"نشریه علوم و فناوری بذر ایران"
جلد یازدهم، شماره ٤، زمستان ١٤٠١
(ص ٩٦-٨٥)
*مقاله پژوهشی*

Iranian Journal of
Seed Science and Technology
Vol.: 11, No.: 4, Winter 2023
(pp: 85-96)
DOI: 10.22092/ijsst.2022.357359.1419
*Research Article*

# بهینه‌سازی شناسایی بذر خردل وحشی (*Sinapis arvensis* L.) در محموله‌های بذری کلزا با روش‌های ریخت‌شناسی، شیمیایی و مولکولی

**بیتا اسکویی[1*]، لیلا صادقی[2]، فاطمه دوروشی[2]**

۱. عضو هیئت علمی مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی، کرج، ایران
۲. محقق مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی، کرج،
(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۱۴؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۰۱)

**چکیده**

در استاندارد ملی تولید بذر کلزا، خردل‌وحشی جزء علف‌های هرز غیرمجاز بشمار می‌رود. علارغم اینکه کلزا و خردل‌وحشی با صفات ریخت‌شناسی قابل تمایز هستند ولی تشخیص بذرو دو گونه بخصوص بذرو پوشش‌دار امکانپذیر نمی‌باشد. پژوهش حاضر در راستای بهینه نمودن شناسایی و تشخیص بذر خردل وحشی در محموله‌های بذری کلزا با روش‌های ریخت‌شناسی، شیمیایی و مولکولی صورت گرفت. آزمون شمارش سایر بذور براساس قوانین بین‌المللی آزمون بذر در نمونه‌کاری کلزا انجام گرفت. درآزمون شیمیایی بذرها تحت تیمار KOH قرار گرفت. نتایج آزمون شیمیایی پنج حالت تظاهر داشت. در آزمون مولکولی سه نشانگر اختصاصی DA، DC و 5S rDNAکلزا و خردل وحشی و نشانگر Cruc به عنوان کنترل داخلی ویژه تیره شب‌بویان بکار برده شد. براساس نتایج M-PCR، نشانگرهای اختصاصی بذرو خردل وحشی با نشانگر 5S rDNA قطعه ۱۹۰ جفت بازی تکثیر نمود که در بذورکلزا تکثیر نداشت و نشانگرهای DA و DC به ترتیب دو قطعه ۲۳۹ و ۶۲۵ جفت بازی در بذور کلزا تکثیر نمود که در خردل وحشی تکثیر نداشت. مقایسه حالت‌های متفاوت بذور کلزا و خردل وحشی درآزمون شیمیایی با نتایج مولکولی نشان داد حالت دوم و پنجم با خردل وحشی مطابقت دارد. محدودیت ویژگی‌های ریخت‌شناسی و حالت‌های تظاهر صفات مرتبط با بذر خردل وحشی و کلزا و نیز عواملی مانند پوشش‌دار بودن بذر و ایجاد محدودیت با تیمار شیمیایی شناسایی خردل وحشی از توده‌های بذری کلزا را مطابق استانداردهای بین‌المللی آزمون بذر با ابهام مواجه می‌کند، در چنین مواردی ابزارهای مولکولی مبتنی بر DNA نتایج قابل اطمینان و قطعی ارائه خواهند نمود.

**کلمات کلیدی:** کلزا، خردل وحشی، شدت‌تابش، نشانگر مولکولی اختصاصی و پوشش بذر

# Optimization Identification of wild mustard *(Sinapis arvensis* L.) seeds in rapeseed seed lots by morphological, chemical and Molecular methods

**B. Oskouei[1*], L. Sadeghi[2], F. Dorooshi[2]**

1. Faculty member Seed and Plant Certification and Registration Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
2. Researcher of Seed and Plant Certification and Registration Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
(Received: Mar. 05, 2022 – Accepted: Aug. 23, 2022)

**Abstract**

In the national standard for canola seed production, wild mustard is considered an illegal weed. Although canola and wild mustard can be distinguished by the morphological traits, it is not possible to distinguish the seeds of two species, especially the coated seeds. The present study was conducted to optimize the identification and detection of wild mustard seeds in rapeseed lots by morphological, chemical and molecular methods. The other seed count test was performed according to the rules of international seed test in rapeseed sampling. Chemical test design was performed under KOH treatment. The results of the chemical test were presented in five different status. Three specific markers of DA, DC and 5S rDNA were used, respectively. The Cruc marker is thought to be an internal control. Multiple polymerase chain reaction show amplification patterns of wild-mustard seed-specific markers with 5S rDNA amplified 190 bp that did not amplify in canola seeds. DA and DC markers in canola seeds amplified 239 and 625 bp, respectively, which did not amplify in wild mustard. According to molecular specific Profile and comparison with different status of rapeseed and wild mustard seeds in the chemical test, the second and fifth status were correspond with wild mustard. Limitation of morphological features and similarity of expression states of seed-related traits in wild mustard and rapeseed and factors such as seed coverage and chemical treatment restriction of wild mustard from rapeseed masses according International seed testing will not be possible, in which case DNA-based molecular tools will provide reliable and conclusive results.

**Key words:** Rapeseed, Wild Mustard, Radiation Intensity, Specific Molecular Marker and Seed Coating

* Email: b_oskouei@yahoo.com

## مقدمه

خردل وحشی (*Sinapis arvensis* L.) در بین گونه‌های تیره Brassicaceae (شب‌بویان) از جایگاه ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. جوانه‌زنی سریع خردل وحشی در پاییز و رشد سریع آن در ابتدای بهار باعث افزایش توان رقابتی آن با محصولات گردیده و عدم کنترلش موجب کاهش کمیت و کیفیت محصول می‌شود (Rieger *et al*., 1999). خردل وحشی منبع ارزشمندی از ژن های مقاومت در برابر بیماری‌ها و شکستگی غلاف (Snowdon *et al*., 2000; Liu *et al*., 2014) بوده و همچنین دارای نوع جدیدی از سیستم نر عقیمی می‌باشد (Liu *et al*., 2015) ولی به عنوان یک علف هرز در مزارع کلزا (*Brassica napus* L.) محسوب می‌شود.

از آنجاکه بذر بسیاری از گیاهان تیره شب بویان بسیار شبیه بذر خردل وحشی می‌باشد و اغلب تیره شب بویان دگرگشن هستند. بنابراین بذرهایی با خصوصیات حدواسط حاصل می‌شود، همچنین شرایط محیطی، میزان رسیدگی بذر و فرآوری نیز ممکن است بر روی خصوصیات بذر تاثیرگذار گردد. در اینصورت شناسایی خردل وحشی از بسیاری از گونه‌های یکساله زرد گل تیره شب‌بویان با مشکلات و ابهاماتی مواجه می‌شود (Baxter *et al*., 2008).

چنانچه بذرهای خردل وحشی در مجاورت محلول ۵ درصد KOH و سپس تحت نور UV قرار گیرند، در اطراف هر بذر فلورسانس زرد–سبز ایجاد می‌شود. تولید تشعشات فلورسانس را به وجود لایه موسیلاژی پوسته بذر خردل نسبت می‌دهند (Agrawal and Pawar, 1990). همینشو و همکاران (Himanshu *et al*., 2018) نیز نتایج مشابهی را با استفاده از محلول ۵ درصد KOH گزارش کرد. غوطه‌ور نمودن ۲۵ رقم برنج در محلول ۳ درصد NaOH به مدت ۳ ساعت واکنش های متفاوتی نشان داد بطوریکه طیف رنگی از زرد کمرنگ تا قرمز قابل تفکیک بود و ارقام واکنش‌های متفاوتی با تیمار شیمیایی بروز دادند (Nagendra *et al*., 2020).

تیمارهای شیمیایی آزمون استاندارد فنل، آزمون فنل تغییر یافته، آزمون KOH و آزمون NaOH، ۲۴ رقم گوجه فرنگی را متمایز نمود (Vishwanath *et al*., 2013).

ابزاهای مولکولی بوضوح روابط فیلوژنی و تاکسونومیکی گونه‌های تیره شب‌بویان را در سطح ژنوم آشکار نموده است (Samers and Demmon, 2002; Flannery *et al*., 2006; Cheng *et al*., 2014). نشانگرهای اختصاصی مبتنی بر DNA روابط بین گونه‌ها و دورگ‌های بین گونه‌ای جنس براسیکا مشخص و قابل تمایز می‌کند (Hasterok *et al*., 2001; La Mura *et al*. 2010; Yan *et al*., 2014).

ژن *Transparent Testa Glabra 1* (TTG1) کدکننده پروتئین WD40 یکی از تنظیم کننده‌های فرآیندهای بیولوژیکی از جمله تمایز سلول اپیدرمی پوست، تمایز کرک و تشکیل رنگ پوشش بذر است (Walker *et al*., 1999). ژن TTG1 روی کروموزوم A06 گونه *B. rapa* نه تنها رنگ پوشش بذر را کنترل می‌کند بلکه در تشکیل کرک نیز نقش دارد (Zhang *et al*., 2009). تجزیه و تحلیل توالی‌های همسان‌سازی شده ژن *TTG1* از سه ژنوم A، B و C به ترتیب ۳، ۴۵ و ۷ نوکلئوتیدتفاوت در توالی ژن نشان داد. براساس اختلافات اختصاصی موجود بین ژنوم A، B و C شناسایی و تشخیص شش گونه جنس Brassica با طراحی نشانگرهای اختصاصی امکانپذیر خواهد بود (Yan *et al*., 2014).

مطالعات سیتولوژی نشان می‌دهد ژنوم خردل وحشی (SarSar, 2n=18) علی‌رغم اینکه ارتباط بیشتری با ژنوم B دارد ولی از ژنوم آلوتتراپلوییید کلزا (AACC, 2n=38) متفاوت می‌باشد (Schelfhout *et al.* 2004). سایر مطالعات نیز نشان می‌دهند که ژنوم B تشابه کمتری به ژنوم A و C دارد (Hosaka *et al*. 1990; Chèvre *et al*. 1997; Song *et al*. 1988; Quiros *et al*. 1991; Truco *et al*. 1996).

چندشکلی موجود در توالی نواحی جدا کننده 5S rDNA گونه‌های مختلف، این امکان را فراهم می‌کند که نشانگرهای اختصاصی ژنوم برای شناسایی و تمایز دورگ‌های بین گونه‌ای از گونه های اصلی طراحی نمود. استفاده از نشانگرهای اختصاصی 5S rDNA گونه‌های با ژنوم A، B و C و SarSar و دورگ‌های مرتبط از جمله کلزا و خردل می‌تواند بسیار کاربردی و قابل اطمینان باشد (La Mura *et al*. 2010).

اخیرا با فناوری توالی‌یابی ترانسکریپتوم *S. arvensis*، امکان دسترسی به توالی‌های متعددی از ژن‌های خاص فراهم گردید که طراحی نشانگرهای اختصاصی ژنوم خردل را به منظور شناسایی و تشخیص فراهم شد (Liu *et al*. 2014).

در مطالعه‌ای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه با نشانگرهای اختصاصی ژنوم A، B و C ۱۲۰ ژنوتیپ از گونه‌های مختلف جنس Brassica توانست به شش گونه تفکیک کند (Koh *et al*., 2017).

با توجه به استاندارد ملی تولید بذر کلزا، علف هرز خردل وحشی جزء علف‌های هرز غیرمجاز می‌باشد. براین اساس در طبقه سوپرالیت و الیت تعداد بذر خردل وحشی صفر و در طبقه گواهی شده حداکثر ۳ عدد در ۱۰۰ گرم تعیین شده است(SPCRI, 2016 )، علارغم اینکه کلزا و خردل وحشی با صفات ریخت‌شناسی برگ، ساقه، و گلبرگ قابل تمایز هستند ولی تشخیص بذرو دو گونه بخصوص بذرو پوشش‌دار دشوار و امکانپذیر نمی‌باشد. بنابراین پژوهش حاضر در راستای بهینه نمودن شناسایی و تشخیص بذر خردل وحشی در محموله‌های بذری کلزا با روش‌های ریخت‌شناسی، شیمیایی و مولکولی ضرورت دارد.

## مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در سال ۱۳۹۸ در مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال انجام گرفت. در این تحقیق روند تشخیص بذر علف هرز خردل وحشی در محموله بذری کلزا در سه مرحله ریخت‌شناسی، شیمیایی و مولکولی انجام گرفت.

### ۱- خصوصیات ریخت‌شناسی

آزمون خلوص فیزیکی و شمارش سایر بذور براساس قوانین انجمن بین المللی آزمون‌های بذر ایستا (ISTA, 2021) انجام گرفت. در آزمون خلوص فیزیکی، نمونه مورد آزمون به سه جزء بذر خالص، سایر بذرها و مواد جامد تفکیک گردید. براساس تخمین وزنی حداقل میزان نمونه در آزمون خلوص فیزیکی متشکل از ۲۵۰۰ واحد بذری می‌باشد که برای بذر کلزا مطابق قوانین بین المللی آزمون‌های بذری این میزان معادل ۱۰ گرم برآورد شده است. بدین ترتیب بذرهایی که از لحاظ مورفولوژیکی در میزان ۱۰ گرم نمونه کاری مشکوک به خردل وحشی بودند.

در آزمون شمارش سایر بذور، جداسازی بذور علف‌های هرز و سایر گونه‌های گیاهی در ۱۰۰ گرم نمونه کاری انجام و بذوری که به لحاظ ریخت‌شناسی مشکوک به خردل وحشی بودند، جداسازی و در زیر بینی‌کولار با بزرگ‌نمایی ۲۰ برابر مورد بررسی قرار گرفت. بذور مشکوک کاملا کروی و فاقد شیار شکمی به عنوان خردل وحشی در نظر گرفته شدند (ISTA, 2021).

### ۲- آزمون شیمیایی

بذرهای کلزا در دو حالت ضدعفونی شده و ضدعفونی نشده، بذر خردل وحشی شاهد (از بوته‌های خردل وحشی جدا شده بودند) درآزمون شیمیایی مورد استفاده قرار گرفتند. آزمون شیمیایی با اعمال تغییراتی در روش اصلی به شرح ذیل انجام شد؛ بذرهای هر نمونه در پتری‌دیش (۹سانتی‌متر) با فاصله قرار داده شد، به مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد با KOH (MERK, Germany) پنج درصد تیمار شدند و اثر واکنش شیمیایی با اشعه فرابنفش (UV) مورد بررسی قرار گرفت. براساس الگوهای حاصل بذرو

مشکوک به خردل وحشی و کلزا قابل تفکیک و شناسایی گردید (Van der Berg and Vierbergen, 1979).

### ۳-آزمون مولکولی

استخراج DNA ژنومی از تک بذر

DNA ژنومی بذرو کلزا و خردل مشکوک و شاهد به همراه تعدادی از بذرو گونه‌های مختلف تیره شب بویان به صورت تک بذر براساس دستورالعمل استخراج DNA از بذر (Jamali *et al*., 2017) استخراج گردید.

تک بذر کلزا، شلغم و کلم و خردل وحشی در میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE به همراه یک عدد ساچمه فلزی قرار داده و بوسیله دستگاه تیشولایزر (Tissue Lyser II, Qia gen , Germany) کاملاً خرد شدند. بلافاصله ۳۰۰ میکرولیتر بافر استخراج حاوی (0.5 M Tris pH 7.5, 0.35 M NaCl، 0.5% SDS) به تیوب‌ها اضافه و در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ دقیقه در حمام آبی نگهداری شدند. فاز رویی پس از سانتریفیوژ (Eppendorf, 5430 R) به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ *rpm*، به تیوب‌های جدید و استریل منتقل و یک دهم حجم استات پتاسیم ۰/۵ مولار اضافه و مخلوط شدند. به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ نگهداری سپس به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۳۰۰۰ *rpm* سانتریفیوژ شدند. دو برابر حجم عصاره، اتانول ۹۶ درصد و یک دهم حجم استات سدیم ۳ مولار به فاز رویی اضافه و به مدت ۷ دقیقه در ۷۰۰۰ *rpm* سانتریفیوژ گردید. فاز رویی را خارج نموده و به رسوب DNA، ۶۰۰ میکرولیتر الکل ۷۰ درصد اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۶۰۰۰ *rpm* سانتریفیوژ شده و فاز رویی را خارج نمود. پس از خشک شدن در معرض هوا، ۷۰ میکرولیتر آب دیونیزه استریل به رسوب DNA اضافه شد. کمیت و کیفیت نمونه‌ها به ترتیب با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتر (نانودراپ مدل ND-1000) و الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد تعیین شد و غلظت نهایی DNA در ۲۵ نانو گرم بر میکرولیتر تنظیم شد.

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای استفاده شده در تحقیق حاضر

Table 1- Primer characters used in this study

| نام آغازگر Primer | توالی (5'-3') Sequence | اندازه قطعه bp Size | ژنوم / ژن هدف پیش‌بینی شده Genome/ target genome | دما Temperature | منابع References |
|---|---|---|---|---|---|
| DA | F: GGGTTTTCGCCTCGGTCTCC<br>R: ACTCCCCTGGTGCCGCTGC | 239 | AA | 58 | Yan *et al.* 2014 |
| DC | F: ACTCCGACTCCATGTCCCTCA<br>R: ACACTCCCCTGGTGCCTTTCA | 625 | CC | 58 | |
| Cruc | F: CCATCCTTCGCTTCCTTCGT<br>R: GTCGAACACTCTGTCACCGT | 325 | *BnC1* | 58 | Jamali et al., 2017 |
| S-5S rDNA | F:CTTGGTCGGTGATAGCTCAT<br>R:GCAACGGAAGTGCACCGT | 190 | SarSar | 60 | La Mura *et al*. 2010 |

به منظور اطمینان از براسیکا بودن نمونه‌های استخراج شده از نشانگر اختصاصی ژن کروسیفرین *BnC1* به عنوان کنترل داخلی تیره شب‌بویان استفاده گردید (Jamali *et al*., 2017). دو نشانگر اختصاصی ژنوم A و C برای شناسایی اختصاصی دورگ‌های کلزا و نشانگر اختصاصی S-5S rDNA برای ژنوم خردل وحشی (SarSar) در نظر گرفته شد(La Mura *et al*. 2010; Yan *et al*. 2014). مشخصات کامل آغازگرهای استفاده شده در جدول ۱ فهرست شده است.

### واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ساده با استفاده از

Master Mix آماده (شرکت سیناژن) با غلظت دو برابر (2X)، حاوی ۰/۰۸ واحد آنزیم DNA پلیمراز، ۳ میلی‌مولار $MgCl_2$ و ۰/۴ میلی مولار dNTPs، انجام شد. برای تهیه حجم ۲۰ میکرولیتر واکنش PCR به میزان ۱۰ میکرولیتر مستر میکس آماده، ۰/۵میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای پیشرو و پسرو و ۲ میکرولیتر DNA الگو به غلظت ۵۰ نانوگرم استفاده شد. در واکنش زنجیره‌ای چندگانه (Multiplex) از سه جفت آغازگر Cruc، DC و S-5SrDNA به ترتیب به عنوان کنترل داخلی، آغازگر اختصاصی کلزا و خردل وحشی در یک واکنش استفاده شد. برای تهیه حجم ۲۰ میکرولیتر واکنش PCR به میزان ۱۰ میکرولیتر مستر میکس آماده، ۰/۳میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای اختصاصی ژنوم کلزا (DC) وکنترل داخلی (Cruc) و ۰/۷ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرهای اختصاصی خردل وحشی (S-5S rDNA) و ۲ میکرولیتر DNA الگو به غلظت ۵۰ نانو گرم استفاده شد (Jamali *et al*., 2017).

چرخه‌های حرارتی برای تکثیر نواحی اختصاصی با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ساده و چندگانه با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر (Eppendorf مدل Master cycler Gradient) به شرح ذیل انجام شد: مرحله واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سلیسوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای بهینه شده هر کدام از آغازگرها (مطابق جدول ۱) و برای واکنش پلیمراز چندگانه دمای اتصال ۶۰ درجه سلیسوس به مدت ۳۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلیسوس به مدت ۳۰ ثانیه، سپس یک مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسوس به مدت ۵ دقیقه تنظیم گردید. از ژل آگارز ۱/۵ درصد برای بارگذاری محصول PCR و از رنگ Gel Red™ (Biotium) برای رنگ‌آمیزی استفاده گردید. تصویر مطلوبی از محصول PCR آشکار شده توسط نور ماوراء بنفش (UV) در دستگاه ژل داک (G:BOX, SYNGENE, UK) ثبت شد.

## نتایج

### - شناسایی براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی

بذرهای کروی با اندازه حدود ۱ تا ۱/۵ میلی‌متر، پوسته بذر مخطط و برجستگی کوچکی به سمت بیرون در ناحیه ناف به عنوان خردل وحشی در نظر گرفته شد (ISTA, 2021). یکی از مهمترین ویژگی متمایز کننده بذر خردل وحشی از کلزا، وجود شیار عرضی عمیق در بذر کلزا می‌باشد که در خردل وحشی این شیار قابل رویت نمی‌باشد. در سایر مطالعات نیز بذرهای خردل وحشی را کروی، به رنگ‌های سیاه تا قهوه‌ای تیره و به اندازه ۲-۱ میلی‌متر توصیف نمودند (Warwick *et al.*, 2000; Husrev, 2003).

(a) (b)

شکل ۱- (a) خردل وحشی (*S. arvensis*) (b) کلزا (*B. napus*)

Figure 1- Seed picture (a) wild mustard (*S. arvensis*) B: Rapeseed (*Brassica napus*)

**- شناسایی به روش شیمیایی**

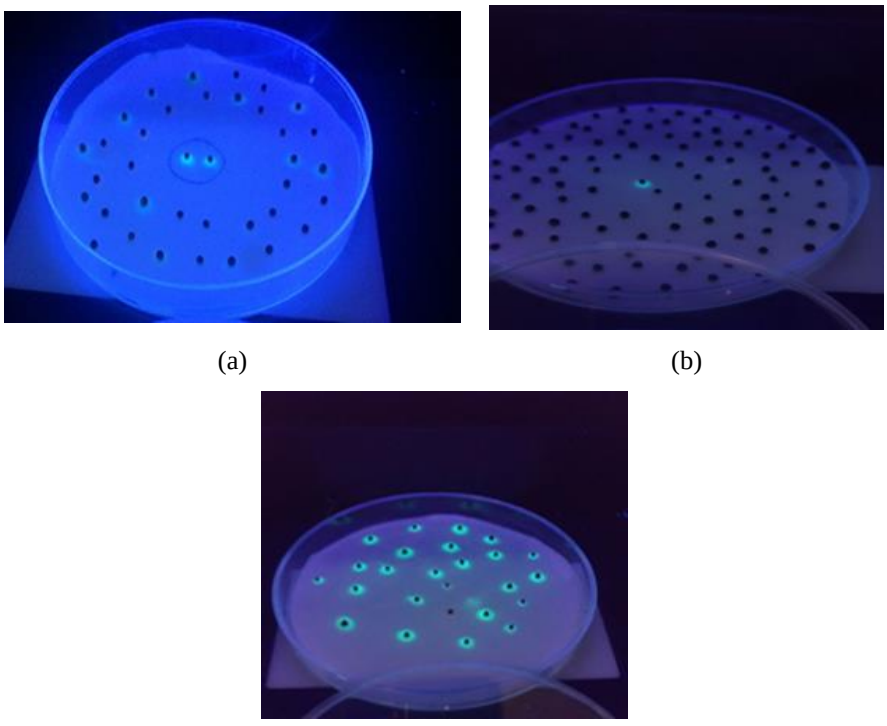
نتایج حاصل تیمار شیمیایی نشان داد واکنش KOH پنج درصد در بذر خردل وحشی بصورت یک تشعشع سبز رنگ یکنواخت در پیرامون بذر تظاهر می‌یابد (شکل ۲ a) ولی بذرهای ضدعفونی نشده کلزا چنین تشعشعی را در واکنش با KOH نشان نمی‌دهند (شکل ۲ b). نتایج تیمار شیمیایی با نتایج ون در برگ و ویربرگن (Van der Berg and Vierbergen, 1979) مطابقت داشت. بعضی از بذر های کلزا ضدعفونی شده، هاله‌ای با رنگ مشابه در بذور خردل وحشی ولی با شدت متفاوت نشان دادند که به عنوان رنگ کاذب در نظر گرفته شد (شکل ۲ c). بنابراین چنین نتیجه گیری شد موادی که برای ضدعفونی بذرها به‌کار می‌رود نیز ممکن است با KOH واکنش نشان دهند.

در آزمون شیمیایی کلزا ضدعفونی شده چندین حالت مختلف مشاهده گردید ۱- بذرهایی که از لحاظ مرفولوژیکی شباهت به خردل وحشی داشتند ولی پس از آزمون شیمیایی، واکنشی نشان ندادند (حالت a از شکل ۳) ۲ - بذرهایی در اطراف آنها هاله-های رنگی با نور تابنده مشابه شاهد( بذر خردل وحشی) قابل مشاهده بود (حالت b از شکل ۳).

۳- در اطراف بذر هاله ای با رنگ مشابه شاهد تشکیل شد ولی شدت تابش آن نسبت به شاهد اندک بود (حالت a از شکل ۴)

۴- در اطراف بذر هاله ای با رنگ و شدت تابش متفاوت از شاهد تشکیل شد (a از شکل ۵)

۵- در اطراف بذر هاله ای با رنگ متفاوت از شاهد تشکیل شد ولی شدت تابش آن مشابه با شاهد بود (a از شکل ۶).

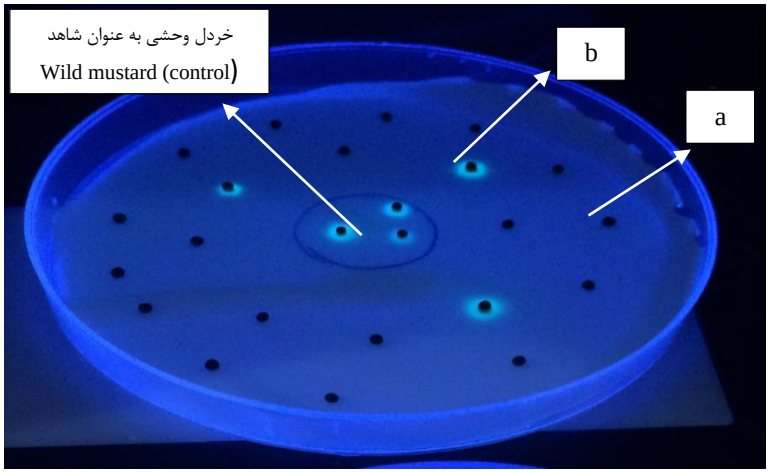


(a) (b)

(c)

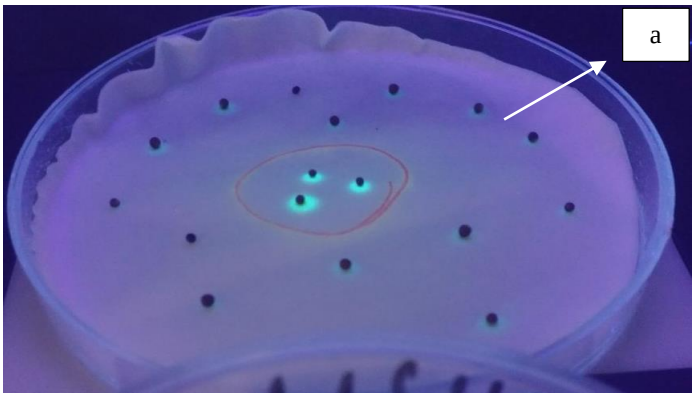
شکل ۲- تشعشع بذر خردل وحشی و کلزا (a) بذر خردل وحشی تحت تیمار KOH زیر نور UV (b) بذر کلزا ضدعفونی نشده تحت تیمار KOH زیر نور UV (c) مقایسه تشعشع بذر خردل وحشی با بذر کلزا ضدعفونی شده در بستر KOH و در مجاورت نور UV.

Figure 2- Wild mustard and rapeseed seeds radiation UV (a) Wild mustard seeds exposed to KOH under UV (b) Rapeseed exposed to KOH under UV (c) comparison of wild mustard radiation with treated rapeseed exposed to KOH under UV



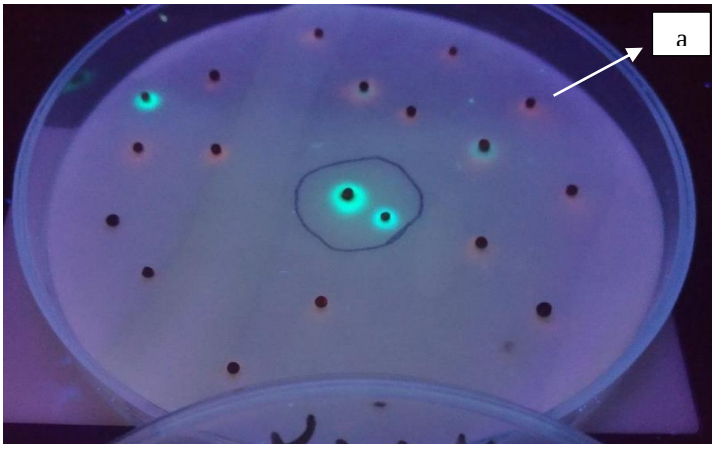

شکل ۳- واکنش بذرهای مشکوک به خردل وحشی از محموله بذری کلزای ضدعفونی شده در بستر KOH و در مجاورت نور UV

Figure 3- Reaction of suspected seeds to wild mustard (*S. arvensis*) from rapeseed treated seed lot in exposed to KOH under UV



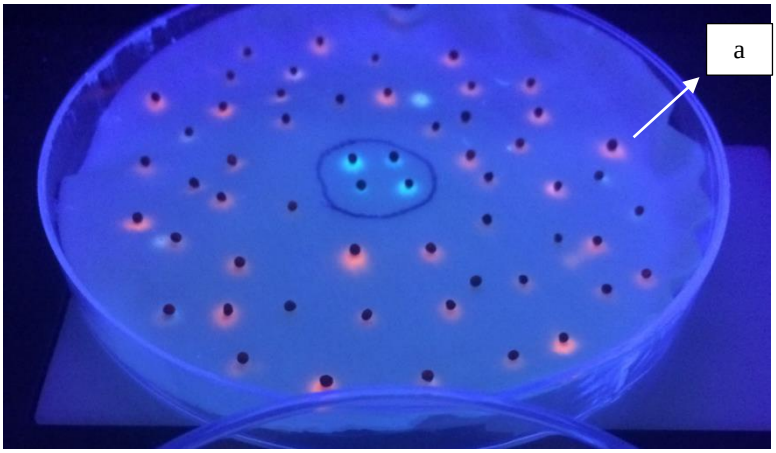

شکل ۴- واکنش بذرهای مشکوک به خردل وحشی مستخرج از محموله بذری کلزای ضدعفونی شده در بستر KOH و در مجاورت نور UV (حالت سوم)

Figure.4- Reaction of suspected seeds to wild mustard (*S. arvensis*) from rapeseed treated seed lot in exposed to KOH under UV (The third status)




شکل ۵- واکنش بذرهای مشکوک به خردل وحشی مستخرج از محموله بذری کلزای ضدعفونی شده در بستر KOH و در مجاورت نور UV (حالت چهارم)

Figure 5- Reaction of suspected seeds to wild mustard (*S. arvensis*) from rapeseed treated seed lot in exposed to KOH under UV (The forth status)

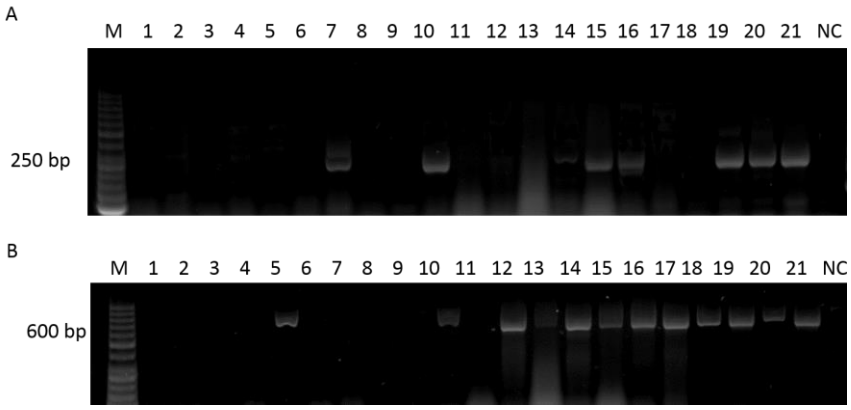



شکل ۶- واکنش بذرهای مشکوک به خردل وحشی در محموله بذری کلزای ضدعفونی شده در تیمار KOH و در مجاورت نورفرابنفش (حالت پنجم).

Figure 6- Reaction of suspected seeds to wild mustard (*S. arvensis*) from rapeseed treated seed lot in exposed to KOH under UV (The fifth status).

از هر کدام از پنج حالت نمونه‌های مشکوک به خردل و کلزا انتخاب و با نشانگرهای مولکولی مورد بررسی قرار گرفتند.

نمونه‌های کلزا با استفاده از دو نشانگر اختصاصی DA و DC به ترتیب دو قطعه ۲۳۹ و ۶۲۵ جفت باز تکثیر نمودند. به دلیل تفاوت ژنوم کلزا (AACC) از ژنوم خردل (SarSar)، نمونه‌های مشکوک به خردل وحشی با نشانگرهای DA و DC تکثیر نشدند (تصویر۷). از طرف دیگر نشانگر اختصاصی S-5S rDNA در بذور *S. arvensis* قطعه‌ای ۱۹۰ جفت بازی تکثیر نمود که نمونه‌های کلزا با این نشانگر تکثیر نشدند (شکل ۸).




شکل ۷- الگوی تکثیری آغازگرهای اختصاصی DA و DC مرتبط با ژنوم AA، CC در نمونه‌های کلزا، و بذور مشکوک به خردل (*S. arvensis*).

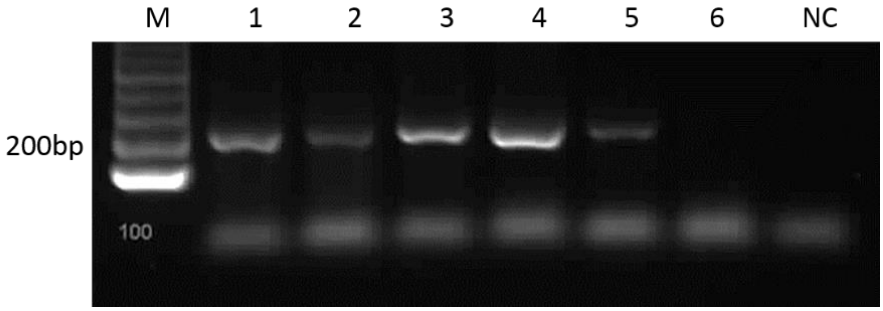
A: تکثیر قطعه ۲۳۹ جفت بازی از ژنوم AA.. شماره‌های ۱تا ۱۰ بذور مشکوک به خردل. شماره های ۱۲ تا ۲۱ نمونه‌های بذری مرتبط باکلزا.

B: تکثیر قطعه ۶۲۵ جفت بازی از ژنوم CC. شماره های ۱تا ۱۰ بذور مشکوک به خردل. شماره های ۱۲ تا ۲۱ نمونه‌های بذری مرتبط باکلزا.

M: خط کش ژنومی ۵۰ جفت بازی. NC: کنترل منفی آب.

Figure 7- Specific markers profile DA and DC in AA and CC genome in rapeseed, and Suspicious mustard DNA (*S. arvensis*).

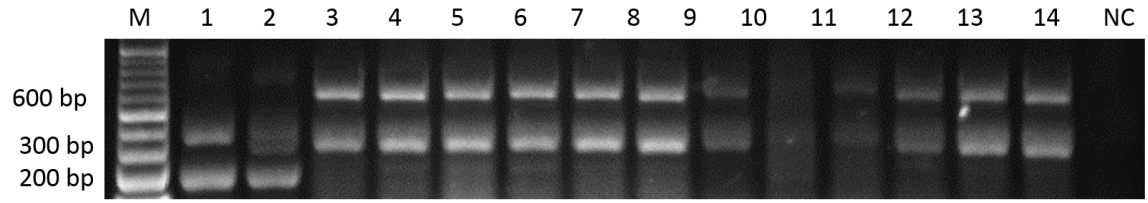
A: Amplification 239 bp in AA- genome. Lane's 1-10 suspicious mustard DNA, Lanes of 12-21 DNA related to rapeseed. B: M: Size marker 100 bp. Amplification 625 bp in CC- genome. Lane's 1-10 suspicious mustard seeds. Lanes of 12-21 DNA related to rapeseed. M; Size marker 50 bp. NC: Negative control.




شکل ۸- نشانگر اختصاصی ژنوم SarSar (*S. arvensis*) قطعه ۱۹۰ جفت بازی شماره‌های ۱ تا ۵ *S. arvensis* و شماره ۶ نمونه کلزا.
M: خط کش ژنومی ۱۰۰ جفت بازی. NC: کنترل منفی آب.

Figure 8- 5S rDNA Specific marker related SarSar genome (*S. arvensis*) amplified 190 bp. Lanes 1-5 in *S. arvensis* and 6 in *B. napus*.
M: Size marker 100 bp. NC: Negative control.

استفاده همزمان از آغازگرهای DC، S-5S و Cruc به عنوان واکنش مولتی‌پلکس امکان شناسایی همزمان ژنوم کلزا (C) و خردل (SarSar) را در یک واکنش فراهم نمود. نشانگر Cruc اختصاصی تیره شب‌بویان به عنوان کنترل داخلی در هر دو گونه قطعه ای با اندازه ۳۲۵ جفت باز تکثیر و دو نشانگر اختصاصی ژنوم کلزا و خردل به ترتیب قطعاتی با اندازه ۶۲۵ و ۱۹۰ جفت باز تنها در نمونه‌های کلزا و خردل وحشی تکثیر داشتند. به این ترتیب استفاده همزمان آغازگرهای اختصاصی ردیابی بذور خردل را در توده بذری کلزا با اطمینان بسیار بالا فراهم نمود (شکل ۹). در واکنش چندگانه اندازه قطعات تکثیری نشانگرها باید بنحوی انتخاب شود که حداقل ۱۰۰ جفت باز از همدیگر اختلاف داشته باشند. نتایج واکنش PCR چندگانه نشان می‌دهد نشانگرها به اندازه کافی از همدیگر فاصله داشته و از لحاظ سرعت و سهولت انجام کار و دقت وهزینه جهت استفاده در توده‌های بذری و ردیابی بذور مشکوک به خردل وحشی مقرون به صرفه و کاربردی می‌باشد.




شکل ۹- آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه (Multiplex) جهت شناسایی همزمان نمونه‌های *S. arvensis* از *B. napus* آغازگر DC اختصاصی ژنوم کلزا و تکثیر قطعه ۶۲۵ جفت بازی از شماره ۳ تا ۱۴. کنترل داخلی (Cruc) تیره شب بویان و تکثیر قطعه ۳۲۵ جفت بازی به عنوان کنترل داخلی در همه نمونه‌ها. نشانگر اختصاصی خردل 5S rDNA و تکثیر قطعه ۱۹۰ جفت بازی در شماره‌های ۱ و ۲.
M: خط کش ژنومی ۱۰۰ جفت باز. NC: کنترل منفی.

Figure 9- Multiplex PCR assay for discriminating rapeseed (*B. napus*) from mustard (*S. arvensis*). DC marker related with rapeseed (C-genome) amplified 625 bp Lines 3-14. Specific marker for Brassicacea family amplified 325 bp used as internal control in all samples. 5S rDNA specific marker in charlock amplified 190 bp lanes 1, 2. M: Size marker 100 bp. NC: Negative control.

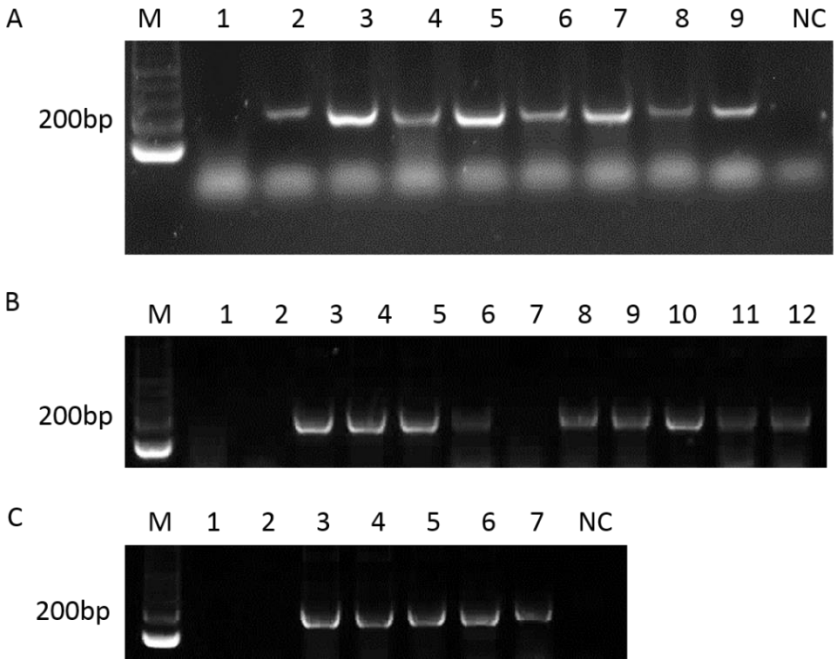
## بحث

در مطالعه حاضر کاربرد جدیدی از نشانگرهای اختصاصی ژنوم در بخش آزمون سایر بذور در تعیین خلوص بذر بهینه‌سازی شد. خردل وحشی به عنوان علف هرز در توده‌های بذری کلزا با نشانگرهای DA، DC و S-5SrDNA قابل شناسایی و تشخیص می‌باشد. برای واکنش زنجیره‌ای چندگانه نشانگر DC با تکثیر قطعه ۶۲۵ جفت بازی از ژنوم کلزا و داشتن فاصله مناسب از دو قطعه دیگر از نشانگر DA با اندازه ۲۳۹ جفت بازی مناسب‌تر می‌باشد (شکل ۹).

نشانگرهای اختصاصی مبتنی بر DNA با دقت و سرعت بالا می‌توانند به عنوان گزینه جایگزین و تکمیلی آزمون‌های شیمیایی و ریخت‌شناسی در تشخیص و شناسایی بذر خردل و کلزا در توده‌های بذری کلزا مورد استفاده قرار گیرند.

پوشش‌های بذری نتایج آزمون‌های شیمیایی را گمراه کننده می‌نماید و براین اساس احتمال نتایج مثبت کاذب و یا منفی کاذب در تشخیص نوع بذر وجود دارد. آزمون‌های مولکولی مستقیما با هدف قرار دادن ژنوم بذر توسط نشانگرهای اختصاصی نتایج کاذب را به حداقل رسانده و نتایج قابل اطمینانی را ارائه می‌دهند.

در طول سال‌های ۹۵ تا ۹۷ پایشی با عنوان شناسایی بذر خردل وحشی از کلزا صورت گرفت. براساس نتایج آزمون شیمیایی ۱۲۴ بذر با تیمار KOH واکنش رنگی نشان دادند. نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگر 5S-SrDNA نشان داد ۹۹ نمونه قطعه ۱۹۰ جفت بازی را تکثیر شد و خردل وحشی بودند و در ۲۵ نمونه تکثیر ناحیه اختصاصی خردل مشاهده نشد.




شکل ۱۰- بذور انتخاب شده به عنوان سایر بذور با روش شیمیایی در سه پارت بذری متفاوت A، B و C در آزمون خلوص بذر و صحه گذاری براساس آزمون مولکولی با آغازگرهای اختصاصی 5S rDNA و تکثیر قطعه ۱۹۰ جفت بازی در نمونه‌های خردل وحشی.
A: شماره ۱ کلزا و شماره های ۲-۹ خردل وحشی. B: شماره‌های ۱، ۲ و ۷ نمونه کلزا و شماره‌های ۳-۵.
نمونه شماره ۷ در B با عدم تکثیر قطعه ۱۹۰ جفت بازی از نظر *S. arvensis* رد می‌شود. M: خط کش ژنومی ۱۰۰ جفت باز. NC: کنترل منفی.

Figure 10- Seeds selected as off type seeds by chemical method in three different seed lot A, B and C in seed purity test and validation based on molecular test with *S. arvensis* specific marker and amplification of a 190 bp in mustard samples.
Lanes 1 (A), 1, 2 (B, C) and 7 (B) not amplified are rapeseed. M: size marker 100 bp. NC: Negative control.

بذرهای تکثیر نشده در آزمون مولکولی با نشانگر خردل، از نظر ریخت‌شناسی ریزتر و کروی‌تر از سایر بذرهای غالب کلزا بودند و پس از آزمون شیمیایی نیز دارای هاله رنگی ولی با شدت کمتر و متفاوت از بذر شاهد خردل وحشی بوده و به عنوان رنگ کاذب طبقه بندی شده بودند. با توجه به نتایج پژوهش حاضر، استدلال می‌شود که ریز بودن و شباهت زیاد بذر خردل وحشی به کلزا خصوصیات ریخت‌شناسی به تنهایی برای تشخیص بذر علف هرز خردل وحشی کفایت نمی‌کند و انجام آزمون شیمیایی ضرورت دارد. از آنجائی‌که محموله های بذری کلزا به صورت ضدعفونی شده و یا پوشش دار عرضه می‌شوند، ممکن است مواد پوششی بذر با محلول KOH واکنش نشان دهد و نتایج کاذب حاصل شود. بنابراین علاوه براینکه در آزمون شیمیایی وجود هاله رنگی در پیرامون بذور کافی نیست و شدت تشعشع نیز باید در نظر گرفته شود. علارغم اینکه شدت تشعشع سایر بذور با بذر خردل وحشی شاهد باید تنظیم گردد، محدودیت خصوصیات ریخت‌شناسی و نزدیک بودن حالت‌های تظاهر صفات مرتبط با بذر در خردل وحشی و کلزا و عواملی مانند پوشش‌دار بودن بذر و ایجاد محدودیت با تیمار شیمیایی شناسایی خردل وحشی از توده‌های بذری کلزا مطابق استانداردهای بین‌المللی آزمون بذر امکانپذیر نخواهد بود، در چنین مواردی ابزارهای مولکولی مبتنی بر DNA نتایج قابل اطمینان و قطعی ارائه خواهند نمود.

## منابع

## Reference


**Agrawal, R.L., and A. Pawar. 1990.** Identification of soybean varieties based on seed and seedling characteristics. Seed Res. 18:77-81.

**Allen, L. M. 1917.** The chloral hydrate test for *Brassica arvensis*. Proceedings of the Association of Official Seed Analysts of North America. 9: 29-30.

**SPCRI. 2016.** National standard for rapeseed production. Seed and Plant Certification and Registration Institute (SPCRI). [Online] Available at https://spcri.ir/dorsapax/userfiles/file/m.fani/kolza.pdf.

**ISTA. 2021.** International rules for seed testing. International Seed Testing Association (ISTA). Zurich, Switzerland.

**ISTA. 2021.** ISTA List of Stabilised Plant Names. The International Seed Testing Association (ISTA) Zurich, Switzerland.

**Baxter, D., and L.O. Copeland. 2008.** Seed Purity and Taxonomy. Michigan State University Press, East Lansing, Michigan, U.S.

**Chèvre, A.M., P. Barret, F. Eber, P. Dupuy, H. Brun, X. Tanguy, and M. Renard. 1997.** Selection of stable *Brassica napus-B. juncea* recombinant lines resistant to blackleg (*Leptoshaeria maculans*).1. Identification of molecular markers, chromosomal and genomic origin of the introgression. Theor. Appl. Genet. 95:1104-1111.

**Cheng, F., W. Jian, and W. Xiaowu. 2014.** Genome triplication drove the diversification of Brassica plants. Hortic. Res. 1: 14024. Doi: 10.1038/hortres.2014.24.

**Flannery, M., F. Mitchell, S. Coyne, T. Kavanagh, J. Burke, N. Salamin, P. Dowding, and T. Hodkinson. 2006.** Plastid genome characterization in Brassica and Brassicaceae using a new set of nine SSRs. Theor. Appl. Genet. 113(7): 1221-1231.

**Ghadami, N. 2010.** Agricultural and breeding (Canola). (Planting, Had, Harvest) Agricultural education and promotion publications, Tehran, Iran. (In Persian)

**Himanshu, Rai., O. Hamid Peerzada, O.S. Dahiya, and S.S. Jakhar. 2018.** Varietal Identification Based on Chemical Methods in Different Varieties of Indian Mustard (*Brassica juncea* L.) (Czern. & Coss.). Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. 7 (5): xx-xx. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.705.xx

**Holm, L., J. Doll, E. Holm, J. Poncho, J. Herberger. 1997.** World Weeds. Natural Histories and Distribution. John Wiley and Sons, Inc., USA.

**Hosaka, K., S.F. Kianian, J.M. McGrath, and C.F. Quiros. 1990.** Development and chromosomal localization of genome-specific DNA markers of Brassica and the evolution of amphidiploids and n=9 diploid species. Genome. 33: 131-142.

**Jamali, H., L. Sadeghi, L., and M. Najafian. 2017.** A Multiplex PCR assay for Discriminating Charlock from Rapeseed: Implications for Seed Testing. Biol. Forum – Int. J. 9 (2): 87-91.

**Koh, J.C.O., D.M. Barbulescu, S. Norton, B. Redden, Ph. A. Salisbury, S. Kaur, N. Cogan, and A.T. Slater. 2017.** A multiplex PCR for rapid identification of Brassica species in the triangle of U. Plant Methods.13:49. Doi: 10.1186/s13007-017-0200-8.

La Mura, M., C. Norris, S. Sporle, D. Jaya weera, A. Greenland, and D. Lee. 2010. Development of genome-specific 5S rDNA markers in Brassica and related species for hybrid testing. Genome. 53(8): 643-649.

**Liu, J., D. Mei, Y. Li, S. Huang, and Q. Hu. 2014.** Deep RNA-Seq to unlock the gene bank of floral development in Sinapis arvensis. Plos one 9(9): e105775.

**Liu, J., R. Xiang, W. Wang, D. Mei, Y. Li, A.S. Mason, L. Fu, and Q. Hu. 2015.** Cytological and molecular analysis of Nsa CMS in Brassica napus L. Euphytica. 206 (2): 279-286.

**Mennan, H. 2003.** Economic Thresholds of *Sinapis arvensis* (Wild Mustard) in Winter Wheat Fields. J. Agron, 2: 34-39. Doi: 10.3923/ja.2003.34.39.

**Nagendra, M.S., P. Selvaraju, R. Jerlin, K. Ganesamurthy, and N. Senthil. 2020.** Identification and characterization of popular rice (Oryza sativa L.) varieties through chemical tests. Journal of Phytology.12: 82-85. Doi: 10.25081/jp. 2020.v12.6513.

**Quiros, CF., J. Hu, P. This, A.M. Chèvre, and M. Delseny. 1991.** Development and chromosomal localization of genome-specific markers by polymerase chain reaction in Brassica. Theor. Appl. Genet. 82: 627-632.

**Rashed Mohasel, M. 2001.** Cereal production, Jehad-e-university- Ferdosi University of Mashhad, Iran. (In Persian)

**Rieger, M. A., C. Preston, and S.B. Powles. 1999.** Risks of gene flow from transgenic herbicide-resistant canola (*Brassica napus*) to weedy relatives in southern Australian cropping systems. Aust J. Agric. Res 50: 115-128.

**Schelfhout, C., R. Snowdon, W. Cowling,W., Wroth, J. 2004.** A PCR based B-genome-specific marker in Brassica species. Theor Appl Genet. 109(5): 917-921.

**Snowdon, R., H. Winter, A. Diestel, and M. Sacristan. 2000.** Development and characterization of *Brassica napus-Sinapis arvensis* addition lines exhibiting resistance to *Leptosphaeria maculans*. Theor. Appl. Genet. 101(7): 1008- 1014.

**Somers, D. J., and G. Demmon. 2002.** Identification of repetitive, genome-specific probes in crucifer oilseed species. Genome. 45: 485–492.

**Song, K. M., T.C. Osborn, and P.H. Williams. 1988.** Brassica taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) 1. Genome evolution of diploid and amphidiploids species. Theor. Appl. Genet. 75: 784-794.

**Truco, M.J. J. Hu, J. Sadowski, and C.F. Quiros. 1996.** Inter- and intragenomic homology of the Brassica genomes: implications for their origin and evolution. Theor. Appl. Genet. 93: 1225-1233.

**Van der Burg, W.J., and G. Vierbergeen. 1979.** Distinguishing Sinapis arvensis from *Brassica napus* and *B. rapa* (*B. compestris*). Seed Sci. Technol.7: 567.

**Vishwanath, K., H.M. Pallavi, N. Nethra, and S. Rajendra Prasad. 2013.** Chemical tests for identification and characterization of tomato cultivars. Plant breeding and seed science. 68: 3-13. Doi: 10.2478/v10129-011-0076-0.

**Warwick, S. I., H.J. Beckie, A.G. Thomas, and T. McDonald. 2000.** The biology of Canadian weeds. 8 *Sinapis arvensis* L. (Updated). Can. J. Plant Sci. 80: 939–961.

**Yan, M., X. Liu, C. Guan, L. Liu, J. Xiang, Y. Lu, and Z. Liu. 2014.** Cloning of *TTG1* gene and PCR identification of genomes A, B and C in Brassica species. Genetica. 142(2): 169-176.