Archive of SID

"نهال و بذر"
جلد ۲۱، شماره ٤، سال ۱۳۸٤

شناسایی نشانگرهای مولکولی پیوسته با مقدار اسید اولئیک در کلزای بهاره (*Brassica napus* L.)*

Identification of Molecular Markers Associated with Oleic Acid Level in Spring Oilseed rape (*Brassica napus* L.)

فرزاد جاویدفر، حسن زینالی، سیروس عبدمیشانی، علی‌اکبر شاه‌نجات بوشهری و رضا توکل‌افشاری

دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

تاریخ دریافت: ۱۳۸۳/۱۲/۸

چکیده

جاویدفر، ف.، زینالی، ح.، عبد میشانی، س.، شاه‌نجات بوشهری، ع. ا.، و توکل افشاری، ر. ۱۳۸٤. شناسایی نشانگرهای مولکولی پیوسته با مقدار اسید اولئیک در کلزای بهاره (*Brassica napus* L.). **نهال و بذر** ۲۱: ۵۲۹-۵۱۵.

کیفیت روغن کلزا (*Brassica napus* L.) به وسیله ترکیب اسیدهای چرب آن تعیین می‌گردد. یکی از مهم‌ترین برنامه‌های به نژادی کلزا درحال حاضر افزایش ترکیب اسید اولئیک می‌باشد که منجر به افزایش دوام و عمر روغن می‌گردد. به منظور شناسایی نشانگرهای مولکولی مرتبط با مقداراسید اولئیک در کلزا از جمعیت دابلد هاپلوئید حاصل از تلاقی لاین T099-5318-20 با لاین DH12075، نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR و روش تجزیه تفرق توده‌ای استفاده شد. شش نشانگر مولکولی ارتباط نزدیکی را با مقدار اسید اولئیک در کلزا نشان دادند. دو نشانگر RAPD، $UBC\ 2_{830}$ با اثر مثبت و $UBC\ 538_{1650}$ با اثر منفی به ترتیب ۴۳ و ۳٤ درصد واریانس فنوتیپی را برای مقادیر اسید اولئیک توجیه کردند. به منظور ایجاد نشانگر SCAR، نشانگر $UBC2_{830}$ همسانه و توالی یابی شد. بر اساس اطلاعات حاصل از توالی، آغازگرهای اختصاصی طراحی شد. نشانگر SCAR، یک قطعه اختصاصی با ۳۹۹ جفت باز پیوسته با اسید اولئیک را تکثیر کرد. نشانگرهای شناسایی شده در این تحقیق و نشانگرSCAR می‌توانند به عنوان ابزار مناسبی جهت گزینش برای مقادیر بالای اسید اولئیک مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: کلزا، اسید اولئیک، نشانگرمولکولی، ISSR، RAPD، SCAR.

* بخشی از رساله دکتری نگارنده اول.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

کلزا (*Brassica napus* L.) یکی‌ازمهم‌ترین گیاهان خانواده Cruciferae می‌باشد. دانه کلزا حاوی ٤٦- ٤٠ درصد روغن می‌باشد و در حال حاضر در بین گیاهان روغنی بعد از سویا و نخل روغنی مکان سوم را در جهان دارا می‌باشد (Rajcan *et al*., 1999). تولید ارقام دو صفر کلزا که مقدار اسید اروسیک آن در روغن کمتر از دو درصد و میزان گلوکوزینولات آن در کنجاله کمتر از ۳۰ میکرومول در هر گرم ماده خشک کنجاله بود، موجب شد که سطح زیر کشت وتولید کلزا در دنیا به‌طور چشم‌گیری افزایش یابد (Rajcan *et al*., 1999).

یکی از مهم‌ترین برنامه‌های به نژادی کلزا، کیفیت روغن می‌باشد. کیفیت روغن کلزا به وسیله ترکیب اسیدهای چرب آن مشخص می‌شود. از مهم‌ترین اسیدهای چرب کلزا می‌توان به اسید پالمیتیک (۰ : ١٦)، اسید استئاریک (۰ : ۱۸)، اسید اولئیک (۱ : ۱۸)، اسید لینولئیک (۲ : ۱۸) و اسید لینولنیک (۳ : ۱۸) اشاره کرد. اکثریت روغن کلزا را اسیدهای چرب ۱۸ کربنه تشکیل می‌دهند. روغن کلزا به طور متوسط حاوی ٦٥-٥٥ درصد اسید اولئیک، ۲۰-١٤ درصد اسید لینولئیک و ۱۲-۸ درصد اسید لینولنیک می‌باشد (Somers *et al*., 1998). اسید اولئیک به دلیل دارا بودن یک باند دوگانه دارای پایداری بیشتری در مقابل حرارت است و موجب افزایش دوام و عمر روغن می‌شود. اسید لینولنیک دارای سه باند دوگانه است و به راحتی اکسیده شده و در نتیجه پایداری و عمر روغن به شدت کاهش می‌یابد (Hu *et al*., 1999). تولید ارقام با مقادیر اندک اسید لینولئیک و اسید لینولنیک به طور غیرمستقیم باعث افزایش سطوح اسید اولئیک می‌شود و بدین ترتیب روغن حاصل نسبت به دما از پایداری بیشتری برخوردار خواهد بود. ترکیب مطلوب برای روغن کلزا بایستی حاوی بیش از ۸۰ درصد اسید اولئیک، کمتر از ۱۰ درصد اسید لینولئیک و کمتر از ۲ درصد اسید لینولنیک باشد (Somers *et al*., 1998).

گزینش به کمک نشانگر برای ژن‌های کنترل‌کننده غلظت اسیدهای چرب در کلزا یک ابزار مهم در برنامه به‌نژادی کلزا محسوب می‌شود. انتخاب نشانگرهای مناسب می‌تواند به نحو مؤثری به گزینش ژنوتیپ‌های مناسب از نظر اسیدهای چرب منجر شود (Hu *et al*., 1999).

تلاش‌های به‌نژادی برای تغییر اسیدهای چرب به دلیل وجود اثر محیطی و وراثت چند ژنی این صفات بسیار پیچیده می‌باشد (Thomas and Kondra, 1973؛ Kondra and Thomas, 1975؛ Depenbrock and Wilson, 1987؛ Chen and Beversdorf, 1990). کنترل ژنتیکی مقدار اسید اولئیک در روغن کلزا پیچیده می‌باشد.به نظر می‌رسد که چهار مکان ژنی در کنترل این صفت نقش دارند

www.SID.ir

Archive of SID

(Burns *et al*., 2003). هو و همکاران (Hu *et al*., 1999)یک‌نشانگرمولکولی RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA) را که همبستگی منفی با اسید اولئیک داشت، شناسایی کردند که این نشانگر حدود ۲۸ درصد از تنوع فنوتیپی این صفت در جمعیت را توصیف می‌کرد. تان هوانپا و همکاران (Tanhuanpää *et al*., 1998) یک ارتباط بین ژن FAD2 که کد کننده آنزیم غیراشباع کننده اسید اولئیک می‌باشد و یک QTL (Quantitative trait loci) برای اسید اولئیک در شلغم روغنی (*B. rapa*) شناسایی کردند. شیرهولت وهمکاران (Schierholt *et al*., 2000) یک موتاسیون با اسید اولئیک بالا را در کلزا نشانمند کردند و نشان دادند که نشانگرهای AFLP (Amplified fragment length polymorphic) مرتبط، نزدیک یک کپی از ژن FAD2 قرار دارند. تان هوانپا و شولمون (Tanhuanpää and Schulman, 2002) سه مکان ژنی را در سه گروه لینکاژی شناسایی کردند که حدود ۷۳/۵ درصد تنوع برای سطوح اسید لینولنیک در شلغم روغنی را در بر می‌گرفت.

این تحقیق به منظور شناسایی نشانگرهای مولکولی مناسب برای مقدار اسید اولئیک در کلزا انجام گرفت. هدف از این تحقیق یافتن نشانگرهای مولکولی RAPD یا ISSR بود که بتوانند در گزینش برای مقادیر بالای اسید اولئیک در گیاه کلزا مورد استفاده قرار گیرند. هدف بعدی تبدیل این نشانگر به نشانگر اختصاصی SCAR بود که به سهولت گزینش کمک کند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

تلاقی بین یک لاین اصلاح شده خالص T099-5318-20 با یک لاین دابلد هاپلوئید DH12075 برای تولید ۱۱۹ لاین دابلد هاپلوئید از میکروسپورهای F_1 طبق روش کارلوس و دایاس (Carlos and Dias, 2001)، مورد استفاده قرار گرفت. لاین T099-5318-20 یک لاین اصلاح شده در مرکز تحقیقات کشاورزی ساسکاتون کانادا می‌باشد که از طریق تلاقی لاین S86-69 (موتان FAD3/7) با لاین M453 (موتان FAD2/6) حاصل شده است (مذاکره شخصی با دکتر گرهارد راکو). لاین‌های دابلد هاپلوئید در مزرعه تحقیقاتی مرکز تحقیقات ساسکاتون کانادا در سال‌های ۱۳۸۲ و ۱۳۸۳ کاشته شدند. کاشت لاین‌ها در هر دو سال با بذرهای ذخیره شده از گیاهان دابلد هاپلوئید اصلی انجام شد و شامل دو تکرار با حدود ۸۰-۶۰ گیاه در هر ردیف بود. بذرهای هر ردیف برای اندازه‌گیری تمام ترکیبات اسیدهای چرب به ویژه اسید اولئیک با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی(GC) و طبق روش تایز (Thies, 1974) مورد استفاده قرار گرفتند.

www.SID.ir

Archive of SID

استخراج DNA

به منظور استخراج DNA از بذر گیاهان دابلد هاپلوئید اصلی حاصل از کشت میکروسپور استفاده گردید. سه گیاه از هر یک از ۱۱۹ دابلد هاپلوئید و والدین در گلخانه با شرایط کنترل شده به مدت ۱۲ روز رشد داده شدند. مقادیر مساوی از بافت برگ به تیوب منتقل و در دستگاه خلاء انجماد در دمای ٤٥- درجه سانتی‌گراد خشک گردید. استخراج DNA طبق روش سومرز و همکاران (Somers *et al.*, 1998) انجام شد. بدین منظور حدود ۵۰ میلی‌گرم از بافت خشک شده برگ به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتر منتقل گردید و مقدار یک میلی لیتر از بافر عصاره گیری [(۰/۱ مول Tris-HCl (pH=8.0) ، ۱۰ میلی‌مول EDTA ، ۱ مول KCl و ۵ درصد SDS)] به آن اضافه شد و در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ده دقیقه حرارت داده شد. سپس نمونه‌ها سانتریفوژ شدند و به مایع رویی یک میکرومول Rnase اضافه گردید و DNA با ایزوپروپانول رسوب داده شد. DNA به وسیله اتانول ۷۰ درصد دوباره شسته شد و مجدداً در آب حل شد و سپس توسط نمونه‌های استاندارد کمیت DNA تعیین گردید. کمیت و کیفیت DNA به وسیله ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر 1XTAE و با استفاده از نمونه‌های استاندارد تعیین شد. مقدار DNA حاصل از هر نمونه بین ۲۵ تا ۱۰۰ میکروگرم بود که همه نمونه‌ها به ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق و تقسیم شدند.

تجزیه تفرق توده‌ای

دو بالک از مقادیر بسیار اندک و بسیار بالای اسید اولئیک ازجمعیت دابلد هاپلوئید تهیه گردید. بدین منظور پس از استخراج DNA ، شش نمونه از مقادیر بسیار اندک اسید اولئیک با میانگین ۵۸ درصد و شش نمونه از مقادیر بسیار بالای اسید اولئیک با میانگین ۷۷ درصد مورد استفاده قرار گرفت. برای هر بالک، از مقادیر مساوی DNA (۲۵ میکرولیتر) از هر کدام از شش لاین دابلد هاپلوئید استفاده شد.

تجزیه RAPD

در مجموع ٤٦۳ آغازگر RAPD تهیه شده از دانشگاه بریتیش کلمبیا، ونکوور کانادا (سری ۱، ۲، ۳، ٤، ٦ و ۷)، برای تعیین چند شکلی لاین‌های والدین مورد استفاده قرار گرفتند. آغازگرهایی که در والدین چند شکلی نشان دادند برای غربال بالک‌ها استفاده شدند. تعداد ۱۸ آغازگر منتخب در اجزای بالک و کل جمعیت بررسی‌شدند. واکنش‌زنجیره‌ای پلی‌مراز (۲۰ میکرولیتر) حاوی 1X بافر PCR، ۲/۵ میلی‌مول $MgCl_2$ ، ۲۰۰ میکرومول از هر کدام از dNTP، ۰/۲ میکرومول آغازگر، یک واحد Taq پلی مراز (NEB) و ۱۰ نانوگرم از DNA بود. تکثیر قطعات DNA در ترموسایکلر PTC-200 (از شرکت تحقیقات USA, Reno, MJ) شامل طبع برگشتگی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد (۹۰ ثانیه) که توسط ۳۵ سیکل با ۲۰ ثانیه در ۹۵ درجه، یک دقیقه در ۳٦ درجه و ۹۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد دنبال

www.SID.ir

Archive of SID

گردید. یک سیکل انتهایی با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت هفت دقیقه انجام گردید.

تجزیه ISSR

در مجموع ٦٣ آغازگر ISSR تهیه شده از دانشگاه بریتیش کلمبیا ، ونکوور کانادا (سری ۹) طبق روش ذکر شده در تجزیه RAPD برای غربال لاین‌های والدین و بالک‌ها به منظور تعیین چند شکلی مورد استفاده قرار گرفتند. تعداد دو آغازگر ISSR منتخب، در اجزای بالک و کل جمعیت بررسی شدند. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (۲۰ میکرولیتر) حاوی 1X بافر PCR، ۱/۵ میلی‌مول $MgCl_2$ ، ۱۰۰ میکرومول از هر dNTP، ۰/۲۵ میکرومول از هر آغازگر ، یک واحد Taq پلی مراز (NEB) و ۲٪ فرمامائید (USA, Westchester, VWR) و ۱۰ نانوگرم از DNA بود. تکثیر قطعات DNA در ترموسایکلر PTC-200 شامل طبع برگشتگی اولیه در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد (۵ دقیقه) که توسط ٤٠ سیکل ۹۵ درجه (٤٥ ثانیه)، ۵۲ درجه (٤٥ ثانیه) و یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد دنبال گردید. یک سیکل انتهایی با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ده دقیقه انجام گردید.

تجزیه FAD2

تعدادسه‌جفت‌آغازگر اختصاصی ژن FAD2 (NCBI accession: AJ459107, AF243045) طراحی شد. توالی‌های FAD2F1 و FAD2R1 به ترتیب 5'ATGGGTGCAGGTGGAAGAAT3' و 5'GTCGTCTAGCCACTGGTAGTCG3' ، توالی‌های FAD2F2 و FAD2R2 به ترتیب 5'CCTCCTCGTCCCTTACTTCTCCTG3'و 5'CCGTAGCAGACGGCGAGGATGCC3' و توالی‌های FAD2F3 و FAD2R3 به ترتیب 5'ATGGGTGCAGGTGGAAGAAT3' و 5'GTGGAAGACCTTGTTC 3' بودند. این آغازگرها برای بررسی چند شکلی در والدین و اجزای بالک‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. واکنش‌زنجیره‌ای پلی‌مراز شامل 1X بافر PCR ، ۲/۵ میلی‌مول $MgCl_2$، ۱۰۰ میکرومول از هر کدام از dNTP ، ۰/۲۵ میکرومول از هر آغازگر ، یک واحد Taq پلی مراز (NEB) و ۱۰ نانوگرم از DNA بود. تکثیر قطعات DNA در ترموسایکلر PTC-200 شامل طبع برگشتگی اولیه در دمای ٩٤ درجه سانتی‌گراد (پنج دقیقه)، ۳۲ سیکل با ٤٥ ثانیه در ٩٤ درجه، ٤٥ ثانیه در ۵۹ درجه و یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد دنبال شد. یک سیکل انتهایی با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ده دقیقه انجام شد.

همسانه سازی و تهیه نشانگرهای SCAR

در نشانگر منتخب برای همسانه‌سازی ابتدا قطعات تکثیر شده مورد نظر با استفاده از اسکالپل ضدعفونی شده توسط نمونه‌برداری نقطه‌ای از روی ژل آگارز جدا گردید و قطعه DNA توسط آغازگر اولیه مورد نظر و واکنش PCR مشابه با RAPD تکثیر شد تا مقدار کافی از قطعه مورد نظر تکثیر شود و نیز از خلوص آن اطمینان حاصل گردد. قطعات DNA تکثیر شده

www.SID.ir

Archive of SID

در داخل ناقل pDrive با استفاده از کیت کیاژن همسانه‌سازی شدند. پلاسمید تکثیر شده با استفاده از کیت Wizard plus Minipreps (پرامگا، مدیسن، آمریکا) جداسازی شد. توالی قطعات همسانه‌سازی شده در آزمایشگاه توالی‌یابی DNA، موسسه بیوتکنولوژی گیاهی انجمن تحقیقات ملی ساسکاتون کانادا تعیین توالی شد.

با استفاده از داده‌های حاصل از تعیین توالی، آغازگرهای اختصاصی طراحی شد. آغازگرهای طراحی شده برای نشانگر $UBC2_{830}$ شامل آغازگر پیش رو با توالی 5' TGATGAACCTCCATGGA3' و آغازگر پس رو با توالی 5'ACATAGTCGCCATTAATTA3' بودند. نشانگر SCAR در گونه‌های دیپلوئید جنس براسیکا شامل شلغم روغنی *B. rapa* (AA)، کلم *B. oleracea* (CC)، خردل سیاه *B. nigra* (BB) و گونه‌های آلوتتراپلوئید شامل خردل هندی *B. juncea* (AABB)، خردل حبشی *B. carinata* (BBCC) و کلزا *B. napus* (AACC) مورد بررسی قرار گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (۲۰ میکرولیتر) شامل بافر 1XPCR، ۱/۵ میلی‌مول $MgCl_2$، ۱۰۰ میکرومول از هر کدام از dNTP، یک واحد Taq پلی‌مراز (NEB)، ۰/۲۵ میکرومول از هر آغازگر و ۱۰ نانوگرم از DNA بود. تکثیر قطعات DNA شامل طبع برگشتگی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد (پنج دقیقه)، ۳۷ سیکل شامل یک دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، یک دقیقه در ۵۸ درجه و یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. یک سیکل انتهایی نیز با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ده دقیقه انجام گردید. قطعات PCR تکثیر شده در تجزیه RAPD، ISSR و SCAR در ژل آگارز ۱/۵ درصد و در تجزیه FAD2 در ژل آگارز ۲/۵ درصد 1X TAE توسط الکتروفورز با ولتاژ ۱۲۰ ولت به مدت سه ساعت جداسازی گردید. برای نمایان سازی ژل از سیستم رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید و عکس‌برداری تحت یک سیستم دیجیتال عکس برداری از ژل (استراتاژن) استفاده گردید.

تجزیه داده‌ها

تجزیه رگرسیون تک نشانگری بر اساس مدل خطی جهت تشریح مقادیر تنوع فنوتیپی تبیین شده توسط هر نشانگر برای مقادیر اسید اولئیک در کل جمعیت با نرم‌افزار آماری SAS V.6.12 (مؤسسه SAS، کاری، ان سی) انجام شد. برای تعیین تفرق نشانگرها از مربع کای (χ^2) استفاده شد.

نتایج و بحث

توزیع اسید اولئیک

یک جمعیت شامل ۱۱۹ لاین دابلد هاپلوئید از تلاقی بین لاین اصلاح شده T099-5318-20 و DH12075 حاصل گردید. شکل ۱ توزیع فراوانی مقادیر اسید اولئیک در جمعیت دابلد هاپلوئید را نشان می‌دهد. میانگین

www.SID.ir

Archive of SID

اسید اولئیک در جمعیت دابلد هاپلوئید ۶۹ درصد و در لاین‌های T099-5318-20 و DH12075 به ترتیب ۷۹ و ۶۷ درصد بود. با توجه به این که مقادیر اسید اولئیک در برخی از لاین‌ها بیشتر از لاین T099-5318-20 و در برخی کمتر از لاین DH12075 بود بنابراین تفرق متجاوز برای این صفت مشاهده شد.

شکل ۱- توزیع فراوانی اسید اولئیک در جمعیت دابلد هاپلوئید حاصل از تلاقی T099-5318-20 با DH12075

Fig. 1. Frequency distribution for oleic acid in the DH polulation of plants derived from the cross between T099-5318-20 and DH12075

تجزیه تفرق توده‌ای

در مجموع تعداد ۱۲۵ (۲۷٪) آغازگر RAPD و۱۷ (۳۰٪) آغازگرISSR بین لاین‌های والدینی چند شکلی نشان دادند. این آغازگرهای گزینش شده سپس برای بررسی دو بالک اسید اولئیک کمتر و بیشتر مورد بررسی قرار گرفتند. تعداد ۱۸ آغازگر RAPD (۴ درصد) و دو آغازگرISSR (۳ درصد) بین بالک‌ها چند شکلی را نشان دادند. این نشانگرها سپس در اجزای هر بالک و کل جمعیت مورد بررسی قرار گرفتند. برخی از این نشانگرها نوترکیبی زیادی را نشان دادند که جهت انتخاب نشانگر مناسب برای اسید اولئیک قابل استفاده نبودند. از این میان شش نشانگر ارتباط نزدیک و معنی‌داری با صفت اسید اولئیک نشان دادند (جدول ۱). نشانگر RAPD ، $UBC\ 2_{830}$ یک باند چند شکل را از والد T099-5318-20 دارا بود که طول تقریبی آن ۸۳۰ جفت باز بود. این نشانگر در تمام اجزای بالک (۶ لاین بالک) با مقادیر بالای اسید اولئیک تکثیر شد ، در حالی که درهیچ کدام از اجزای بالک با مقادیر اندک اسید اولئیک تکثیر نشد. همچنین نشانگر

www.SID.ir

Archive of SID

RAPD ، $UBC538_{1650}$ یک باند چند شکل را از والد DH12075 دارا بود که دارای طول تقریبی ۱۶۵۰ جفت باز بود. این نشانگر در تمام اجزای بالک با مقادیر اندک اسید اولئیک تکثیر شد در حالی که در هیچ کدام از اجزای بالک با مقادیر بالا تکثیر نشد (شکل ۲).

تمام نشانگرها نسبت تفرق ۱:۱ را در میان ۱۱۹ لاین مورد بررسی، توسط مربع کای نشان دادند. تجزیه رگرسیون تک نشانگری بر اساس مدل خطی جهت تشریح مقادیر تنوع فنوتیپی تبیین شده توسط هر نشانگر در کل جمعیت انجام شد (جدول ۲). نشانگرهای $UBC\ 2_{830}$ و $UBC\ 538_{1650}$ با ضرایب تبیین شده به ترتیب ۴۳ و ۳۴ درصد بیشترین و نشانگر $UBC707_{750}$ با ضریب تبیین ۴ درصد کمترین تنوع فنوتیپی را برای مقادیر اسید اولئیک در جمعیت مورد بررسی نشان دادند. در تمام این نشانگرها میانگین اسید اولئیک بین دسته‌های ژنوتیپی به طور معنی‌داری متفاوت بود.

جدول ۱- آغازگرهای مناسب مرتبط با صفت اسید اولئیک در کلزا

Table 1. Suitable primers related to oleic acid trait in *B. napus*

آغازگر Primer	توالی Sequence	آلل مشاهده شده از لاین Visible allele derived from line	اندازه قطعه (جفت باز) Fragment size (bp)
UBC 2	5' CCTGGGCTTG 3'	TO99-5318-20	830
UBC 250	5' CGACAGTCCC 3'	DH12075.12	750
UBC 357	5' AGGCCAAATG 3'	DH12075.12	600
UBC 538	5' TGACCTCTCC 3'	DH12075.12	1650
UBC 561	5' CATAACGACC 3'	DH12075.12	990
UBC 707	5' CCCAACACCC 3'	DH12075.12	750

جدول ۲- تجزیه واریانس نشانگرهای مناسب که با مقدار اسید اولئیک در جمعیت دابلد هاپلوئید مرتبط می باشند

Table 2. Analysis of variance of suitable markers related with oleic acid in DH population

نشانگر Marker	لاین های دابل هاپلوئید با وجود نشانگر DH lines with marker present	لاین های دابل هاپلوئید بدون نشانگر DH lines with marker absent	سطح احتمال P- value	ضریب تبیین R^2
UBC 2	74	65	< 0.001	0.43
UBC 538	66	73	< 0.001	0.34
UBC 561	66	72	< 0.001	0.29
UBC 250	66	72	< 0.001	0.28
UBC 357	67	70	0.006	0.05
UBC 707	68	70	0.009	0.04

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۲- پروفیل آغازگرهای RAPD برای UBC2 (a) و UBC 538 (b) در والدین و بالک‌ها
ستون ۱ـ استاندارد یک کیلو بازی، ستون ۲ـ T099-5318-20 ، ستون ۳ـ DH12075 ، ستون ٤ـ بالک با اسید اولئیک بالا، ستون ٥ـ بالک با اسید اولئیک پایین، ستون ۱۱-٦ اجزای بالک با اسید اولئیک بالا، ستون ۱۷-۱۲ اجزای بالک با اسید اولئیک پایین (فلش‌ها نشان‌دهنده قطعات $UBC\ 2_{830}$ و $UBC\ 538_{1650}$ مرتبط با اسید اولئیک می‌باشد).

Fig. 2. PCR profiles produced by RAPD primers UBC 2 (a) and UBC 538 (b) in parents and bulks

Lane 1-1 kb ladder, Lane 2- T099-5318-20, Lane 3- DH12075, Lane 4- high oleic bulk, Lane 5- low oleic bulk, Lane 6-11- high oleic bulk constituents, Lane 12-17- low oleic bulk constituents. (Arrows indicate the UBC 2_{830} and UBC 538_{1650} fragments associated with oleic acid).

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی آغازگرهای FAD2

آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن FAD2 بر روی والدین و اجزای بالک مورد استفاده قرار گرفتند. با توجه به این که آغازگرهای FAD2 چند شکلی را بین والدین و اجزای والدین نشان ندادند بنابراین برای تعیین چند شکلی از آنزیم‌های برشی استفاده شد. استفاده از آنزیم‌های برشی شامل AluI ، HaeIII ، HhaI ، MseI ، RsaI ، PstI ، MspI، TaqaI ، NIaIII و EcoRI چند شکلی نشان نداد.

ایجاد نشانگر SCAR برای مقادیر بالای اسیداولئیک

به منظور ایجاد نشانگرهای تکرارپذیر، اختصاصی و سهولت استفاده در گزینش، نشانگر $UBC2_{830}$ همسانه وتعیین توالی گردید (شکل ۳). هیچ توالی مشابه با توالی این نشانگر با جستجوی Blast در NCBI شناسایی نشد. یک جفت آغازگر برای این نشانگر بر اساس توالی DNA طراحی شد. آغازگرهای طراحی شده برای نشانگر $UBC\ 2_{830}$ یک باند مشخص با طول **۳۹۹** جفت باز و مرتبط با نشانگر اصلی را نشان داد. این نشانگر SCAR بر روی اجزای بالک و جمعیت موجود بررسی گردید و نظیر نشانگر $UBC2_{830}$ در جمعیت مورد بررسی تکثیر گردید (شکل ۴).

بررسی نشانگر SCAR در گونه‌های دیپلوئید جنس براسیکا شامل شلغم روغنی *B. rapa* (AA)، کلم *B. oleracea* (CC)، خردل سیاه *B. nigra* (BB) و گونه‌های آلوتتراپلوئید شامل خردل هندی *B. juncea* (AABB) ، خردل حبشی *B. carinata* (BBCC) و کلزا *B. napus* (AACC) نشان داد که باند اختصاصی در هر دو لاین گونه‌های شلغم روغنی وخردل هندی و یک لاین کلزا تکثیر شد در حالی که در گونه‌های کلم، خردل سیاه و خردل حبشی تکثیر انجام نشد (شکل ۵).

شکل ۳ـ توالی DNA قطعه تکثیر شده به وسیله نشانگر $UBC\ 2_{830}$ مرتبط با سطوح اسید اولئیک
آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر اختصاصی با خطوط مشخص شده‌اند.

Fig. 3. The DNA sequence of UBC 2_{830} linked to high oleic levels
The primers designed for specific amplification are underlined.

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ٤- الگوی نشانگر SCAR حاصل از $UBC\ 2_{830}$ در والدین و اجزای بالک
ستون ۱- استاندارد یک کیلو بازی، ستون ۲- T099-5318-20 ، ستون ۳- DH12075 ، ستون ٤- بالک با اسید اولئیک بالا، ستون ٥- بالک با اسید اولئیک پایین، ستون ٦-۱۱ اجزای بالک با اسید اولئیک بالا، ستون ۱۲-۱۷ اجزای بالک با اسید اولئیک پایین.

Fig. 4. $UBC\ 2_{830}$ derived SCAR banding pattern on parents and bulks
Lane 1-1 kb ladder, Lane 2- T099-5318-20, Lane 3- DH12075, Lane 4- high oleic bulk, Lane 5- low oleic bulk, Lane 6-11- high oleic bulk constituents, Lane 12-17- low oleic bulk constituents.

این تحقیق برای شناسایی و تعیین نشانگرهای مولکولی پیوسته با مکان‌های ژنی کنترل‌کننده مقدار اسید اولئیک در کلزا انجام شد. هو و همکاران (Hu *et al.*, 1999) یک نشانگر مولکولی RAPD (M14-550) را که ۲۸ درصد تنوع فنوتیپی را توجیه می‌کرد، شناسایی کردند. بنابراین نشانگرهای $UBC\ 2_{830}$ و $UBC\ 538_{1650}$ که در این تحقیق شناسایی شدند اولین گزارش در گیاه کلزا می‌باشد که تنوع فنوتیپی بالایی را نشان می‌دهند.

تانهوانپا و همکاران (Tanhuanpää *et al.*, 1996) در گیاه شلغم روغنی (*B. rapa*) یک QTL را شناسایی کردند که ۵۳ درصد تنوع فنوتیپی را نشان داد.

به دلیل ماهیت وراثت چند ژنی صفت اسید اولئیک در کلزا، برآورد فراوانی نوترکیبی بین نشانگرها و صفت اسید اولئیک امکان‌پذیر نیست. در جمعیت دابلد هاپلوئید این تحقیق ۲۳ لاین دارای اسید اولئیک بالای ۷۴ درصد و ۲۷ لاین با اسید اولئیک کمتر از ۶۴ درصد وجود داشت. در بین این لاین‌ها هیچ نوترکیبی برای نشانگر $UBC2_{830}$ وجود نداشت که نشان دهنده لینکاژ نزدیک این نشانگر با یکی از مکان‌های ژنی کنترل‌کننده اسید اولئیک در جمعیت موجود می‌باشد.

شناسایی این تعداد نشانگر مرتبط با صفت اسید اولئیک به دلیل وراثت چند ژنی آن چندان عجیب به نظر نمی‌رسد. برنز وهمکاران

www.SID.ir

Archive of SID

(Burns *et al*., 2003) چهـــار QTL را بـــرای اسید اولئیک در کلزا گزارش کرده‌انـد. لیونتـون و همکـــــاران (Lionneton *et al*., 2002) و محمود و همکاران (Mahmood *et al*., 2003) دو QTL را برای اسید اولئیک در خردل هنـدی (*B. juncea*) گزارش کرده‌اند.

شکل ۵- مقایسه گونه‌های مختلف براسیکا با نشانگر SCAR حاصل از $UBC\ 2_{830}$
ستون ۱- استاندارد یک کیلو بازی، ستون ۲- *B. rapa* 'Sunbeam' ، ستون ۳- *B. rapa* 'TR7' ستون ٤- 'SRS 1082' ،
ستون ٥- *B. nigra* 'Ni-100' ، ستون ٦- *B. oleracea* '3017' ، ستون ۷- *B. olerace* '3523' ،
ستون ۸- *B. juncea* 'Konskaja' ، ستون ۹- *B. juncea* "Varuna' ، ستون ۱۰- *B.napus* 'Range' ،
ستون ۱۱- *B. napus* 'Westar' ، ستون ۱۲- *B. carinata* '99-7699' ، ستون ۱۳- *B. carinata* '30EM-15'

Fig. 5.Brassica species comparison of the UBC 2_{830} derived SCAR marker
Lane 1- 1 kb ladder, Lane 2- B. rapa 'Sunbeam, Lane 3- B. rapa 'TR7', Lane 4- B. nigra 'SRS 1082',
Lane 5- B. nigra 'Ni-100', Lane 6- B. oleracea '3017', Lane 7- B. oleracea '3523',
Lane 8- B. juncea 'Donskaja', Lane 9- B. juncea ' Varuna', Lane 10- B. napus 'Range',
Lane 11- B. napus 'Westar', Lane 12- B. carinata '99-7699', Lane 13- B. carinata '30EM-15'

شفلر و همکـاران (Scheffler *et al*. 1997) نتیجه‌گیری کردند کـه تبـدیل اسـید اولئیـک بـه اســـید لینولئیـــک و اســـید لینولئیـــک بـــه اسید لینولنیک در گیاه کلزا توسـط دو سـری از ژن‌هـای مـستقل انجـام مـی‌گـردد. آنـزیم‌هـای غیراشباع کننـده دلتـا- ۱۲ (e_2) و دلتـا- ۱۵ (e_3) در شبکه آندوپلاسمی فعال می‌باشـند، در حـالی که آنزیم‌های غیر اشـباع کننـده امگـا- ۶ (p_2) و امگا- ۳ (p_3) واکـنش‌هـای موجـود را از طریـق مسیر موازی در پلاستیدها انجام مـی‌دهنـد. البتـه نشانگرهای شناسایی شده در ایـن تحقیـق معلـوم نیـست کـه کـدام یـک از مـسیرهای بیوسـنتز اسید اولئیک را مشخص می‌کنند.

آغازگرهـــای اختـــصاصی FAD2 بـــر روی اجزای بالک و والدین مورد بررسی قرار گرفتند و الگوی مشابهی را نشان دادند. این نتـایج نـشان

www.SID.ir

Archive of SID

می‌دهد که‌اختلاف بین‌دو والد T099-5318-20 و DH12075 در ژن FAD2 ممکن است به دلیل چند جفت باز می‌باشد که این اختلاف در روی ژل آگارز قابل شناسایی نبوده است. از طرف دیگر ممکن است ژن‌های دیگری در مسیرهای بالادست و پایین دست ژن FAD2 توانسته اند بر روی بیوسنتز اسید اولئیک و لینولئیک مؤثر باشند. میکیلینی و راچفورد (Mikkilineni and Rocheford, 2003) گزارش مشابهی را در ذرت ارائه کرده‌اند.

بر اساس نتایج حاصل از توالی یابی، نشانگر $UBC2_{830}$ به نشانگر SCAR تبدیل شد. تحقیقات انجام شده بسیاری قابل اعتماد بودن، تکرارپذیری و سادگی امتیازدهی نشانگرهای SCAR را نسبت به نشانگرهای RAPD نشان می‌دهند (تانهوانپا و همکاران، ۱۹۹۶؛ هو و همکاران، ۱۹۹۹). نشانگرهای SCAR یک باند مشخص را تکثیر می‌کنند که به شرایط آزمایشگاهی حساس نیستند. نشانگر SCAR که در این تحقیق شناسایی شد یک باند مشخص از والد T099-5318-20 را تکثیر نمود و به سادگی برای گزینش در جهت افزایش اسید اولئیک در برنامه‌های به نژادی قابل استفاده بود.

بررسی گونه‌های مختلف جنس براسیکا با نشانگر SCAR حاصل از $UBC\ 2_{830}$ نشان داد که قطعه DNA مورد نظر در گونه‌های حاوی ژنوم A شامل شلغم روغنی *B. rapa* (AA)، خردل هندی *B. juncea* (AABB) و کلزا *B. napus* (AACC) تکثیر شد که نشان می‌دهد این نشانگر در ژنوم A کلزا می‌باشد.

نشانگرهایی که در این تحقیق شناسایی شدند همراه با نشانگر SCAR بعد از بررسی در جوامع دیگر و در صورت ارتباط نزدیک با مقدار اسید اولئیک می‌توانند در گزینش برای مقادیر بالای اسید اولئیک در کلزا نقش مهمی داشته باشند.

References

Burns, M. J., Barnes, S. R., Bowman, J. G., Clarke, M. H. E., Werner, C. P., and Kearsey, M. J. 2003. QTL analysis of an intervarietal set substitution lines in *Brassica napus*: (i) Seed oil content and fatty acid composition. Heredity 90: 39-48.

Carlos, J., and Dias, S. 2001. Effect of incubation tempreture regimes and culture medium on broccoli microspore culture embryogenesis. Euphytica 119: 389-394.

Chen, J., and Beversdorf, W. D. 1990. Fatty acid inheritance in microspore- derived populations of spring rapeseed (*Brassica napus* L.). Theoreticl and Applied Genetics 80: 465-469.

Depenbrock, W., and Wilson, R. F. 1987. Genetic regulation of linolenic acid concentration in rapeseed. Crop Science 27: 75-77.

www.SID.ir

Archive of SID

Hu, J., Li, D., Struss, D., and Quiros, C. F. 1999. SCAR and RAPD markers associated with 18- carbon fatty acids in rapeseed, *Brassica napus*, Plant Breeding 118: 145-150.

Kondra, Z. P., and Thomas, P. M. 1975. Inheritance of oleic, linoleic, and linolenic acids in seed oil rapeseed (*Brassica napus*). Candian Journal of Plant Science 55: 205-210.

Lionneton, E., Ravera, S., Sanchez, L., Aubert, G., Delourme, R., and Ochatt, S. 2002. Development of an AFLP-based linkage map and localization of QTLs for seed fatty acid content in condiment mustard (*Brassica juncea*). Genome 45: 1203-1215.

Mahmood, T., Ekuere, U., Yeh, F., Good, A. G., and Stringam, G. R. 2003. RFLP linkage analysis and mapping genes controlling the fatty acid profile of *Brassica juncea* using reciprocal DH populations. Theoretical and Applied Genetics 107: 283-290.

Mikkilineni, V., and Rocheford, T. R. 2003. Sequence variation and genomic organization of fatty acid desaturase- 2 (fad2) and fatty acid desaturase- 6 (fad6) cDNAs in maize. Theoretical and Applied Genetics 106: 1326-1332.

Rajcan, I., Kasha, K. J., Kott, L. S., and Beversdorf, W. D. 1999. Detection of molecular markers associated with linolenic and erucic acid levels in spring rapeseed (*Brassica napus* L.). Euphytica 105: 173-181.

Scheffler, J. A., Sharpe, A. G., Schmidt, H., Sperling, P., Parkin, I. A. P., Lühs, W., Lydiate, D. J., and Heinz, E. 1997. Desaturase multigene families of *Brassica napus* arose through genome duplication. Theoretical and Applied Genetics 94: 583-591.

Schierholt, A., Becker, H. C., and Ecke, W. 2000. Mapping a high oleic acid mutation in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). Theoretical and Applied Genetics 101: 897-901.

Somers, D. J., Friesen, K. R. D., and Rakow, G. 1998. Identification of molecular markers associated with linoleic acid desaturation in *Brassica napus*. Theoretical and Applied Genetics 96: 897-903.

Somers D. J., Rakow G, Raney P., Prabhu V., Swartz G.S., Rimmer R., Gugel R., Lydiate D., and Sharpe A. 1999. Developing Marker - Assisted breeding for quality

www.SID.ir

Archive of SID

and disease resistance traits in Brassica oilseeds. In: 10th International Rapeseed Congress. 26-29.9.1999., Canberra, Australia.

Tanhuanpää, P. K., and Schulman, A. 2002. Mapping of genes affecting linolenic acid content in *Brassica rapa* ssp. *oleifera*. Molecular Breeding 10: 51-62.

Tanhuanpää, P. K., Vilkki, J. P., and Vihinen, M. 1998. Mapping and cloning of FAD2 gene to develop allele- specific PCR for oleic acid in spring turnip rape (*Brassica rapa* ssp. *oleifera*). Molecular Breeding 4: 543-550.

Tanhuanpää, P. K., Vilkki, J. P., and Vilkki, H. J. 1996. Mapping of a QTL for oleic acid concentration in spring turnip rape (*Brassica rapa* ssp. *oleifera*). Theoretical and Applied Genetics 92: 952-956.

Thies, W. 1974. New methods for the analysis of rapeseed constituents. Proceedings of the 4th Rapeseed Congress, GCIRC, Giessen: pp. 275-282.

Thomas, P. M., and Kondra, Z. P. 1973. Maternal effects on the oleic, linoleic, and linolenic acid content of rapeseed oil. Canadian Journal of Plant Science 53: 221-225.

آدرس نگارندگان:

فرزاد جاویدفر- بخش تحقیقات دانه‌های روغنی، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، صندوق پستی ٤١١٩، کرج ٣١٥٨٥.

حسن زینالی، سیروس عبدمیشانی، علی‌اکبر شاه‌نجات بوشهری و رضا توکل افشاری، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج.

www.SID.ir