Archive of SID

"مجله علوم زراعی ایران"

جلد هفتم ، شماره 3، پاییز 1384

مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت به سرما در کلزا با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره

Mapping cold resistance genes in rapeseed (*Brassica napus* L.) using microsatellite markers

علی اصغری[1]، سیدابوالقاسم محمدی[2]، محمد مقدم[3]، محمود تورچی[4] و عادل دباغ محمدی‌نسب[5]

چکیده

اصغری، ع.، س. ا. محمدی، م. مقدم. تورچی، ع. دباغ محمدی نسب، 1384. مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت به سرما در کلزا با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره. مجله علوم زراعی ایران. جلد هفتم، شماره 3، صفحه: 211-202.

نشانگرهای ریزماهواره به علت اختصاصی بودن، ماهیت همبارز، داشتن چند شکلی بالا و مکان ژنومی مشخص، نشانگرهای مناسبی برای مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی هستند. به منظور شناسایی نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن‌های مرتبط با مقاومت به سرما در کلزا جمعیت $F_{2:3}$ حاصل از تلاقی دو رقم SLMO46 به عنوان رقم پاییزه و مقاوم به سرما و کوانتوم به عنوان رقم بهاره وحساس به سرما با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره مورد ارزیابی قرار گرفت. چندشکلی والدین با استفاده از 350 آغازگر ریزماهواره بررسی شد و از 32 آغازگر چند شکل در بین والدین برای ارزیابی 200 فرد از جمعیت F_2 استفاده شد. LT50 به عنوان معیاری برای ارزیابی مقاومت به سرما در خانواده‌های F_3 حاصل از بوته‌های F_2 اندازه‌گیری شد. بر اساس تجزیه پیوستگی، نشانگرهای چند شکل به پنج گروه پیوستگی منتسب شدند. ارتباط نشانگرها با LT50 بر اساس تجزیه تک نشانگری، مکان‌یابی فاصله‌ای و مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب ارزیابی شد. براساس نتایج حاصل، سه QTL مرتبط با مقاومت به سرما در جمعیت مورد ارزیابی شناسایی شد که مجموعاً 13 درصد از تغییرات صفت را تبیین کردند.

واژه‌های کلیدی: کلزا، مقاومت به سرما، نشانگرهای ریزماهواره، QTL.

تاریخ دریافت: 1384/1/17

1ـ مربی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه محقق اردبیلی و دانشجوی دکتری در دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

2ـ دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز (مکاتبه‌کننده)

3ـ استاد دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

4ـ استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

5ـ استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

دماهای پایین یکی از عوامل مهم محدودکننده رشد و تولید گیاهان زراعی در کشت‌های پائیزه و اوایل بهار است. در ارقام پائیزه کلزا که نسبت به ارقام بهاره عملکرد بالاتری دارند، کشت و تولید عملکرد بالا به وسیله تنش سرما محدود می‌شود و شناسائی ارقام مقاوم به سرما در این گیاه اهمیت فراوانی دارد. تحمل سرما و بقا در زمستان صفت پیچیده‌ای است که به عوامل متعددی مانند خصوصیات مرفولوژیک، فیزیولوژیک، ژنوتیپ گیاه، وضعیت خاک و نوسانات آب و هوایی بستگی دارد. گزینش فنوتیپی برای این صفت در نسل‌های در حال تفرق از کارآیی خوبی برخوردار نیست. امروزه از نشانگرهای مولکولی به عنوان ابزارهای کارآ و مکمل روش‌های کلاسیک برای مکان‌یابی و شناسایی ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی و برنامه‌های گزینش به کمک نشانگر استفاده می‌شود.

نقشه پیوستگی در کلزا ابتدا با استفاده از نشانگرهای RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) ایجاد شد (Frreira *et al*., 1994; Uzunova *et al*., 1995). از نشانگرهای دیگری مانند ریزماهواره‌ها (Microsatellite)، RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) و AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) نیز به طور گسترده در تهیه نقشه‌های پیوستگی، شناسایی ارقام، تجزیه تنوع ژنتیک و مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات مختلف در کلزا استفاده شده است (Saal *et al*., Divaret *et al*., 1999; Pilet *et al*., 1998; Plieske *et al*., 2001, 2001; Xu *et al*., 2001). هر چند که نقشه پیوستگی نشانگرهای ریزماهواره در گونه‌های Brassica کامل نشده است ولی امید می‌رود که در چند سال آینده نشانگرهای ریزماهواره زیادی در این گونه‌ها مکان‌یابی شوند. این نشانگرها به علت اختصاصی بودن، ماهیت همبارز، چند شکلی بالا و معلوم بودن مکان ژنومی آن‌ها، نشانگرهای مناسبی برای مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی هستند (Uzunova & Ecke, 1999; Sharon *et al*., 1995). در گیاهان خانواده چلیپائیان استفاده از این نشانگرها گسترش زیادی پیدا کرده است. رودولف و همکاران (Rudolph *et al*., 1999) با ارزیابی مجموعه DNA ژنومی کلزا 15 نشانگر ریزماهواره چند شکل طراحی و آن‌ها را به 7 گروه پیوستگی منتسب کردند. اوزونوا و همکاران (Uzunova & Ecke, 1999) با بررسی 31 ژنوتیپ کلزا با استفاده از 11 نشانگر ریزماهواره، 8 نشانگر تکرارپذیر با دو تا سه الل قابل مشاهده در هر مکان شناسایی کردند که چهار تا از این نشانگرها در چهار گروه پیوستگی نقشه RFLP در ژنوم کلزا مکان‌یابی شدند. استراس و همکاران (Struss *et al*., 1999) با مطالعه 120 نشانگر ریزماهواره گزارش کردند که توزیع این نشانگرها در ژنوم‌های A و C به صورت تصادفی است. ویسلدر و همکاران (Weisleder *et al*., 1995) 150 لاین هاپلوئید مضاعف شده کلزا را با بیش از 250 نشانگر ریزماهواره، RAPD و RFLP ارزیابی و یک QTL (Quantitative Trait Loci) برای رنگ گل و دو QTL برای محتوای اسید اروسیک مکان‌یابی کردند. سیوواب و همکاران (Suwabe *et al*., 2003) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره، دو QTL مرتبط با مقاومت به کلافی شدن ریشه کلزا را مکان‌یابی کردند. هیوند و همکاران (Hund *et al*., 2004) در یک جمعیت $F_{2:4}$ ذرت، چهل QTL کنترل‌کننده صفات ریشه و ساقه را در شرایط تنش سرمایی شناسایی کردند. تیوتونیکو و همکاران (Teotonico *et al*., 1995) با استفاده از نشانگرهای RFLP، در جمعیت F_2 مربوط به گونه (*B. napus*)، QTL خاصی را برای مقاومت به سرما شناسایی نکردند ولی در جمعیت عادت‌دهی شده گونه (*B. rapa*)، چهار QTL و در جمعیت عادت‌دهی نشده این گونه دو QTL مرتبط با مقاومت به سرما شناسایی شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

این مطالعه به منظور شناسایی نشانگرهای ریزماهواره مرتبط با QTL های مقاومت به سرما و تعیین سهم هر QTL در تبیین تغییرات ژنتیک این صفت انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: در این پژوهش از جمعیت $F_{2:3}$ حاصل از تلاقی رقم کوانتوم (بهاره و حساس به سرما) و رقم SLMO46 (پاییزه و مقاوم به سرما) استفاده شد. برای ارزیابی ژنوتیپی و نیز تولید خانواده‌های F_3 ، 200 بوته F_2 در گلدان‌های سه کیلویی در شرایط گلخانه‌ای با دوره روشنائی 10/14 ساعت (روز/شب) کشت شدند. به منظور استخراج دی. ان. ا، از برگ‌های هر بوته نسل F_2 در مرحله شش تا هشت برگی، نمونه برگی برداشت شد. نمونه‌های برگی پس از انجماد در ازت مایع به فریزر 80- درجه منتقل گردیدند و تا زمان استخراج دی. ان. ا، در این دما نگهداری شدند. برای تولید خانواده‌های F_3 ، بوته‌های F_2 در مرحله قبل از گرده افشانی پاکت‌گذاری شدند تا نتاج F_3 در نتیجه خود باروری هر بوته تولید گردد. خانواده‌های F_3 حاصل برای ارزیابی فنوتیپی استفاده شدند.

استخراج دی. ان. ا و ارزیابی ژنوتیپی: استخراج دی. ان. ا با استفاده از روش CTAB انجام گرفت (Saghai-Maroof *et al.*, 1984). کمیت و کیفیت نمونه‌های دی. ان. ا توسط روش اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز 0/8 درصد تعیین شد. نمونه‌های دی. ان. ا پس از تعیین غلظت، به غلظت 25 نانوگرم در میکرولیتر رقیق شدند و در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد استفاده قرار گرفتند.

برای ارزیابی ژنوتیپی از 350 جفت آغازگر ریزماهواره استفاده شد. این آغازگرها از سایت مربوط به بانک اطلاعاتی کلزا با آدرس اینترنتی http://ukcrop.net/perl/ace/tree/brassicaDB انتخاب و توسط شرکت UBC کشور کانادا سنتز شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با حجم نهایی 10 میکرولیتر با اجزای 50 نانوگرم دی. ان. ا الگو، سه میلی‌مول MgCl2، 0/25 میلی‌مول از هر dNTP، 0/25 میکرومول آغازگر، یک واحد Taq DNA Polymerase و 1x بافر انجام گرفت.

برنامه تکثیر به صورت 94 درجه سانتیگراد به مدت سه دقیقه برای واسرشته سازی اولیه و به دنبال آن 35 چرخه شامل سه مرحله: 94 درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، 55 درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و 72 درجه سانتیگراد به مدت دو دقیقه و نهایتاً مرحله بسط نهایی در 72 درجه سانتیگراد به مدت هفت دقیقه انجام شد.

محصول حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از الکتروفورز ژل پلی آکریلامید واسرشته ساز شش درصد تفکیک و از طریق رنگ‌آمیزی نیترات نقره مطابق پروتکل سیمیت (CIMMYT, 1984) آشکارسازی شد.

ارزیابی فنوتیپی: برای ارزیابی مقاومت به سرما از هر خانواده F_3، 14 بوته در ظروف پلاستیکی با ابعاد 25×35×15 به عنوان گلدان کشت گردیدند. در هر ظرف بذرهای دو خانواده با فاصله پنج سانتیمتر بین بوته‌های مجاور کشت شد. بوته‌های کشت شده، در گلخانه‌ای با دوره روشنایی 10/14 ساعت (روز / شب) و دمای 15-12 درجه سانتیگراد در روز و 20 درجه سانتیگراد در شب به مدت پنج هفته نگهداری شدند تا به مرحله شش تا هشت برگی برسند. بعد از پنج هفته گلدان‌ها به منظور عادت‌دهی به اطاقک رشد با دمای 2/4 درجه سانتیگراد (روز/ شب)، شدت نور 260 میکرومول بر مترمربع در ثانیه و دوره روشنایی 10/14 (روز/ شب) منتقل و به مدت سه هفته در اطاقک رشد نگهداری شدند. این بوته‌ها سپس به سردخانه با دمای 2- درجه سانتیگراد منتقل شده و به مدت 24 ساعت در این دما در تاریکی نگهداری گردیدند تا عادت‌دهی آن‌ها تکمیل شود. سپس بوته‌ها به فریزر قابل برنامه‌ریزی منتقل و دما به میزان دو درجه سانتیگراد در ساعت کاهش داده شد تا دما به تیمارهای دمای مورد نظر

www.SID.ir

Archive of SID

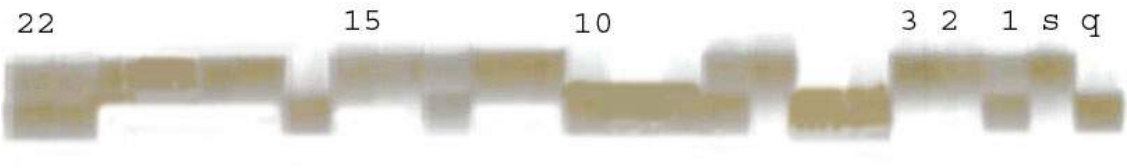
رسانده شد. تیمارهای سرمایی مورد استفاده عبارت از 4-، 8-، 12- و 16- درجه سانتیگراد بودند. برای هر تیمار دمائی 14 بوته از هر خانواده در نظر گرفته شد. در هر تیمار دمایی، بوته ها به مدت 24 ساعت در تاریکی نگهداری و سپس دما به میزان دو درجه سانتیگراد در ساعت افزایش داده شد تا به صفر درجه سانتیگراد برسد. بوته‌ها به مدت 24 ساعت در این دما نگهداری شدند تا یخ آن‌ها به تدریج باز شود و سپس مجدداً به گلخانه منتقل شدند. بعد از سه هفته شمارش تعداد بوته‌های زنده مانده انجام گردید و درصد زنده‌مانی درهر تیمار سرمائی برای خانواده‌ها برآورد گردید. سر انجام دمای LT50 هر خانواده با استفاده از روش پروبیت محاسبه شد (Finney, 1971).

تجزیه آماری: تجزیه پیوستگی نشانگرهای چندشکل پس از آزمون انحراف از تفرق (Distortion Segregation) در هر جایگاه با فرض حداکثر فاصله 50 سانتی‌مورگان بین دو نشانگر مجاور و LOD (Log Likelihood Ratio) برابر سه انجام گردید. رابطه بین داده‌های ژنوتیپی و فنوتیپی برای مکان‌یابی QTL های فرضی با استفاده از تجزیه تک نشانگری (Single Marker Analysis)، مکان‌یابی فاصله‌ای (Interval Mapping) و مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب (Composite Interval mapping) ارزیابی شد.

تجزیه‌های پیوستگی با استفاده از نرم‌افزارهای MapMaker/exe ver 3.0 و Map anagar/QTL و مکان‌یابی QTL ها توسط نرم‌افزار QTL Cartographer انجام شد.

نتایج و بحث

برای ارزیابی‌های ژنوتیپی ابتدا چند شکلی والدین با استفاده از 350 جفت آغازگر ریزماهواره بررسی شد. از مجموع آغازگرهایی که تکثیر مناسب و قابل امتیازدهی داشتند، 32 جفت از آن‌ها چند شکلی در بین والدین داشتند که برای ارزیابی ژنتیک جمعیت و تعیین ژنوتیپ افراد نسل F_2 مورد استفاده قرار گرفتند. شکل 1 الگوی نواربندی نشانگر ریزماهواره Na12-B02 را در والدین و تعدادی از افراد جمعیت F_2 نشان می‌دهد. نقشه پیوستگی نشانگرهای چندشکل پس از آزمون انحراف از نسبت‌های مندلی، با در نظر گرفتن حداکثر فاصله 50 سانتی‌مورگان بین دو نشانگر مجاور و حداقل LOD برابر سه تهیه گردید. از بین 32 نشانگر، 15 نشانگر به پنج گروه پیوستگی با متوسط فاصله 12/65 سانتی‌مورگان بین دو نشانگر مجاور منتسب شدند که حدود 202/4 سانتی‌مورگان، ژنوم کلزا را پوشش دادند. 17 نشانگر دیگر در هیچیک از گروه‌های پیوستگی قرار نگرفتند (شکل 2). به منظور شناسایی نشانگرهای پیوسته با

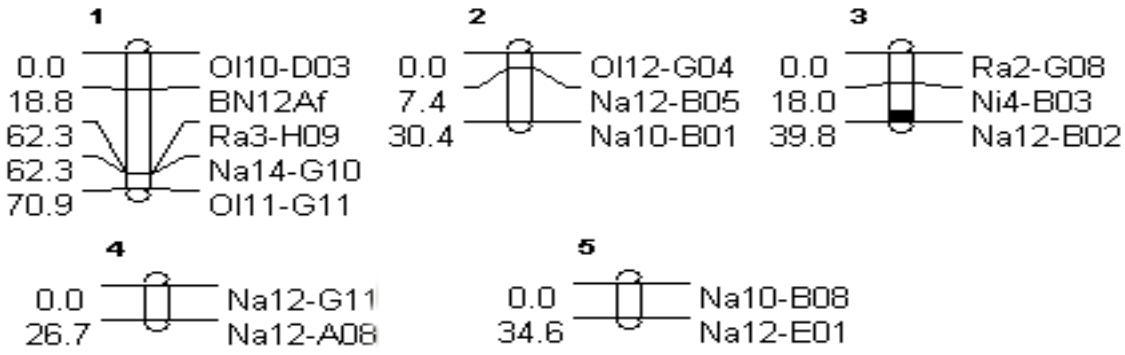


شکل 1- الگوی نواربندی نشانگر Na12-B02 ریزماهواره در والدین کوانتوم (q)، SLMO46 (s) و تعدادی از افراد جمعیت F_2

Fig.1. The banding pattern of Na12-Bo2 (microsatellite marker) in parents Quantum (q), SLMO46 (s) and a number of F_2 plants

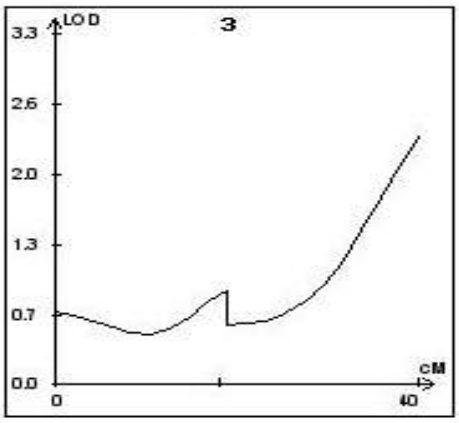
www.SID.ir

Archive of SID



شکل2- نقشه پیوستگی و جایگاه QTL شناسائی شده در کلزا برای مقاومت به سرما با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره

Fig.2. Linkage groups and position of identified QTL for cold resistance in rapeseed using microsatellite markers



شکل3- منحنی حاصل از مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب برای گروه پیوستگی شماره 3 توسط نرم‌افزار Win QTL Cartographer

Fig.3. The graph of composite interval mapping method for the third linkege group using Win QTL Cartographer software

QTL های مقاومت به سرما و تعیین سهم هرQTL در تبیین تغییرات فنوتیپی صفت LT50 تجزیه تک نشانگری، مکان‌یابی فاصله‌ای و مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب انجام گرفت. در شکل 3 منحنی حاصل از مکان‌یابی فاصله‌ای در گروه پیوستگی سه دیده می‌شود.بر اساس نتایج تجزیه تک نشانگری سه QTL و در مکان‌یابی فاصله‌ای و مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب یک QTL شناسایی شدند. علت تفاوت نتایج تجزیه تک نشانگری و روش‌های مکان‌یابی فاصله‌ای این بود که در تجزیه تک نشانگری، دو نشانگر پیوسته با QTL های تشخیص داده شده، جزو نشانگرهای غیرمنتسب به گروه‌های پیوستگی بود و استفاده از آن‌ها در روش‌های مکان‌یابی فاصله‌ای امکان‌پذیر نبود. QTL شناسایی شده در مکان‌یابی فاصله‌ای و فاصله‌ای مرکب در گروه پیوستگی سوم در فاصله بین دو نشانگر Ni4-B03 و Na12-B02 و با فاصله 18 سانتی‌مورگان از نشانگر اول و

www.SID.ir

Archive of SID

2 سانتی‌مورگان از نشانگر دوم قرار داشت. این QTL شش درصد از تغییرات فنوتیپی صفت LT50 را توجیه کرد و میزان اثر آن از دو QTL دیگر بیشتر بود. در تجزیه تک نشانگری نیز این QTL توسط ارتباط آن با نشانگر Na12-B02 تشخیص داده شد که میزان اثر آن در توجیه تغییرات صفت مورد مطالعه تقریباً مشابه با اثر بر آورد شده آن در تجزیه مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب بود. دو نشانگر دیگر (Ol10-G05، Na12-C06) که در تجزیه تک نشانگری با QTL های مقاومت به سرما پیوستگی نشان دادند، به ترتیب سه و چهار درصد از تغییرات فنوتیپی صفت مورد مطالعه را تبیین کردند. این سه QTL در مجموع 13 درصد از تغییرات صفت LT50 را توجیه کردند. این نتایج، دخیل بودن QTL های کوچک اثر را در مقاومت به سرما نشان می‌دهد (جدول 1). تیوتونیکو و همکاران (Teotonico *et al*., 1995) در جمعیت عادت‌دهی شده کلزا میزان اثر QTL های شناسایی شده برای درصد تراوش یونی به عنوان معیاری برای مقاومت به سرما را از سه تا بیست درصد بر آورد کردند. توس و همکاران (Toth *et al*., 2003) روی کروموزم 5B گندم، یک QTL برای مقاومت به سرما شناسایی کردند که 31/4 درصد از تغییرات صفت را تبیین کرد. هیوند و همکاران (Hund *et al*., 2004) در ذرت برای صفات مربوط به ریشه و ساقه در شرایط تنش سرما، چهل QTL شناسایی کردند که اثر این QTL ها از 0/4 تا 30/1 درصد بر آورد گردید.

QTL های اول و دوم تشخیص داده شده در این پژوهش دارای اثرهای افزایشی و غالبیت منفی ولی QTL سوم دارای اثرهای مثبت بود. در QTL اول اثر غالبیت بزرگتر از اثر افزایشی، در QTL دوم تقریباً برابر و در QTL سوم بزرگتر از اثر افزایشی بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که در QTL اول و دوم الل‌های افزایش‌دهنده مقاومت از رقم حساس کوانتوم و در QTL سوم از رقم مقاوم SLMO46 به نتاج منتقل شده است. در صفاتی که تفکیک متجاوز نشان می دهند، انتقال الل‌های مؤثر در صفت از هر دو والد به نتاج قابل انتظار است. از طرف دیگر منفی بودن اثرهای غالبیت در QTL اول و دوم نشان می‌دهد که در مورد این QTL ها افراد هتروزیگوت دارای LT50 بالاتر از رقم SLMO46 بودند ولی در QTL سوم اثر غالبیت مثبت بود و افراد هتروزیگوت، LT50 پایین‌تری از رقم SLMO46 داشتند. تیوتونیکو و همکاران (Teotonico *et al*., 1995) QTL های با اثرهای افزایشی مثبت را گزارش کردند ولی اثرهای افزایشی به مراتب از اثرهای غالبیت کوچکتر بودند. این موضوع نشان می‌دهد که الل‌های افزاینده مقاومت از رقم مقاوم به نتاج منتقل شده‌اند و سهم اثرهای افزایشی در کنترل این صفت کمتر از اثرهای غالبیت است. ضمناً این محققان برای صفت مقاومت به سرما هتروزیس گزارش و اشاره کردند که در صفات بر خوردار از هتروزیس، پایین بودن میانگین هتروزیگوت‌ها از والد برتر غیر قابل توجیه است. آن‌ها

جدول 1- گروه پیوستگی، اثرهای افزایشی وغالبیت،LOD و سهم QTL های شناسائی شده در توجیه واریانس صفت مورد مطالعه

Table 1.The likage groups, additive and dominance effects and LOD scores of identified QTLs and phenotypic variance of the trait explained by each QTL

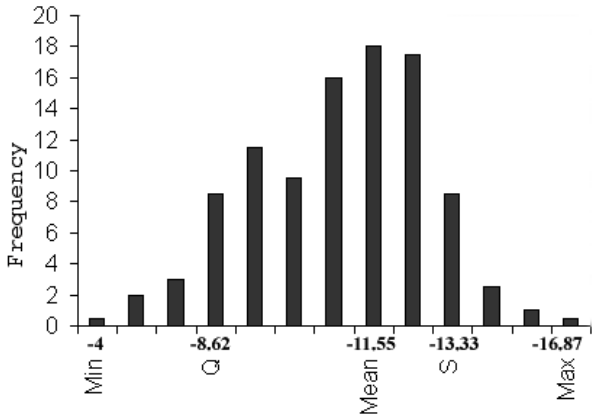
QTL	گروه پیوستگی Linkag group	LOD	اثرهای افزایشی Additive effects	اثرهای غالبیت Dominance effects	سهم در واریانس صفت Explained Phenotypic Variance
1	3	2.30	-0.33	-1.39	0.06
2	Unlinked	2.00	-0.41	-0.49	0.03
3	Unlinked	3.19	1.30	0.96	0.04

www.SID.ir

Archive of SID

اظهار داشتند که به علت محدود بودن تعداد QTL های مکان‌یابی شده در این مطالعه مقدار کمی از تغییرات صفات توجیه گردید و ممکن است QTL های دیگری با اثرهای غالبیت و حتی فوق غالبیت در این صفات دخیل باشند که شناسایی نشدند.

در این مطالعه LT50 بر آورد شده در 200 خانواده F_3 از 4- تا 16/87- درجه متغیر بود. LT50 رقم مقاوم 13/33-، رقم حساس 8/62- و میانگین خانواده‌ها برابر 11/554- درجه برآورد شد. از مجموع خانواده‌ها، 40 خانواده (20٪) دارای LT50 پایین‌تر از رقم SLMO46 و 20 خانواده (10٪) بالاتر از رقم کوانتوم بودند. بنابراین برای این صفت نسبت به والد مقاوم و والد حساس تفکیک متجاوز رخ داده و صفت توسط ژن‌های متعددی کنترل می‌شود. شکل 2 توزیع فراوانی صفت LT50 را برای خانواده‌های F_3 و والدین نشان می‌دهد. با توجه به این که دو QTL دارای اثر افزایشی منفی و یک QTL دارای اثر افزایشی مثبت بودند، می‌توان نتیجه گرفت که ژن‌های مقاومت به سرما از هر دو والد مقاوم و حساس به نتاج منتقل شده است. در صفاتی که تفکیک متجاوز نشان می‌دهند دخالت الل‌های والد حساس برای افزایش صفت قابل انتظار است (Saal *et al.*, 2001). تیوتونیکو و همکاران (Teotonico *et al.*, 1995) در جمعیت‌های مربوط به گونه‌های (*B. rapa*) و (*B. napus*) در ارتباط با توانایی عادت‌دهی، تفکیک متجاوز را گزارش کرده و اظهار داشتند که تفکیک متجاوز به



شکل 4- نمودار توزیع صفت LT50 در والدین کوانتوم (Q)، SLMO46 (S) و خانواده‌های F_3.

Fig. 4. The LT50 distribution of parental lines Quantum (Q), SLMO46 (S) and F_3 families

علت دخالت چند ژن در کنترل این صفت و تجمع ژن‌های هر دو والد در نتاج حاصل می‌شود. از تلاقی‌های دیالل در گل کلم نیز نتیجه‌گیری شده که اختلاف واریته‌ها از نظر مقاومت به یخزدگی در اثر تجمع ژن‌های مربوطه ناشی می‌شود (Fuller, 1993). ون وهمکاران (Wan *et al.*, 1995) وراثت‌پذیری زمستان‌گذرانی را در کلم 65/2 درصد بر آورد کرده و بر توارث کمی صفت تأکید کرده‌اند. آکاریا وهمکاران (Acharia *et al.*, 1983) نیز وراثت‌پذیری مقاومت به سرما را 23 تا 64 درصد به دست آوردند. دانه لوئی پور (1380) برای صفات درصد بقا در زمستان و درصد تراوش یونی در کلزا،

www.SID.ir

Archive of SID

سهم واریانس افزایشی از واریانس ژنتیک کل را به ترتیب 81/70 و 76/8 درصد برآورد کرده و نتیجه‌گیری کرد که این صفات وراثت‌پذیری خصوصی بالایی دارند و در اصلاح این صفات می‌توان از روش‌های گزینش فنوتیپی استفاده کرد. در حالی که برای مقدار آب بافت سهم اثرهای غالبیت بیشتر از اثرهای افزایشی ژن‌ها برآورد شد. توس و همکاران (Toth *et al*., 2003) برای QTL مرتبط با مقاومت به سرما در گندم، اثر افزایشی را 0/33 برآورد کردند. هیوند و همکاران (Hund *et al*., 2004) برای QTL های مربوط به صفات ریشه و ساقه در شرایط تنش سرما در ذرت، اثرهای افزایشی مثبت ومنفی گزارش کردند که این اثرها از 0/005 تا 10/57 درصد متغیر بودند. هرک و همکاران (Herk *et al*., 1986) گزارش کردند که از نظر درصد بقا در زمستان هیبریدهای کلزا بهتر از لاین‌های خالص هستند که دلیل آن وجود هتروزیس برای این صفت است.

مقاومت به سرما صفتی کمی بوده و شدیداً تحت تأثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرد و گزینش برای این صفت در نسل‌های تفکیک از کارآیی چندانی برخوردار نیست و نیاز به استفاده از ابزارهای مکملی مانند نشانگرهای مولکولی در گزینش برای این صفت شدیداً احساس می‌شود. با توجه به این که در منابع مختلف بر مؤثر بودن اثرات افزایشی و غالبیت ژن‌ها در کنترل مقاومت به سرما اشاره شده است، بنابراین شناسایی QTL هایی با اثرهای افزایشی و غالبیت مرتبط با مقاومت به سرما و نشانگرهای مرتبط با این QTL ها، می‌تواند در برنامه‌های گزینش و اصلاح برای این صفت راهگشا باشد.

سپاسگزاری

هزینه پژوهش حاضر توسط قطب اصلاح نباتات مولکولی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز تأمین گردید.

منابع مورد استفاده **References**

دانه لوئی پور، ن.1380. بررسی وراثت مقاومت به سرما در کلزا با استفاده از صفات کمی و مارکرهای مولکولی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز.

Acharya, S. N., J. Dueck and R. K. Downey. 1983. Selection and heritability studies on canola/rapeseed for low temperature germination. Can. J. Plant Sci. 63: 377-384.

Andrews, C. J. and M. J. Morrison. 1992. Freezing and ice tolerance tests for winter Brassica. Agronomy J. 84: 960-962.

CIMMYT. 1984. AMBIONET laboratory protocols. http//www.cimmyt .org /ambionet. Divaret, I., E. Margale and G. Thomas. 1999. RAPD markers on seed bulks efficiently assess the genetic diversity of a *Brassica oleracea* L. collection. Theor. Appl. Genet. 98: 1029-1035.

Ferreira, M. E., P. H. Williams and T. C. Osborn. 1994. RFLP mapping of *Brassica napus* using doubled haploid lines. Theor. Appl. Genet. 89: 615-621.

Finney, D. J. 1971. Probit analysis. Third Edition, London, Cambridge University. Fuller, M.P. 1993. Varietal differences in frost hardiness of cauliflower. Aspects of Applied Biology, 34: 179-182.

Gowers, S. and D. J. Gemmell. 1984. Soluble sugar content and winter hardiness in Swedes canola varieties. Cruciferae Newsletter, 9: 32-33.

www.SID.ir

Archive of SID

Herk, J. G. V., W. D. Beversdorf, B. D. Mckersie and I. Grant. 1986. Winter survival in *Brassica napus*. Proceeding of Crucifer Genetics Workshop III, May 29-30, University of Guelph, Canada, P: 71.

Hund, A., Y. Frachebond, A. Soldati, E. Frascaroli, S. Salvi and P. Stamp. 2004. QTL controlling root and soot of maize seedlings under cold stress. Theor. Appl. Genet. 109: 618-629.

Laroche, A., X. M. Geng and J. Singh. 1992. Differentiation of freezing tolerance and vernalization responses in Cruciferae exposed to a low temperature. Plant Cell and Environment 15: 439-445.

Pilet, M. L., R. Delourme, N. Foisset and M. Renard. 1998. Identification of QTL involved in field resistance to leaf spot (*Pyrenopeziza brassicae*) and blackleg resistance (*Leptosphaeria maculans*) in winter rapeseed (*Brassica napus* L.). Theor. Appl. Genet. 97: 398-406.

Plieske, J. and D. Struss. 2001. Microsatellite markers for genome analysis in Brassica. I. Development in *Brassica napus* and abundance in Brassicaceae species. Theor. Appl. Genet. 102: 689-694.

Rudolph, B., M. I. Uzunova and W. Ecke. 1999. Development and genetic mapping of microsatellite markers in rapeseed. Proceeding of the 10th International Rapeseed Congress. Canberra, Australia.

Saal, B., J. Plieske, J. Hu, C. F. Quiros and D. Struss. 2001. Microsatellite markers for genome analysis in Brassica. II. Assignment of rapeseed microsatellites to the A and C genomes and genetic mapping in *Brassica oleracea* L. Theor. Appl. Genet. 102: 695-699.

Saghai–Maroof, M. A., K. Soliman, R. A. Jorgensen and R. W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacerlength polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. PNAS, 81: 8014-8018.

Sharon, D., A. Adato, S. Mhameed and U. Lavi. 1995. DNA fingerprints in plants using simple sequence repeats and minisatellite probes. Hort Sci. 30: 109-112.

Struss, D., J. Plieske and B. Saal. 1999. Assignment of rapeseed microsatellite markers into A and C genomes. Plant and Animal Genome VII Conference. Town and Country Hotel, San Diago, CA. January, 17-21: 140.

Suwabe, K., H. Tsukazaki, H. Iketani, K. Hatakeyama, M. Fujimura, T. Nunome, H. Ffukuoka, S. Matsumoto and M. Hirai, 2003. Identification of two loci for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) in *Brassica rapa* L. Theor. Appl. Genet. 107: 997-1002.

Teotonico, R. A., B. Yandell, J. M. Satagopan, M. E. Ferreira, J. P. Palta and T. C. Osborn. 1995. Genetic analysis and mapping of genes controlling freezing tolerance oilseed Brassica. Molecular Breeding 1: 329-339.

Toth, B., G. Galiba, E. Feher, J. Sutka and J. W. Snape. 2003. Mapping genes affecting flowering time and frost resistance on chromosome 5B of wheat. Theor. Appl. Genet. 107: 509-514.

Uzunova, M. I. and W. Ecke. 1999. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellite in oilseed rape (*Brassica napus* L.). Plant Breeding 118: 323- 326.

Uzunova, M. I., W. Ecke, A. Wei Bleder and K. Robbelen. 1995. Mapping the genome of rapeseed (*Brassica napus* L.): Construction of an RFLP linkage map and localization of QTLs for seed glucosinolate content. Theor. Appl. Genet. 90: 194-200.

Wan, W. P., W. Zhang, J. Lai and D. Zhu. 1995. Study of heredity, breeding and relevant selection methods of strong winteriness of Chinese cabbage. Horticulture, 405: 233-242.

Weisleder, K., M. Uzunova and W. Ecke. 1995. Genetic mapping of loci for phenotypic traits in rapeseed (*Brassica napus* L.). Plant Genome IV Conference. Town and Country Conference Center, San Diago, CA. January, 17-21: 196.

www.SID.ir

Archive of SID

Xu, F. S., Y. H. Wang and J. Meng. 2001. Mapping boron efficiency gene(s) in *Brassica napus* using RFLP and AFLP markers. Plant Breeding 120: 319-324.

Mapping of cold resistance genes in rapeseed (*Brassica napus* L.) using microsatellite markers

Asghari. A[1]., S. A. Mohammadi[2], M. Moghadam[3], M. Toorchi[4] and A. Dabagh-Mohammadi Nasab[5]

ABSTRACT

Microsattalite markers are genome specific, co-dominant and highly polymorphic markers with known map location. These markers are very suitable for quantitative trait loci mapping. In order to identify the molecular markers linked to cold resistance genes in rapeseed, a $F_{2:3}$ derived population from crossing between cv. SLMO46 (winter type and cold resistant) and cv. Quantum (spring type and susceptible to low temperature) were evaluated using microsatellite markers. The LT50 (the temperature in which 50 % of plants are killed), as a cold resistance index in F_3 families was measured. The parental polymorphism was assessed using 350 SSR primer pairs. The 32 polymorphic primer pairs were selected for genotyping of F_2 individuals. Linkage map was constructed using polymorphic markers. The markers were assigned to five linkage groups. The relationship between LT50 and genotypic data was analysed using single marker analysis, interval mapping and composite interval mapping methods. Three detected QTLs explained 13 % of the LT50 phenotypic variations.

Key words: Polymorphic, Cold resistance, Microsatellite, QTL mapping.

Received: Aprill, 2005

1- Lecturer, Mohagheghe-Ardebili University and Ph-D student. Tabriz University. (Corresponding Author), Tabriz, Iran.

2- Associated Profesor, Tabriz University, Tabriz, Iran.

www.SID.ir

Archive of SID

3- Profesor, Tabriz University, Tabriz, Iran.
4- Assistant Profesor, Tabriz University, Tabriz, Iran.
5- Assistant Profesor, Tabriz University, Tabriz, Iran.

www.SID.ir