B.napus</i>	آلمان	۳۹	<i>Niro</i>	<i>B.nigra</i>	آلمان
۱۷	<i>Hyola401</i>	<i>B.napus</i>	آلمان	۴۰	<i>Torch*RGS003</i>	<i>B.napus*B.rapa</i>	-
۱۸	<i>Hyola</i>	<i>B.napus</i>	هلند	۴۱	<i>Torch</i>	<i>B.rapa</i>	آلمان
۱۹	<i>Ib1434</i>	<i>B.juncea</i>	آلمان	۴۲	خردل وحشی	<i>Sinapsis arvensis</i>	آلمان
۲۰	<i>Hirashima Katsuna</i>	<i>B.juncea</i>	آلمان	۴۳	<i>Option</i>	<i>B.napus</i>	آلمان
۲۱	<i>Grunim Schnee</i>	<i>B.juncea</i>	آلمان	۴۴	<i>PF*Torch</i>	<i>B.napus*B.rapa</i>	-
۲۲	<i>Aurea</i>	<i>B.juncea</i>	آلمان	۴۵	<i>Option*Torch</i>	<i>B.napus*B.rapa</i>	-
۲۳	<i>SVP Tome Sao</i>	<i>B.carinata</i>	هلند	۴۶	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	-

برای سازگارسازها EcoRI و ۵۰ میکرومولار برای MseI است. سپس تمامی این ۴۶ میکروتیوب در داخل دستگاه ترموسایکلر (BIO-RAD) در دمای ۱۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۴ ساعت قرار گرفت تا از اتصال کامل سازگارسازها اطمینان حاصل شود. تمامی این ۵۰ میکرولیتر به نسبت ۱ به ۵ رقیق شد. مخلوط که شامل رشته‌های الگو برای مرحله پیش‌انتخابی است تا زمان اجرای این مرحله در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

ج) تکثیر پیش‌انتخابی

واکنش پیش‌انتخابی نخستین مرحله از واکنشی است که تنها بخشی از قطعات موجود در مخلوط واکنش مربوط به مرحله برش/ اتصال را تکثیر می‌کند (با توجه به نوکلئوتید اضافه‌شده به انتهای ۳'). در این مرحله از آغازگرهای سازگار به‌عنوان آغازگر رفت (Forward) و از آغازگرهای NBS به‌عنوان آغازگر برگشت (Reverse) استفاده شد. حجم نهایی اجزای واکنش ۲۰ میکرولیتری تکثیر مقدماتی عبارت بود از ۵ میکرولیتر از DNA الگو، ۰/۵ میکرولیتر از آغازگر EcoRI یا MseI (10 μ M)، ۲ میکرولیتر از بافر PCR (10X)، ۰/۸ میکرولیتر از MgCl₂ (50 Mm)، ۰/۵ میکرولیتر از آغازگر NBS (10 μ M)، ۰/۵ میکرولیتر از dNTP (10 mM)، Taq Polymerase (5 u/ μ l)، ۱۰/۵ میکرولیتر از آب دو بار تقطیر. شرایط واکنش مرحله پیش‌انتخابی برای قطعات حاصل از هضم MseI هم مانند آنزیم EcoRI بود. تیوب آماده شده جهت تکثیر پیش‌انتخابی، بلافاصله در دستگاه ترموسایکلر (MJ Mini™ Personal Thermal Cycler; BIO-RAD) قرار داده شد. به محض پایان یافتن مراحل پی.سی.آر، ۵ میکرولیتر از مخلوط واکنش، بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با بافر TBE 1X با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت الکتروفورز شد.

تکثیر انتخابی

در این مرحله مجدداً مجموعه کوچک‌تری از قطعات مرحله پیش‌انتخابی برای تکثیر انتخاب می‌شوند. اجزای واکنش ۲۰ میکرولیتری تکثیر انتخابی به شرح زیر بود: ۵ میکرولیتر از DNA الگو، ۰/۵ میکرولیتر از آغازگر EcoRI یا MseI (10 μ M)، ۲ میکرولیتر از بافر PCR

شایان ذکر است از بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی، ژنوتیپ‌های *Okapi*، *RGS003*، *PF Hyola 401* و *Option* در ایران کشت می‌شوند.

استخراج DNA

استخراج DNA ژنومی در این تحقیق با تغییر در روش Dellaporta (1983) و به نمونه‌های برگ‌های به‌روش بالک انتخاب و اجرا شد. تعیین کمی و کیفی DNA با استفاده از دو روش الکتروفورز ژل و اسپکتوفوتومتری انجام گرفت.

روش نمایه‌برداری NBS

روش استفاده‌شده برای نمایه‌برداری NBS مشابه روش تغییر یافته AFLP است (Hayes *et al.*, 2000). روش نمایه‌برداری NBS طبق پروتکل Van der Linden *et al.* (2004) با کمی تغییرات به شرح زیر انجام گرفت.

الف) برش DNA ژنومی

DNA ژنومی با استفاده از دو آنزیم *EcoRI* و *MseI* به‌طور جداگانه به‌منظور هضم آنزیمی تیمار شد. اجزای واکنش ۴۰ میکرولیتری برای هر نمونه عبارت بود از: ۴ میکرولیتر بافر ۵X، ۲/۱۰ واحد از آنزیم *EcoRI* (10 μ M) و ۱۰ میکرولیتر DNA ژنومی و آب مقطر و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد؛ ۱ واحد بافر ۱۰X، ۱ واحد از آنزیم *MseI* (10 μ M) و ۱۰ میکرولیتر از DNA ژنومی (۵۰۰ نانوگرمی) و آب مقطر و دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد.

ب) اتصال سازگاراها

پس از برش DNA توسط آنزیم‌های برشی سازگارسازهای الیگونوکلئوتیدی دورشته‌ای به انتهای قطعه‌های برشی چسبنده اضافه می‌شود. آنزیم DNA لیگاز این سازگارسازها را به انتهای قطعات DNA می‌چسباند و قطعاتی با انتهای صاف ایجاد می‌کند. حجم نهایی برای یک واکنش در مرحله اتصال ۱۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد. یعنی این مقدار به ۴۰ میکرولیتر مخلوط واکنش مربوط به مرحله هضم اضافه شد، تا حجم کل به ۵۰ میکرولیتر برسد. برای یک واکنش از ۱/۵ میکرولیتر آنزیم DNA لیگاز T4، (Germany, Roche) استفاده شد. غلظت ۵ میکرومولار

واکنش مرحله پیش‌انتخابی برای قطعات حاصل از هضم *MseI* هم مانند آنزیم *EcoRI* بود. واکنش‌ها در دستگاه ترموسایکلر (MJ Mini™ Personal Thermal Cycler ; BIO-RAD) قرار داده شد (جدول ۳).

(10X)، ۰/۸ میکرولیتر از $MgCl_2$ (50Mm)، ۰/۵ میکرولیتر از آغازگر NBS (10μM)، ۰/۵ میکرولیتر از Taq Polymerase، ۰/۳ dNTP (10 mM)، ۱۰/۵ (5 u/μl) میکرولیتر از آب دو بار تقطیر. شرایط

جدول ۲. توالی همه الیگونوکلوئوتیدهای مورد استفاده در مرحله پیش‌انتخابی

نام	توالی
NBS 2	5'-GTWGTYYTTICCYRAICCISSCAT-3'
NBS 5	5'-YYTKRTHGTMITKGATGATGTTGG-3'
<i>EcoRI</i> adaptor 1	5'-CTC GTA GAC TGC GTA CC-3'
<i>EcoRI</i> adaptor 2	5'-AAT TGG TAC GCA GTC TAC-3'
<i>EcoRI</i> Preselective Primer	5'-GAC TGC GTA CCA ATT C-3'
<i>EcoRI</i> Preselective Primer+A	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CA-3'
<i>EcoRI</i> Preselective Primer+C	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CC-3'
<i>EcoRI</i> Preselective Primer+G	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CG-3'
<i>EcoRI</i> Preselective Primer+T	5'-GAC TGC GTA CCA ATT CT-3'
<i>MseI</i> adaptor 1	5'-GAC GAT GAG TCC TGA G-3'
<i>MseI</i> adaptor 2	5'-TAC TCA GGA CTC AT-3'
<i>MseI</i> Preselective Primer	5'-GAT GAG TCC TGA GTA A-3'
<i>MseI</i> Preselective Primer+C	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AC-3'
<i>MseI</i> Preselective Primer+A	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AA-3'

داخل چاهک‌ها بارگذاری شد و کار دستگاه با قدرت ثابت ۶۵ وات ادامه یافت. بعد از پایان یافتن الکتروفورز بافر موجود در محفظه IPC دور ریخته شد و شیشه متحرک که ژل باید به آن بچسبید برای اجرای مرحله رنگ‌آمیزی از آن جدا شد. برای ظهور نوارها از روش رنگ‌آمیزی نیترا نقره استفاده شد. ژل طی مدت دو روز در حرارت اتاق خشک شده و برای عکس‌برداری با اسکنر آماده شد.

تجزیه داده‌ها

یکی از مهم‌ترین مراحل تحقیق، تحلیل صحیح داده‌ها است که در این مطالعه با توجه به موضوع باید از تجزیه‌های آماری کمک گرفت که از قرار زیرند. نمونه‌ها برای تجزیه آماری براساس وجود و نبود باند، با استفاده از نرم‌افزار Total Lab امتیازدهی شدند، به طوری که به وجود باند امتیاز یک و به نبود باند امتیاز صفر داده شد. در مرحله بعد داده‌های امتیازدهی شده با استفاده از نرم‌افزار Excel به یک ماتریس منتقل شد. در این تحقیق با استفاده از نرم‌افزار NTYSY ver2.02 ماتریس تشابه براساس سه ضریب تشابه جاگرد، توافق ساده و دایس تشکیل شد.

گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در این بررسی از سه الگوریتم Complete Linkage، Simple Linkage، UPGMA توسط نرم‌افزار NTYSY ver2.02 تشکیل شد. تجزیه به

جدول ۳. ترکیبات آغازگری مورد استفاده

در مرحله تکثیر انتخابی

آغازگرهای NBS	آغازگرهای <i>MseI</i> / <i>EcoRI</i>
NBS2	<i>EcoRI</i> Selective Primer+AAG
NBS2	<i>EcoRI</i> Selective Primer+AGG
NBS5	<i>EcoRI</i> Selective Primer+AAG
NBS5	<i>EcoRI</i> Selective Primer+AGG
NBS2	<i>MseI</i> Selective Primer+CAC
NBS2	<i>MseI</i> Selective Primer+CTT
NBS5	<i>MseI</i> Selective Primer+CAC
NBS5	<i>MseI</i> Selective Primer+CTT

الکتروفورز عمودی (ژل اکرلامید)

در این تحقیق از روش الکتروفورز ژل پلی‌اکریلامید واسرشته‌کننده ۶ درصد استفاده شد. دستگاه (Sequi-) (Gen GT, BIO-RAD, USA) برای جداسازی قطعات تکثیری به کار رفت. ضخامت ژل مورد استفاده ۴ میلی‌متر و ابعاد آن ۳۰×۳۸ سانتی‌متر با حجم ۵۵ میلی‌لیتر بود و بافر الکتروفورز، TBE 0.5X مورد استفاده قرار گرفت. پیش از بارگذاری نمونه‌ها، دستگاه الکتروفورز با قدرت ثابت ۷۰ وات برای مدت ۱ تا ۱/۵ ساعت تا رسیدن به دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد راه‌اندازی شد. شانه‌ها چند دقیقه بعد از شروع الکتروفورز از دستگاه جدا شدند. ۳ میکرولیتر از محصول پی‌سی‌آر واسرشته‌شده مربوط به هر کدام از نمونه‌های براسیکا در

بردارهای اصلی به منظور تمایز گروه‌های اصلی توسط نرم‌افزار GenAlex ver 6.5 انجام گرفت.

نتایج و بحث

در این تحقیق هشت ترکیب آغازگری NBS-LRR روی ۴۶ ژنوتیپ براسیکا بررسی شد (جدول ۴). از مجموع ۷۹۰ مکان نشانگری امتیازدهی شده برای نشانگر NBS، ۷۰۸ مکان (۸۹/۲۰ درصد) چندشکل بودند. میانگین مکان‌های امتیازدهی شده برای هر ترکیب آغازگری حدود ۹۸/۷۵

درصد و میانگین مکان‌های چندشکل ۸۸/۵ درصد بود. بیشترین تعداد مکان نشانگری متعلق به ترکیب آغازگرهای NBS5-EcoRI AAG و NBS5-EcoRI AGG و کمترین تعداد مکان نشانگری مربوط به ترکیب آغازگر NBS5-MseI CCT بود. بیشترین درصد چندشکلی متعلق به ترکیب آغازگرهای NBS5-EcoRI و NBS2-MseI و CCT با ۱۰۰ درصد و کمترین درصد چندشکلی مربوط به ترکیب آغازگری NBS5-MseI CCT با ۷۷/۲۷ درصد باند چندشکل بود (جدول ۴).

جدول ۴. نتایج بررسی ۴۶ ژنوتیپ براسیکا با استفاده از نشانگر NBS

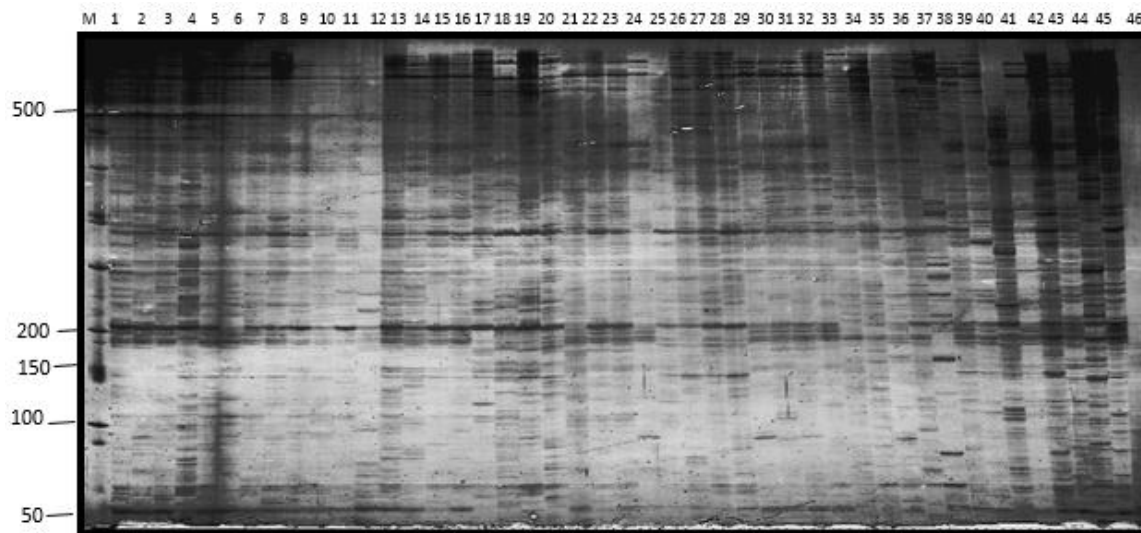
نام آغازگر	NTB ¹	NPB ²	PPB ³	PIC ⁴	MI ⁵	N ⁶	SH ⁷
NBS2-EcoRI AAG	۸۹	۸۰	۸۹/۸۹	۰/۳۵	۳۱/۵	۰/۲۴	۰/۳۹
NBS2-EcoRI AGG	۷۳	۶۷	۹۱/۷۸	۰/۳۷	۳۳/۹۹	۰/۲۶	۰/۴۱
NBS2-MseI CAC	۱۲۱	۱۱۰	۹۰/۹۱	۰/۳۲	۲۹/۰۹	۰/۲۲	۰/۳۶
NBS2-MseI CCT	۸۳	۸۳	۱۰۰/۱۰۰	۰/۳۳	۳۲/۸۸	۰/۲۳	۰/۳۷
NBS5-EcoRI AAG	۱۲۹	۱۱۴	۸۸/۳۷	۰/۳۴	۳۰/۳۵	۰/۷۱	۰/۴۲
NBS5-EcoRI AGG	۱۳۲	۱۱۴	۸۶/۳۶	۰/۳۳	۲۸/۳۱	۰/۲۳	۰/۳۷
NBS5-MseI CAC	۱۱۹	۱۰۶	۸۹/۰۸	۰/۳۸	۳۴/۰۶	۰/۲۹	۰/۴۵
NBS5-MseI CCT	۴۴	۳۴	۷۷/۳۷	۰/۳۰	۲۳/۲۹	۰/۲۱	۰/۳۴
میانگین	۹۸/۷۵	۸۸/۵	۸۹/۲۰	۰/۳	۲۶/۳۶		

۱- تعداد کل باندها ۲- تعداد باندهای چندشکل ۳- درصد باندهای چند شکل ۴- میزان محتوای چند شکلی ۵- شاخص مارکری ۶- ضریب تنوع نی ۷- ضریب تنوع شانون.

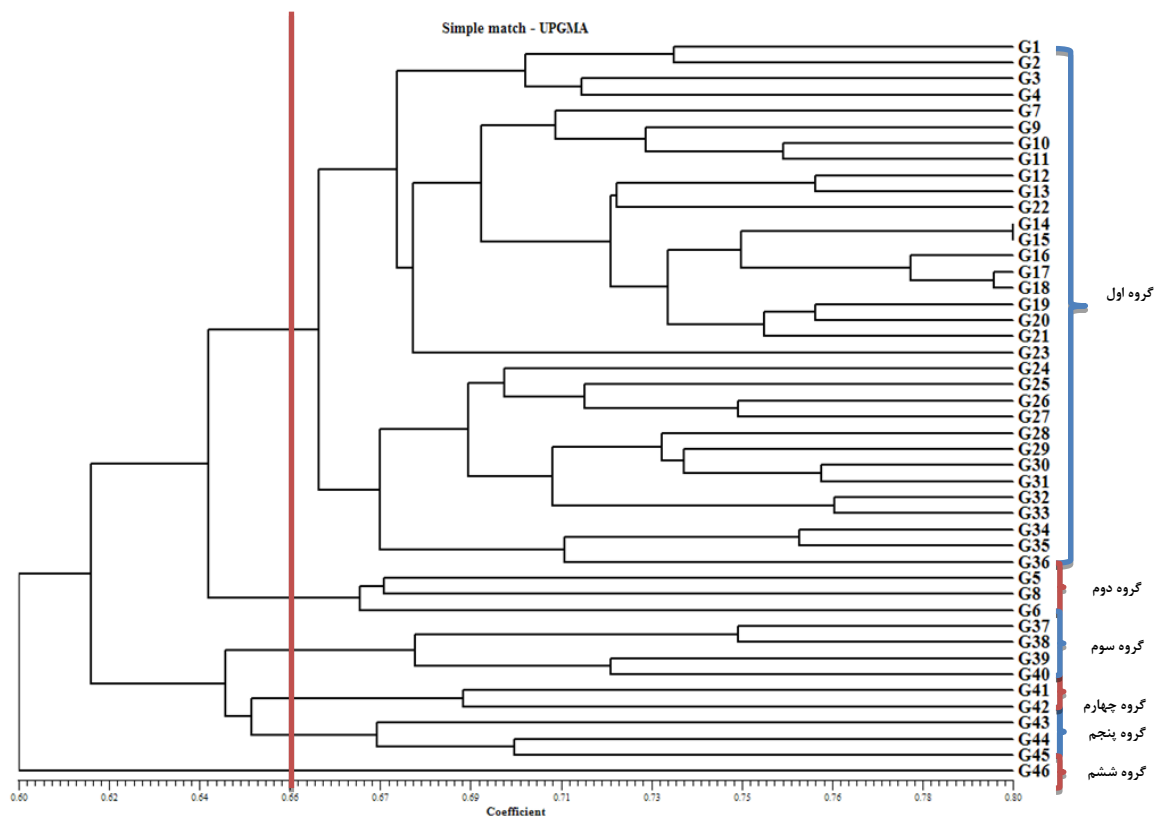
با ۲۳/۲۹ بود. این شاخص پتانسیل هر آغازگر را در تولید نوار بیشتر نشان می‌دهد (Powell et al., 1996). تجزیه خوشه‌ای با استفاده از داده‌های نمایه‌برداری NBS و به دلیل دشواری امتیازبندی باندهای NBS نمایه‌برداری و همچنین اشتباهاتی که در اثر تغییر در کیفیت ژل به وجود می‌آید، حذف باندهای بسیار ضعیف یا نادر می‌توانست تا حد زیادی از بروز خطا در محاسبه تشابه افراد جلوگیری کند که این کار صورت گرفت (Powell et al., 1996). بیشترین شباهت ژنتیکی (۰/۷۹) بین ژنوتیپ‌های Hanna و Cooper و کمترین شباهت (۰/۵۴) بین ژنوتیپ‌های Okapi و Sinapsi و *arvensis* و میانگین ضریب تشابه ۰/۶۶۵ بود. تجزیه خوشه‌ای، ژنوتیپ‌ها را در شش گروه متمایز قرار داد (شکل ۲). میزان همبستگی ضریب تشابه تطابق ساده و الگوریتم UPGMA که بزرگ‌ترین عدد (۰/۸) آزمون مانتل را نشان دادند، سازگارترین الگوریتم خوشه‌بندی و ضریب تشابه انتخاب شدند.

تنوع ژنی نی (H) که از شاخص‌های مهم برای ارزیابی تنوع ژنی بین ژنوتیپ‌ها و جمعیت‌ها است (Nei, 1972)، برای کل ژنوتیپ‌های مورد مطالعه ۰/۳۰ و شاخص شانون آنها ۰/۳۸ محاسبه شد. آغازگرهای NBS5-EcoRI AAG، NBS5-MseI CAC، NBS2-EcoRI AGG و NBS2-EcoRI AAG دارای بیشترین مقدار شاخص شانون و تنوع ژنی نی بودند. زیاد بودن مقدار این شاخص و تنوع ژنی نی در آغازگرهای یادشده، نشان‌دهنده این است که نسبت به سایر آغازگرهای به‌کاررفته، می‌توانند تنوع ژنتیکی درون جمعیتی را بهتر توجیه کنند، از این رو می‌توان از آنها به‌عنوان آغازگرهایی کارا برای بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های براسیکا در مطالعات بعدی استفاده کرد.

میانگین شاخص نشانگر (NBS Marker Index) در این تحقیق ۲۶/۳۶ و بیشترین آن با ترکیب آغازگرهای NBS5-MseI CAC برابر با ۳۴/۰۶ و کمترین میزان آن مربوط به ترکیب آغازگری NBS5-MseI CCT



شکل ۱. نیمرخ ژل اکریلامید واسرشت نشان‌دهنده الگوی باندهای NBS-LRR ۴۶ نمونه ژنوتیپ جنس براسیکا با ترکیب آغازگری CTT NBS2-MseI



شکل ۲. گروه‌بندی ژنوتیپ‌های جنس براسیکا با استفاده از نشانگر NBS-LRR

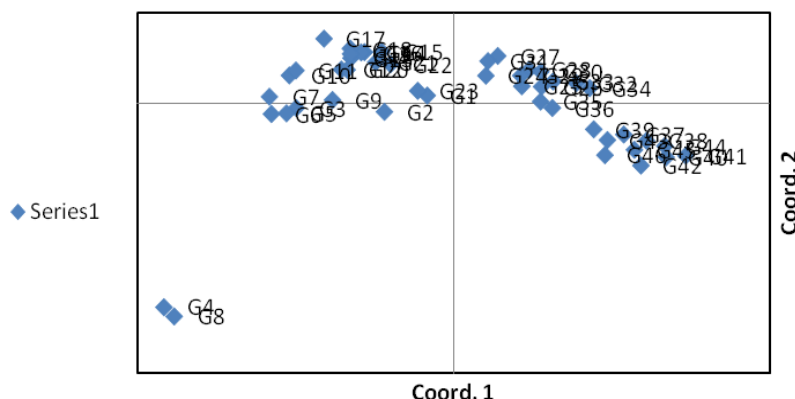
تنوع ژنتیکی از طریق داده‌های مولکولی، دو یا سه مؤلفه اول حداکثر حدود ۱۰ تا ۲۰ درصد تغییرات اولیه نشانگرها را توجیه می‌کنند که نشان‌دهنده نمونه مطلوب نشانگرها از کل ژنوم است. به این ترتیب که هر

برای داشتن دیدگاه بهتر درباره فواصل ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها و همچنین مشاهده آنها به صورت چندبعدی، تجزیه به بردارهای اصلی نیز در تکمیل روش تجزیه خوشه‌ای انجام گرفت (Rahaii et al., 2004). در بررسی

LRR در ژنوتیپ‌های موردنظر در قسمت‌های خاصی از گیاه وجود دارد. در بررسی گونه‌های کلزا مشخص شد که گونه‌های دارای ژنوم B مانند نیگرا (BB)، ژونسه آ (AABB) و کاریناتا (BBCC) در برابر بیماری سیاه مقاومند (Roy, 1984) که نشان می‌دهد گروه‌های ژنی مقاومت در نواحی خاصی از ژنوم گیاه وجود دارند.

یک از نشانگرهای مورد استفاده از بخش‌های متفاوت ژنوم هستند و بنابراین همبستگی کمتری دارند (Mohammadi, 2006). اما در این مطالعه مجموع دو بردار اول ۴۸/۶۵ درصد است (شکل ۳) که نشان‌دهنده همبستگی بین نشانگرها است که توانستند بخشی از ژنوم را پوشش دهند و در نتیجه نشان می‌دهد که نواحی NBS-

Principal Coordinates (PCoA)



شکل ۳. رابطه میان ۴۶ نمونه ژنوتیپ براسیکا با استفاده از تجزیه به بردارهای اصلی

بستگی دارد، اما Ellis *et al.* (1997) ثابت کردند که با انتخاب شش جفت از بهترین آغازگرها، امکان توجیه ۸۰ درصد روابط مورد انتظار وجود دارد. نبود یک نشانگر AFLP در دو گیاه می‌تواند به دلیل موتاسیون‌های کاملاً متفاوت (حذف، اضافه، جابه‌جایی) باشد که نباید یکسان در نظر گرفته شوند. از طرف دیگر تا یک قطعه توالی‌یابی نشود نمی‌توان اطمینان یافت دو باندهای که در یک موقعیت یکسان در دو ژنوتیپ قرار گرفته‌اند، همسانند (De Riek *et al.*, 1999). از آنجا که باندهای یک‌شکل فاقد اطلاعات‌اند، حذف شدند. حذف این باندها و همچنین باندهای نادر سبب کاهش میانگین تشابه بین ژنوتیپ‌ها شد (Powell *et al.*, 1996).

Grube *et al.* (2000) با مطالعه مقایسه‌ای سازمان ژنومی ژن‌های مقاومت و RGAها را در گوجه‌فرنگی، سیب‌زمینی و فلفل گزارش کردند که با وجود تطابق کم جایگاه ژنومی ژن‌هایی با فنوتیپ مشخص که مقاومت به عوامل بیماری‌زای خویشاوند یا یکسان را ایجاد می‌کنند، مکان‌های ژنی مقاومت به‌صورت معنی‌داری حفاظت شده‌اند. این موضوع نشان داد که جایگاه‌های کروموزومی خوشه‌های ژن‌های مقاومت به‌صورت گسترده‌ای در

Van der Linden *et al.* (2004) دریافتند که اغلب

نمایه‌برداری NBS سطوح معنی‌داری از شباهت را با توالی‌های دمین شناخته‌شده در R ژن‌ها (Resistance Gene Analogues) RGAs و (Resistance Gene Analogues) در گونه‌های مختلف نشان دادند. آنان به این نتیجه رسیدند که نمایه‌برداری NBS می‌تواند نشانگرهای چندشکل از ژن‌های مرتبط با مقاومت به بیماری را تولید کند. بنابراین روش نمایه‌برداری NBS می‌تواند در اصلاح به‌کمک نشانگر و مشخص کردن لوکوس‌های مقاومت در ژرم‌پلاسماها به‌کار رود و با امکان تولید نشانگرهای مفید در اطراف ژن‌های R، در شناسایی لوکوس‌های مقاومت جدید در منابع ژنتیکی و کلونینگ ژن‌های مقاومت جدید استفاده شود.

با توجه به اینکه بررسی ژنوتیپ‌های ما براساس ژن‌های مقاومت به بیماری از گروه NBS-LRR بوده است، طبقه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس ژن‌های مقاومت به بیماری بوده است و نشان می‌دهد که ژنوتیپ‌های مورد بررسی از لحاظ نوع ژن‌های مقاومت به بیماری گروه NBS-LRR در گروه‌های مختلف قرار گرفتند.

میزان اطلاعاتی که از روش AFLP به‌دست می‌آید تا حد زیادی به تعداد آغازگر و نوع نوکلئوتید انتخابی آن

نتیجه‌گیری کلی

روش نمایه‌برداری NBS حضور سطح چشمگیری از تنوع ژنتیکی در مناطق غنی از ژن مقاومت به بیماری را در ژنوتیپ‌های جنس براسیکا در این مطالعه نشان می‌دهد. علاوه بر این، نتایج ما نشان می‌دهد که روش نمایه‌برداری NBS برای بررسی تنوع ژنتیکی و مهم‌تر از آن برای مطالعات نقشه‌یابی یا شناسایی ژن یا QTL‌های ایجادکننده مقاومت به بیماری در براسیکا می‌تواند بسیار مناسب باشد.

سپاسگزاری

این پژوهش با همیاری پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری طبرستان و مرکز تحقیقات کاربردی دانه‌های روغنی شمال کشور و گروه اصلاح و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انجام گرفته است. نگارندگان صمیمانه از همکاری مؤسسات نامبرده در پیشبرد این پژوهش قدردانی می‌کنند.

گونه‌زایی حفاظت شده‌اند و ژنومیک مقایسه‌ای می‌تواند ابزاری مناسب برای شناسایی سریع ژن‌هایی باشد که از نظر ساختاری مشابه ژن‌هایی هستند که تاکنون در جنس‌های خویشاوند مکان‌یابی شده‌اند.

روش نمایه‌برداری NBS با هدف قرار دادن گروه‌ها و زیرگروه‌های ژن‌های مقاومت و خوشه‌های ژنی اختصاصی، شناسایی نشانگرهای کاملاً پیوسته با مکان‌های ژنی مقاومت به بیماری را امکان‌پذیر می‌کند. از این طریق علاوه بر اعضای جدید خوشه‌های موجود، شناسایی خوشه‌های ژنی مقاومت فرضی جدید نیز ممکن است (van der Linden *et al.*, 2004). در بررسی تنوع ژنتیکی ۵۸ ژنوتیپ گندم دوروم توسط نشانگرهای AFLP، SSR و روش نمایه‌برداری NBS و با مقایسه همبستگی AFLP و SSR با نمایه‌برداری NBS که به ترتیب برابر بود با $r = 0.73$ و $r = 0.76$ نشان داد که نمایه‌برداری NBS می‌تواند یک ابزار معتبر طبقه‌بندی، برای بررسی تنوع ژنتیکی باشد (Mantovani *et al.*, 2006).

REFERENCES

1. Afshari Azad, H. (2001). *Important diseases of canola*. Agricultural Education Press, 17p. (In Farsi)
2. Afshari Azad, H. & Chegini, M.R. (2005). *Management of sclerotinia stem rot of canola*. Plant Protection Institute of Iran, 34p. (In Farsi)
3. Aghajani, M. A., Safaee N. & Alizade A. (2008). *Condition of root rot disease canola in Golestan*. Eighteen Iran Plant protection Congress, Hamedan Boo Alisina University, 52p. (In Farsi)
4. Ahmadi, M. R. & Javidfar, F. (1999). *Canola translation*, Holmz, R. J., Rape seeds culture improvement center, 194 papers. (In Farsi)
5. Al-Barrak, Kh. M. (2006). Irrigation interval and nitrogen level effects on growth and yield of canola (*Brassica napus* L.). *Sci. J. King Faisal U. Al-Hassa, Saudi Arabia*, 7(1), 87-102.
6. Azizi, M., Soltani, A. & Khavari khorasani, S. (2000). *Canola translation (Physiology, Cultivation. Breeding and Biotechnology)*. Kimber, D., Mak garegoor, D.I. Mashhad. Mashhad Publication, 230 papers. (In Farsi)
7. Bai, G.H. & Shaner, G.E. (1994). Scab of wheat: prospect for control. *Plant Disease*, 78, 760-776.
8. Balesdent, M.H., Attard, A., Ansan-Melayah, D., Delourme, R., Renard, M. & Rouxel, T. (2001). Genetic control and host range of avirulence toward *Brassica napus* cultivars Quinta and Jet Neuf in *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology*, 91, 70-76.
9. Barari, H., Zamani Zadeh, H., Ershad, D. & Foroutan, A.R. (2000). Distribution of sclerotinia stem rot of canola in Mazandaran province. P295, In: Proceeding of the Iranian 14th Plant Protection Congress, Isfahan, Iran. (In Farsi)
10. Bhowmik, T.P. (2003). Oilseed brassicas, constraints and their management. *CBS publishers and distributors*, India, Dehli.
11. Clark, R.L., Shands, H.L., Bretting, P.K. & Eberhart, S.A. (1997). Germplasm regeneration: developments in poulation genetics and their application. *Crop Scince*, 37, 1-6.
12. Dangl, J. L. (1995). Piece de resistance: Novel classes of plant disease resistance genes. *Cell*, 80, 363-366.
13. Dejestan, S., Mohammadi, S.A., Moghadam, M., Ahari zad, S. & Vesn, J.H. (2010). Isolation of Resistance Gene Analogues (RGAs) in Potato Using Motif Directed Profiling Method and development of Their Genetic Map. *Seed and Plant Improvment Journal*, 1-26, 105-121. (In Farsi)
14. Dellaporta, S.L., Wood, J. & Hichs, J.B. (1983). A plant DNA minipreparation. *Plant Molecular Biology Report*, 1, 19-21.

15. Ellis zzz, R.P., Mcnicol, J.W., Baird, E., Booth, A. & Lawrence, P. (1997). The use of AFLPs to examine genetic relatedness in barley. *Mol Breeding*, (3), 359-369.
16. Fitt, B. D. L., Hu, B. C., Barbetti, M.J. & Rimmer, S. R. (2006). World-breadth importance of phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans* and *L.biglobosa*) on oilseed rape (*Brassica napus*). *European Journal Plant Pathology*, 114, 3-15.
17. De Riek, J., Dendauw, J., Mertens, M., Heurse, J. & Van Blockstaele, E. (1999). Validation of criteria for the selection of AFLP markers to assess the genetic variation of a breeders collection of ever green azaleas. *Theoretical and Applied Genetics*, 99, 1155-1163.
18. Grube, R.C., Radwanski, E. R. & Jahn, M. (2000). Comparative genetics of disease resistance within the solanaceae. *Genetics*, 155, 873-887.
19. Hulbert, S.H., Webb, C.A., Smith, S.M. & Sun, Q. (2001). Resistance gene complexes: Evolution and utilization. *Annual Review of Phytopathology*, 39, 285-312.
20. Koch, S., Dunk, S., Kleinhenz, B., Rohring, M. & Tiedemann, A.V. (2007). A crop loss-related forecasting model for Sclerotinia stem rot in winter oilseed rape. *Phytopathology*, 97, 1186-1194.
21. Meyers, B.C., Kozik A, Griego, A., Kuang, H. & Michelmore, R.W. (2003). Genome-wide analysis of NBS-LRR encoding genes in Arabidopsis. *Plant Cell*, 15, 809-34.
22. Michelmore, R. (2000). Genomic approaches to plant disease resistance. *Current Opinion Plant Biol*, 3, 125-131.
23. Natti, J.J. (1971). Epidemiology and control of bean white mold. *Phytopathology*, 61, 669-674.
24. Powell, W., Morgant, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S. & Rafalasky, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol Breeding*, 2, 225-238.
25. Rahaii, M., Seyyed Tabatabaai, A., Shah Nejat booshehri, A., Abdemishani, S. & Malboobi, M. (2004). Using AFLP technic for assessment genetic diversity in *Brassica napus* L. *Seed and Plant Journal*, 19, 469-481. (In Farsi)
26. Rimmer, S.R. (2007). Chasing genes for resistance to blackleg and sclerotinia in Brassica napus. Proceedings 12th International Rapeseed Congress, Wuhan, China.
27. Roy, N.N. (1984). Interspecific transfer of *Brassica juncea*-type high blackleg resistance to *Brassica napus*. *Euphytica*, 33, 145-149.
28. Salati, M. & Afshari Azad, H. (2002). Identification of plant pathogenic fungi of canola in Golestan province. P51, In: Proceeding of 15th Iranian Plan Protection Congress. Karaj. Iran. (In Farsi)
29. Van der Linden, C.G., Wouters, D., Mihalka, V., Kochieva, E., Smulders, M. & Vosman, B. (2004). Efficient targeting of plant disease resistance loci using NBS profiling. *Theoretical Applied Genetics*, 109, 384-393.
30. West, J.S., Kharbanda, P.D., Barbetti, M.J. & Fitt, B.D.L. (2001). Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe. *Plant Pathology*, 50, 10-27.
31. Zaman miradadi, A., Alamdarloo, M. & Esmaeeli far, A. (2008). Transmittal Agent fungal disease of blackleg canola (*Leptosphaeria maculans*) in Iran. *Research report. Publication in center of development oilseeds*. (In Farsi)