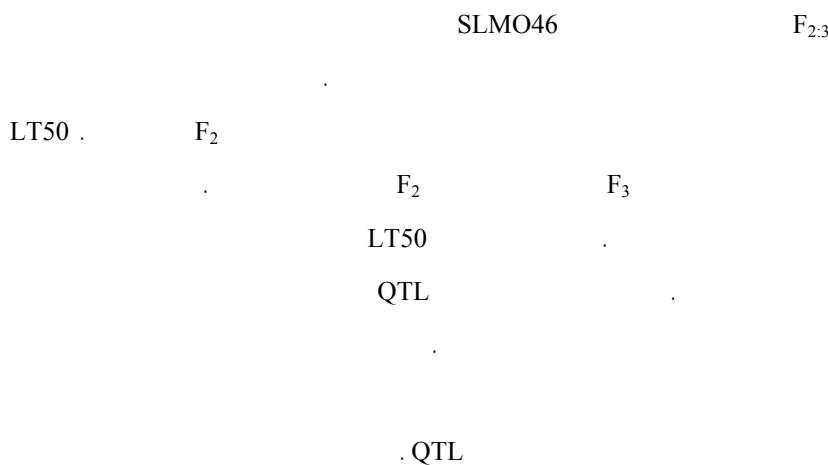


## Mapping cold resistance genes in rapeseed (*Brassica napus* L.) using microsatellite markers

علی اصغری<sup>۱</sup>، سید ابوالقاسم محمدی<sup>۲</sup>، محمد مقدم<sup>۳</sup>، محمود تورچی<sup>۴</sup>  
و عادل دباغ محمدی نسب<sup>۵</sup>

مکانیابی ژن‌های کنترل کننده مقاومت به سرما در کلزا با استفاده از نشانگرهای

ریزماهواره. مجله علوم زراعی ایران. جلد هفتم، شماره ۳، صفحه: ۲۱۱-۲۰۲.



تاریخ دریافت: ۱۳۸۴/۱/۱۷

- ۱- مریم گروه زراعت و اصلاح بیاتات دانشگاه محقق اردبیلی و دانشجوی دکتری در دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز  
۲- دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز (مکاتبه کننده)  
۳- استاد دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز  
۴- استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز  
۵- استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

بودن مکان ژنومی آن‌ها، نشانگرهای مناسبی برای مکان‌یابی ژن‌های کنترل کننده 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 ۱۵ نشانگر ریزماهواره چند شکل طراحی و آن‌ها را به ۷ گروه پیوستگی مناسب کردند. اووزونوا و همکاران (Uzunova & Ecke, 1999) با بررسی ۳۱ ژنوتیپ کلزا با استفاده از ۱۱ نشانگر ریزماهواره، ۸ نشانگر تکرارپذیر با دو تا سه الی 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 ۱۲۰ نشانگر ریزماهواره گزارش کردند که توزیع این نشانگرها در ژنوم‌های A و C به صورت تصادفی است. ویسلدر و همکاران (Weisleder *et al.*, 1995) ۱۵۰ لاین هاپلوئید مضاعف شده کلزا را با بیش از ۲۵۰ 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 نشانگرها 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 کنترل کننده صفات ریشه و ساقه را در شرایط تنش سرمایی شناسایی کردند. تیوتونیکو و همکاران (Teotonico *et al.*, 1995) با استفاده از نشانگرها 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.

دماهای پاییز یکی از عوامل مهم محدود کننده 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 مرفوژیک، فیزیولوژیک، ژنوتیپ گیاه، وضعیت خاک و نوسانات آب و هوایی بستگی دارد. گزینش فتوتیپی برای این صفت در نسل‌های در حال تفرق از کارآبی خوبی برخوردار نیست. امروزه از نشانگرها مولکولی به عنوان ابزارهای کارآ و مکمل روش‌های کلاسیک برای مکان‌یابی و شناسایی ژن‌های کنترل کننده صفات کمی و برنامه‌های گزینش به کمک نشانگر استفاده می‌شود.

نقشه پیوستگی در کلزا ابتدا با استفاده از نشانگرها (Restriction Fragment Length Polymorphism) RFLP ایجاد شد (Frreira *et al.*, 1994; Uzunova *et al.*, 1995) از نشانگرها دیگر ریمانند RAPD، (Microsatellite) RPSA، (Random Amplified Polymorphic DNA) و (Amplified Fragment Length Polymorphism) AFLP نیز به طور گسترده در تهیه نقشه‌های پیوستگی، شناسایی ارقام، تجزیه تنویر ژنتیک و مکان‌یابی ژن‌های کنترل کننده 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 نشانگرها ریزماهواره در گونه‌های Brassica کامل نشده است ولی امید می‌رود که در چند سال آینده نشانگرها ریزماهواره زیادی در این گونه‌ها مکان‌یابی شوند. این نشانگرها به علت اختصاصی بودن، ماهیت همباز، چند شکلی بالا و معلوم

۵۰ نانوگرم دی. ان. ۱ الگو، سه میلیمول MgCl<sub>2</sub>، ۰/۲۵ میلیمول از هر dNTP، ۰/۲۵ میکرومول آغازگر، یک واحد Taq DNA Polymerase و ۱x بافر انجام گرفت. برنامه تکثیر به صورت ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۵ دقیقه برای واسرشته سازی اولیه و به دنبال آن ۷۲ دقیقه، ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت دو دقیقه و نهایتاً مرحله بسط نهایی در ۷۲ 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 رنگ آمیزی نیترات نقره مطابق پروتکل سیمیت (CIMMYT, 1984) آشکارسازی شد.

: برای ارزیابی مقاومت به سرما از هر خانواده F<sub>3</sub>، ۱۴ بوته در ظروف پلاستیکی با ابعاد ۱۵×۳۵×۲۵ به عنوان گلدان کشت گردیدند. در هر ظرف بذرهاي دو خانواده با فاصله پنج سانتیمتر بین بوتهای مجاور کشت شد. بوتهای کشت شده، در گلخانه‌ای با دوره روشنايی ۱۰/۱۴ ساعت (روز / شب) و دمای ۱۲-۱۵ درجه سانتیگراد در روز و ۲۰ 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 عادت دهی به اطاکچ رشد با دمای ۲/۴ درجه سانتیگراد (روز / شب)، شدت نور ۲۶۰ میکرومول بر مترمربع در ثانیه و دوره روشنايی ۱۰/۱۴ (روز / شب) منتقل و به مدت سه هفته در اطاکچ رشد نگهداری شدند. این بوتهای سپس به سردخانه با دمای -۲ درجه سانتیگراد منتقل شده و به مدت ۲۴ ساعت در این دما در تاریکی نگهداری گردیدند تا عادت دهی آن‌ها تکمیل شود. سپس بوتهای به فریزر قابل برنامه‌ریزی منتقل و دما به میزان دو درجه سانتیگراد در ساعت کاهش داده شد تا دما به تیمارهای دمای مورد نظر

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

: در این پژوهش از جمعیت F<sub>2:3</sub> حاصل از تلاقی رقم کوانتم (بهاره و حساس به سرما) و رقم SLMO46 (پاییزه و مقاوم به سرما) استفاده شد. برای ارزیابی ژنتیکی و نیز تولید خانواده‌های F<sub>3</sub>، ۲۰۰ بوته F<sub>2</sub> در گلدان‌های سه کیلوگرمی در شرایط گلخانه‌ای با دوره روشنايی ۱۰/۱۴ ساعت (روز / شب) کشت شدند. به منظور استخراج دی. ان.، از برگ‌های هر بوته نسل F<sub>2</sub> در مرحله شش تا هشت برگی، نمونه برگی برداشت شد. نمونه‌های برگی پس از انجماد در ازت مایع به فریزر -۸۰ درجه منتقل گردیدند و تا زمان استخراج دی. ان.، در این دما نگهداری شدند. برای تولید خانواده‌های F<sub>3</sub>، بوته‌های F<sub>2</sub> در مرحله قبل از گرده افشاری پاکت گذاری شدند تا نتاج F<sub>3</sub> در نتیجه خود باروری هر بوته تولید گردد. خانواده‌های F<sub>3</sub> حاصل برای ارزیابی فوتیپی استفاده شدند.

: استخراج دی. ان. ابا استفاده از روش CTAB انجام گرفت (Saghai-Maroof *et al.*, 1984). کمیت و کیفیت نمونه‌های دی. ان. اتوس ط روشن اسپکتروفوتومتری و الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد تعیین شد. نمونه‌های دی. ان. ا پس از تعیین غلظت، به غلظت ۲۵ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شدند و در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد استفاده قرار گرفتند.

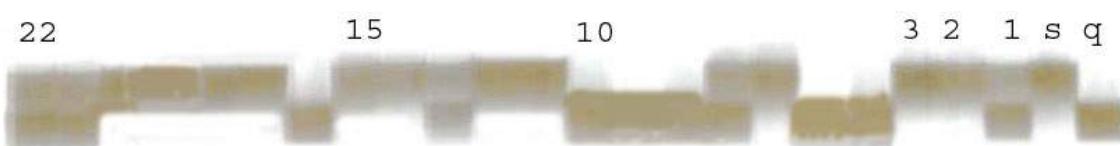
برای ارزیابی ژنتیکی از ۳۵۰ جفت آغازگر ریزماهواره استفاده شد. این آغازگرها از سایت مربوط به بانک اطلاعاتی کلزا با آدرس اینترنتی <http://ukcrop.net/perl/ace/tree/brassicaDB> توسط شرکت UBC کشور کانادا سنتز شدند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر با اجزای

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

برای ارزیابی‌های ژنتیکی ابتدا چند شکلی والدین با استفاده از ۳۵۰ جفت آغازگر ریزماهواره بررسی شد. از مجموع آغازگرهایی که تکثیر مناسب و قابل امتیازدهی داشتند، ۳۲ جفت از آن‌ها چند شکلی در بین والدین داشتند که برای ارزیابی ژنتیک جمعیت و تعیین ژنتیک افراد نسل  $F_2$  مورد استفاده قرار گرفتند. شکل ۱ 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 حداقل فاصله ۵۰ سانتی‌مورگان بین دو نشانگر مجاور و حداقل LOD برابر سه تهیه گردید. از بین ۳۲ نشانگر، ۱۵ نشانگر به پنج گروه پیوستگی با متوسط فاصله ۱۲/۶۵ سانتی‌مورگان بین دو نشانگر مجاور منتبه شدند که حدود ۲۰/۲۴ سانتی‌مورگان، ژنوم کلزا را پوشش دادند. ۱۷ نشانگر دیگر در هیچیک از گروه‌های پیوستگی قرار نگرفتند (شکل ۲). به منظور شناسایی نشانگرهای پیوسته با

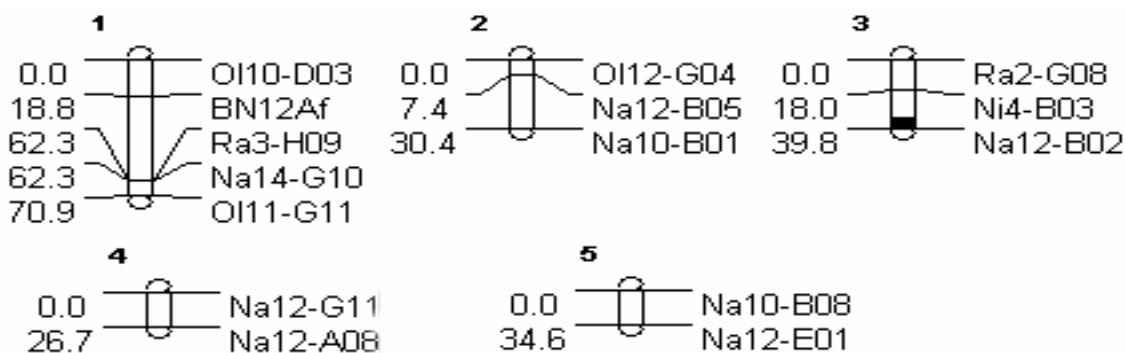
رسانده شد. تیمارهای سرمایی مورد استفاده عبارت از ۴، ۸، ۱۲ و ۱۶ درجه سانتیگراد بودند. برای هر تیمار دمائی ۱۴ بوته از هر خانواده در نظر گرفته شد. در هر تیمار دمائی، بوته‌ها به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی نگهداری و سپس دما به میزان دو درجه سانتیگراد در ساعت افزایش داده شد تا به صفر درجه سانتیگراد برسد. بوته‌ها به مدت ۲۴ 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 در هر تیمار سرمایی LT50 برای خانواده‌ها برآورد گردید. سر انجام دمای ۵۰ هر خانواده با استفاده از روش پروبیت محاسبه شد (Finney, 1971).

تجزیه پیوستگی نشانگرهای چندشکل پس از آزمون انحراف از تفرق (Distortion Segregation) در هر جایگاه با فرض حداقل فاصله ۵۰ سانتی‌مورگان بین دو نشانگر مجاور و LOD (Log Likelihood Ratio) برابر سه انجام گردید. رابطه بین داده‌های ژنتیکی و فنوتیپی برای مکان‌یابی QTL‌های فرضی با استفاده از تجزیه تک نشانگری (Single Marker Analysis)، مکان‌یابی فاصله‌ای (Interval Mapping) و مکان‌یابی فاصله‌ای مرکب (Composite Interval mapping) ارزیابی شد.



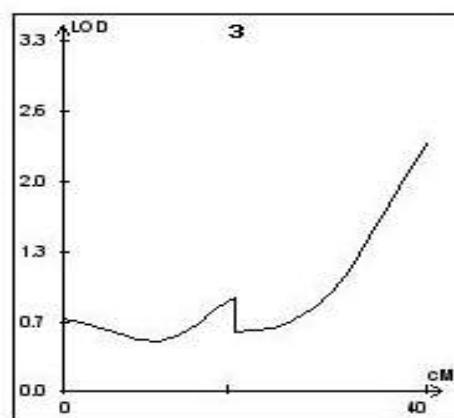
شکل ۱- الگوی نواربندی نشانگر Na12-B02 ریزماهواره در والدین کوانتم (q)، SLMO46 (s) و تعدادی از افراد جمعیت  $F_2$

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



شکل ۲- نقشه پیوستگی و جایگاه QTL شناسایی شده در کلزا برای مقاومت به سرما با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره از

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



شکل ۳- منحنی حاصل از مکان یابی فاصله ای مرکب برای گروه پیوستگی شماره ۳ توسط Win QTL Cartographer نرم افزار

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

نشانگری و روش های مکان یابی فاصله ای این بود که در تجزیه تک نشانگری، دو نشانگر پیوسته با QTL های تشخیص داده شده، جزو نشانگرهای غیر مرتبط به گروه های پیوستگی بود و استفاده از آنها در روش های مکان یابی فاصله ای امکان پذیر نبود. QTL شناسایی شده در مکان یابی فاصله ای و فاصله ای مرکب در گروه پیوستگی سوم در فاصله بین دو نشانگر Ni4-B03 و Na12-B02 و با فاصله ۱۸ سانتی متر گان از نشانگر اول و

QTL های مقاومت به سرما و تعیین سهم هر QTL در تبیین تغییرات فتوتیپی صفت LT50 تجزیه تک نشانگری، مکان یابی فاصله ای و مکان یابی فاصله ای مرکب انجام گرفت. در شکل ۳ منحنی حاصل از مکان یابی فاصله ای در گروه پیوستگی سه دیده می شود. بر اساس نتایج تجزیه تک نشانگری سه QTL و در مکان یابی فاصله ای و مکان یابی فاصله ای مرکب یک QTL شناسایی شدند. علت تفاوت نتایج تجزیه تک

QTL های اول و دوم تشخیص داده شده در این QTL پژوهش دارای اثرهای افزایشی و غالیت منفی ولی QTL سوم دارای اثرهای مثبت بود. در QTL اول اثر غالیت 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 کوانتم و در QTL سوم از رقم مقاوم SLMO46 به نتاج منتقل شده است. در صفاتی که تفکیک متجاوز نشان می‌دهند، انتقال اللهای مؤثر در صفت از هر دو والد به نتاج قابل انتظار است. از طرف دیگر منفی بودن اثرهای غالیت 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 غالیت 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 مرتب از اثرهای غالیت 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 غالیت 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

۲ سانتی‌مورگان از نشانگر دوم قرار داشت. این QTL شش درصد از تغییرات فنتوپیی 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 برآورده 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 فنتوپیی صفت مورد مطالعه را تعیین کردند. این سه در مجموع ۱۳ درصد از تغییرات صفت LT50 را توجیه کردند. این نتایج، دخیل بودن QTL های کوچک اثر را در مقاومت به سرما نشان می‌دهد (جدول ۱). 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 برآورد کردند. تووس و همکاران (Toth *et al.*, 2003) روی کروموزم 5B گندم، یک QTL برای مقاومت به سرما شناسایی کردند که ۳۱/۴ درصد از تغییرات صفت را تعیین کرد. هیوند و همکاران (Hund *et al.*, 2004) در ذرت برای صفات مربوط به ریشه و ساقه در شرایط تنفس سرما، چهل QTL شناسایی کردند که اثر این QTL ها از ۰/۴ تا ۳۰/۱ درصد برآورد گردید.

#### جدول ۱- گروه پیوستگی، اثرهای افزایشی و غالیت، LOD و سهم QTL های شناسائی شده در توجیه واریانس صفت مورد مطالعه

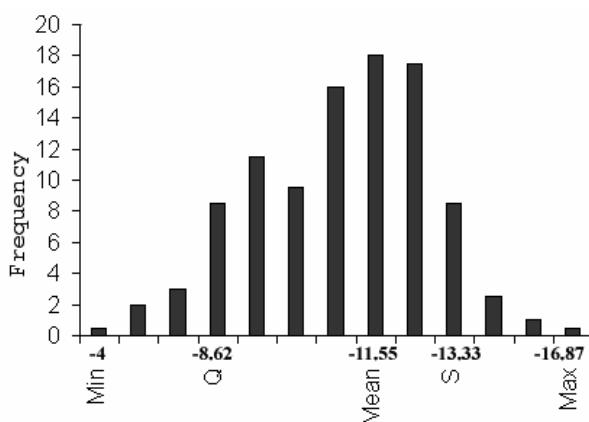
Table 1.The linkage groups, additive and dominance effects and LOD scores of identified QTLs and phenotypic variance of the trait explained by each QTL

QTL	گروه پیوستگی Linkag group	LOD	اثرهای افزایشی Additive effects	اثرهای غالیت 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

متعددی کنترل می‌شود. شکل ۲ 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) (Teotonico *et al.*, 1995) در جمعیت‌های مربوط به گونه‌های (*B. napus*) و (*B. rapa*) در ارتباط با توانایی عادت‌دهی، تفکیک متجاوز را گزارش کرده و اظهار داشتند که تفکیک متجاوز به

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

در این مطالعه LT50 بر آورده شده در ۲۰۰ خانواده  $F_3$  از ۴-تا ۱۶/۸۷ درجه متغیر بود. رقم مقاوم ۱۳/۳۳، رقم حساس ۸/۶۲ و میانگین خانواده‌ها برابر ۴۰ ۱۱/۰۰۴ درجه برآورده شد. از مجموع خانواده‌ها، ۴۰ خانواده (۲۰٪) دارای LT50 پایین‌تر از رقم SLMO46 و ۲۰ خانواده (۱۰٪) بالاتر از رقم کواتنوم بودند. بنابراین برای این صفت نسبت به والد مقاوم و والد حساس تفکیک متجاوز رخ داده و صفت توسط ژن‌های



شکل ۴- نمودار توزیع صفت LT50 در والدین کواتنوم (Q)، خانواده‌های  $F_3$  و SLMO46

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

تأکید کردند. آکاریا و همکاران (Acharia *et al.*, 1983) نیز وراثت‌پذیری مقاومت به سرما را ۲۳ تا ۶۴ درصد به دست آورده‌اند. دانه لوبی پور (۱۳۸۰) برای صفات درصد بقا در زمستان و درصد تراوش یونی در کلزا، سهم واریانس افزایشی از واریانس ژنتیک کل را به ترتیب ۸۱/۷۰ و ۷۶/۸۱ درصد برآورد کرده و نتیجه گیری کرد که این صفات وراثت‌پذیری خصوصی بالایی دارند

علت دخالت چند ژن در کنترل این صفت و تجمع ژن‌های هر دو والد در نتاج حاصل می‌شود. از تلاقي‌های دیالل در گل کلم نیز نتیجه گیری شده که اختلاف واریته‌ها از نظر مقاومت به یخ‌زدگی در اثر تجمع ژن‌های مربوطه ناشی می‌شود (Fuller, 1993). ون و همکاران (Wan *et al.*, 1995) وراثت‌پذیری زمستان‌گذرانی را در کلم ۶۵/۲ درصد برآورد کرده و بر توارث کمی صفت

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.

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

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 ۰/۳۳ براورد کردند. هیوند و همکاران (Hund *et al.*, 2004) برای QTL های مربوط به صفات ریشه و ساقه در شرایط تنفس سرما در ذرت، اثرهای افزایشی مثبت و منفی گزارش کردند که این اثرها از ۰/۰۰۵ تا ۱۰/۰۵۷ 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

## References

- . 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.
- 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 shoot 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 10<sup>th</sup> 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. Robbelin.** 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: 194-204.
- 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.
- 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<sup>1</sup>, S. A. Mohammadi<sup>2</sup>, M. Moghadam<sup>3</sup>, M. Toorchi<sup>4</sup> and A. Dabagh-Mohammadi Nasab<sup>5</sup>

### ABSTRACT

Microsatellite 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<sub>2:3</sub> 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<sub>3</sub> families was measured. The parental polymorphism was assessed using 350 SSR primer pairs. The 32 polymorphic primer pairs were selected for genotyping of F<sub>2</sub> 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: April, 2005**

- 1- Lecturer, Mohagheghe-Ardebili University and Ph-D student, Tabriz University. (Corresponding Author), Tabriz, Iran.  
2- Associated Profesor, Tabriz University, Tabriz, Iran.  
3- Profesor, Tabriz University, Tabriz, Iran.  
4- Assistant Profesor, Tabriz University, Tabriz, Iran.  
5- Assistant Profesor, Tabriz University, Tabriz, Iran.