مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۴، شماره ۴، سال ۱۳۸۲ (۸۷۹-۸۷۱)

بررسی مارکر مولکولی پیوسته با صفت طول غلاف در جمعیت دابلد هاپلوئید کلزا (*Brassica napus*)

حبیب‌اله سمیع‌زاده[۱]، بهمن یزدی صمدی[۲]، محمدرضا قنادها[۳]، محمد علی ملبوبی[٤]، علیرضا طالعی[٥]، گری رایس استرینگام[٦]
۱، ۲، ۳، ۵، دانشجوی دوره دکتری، استاد و دانشیاران دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران،
٤، پژوهنده مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی زیستی،
٦، استاد دپارتمان کشاورزی و علوم تغذیه دانشگاه آلبرتا کانادا
تاریخ پذیرش مقاله ۸۱/۱۲/۱٤

خلاصه

طول غلاف یا خورجین یکی از اجزاء موثر بر عملکرد کلزا[۱] می‌باشد که با انتخاب بر روی این صفت بطور غیر مستقیم می‌توان نسبت به افزایش عملکرد و به تبع آن افزایش عملکرد روغن دست یافت. بدین جهت مارکرهای مولکولی جهت انتخاب سریع و مطمئن ژنوتیپ‌های با طول غلاف بلند در برنامه‌های به نژادی مورد جستجو قرار گرفتند و مارکرهای مولکولی همبسته با طول غلاف در یک جمعیت هاپلوئید دوبل شده ناشی از تلاقی بین لاین‌های کلزای رقم کوانتوم (با طول بلند غلاف) X لاین چاینا ای (طول غلاف کوتاه) با استفاده از متد تجزیه توده متفرق (BSA) تشخیص داده شدند. یک نقشه لینکاژی مارکر مولکولی حاوی ۳۷ مکان ژنی RAPD برای این جمعیت جهت تشخیص مکان‌های ژنی صفت کمی (QTLs) کنترل کننده صفت طول غلاف مورد بررسی قرار گرفت که دو مارکر در دو مکان ژنی غیر پیوسته با استفاده از روش اینتروال مپینگ انتخاب شدند که دو مارکر ۲۲٪ تنوع فنوتیپی برای طول غلاف را در جمعیت مورد بررسی تخمین زدند. گزینش با این مارکرها در جهت افزایش طول غلاف موجب انتخاب گروهی از لاینهای هاپلوئید دوبل شده با میانگین طول غلافی معادل ۱۱۲ میلی‌متر گردید که افزایشی معادل ۱۵٪ را نسبت به میانگین جمعیت اولیه باعث شد. این نشان می‌دهد که استفاده از این مارکرها در برنامه‌های به نژادی موجب پیشرفت اصلاح جهت تهیه ارقام با طول غلاف بیشتر می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: RAPD، تجزیه QTL، طول غلاف، تجزیه توده متفرق

مقدمه

اجزاء عملکرد بذری براسیکا[۲] مستقیما متاثر از تعداد بذر، اندازه بذر و وزن تک‌بذر می‌باشد (۲، ۲۱). تمامی این اجزاء با طول غلاف همبسته‌اند بطوریکه غلاف‌های بزرگتر معمولا حاوی بذور با اندازه بزرگتر و تعداد بیشتری از غلاف‌های کوچک می‌باشند (۲۰). بدون شک، یک برنامه اصلاحی جهت تولید رقمی با طول غلاف بلند بطور موثری می‌تواند عملکرد بذر را در صنعت تولید کلزا بهبود بخشد. لذا اطلاعات زمینه ژنومی و ژنتیکی طول غلاف جهت استفاده از تکنیک‌های مدرن به نژادی مهم می‌باشد (۳۱). اخیرا تلاشهای اصلاحی بر مطالعه اجزاء عملکرد از جمله غلاف و اندازه بذر متمرکز شده است که ممکن است بطور معنی‌داری اجزاء روغن و پروتئین را همانند عملکرد متاثر سازد (۴). مطالعاتی که روی فعالیتهای فیزیولوژیکی غلافهای کلزا انجام شده چنین عنوان داشته‌اند که غلاف نه تنها بعنوان یک اندام فتوسنتزی عمل می‌کند بلکه مواد فتوسنتزی را

---

۱. گیاه کلزا (کلزا لغت خارجی است) دارای قرابت زیادی با منداب است.

2 . Brassica

مکاتبه کننده: حبیب‌اله سمیع‌زاده

به بذور در حال رشد داخل خود با تقریبا ۳۰٪ ماده خشک غلاف‌ها و بذور خاص آن غلاف‌ها منتقل می‌کند (۱، ۳).

جایگزینی ممکن برای اصلاح مستقیم عملکرد بذر افزایش طول غلاف است. بعلاوه انتخاب برای طول غلاف بلند تعداد بذر را تا حداقل پنج بذر در غلاف افزایش می‌دهد (۱۴). ژنوتیپ‌های با غلاف بلند اگر حاوی بذور درشت نیز باشند ممکن است موجب افزایش محتوای بالای پروتئین و روغن گردند (۲۹). همچنین در مطالعه مزرعه‌ای توارث غلاف بر روی فامیل‌های مختلف معلوم شده که اولا طول غلاف ظاهرا توارثی چندژنی داشته و توسط ژن‌هائی با اثرات افزایشی کنترل می‌شود و ثانیا ژن‌های موثر بر صفت بلند بودن طول غلاف به میزان زیادی در هسته قرار داشته و اگر اثرات سیتوپلاسمی وجود داشته باشد ناچیز است. همچنین تخمینی معادل ۲ ژن با توارث‌پذیری بالا برای طول غلاف عنوان شده است (۲۹).

معرفی تکنیک‌های انتخاب بر اساس مارکر[1] در برنامه‌های به‌نژادی کلزا ممکن است اصلاح ارقام با طول غلاف بالا را تسریع بخشد. توسط MAS انتخاب در نسلهای در حال تفکیک تلاقی‌ها بر اساس وجود یا عدم وجود مارکرهائی است که بطور نزدیکی با صفت طویل بودن غلاف پیوسته بوده و به میزان بسیار کمی تحت تاثیر اثرات محیطی قرار می‌گیرند. انتخاب مولکولی می‌تواند بطور خودکار برنامه‌ریزی شده و وقتی روش‌هائی بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[2] نظیر RAPD یا SCAR بکار گرفته شوند از نظر هزینه ارزان گردد (۲۸).

اکثر خصوصیات مهم آگرونومیکی نظیر عملکرد و اجزاء عملکرد، ارتفاع بوته و تعداد روز تا گلدهی توسط چندین ژن کنترل می‌شود (۲۵). اگرچه تفاوتی اساسی بین تنظیم‌کننده‌های ژنهای خصوصیات کیفی و کمی وجود ندارد معذالک متد مورد استفاده برای تهیه نقشه‌های ژنتیکی برای عوامل کیفی را نمی‌توان بطور مستقیم برای صفات کمی بکار برد (۲۶). ساکس (۱۹۲۳) برای اولین بار سعی به ایجاد یک پیوستگی بین QTL[3] و صفت مورفولوژیکی نمود و ۶۰ سال بعد وقتی نقشه لینکاژی اشباع بر اساس روش RFLP قابل دسترس شد به اوج کاری خود رسید. هم اکنون تعداد زیادی از روش‌های تهیه نقشه ژنتیکی QTL صفات و تخمین اثرات آنها طراحی شده است (۶، ۹، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۹). معذالک ساده‌ترین متد ردیابی QTL بر اساس تجزیه واریانس یک‌طرفه می‌باشد (۲۶). متد رگرسیونی اینتروال مپینگ تغییر شگرفی را در ردیابی و تعیین مکان QTLها با توجه به مارکرهای مجاور دو طرف آن ایجاد نمود (۱۰، ۲۳). سودمندی این روش بر روش تک مارکری وقتی است که مارکرها در فاصله دوری از هم (۲۰< سانتی‌مرگان) قرار گرفته باشند. معذالک عدم سودمندی در استفاده از این روش برای مارکرهائی که بطور نزدیکی با هم قرار گرفته اند وجود ندارد (۵، ۲۲).

تجزیه توده متفرق[4] می‌تواند برای تجزیه صفات پیچیده ژنتیکی توسط ارزیابی بالک‌های افراد دارای مشابهت در صفت خاص بسط داده شود. اگر یک صفت کمی توسط تعداد کمی از ژنهای اصلی (QTL) کنترل شود، مقایسه بالک‌های افراد حداکثر و حداقل می‌تواند موجب تشخیص سریع مارکرهای پیوسته با QTL گردد (۲۴). استفاده از روش تجزیه توده متفرق برای تعیین مارکرهای پیوسته با QTLها توسط محققین مختلفی جهت تعیین مارکرهای همبسته با QTLها استفاده شده است (۸، ۹، ۱۱، ۱۲، ۱۴، ۱۶، ۱۸، ۲۸، ۳۰).

در مطالعه حاضر از تجزیه توده متفرق (۲۴) همراه با تکنیک RAPD جهت تشخیص مارکرهای پیوسته با طول غلاف در جمعیتی از لاین‌های دابلد هاپلوئید گونه براسیکا نیپوس استفاده بعمل آمد و سپس تجزیه QTL تنوع فنوتیپی درون این مارکر توسط مکان‌های ژنی مشخص را تعیین نمود.

مواد و روشها

مواد گیاهی: یک تلاقی بین یک تیپ کلزا با طول غلاف کوتاه، رقم چاینا ای[5]، و یک تیپ کلزای با طول غلاف بلند، رقم کوانتوم[6]، جهت تهیه ۵۰ لاین دابلد هاپلوئید از میکروسپورهای F1 (تکنیک کاشت میکروسپور) مورد استفاده واقع شدند (استرینگام و همکاران، انتشار نیافته). لاین‌های دابلد هاپلوئید

1. Marker Assisted Selection
2. Polymerase Chain Reaction
3. QTL (Quantitative Trait Loci)
4. Bulk segregant analysis
5 . China A
6. Quantum

در سالهای ۱۳۷۹و ۱۳۸۰ از نظر صفت طول غلاف در یک طرح بدون تکرار مورد ارزیابی واقع شدند.

جهت استخراج DNA از بذور نگهداری شده از گیاهان دابلد هاپلوئید اصلی استفاده شد و پنج گیاه از هریک از ۵۰ لاین دابلد هاپلوئید و والدین در گلخانه با محیط کنترل شده به مدت سه هفته رشد داده شدند و مقادیر مساوی از بافت برگ هر کدام از پنج گیاه بالک شده و به ازت مایع منتقل شدند و پس از لیوفلیزه شدن[1] پودر گردیده و در ۲۰- نگهداری شدند.

استخراج DNA و PCR: DNA نمونه‌ها از ۳۰ تا ۵۰ میلی‌گرم بافت خشک در یک میکروتیوپ دو میلی‌لیتری بر اساس متد تغییر یافته CTAB (۶) استخراج گردید در این راستا میزان ۶۰۰ میکرولیتر از بافرگرم (۶۵° C) 2X CTAB (۱۰۰میلی مول Tris-Hcl pH=8.0، ۲۰ میلی‌مول EDTA، ۱/۴مول NaCl، ۲٪ CTAB) به پودر اضافه شد. بعد از استخراج توسط یک حجم کلروفورم: ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) فاز آبی به یک تیوپ جدید منتقل شده و ۰/۱ حجم محلول CTAB (۱۰٪ CTAB، ۰/۷ مول NaCl) به فاز آبی اضافه شد و استخراج تکرار گردید. فاز آبی جدا شد و با حجمی مساوی از بافر داغ (۶۵° C) رسوب‌دهی CTAB (۵۰ میلی‌مول Tris-Hcl pH=8.0، ۱۰ میلی مول EDTA، ۱٪ CTAB) مخلوط شد. کمپلکس CTAB-DNA حاصله بفوریت رسوب داده شده و رسوب حاصله در ۶۵۰ میکرولیتر از بافر با غلظت نمک بالا (۱۰میلی‌مول Tris-Hcl pH=8.0، ۱ میلی‌مول EDTA، ۱ مول.NaCl) حل شده و سپس DNA با دو حجم اتانول سرد (۲۰-) ۱۰۰٪ توسط مخلوط نمودن ملایم و قرار دادن روی یخ بمدت ۳۰ دقیقه و سانتریفیوژ پس از آن رسوب داده شد. رسوب حاصله ۲ بار با ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۰٪ سرد شسته شده و سپس در یک دسیکیتور در خلاء خشک گردید. پلیت نهائی (بی‌رنگ) در ۱۰۰ میکرولیتر آب با pH معادل ۸ محلول گردید. غلظت DNA توسط دستگاه Gene Quant تعیین شد که عملکردی تقریبا معادل۲۰-۳۰ میلی‌گرم DNA از هر نمونه حاصل شد. غلظت تمامی نمونه‌ها به میزان ۵ µg/µl با ddH_2O pH=۸ رقیق شدند.

1. Lypholize

تجزیه توده متفرق شامل DNA والدین و بالک لاین‌های با طول غلاف بلند و کوتاه بود و بالک DNA توسط ترکیب مقادیر مساوی DNA هر کدام از شش لاین با طول غلاف بلند و کوتاه تهیه شد.

تعداد ۴۱۲ پرایمر ۱۰ جفت بازی (۴۰۰ عدد از دانشگاه بریتیش کلمبیا، ونکوور، کانادا و ۱۲ عدد از شرکت اپلاید بایو سیستم) بر روی این توده متفرق مورد ارزیابی واقع شدند.

هر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز حاوی ۱۰ میلی‌گرم DNA بعنوان الگو بوده و واکنش تکثیر شامل ۲ واحد آنزیم Taq پلیمراز، ۲/۵ mM $MgCl_2$، ۲۰۰ µM (هرکدام) dNTPs و ۰/۲ µM پرایمر بود. برنامه تکثیر قطعات DNA در ترموسایکلر MJ PTC-100 در حجم ۲۱ µl شامل طبع برگشتگی اولیه در °C ۹۵ بمدت ۱۵ دقیقه بوده که توسط ۴۵ چرخه با ۳۰ ثانیه در °C۹۵، ۳۰ ثانیه در °C۳۶، ۱ دقیقه در °C۷۲ و پس از ۴۵ دور با ۱۰ دقیقه در °C۷۲ دنبال شد. محصول PCR حاصل در ژل آگارز ۲٪ (وزن/حجم) در 1XTAE توسط الکتروفورز با ولتاژ ۱۲۰ ولت بمدت یک ساعت و ۴۵ دقیقه جداسازی شد و جهت نمایان‌سازی ژل از سیستم رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید و عکس‌برداری تحت یک سیستم دیجیتال عکس‌برداری از ژل (استراتاژن) استفاده شد.

تجزیه داده‌ها: تکرارپذیری اشکال باندینگ RAPD توسط تکرار حداقل ۴ بار واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد بررسی قرار گرفتند. داده‌های تفرق ژنتیکی و تجزیه QTL برای مارکرهای RAPD همبسته با صفت طول غلاف با استفاده از نرم‌افزار Map Manager مورد بررسی قرار گرفتند. گروه‌بندی و نقشه پیوستگی ژنتیکی با استفاده از حداقل LOD معادل ۳/۰ و یک نسبت سهم نوترکیبی ۰/۵انجام پذیرفت. فواصل نقشه توسط تابع کوسمبای (۱۹۴۴) به سانتی‌مرگان تبدیل شد.

آنالیز واریانس توسط نرم‌افزار آماری SAS V. 6.12 (انستیتوی SAS، کاری، ان، سی) برای هر یک از مارکرها و برای ترکیب مارکرهای غیر پیوسته انجام شد.

نتایج

این تحقیق جهت دستیابی به مارکرهای مولکولی مکان‌های ژنی کنترل کننده صفت طول غلاف در کلزا (B.napus) طراحی شده بود. منبع صفت طول غلاف بلند رقم چاینا ای بوده

که بطور وسیعی در ایالت آلبرتا مورد کشت قرار گرفته و در برنامه‌های به‌نژادی دانشگاه آلبرتا مورد استفاده قرار می‌گیرد.

مجموعی از ۴۱۲ پرایمر توسط روش BSA در جستجوی چند شکلی[1] مورد ارزیابی قرار گرفتند. که ۳۷ پرایمر تصادفی چندشکلی را در والدین نشان دادند که از این تعداد ۶ مارکر بین والدین و بالک‌ها پلی‌مورفیک بودند. مارکرهای مفروض (۶ مارکر) طول غلاف برروی لاین‌های تشکیل دهنده بالک‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند و بهترین مارکرها نهایتا برروی کل جمعیت دابلد هاپلوئید مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای تهیه نقشه لینکاژی کلیه ۳۷ مارکر چند شکل نیز برروی جمعیت آزمون گردیدند.

تجزیه RAPD با استفاده از استراتژی BSA در مجموع دو قطعه تکثیر شده را مشخص نمود که با مکانهای ژنی کنترل کننده‌طول‌غلاف‌همبسته‌بودند.شکل۱ پروفیل PCR این مارکرها را برروی ژنوتیپ‌های تشکیل دهنده بالک‌ها نشان می‌دهد.

پرایمرهای UBC_83 (M2) (باند ۴۷۰ جفت بازی) و باند UBC_43 (M18) (باند ۶۴۰ جفت بازی) با طول غلاف همبسته بودند. که پرایمر UBC_83 حالت غالبیت را برای طول غلاف بلند نشان داده و پرایمر UBC_43 در وضعیت ترانس با طول غلاف بلند بود. و هر دو مارکر نسبت تفرق ۱:۱ را در میان ۵۰ لاین مورد بررسی توسط آزمون مربع خی (بترتیب χ^2 معادل۰/۷۲ و ۳/۹۲) نشان دادند. تجزیه رگرسیونی تک‌مارکری بر اساس مدل خطی جهت تشریح مقادیر تنوع فنوتیپی تبیین شده توسط هر مارکر انجام شد. که مارکر UBC_83 و مارکر UBC_43 بترتیب با ضریب تبیینی معادل ۱۴/۶٪ و ۹/۷٪ بیشترین تنوع فنوتیپی در طول غلاف را در جمعیت مورد بررسی توضیح دادند (جدول ۱).

در هر دو مارکر میانگین طول غلاف بین دسته‌های ژنوتیپی بطور معنی‌داری متفاوت بودند (جدول ۱). دسته مارکرهای پلی‌مورفیک RAPD به وسیله تجزیه داده‌های متفرق با نرم‌افزار Map Manager به هفت گروه لینکاژی پیوسته و یک گروه ناپیوسته تخصیص داده شدند (شکل ۲). تجزیه QTL بر اساس مدل اینتروال مپینگ یک پیک را برای مارکرهای UBC_83 و UBC_43 معلوم نمود که بترتیب هر کدام از این مارکرها تنوع فنوتیپی معادل ۱۵٪ و ۱۰٪ را برای طول غلاف معلوم نمودند (شکل ۳). اثر متقابل دو QTL موجب تبیین تغییرات فنوتیپی طول غلاف به میزان ۲۲٪ گردید (جدول ۱).

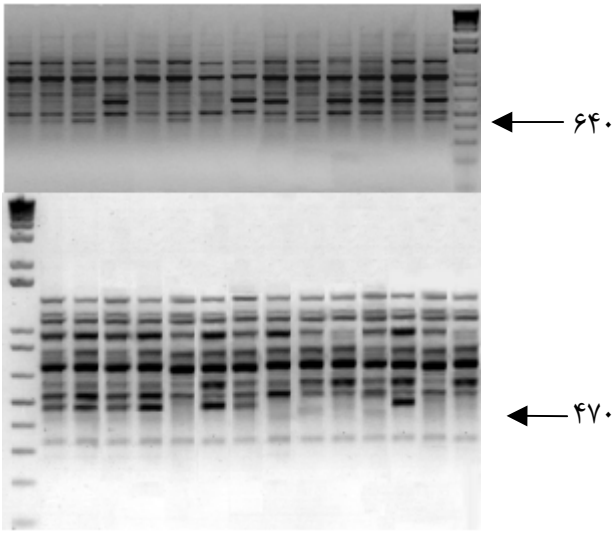
میانگین طول غلاف رقم کوانتوم ۱۳۷ میلی‌متر بوده و این طول برای رقم چاینا ای طول برابر معادل ۸۲ میلی‌متر بود در حالیکه میانگین بالک برای طول بلند معادل ۱۳۳/۱ و برای طول غلاف کوتاه برابر۸۰/۰۴ میلی‌متر و جمعیت دابلد هاپلوئید دارای میانگین ۹۷/۵ بود. در میان ۵۰ لاین دابلد هاپلوئید، ۹ لاین نشان دادند که حامل دو مکان ژنی رقم کوانتوم برای مارکرهای UBC_83 و UBC_43 بودند که با تعداد لاین‌های مورد انتظار برای این کلاس ژنوتیپی در چنین جمعیتی (۱۲/۵) تفاوت معنی‌داری را دارا نبود (χ^2=۴/۴۶، P =۰/۲۵).

انتخاب بر اساس هر دو مارکر موجب افزایش ۱۵٪ میانگین طول غلاف نسبت به میانگین جمعیت گردید و همچنین افزایش ۶/۵٪ را نسبت به انتخاب بر اساس تک‌مارکر UBC_83 شد. بعلاوه ۷ لاین از ۹ لاین انتخاب شده بر اساس این مکان‌های ژنی میانگینی بالاتر از ۱۰۰ میلی‌متر طول غلاف را دارا بودند.

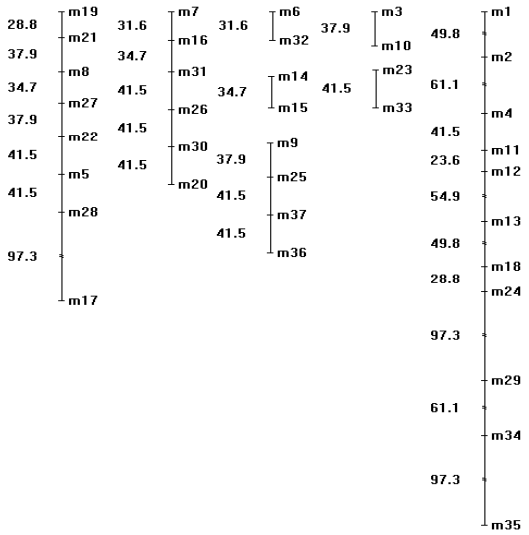
1. Polymorphism

جدول ۱- تجزیه واریانس برای مارکرهای منتخب با تجزیه توده متفرق

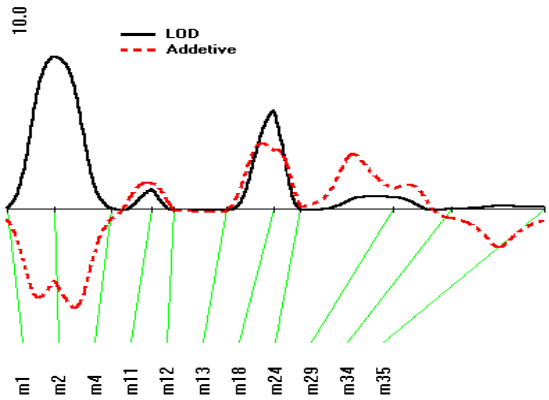
مارکر	میانگین مربعات	احتمال	R^2	SE± میانگین	
				بلند	کوتاه
UBC-83 (M2)	۲۲۰۲/۴۴	۰/۰۰۶	۱۴/۶	۱۰۵/۵±۲۲/۰۱	۹۲/۱±۱۰/۰۳
UBC-304.2 (M9)	۷۱۲/۴۲	۰/۱۳۰	۴/۷	۱۰۱/۶±۲۰/۳۳	۹۴/۱±۱۳/۲۷
UBC-354.1 (M14)	۸۶۳/۶۲	۰/۰۹۴	۶	۱۰۲/۲±۲۰/۲۲	۹۳/۹±۱۳/۵۶
UBC-356.2 (M17)	۵۲۲/۳۹	۰/۱۹۶	۳/۴	۱۰۱/۷±۱۸/۹۸	۹۵/۱۴±۱۶/۱۲
UBC-43 (M18)	۱۴۶۸/۲۸	۰/۰۲۸	۹/۷	۱۰۵/۲±۱۹/۴۶	۹۳/۹۴±۱۲/۲۴
UBC-265 (M26)	۱۰۲۷/۳۵	۰/۰۶۷	۷/۸	۱۰۰/۶±۱۸/۹۸	۸۹/۹۴±۸/۱۹
M2*M18	۱۱۲۹/۵۹	۰/۰۰۸	۲۲/۴	۱۱۲/۲±۲۱/۸۶	۸۹/۲۳±۵/۲۳



شکل ۱- پروفیل PCR ایجاد شده توسط تجزیه RAPD با مارکرهای M2 و M18 بر روی ژنوتیپ‌های تشکیل دهنده بالک‌ها



شکل ۲- نقشه لینکاژی مارکرها در جمعیت حاصل از تلاقی رقم کوانتوم X چاینا ای



شکل ۳- نمودار LOD مکانهای ژنی کنترل کننده طول غلاف

بحث

این مطالعه برروی تشخیص مارکرهای مولکولی همبسته با مکان‌های ژنی طول غلاف در کلزا متمرکز شده بود. هدف این تحقیق ایجاد دسته‌ای از مارکرهای RAPD و بدنبال آن مارکرهای SCAR بود که بتوانند در برنامه‌های به‌نژدای جهت انتخاب یکی از اجزاء مهم عملکرد یعنی طول غلاف بکار رفته و بطور غیر مستقیم عملکرد دانه و روغن را افزایش دهند.

ارزیابی پرایمرهای تصادفی با توجه به اینکه فقط ۹٪ از انها چند شکلی را در والدین نشان دادند بطور کاملی موثر نبود. از طریق روش BSA شش پرایمر حالت پلی‌مورفیک را برای صفت طول غلاف نشان دادند که فقط دو عدد از این پرایمرها پس از آزمون بر روی جمعیت و استفاده از روش تجزیه واریانس ثابت شد که بطور معنی‌داری با صفت طول غلاف همبستگی دارند (جدول ۱).

یکی از مهمترین یافته‌های این مطالعه تشخیص دو مکان ژنی پیوسته با مارکرهای RAPD بود. یکی از دلایل دستیابی به این مهم میزان طول غلاف در رقم کوانتوم بود که تقریبا دو برابر والد با طول غلاف کوتاه بود که امر باعث ایجاد یک تنوع وسیع فنوتیپی برای طول غلاف در جمعیت دابلد هاپلوئید شد. این تنوع وسیع باعث دستیابی و تشخیص دو مکان ژنی در این مطالعه گردید.

تهیه نقشه ژنتیکی مارکرها باعث قرار گرفتن مارکرها در ۷ گروه پیوسته و یک گروه ناپیوسته گردید که در این گروه نیز مارکرهای M1 (UBC-2) –(UBC-83) M2 و مارکرهای M11(UBC-329) - M12(UBC-341) و مارکرهای M18(UBC-43) - M24(UBC-376.1) با یکدیگر بطور نزدیکی پیوسته‌اند. یک تجزیه QTL این اطلاعات پیک QTL را در ناحیه مارکر UBC-83 با حدود اطمینان ۵ سانتی‌مرگان در محاط آن و پیک دیگر را در ناحیه مارکر UBC-43 با حدود اطمینان ۴ سانتی‌مرگان معلوم نمود. مارکر UBC-83 حالت قطعه DNA غالب و مارکر UBC-43 حالت مغلوب را برای مکانهای ژنی رقم کوانتوم نشان دادند (شکل ۱). این خصوصیت به این دسته مارکرها پتانسیل خوبی را برای انتخاب بر اساس مارکر جهت صفت طول غلاف اعطاء می‌کند.

میانگین طول غلاف لاین‌های منتخب از این جمعیت موثر

بودن مارکرها در این دو مکان ژنی را تائید می‌نماید. بهترین مارکر به تنهائی بر اساس تجزیه واریانس مارکر UBC-83 بود که ۱۴/۶٪ تنوع فنوتیپی را تبیین می‌نمود. این مارکر به تنهائی لاینهایی را انتخاب نمود که میانگینی حدود ۱۰۵/۵ میلی‌متر را داشته و وقتی هر دو مارکر برای انتخاب مکان‌های ژنی رقم کوانتوم استفاده شدند میانگین طول غلاف به ۱۱۲/۲۳ میلی‌متر افزایش پیدا کرد و دو مکان ژنی ۲۲/۴٪ تنوع فنوتیپی را توضیح دادند (جدول ۱).

بطور مشابهی تجزیه QTL نشان داد که دو مکان ژنی می‌توانند ۱۸٪ تنوع را توضیح دهند. انتخاب مارکرها در هر دو مکان ژنی در میان ۵۰ لاین دابلد هاپلوئید بایستی بطور متوسط ۱۲ لاین را جدا نماید. در اینجا ۹ لاین حامل مکان‌های ژنی رقم کوانتوم بود که ۷ عدد از آنها میانگینی بالاتر از ۱۰۰ میلی‌متر طول غلاف را دارا بودند. این اطلاعات موثر بودن مارکرهای تهیه شده در این مطالعه را جهت انتخاب لاین‌های با طول غلاف بالا در برنامه های به‌نژادی نشان می‌دهد. وقتی هر دو QTL مورد انتخاب قرار می‌گیرند میانگین طول غلاف انحرافی را از والد رقم کوانتوم نشان می‌دهد که آن را می‌توان به ۴ عامل زیرین نسبت داد:

الف) QTLهای ردیابی نشده ب) تراکم مارکر و سهم نوترکیبی در اطراف QTLهای ردیابی شده ج) اندازه جمعیت دابلد هاپلوئید و بالاخره د) نوع مارکر مورد استفاده.

مفید بودن دسته مارکرهای تشخیص داده شده در این بررسی موضوع مطالعه دیگری خواهد شد که در آن مارکرها جهت تکثیر قطعات DNA با اندازه مشابه در سایر ژرم پلاسمها شامل الف) جمعیتهای حاصل از تلاقی‌های والد کوانتوم با دیگر لاین‌ها ب) تلاقیهای کوانتوم با دیگر گونه‌های جنس براسیکا[1] و ج) لاین‌های با طول غلاف بلند دیگر بکار رود.

1. Brassica

بطور کلی جهت بررسی بیشتر برروی این مارکرها آنها به مارکرهای SCAR تبدیل خواهند شد تا بررسی جهت یافتن مکان‌های ژنی رقم کوانتوم با کارائی و اتوماسیون بیشتری صورت گیرد.

از آنجائیکه دو مارکر در این بررسی تشخیص داده شدند شانس انترگرسیون ژنهای کوانتوم به زمینه‌های مختلف ژنتیکی افزایش پیدا کرده و لذا اگر یک مارکر در تکثیر قطعه‌ای معین از DNA ناتوان باشد. از مارکر دیگر می‌توان برای انتخاب استفاده نمود.

اطلاعات تئوریک تحقیقاتی در زمینه طول غلاف خیلی محدود می‌باشد (۲۹). و تاکنون گزارشات مرتبط با توارث طول غلاف از طریق روشهای مولکولی یافت نشده است. لذا این مقاله حداقل می‌تواند اطلاعات قبلی ما را در رابطه توارث طول غلاف تاتید نماید که عبارتند از: الف) طول غلاف یک صفت آگرونومیکی است که قابل توارث بوده و دارای توارثی کمی است. ب) منابع ژنومیکی قابل دسترسند و نهایتا می‌توانند در به‌نژادی محصول مورد استفاده واقع شوند. و ج) تکنولوژی مولکولی جهت سرعت بخشیدن به تحقیقات مفید بوده و نزدیک نمودن زمینه‌های مختلف تحقیقات بیولوژیکی به یکدیگر را تسریع می‌کند.

با توجه به نتایجی که در این بررسی بدست آمد پیشنهاد می‌گردد که با استفاده از روش‌هائی نظیر افزایش سطح پوشش مارکری در منطقه QTL مورد بحث نسبت به متراکم نمودن این ناحیه اقدام گردد تا بتوان نسبت به جداسازی این QTL اقدام بعمل آورد.

سپاسگزاری

نگارندگان از دکتر گلن هاوکینز و لیزا گوریگان (دانشگاه آلبرتا، ادمونتون، کانادا) جهت مساعدت‌های بیدریغ در اجرای این تحقیق کمال تشکر را دارند.

REFERENCES

1. Allen, E.J., D.G. Morgan & W.J. Ridgman. 1971. A physiological analysis of the growth of oilseed rape. J. Agric. Sci. Camb., 77:339-341.
2. Ali, M., L.O. Copeland, S.G. Kelly & J.D. Kelly. 1995. Relationship between genetic distance and heterosis for yield and morphological traits in winter canola (*Brassica napus L.*). TAG, 77:118-121.
3. Brar, G. & W. Thies. 1977. Contribution of leaves, stem, siliquas and seeds to dry matter accumulation in ripening seeds of rapese. Pflanzenphysiologie,82:1-9.

4. Chay, P., & N. Thurling. 1989. Identification of genes controlling pod length in spring rapeseed, *Brassica napus* L., and their utilization for yield improvement. Plant Breed., 103:54-62.
5. Chmielewicz, K.M, & K.F. Manley. 2002. User manual for Map Manager QTL. Roswell Park Cancer Institute. PP.192.
6. Darvasi, A., A. Weinreb, V. Minke, J.I. Weller & M. Soller. 1993. Detecting marker-QTL linkage and estimating QTL gene effect and location using a saturated genetic map. Genetics, 134:943-951.
7. Doyle, J.F. & J.L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus Gaitherburg Med., 12:13-15.
8. Fourmann, M., Barret P., Renard M., Pelletier G., Delourme R. & D. Brunel. 1998. The two genes homologous to Arabidopsis FAE1 co-segregate with the two loci governing erucic acid content in *Brassica napus*. Theor. Appl. Genet. 96: 852-858.
9. Gimelfarb, A. & R. Lande. 1995. Marker assisted selection and marker-QTL associations in hybrid populations. Theor. Appl. Genet., 91: 522-528.
10. Haley, C. S. & S. A. Knott (1992) A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. Heredity 69: 315-324.
11. Jonsson, R. 1977. Erucic-acid heredity in rapeseed (*Brassica napus* L. and *Brassica campestris* L.). Hereditas 86:159-170.
12. Jourdren, C., P. Barret, R. Horvias, N. Foisset, R. Delourme & M. Renard. 1996. Identification of RAPD markers linked to the loci controlling erucic acid level in rapeseed. Mol. Breed 2: 61-71.
13. Kao, C-H. Z-B. Zeng & R.D. Teasdale. 1999. Multiple interval mapping for quantitative trait loci. Genetics, 152: 1203-1216.
14. Knapp, S.J., W.C. Bridges & D. Birkes. 1990. Mapping Quantitative trait loci using molecular –marker linkage maps. Theor Appl Genet., 79: 583-592.
15. Knott, S.A. & C.S. Halley. 1992. Aspects of maximum-Likelihood methods for the mapping of quantitative traits in line crosses. Genet. Res., 60:139-151.
16. Kondra, Z.P. & B.R. Stefansson. 1965. Inheritance of erucic and eicosenoic acid content of rapeseed oil (*Brassica napus*). Can. J. Genet. Cytol. 7:505-510.
17. Kosembi, D.D. 1944. The estimation of map distances from recombination values. Ann Eugenet. 12:172-175.
18. Kryzmanski, J. & R.K. Downey. 1969. Inheritance of oleic, linoleic and linolenic acids in seed oil of rapeseed, *Brassica napus*. Can. J. Plant Sci. 55:205-210.
19. Paterson, A.H., J.W. De Verna, B. Lanini & S.D. Tanksley. 1990. Fine mapping of quantitative trait loci using a selected overlapping chromosome in an interspecies cross of tomato. Genetics, 124:724-735.
20. Lebowitz, R.J. 1989. Image analysis measurements and repeatability estimates of siliqua morphological traits in *Brassica compestris* L. Eu phytica, 43:113-116.
21. Leon, J. 1993. The importance of crop physiology for the breeding of oilseed rape. Fett Wissenschaft Technologie, Vol. 95: 283-287.
22. Manly, K. F. & J. M. Olson (1999) Overview of QTL mapping software and introduction to Map Manager QTL. Mammalian Genome 10: 327-334
23. Martinez, O. & R. N. Curnow (1992) Estimating the locations and the sizes of the effects of quantitative trait loci using flanking markers. Theor. and Appl. Gene. 85: 480-488
24. Michelmore, R.W., I. Paran & R.V. Kessli. 1991.Identification of markers linked to disease resistance genes by Bulked Segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88:9828-9832.
25. Mohan, M., S. Nair, A. Bhagwat, T.G. Krishna, M. Yano, C.R. Bhatia & T. Sasaki. 1997. Genome mapping, Molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. Molecular Breeding, 3:87-103.
26. Prioul, J-L., S. Quarrie, M. Causse & D.D. Vienne. 1997. Dissecting complex physiological functions

through the use of molecular quantitative genetics. J. Expl. Botany, 48:1151-1163.
27. Sax, K. 1923. The association of size differences with seed coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. Genetics, 8:552-560.
28. Somers, D.J., K.R.D. Friesen & G. Rakow. 1998. Identification of molecular markers associated with linoleic acid desaturation in *Brassica napus*. Theor Appl Genet. 96:897-903
29. Stringam, G.R. & D. J. Bing. 1994. Use of biothechnology to relate pod and seed size, quality traits and yield in canola. Project 90M232. University of Alberta press.62 pp.
30. Thormann, C.E., J. Romero, J. Mantet & T.C. Osborn. 1996. Mapping loci controlling the concentrations of erucic and linolenic acids in seed oil of *Brassica napus* L. Theor. Appl. Genet. 93: 282-286.
31. Thurling, N. 1991. Application of the ideotype concept in breeding for higher yield in the oilseed Brassicas. Field Crop Research, 26:201-220.

Iranian, J. Agric. Sci. Vol. 34, No. 4, 2003

A Study of Molecular Marker Associated with Pod Length Trait in Canola (*B. napus*) Doubled Haploid Population

H SAMIZADEH[1], B. YAZDI-SAMADI[2], M.R.GHANNADHA[3], M.A. MALBOBI[4], A.R. TALEEI[5], AND G. RICE STRINGAM[6]

1, 2, 3, 5, Former Graduate Student, Professor and Associate Proffesors, Faculty of Agriculture, University of Tehran,Karaj, Iran. 4, Researcher, National Center of Genetic Engineering and Biotechnology Researches, 6, Professor, Department of Agriculture and Nutritional Science, University of Alberta, Canada

Accepted March. 4, 2003

SUMMARY

Pod length is one of the components effective in canola yield the selection for which can not only increase seed yield but also the oil yield. For this reason molecular markers are sought to assist in early and reliable selection of desired long pod genotypes in breeding programmes. Molecular marker associated with long pod loci were identified in a doubled haploid population derived from a cross between the canola lines Quantum (long pod)× china A (short pod) using RAPD and bulked segregant analysis. A molecular marker linkage map of 37 loci for this population was used to identify quantitative trait loci (QTL) controlling pod length. Two markers in two unlinked loci were selected by using Interval Mapping Model which explained 22% of phenotypic variation for pod length in this population. Selection for markers at two loci for the increase of pod length resulted in a group of DH lines with 112 mm pods that lead to an increase of 15% in the whole population mean. This shows that use of these markers in the breeding programmes will enhance the breeding of long pod *B.napus* cultivars.

Key words: RAPD, QTL analysis, Pod length, Bulked segregant analysis.