مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۴، شماره ۳، سال ۱۳۸۲ (۶۳۳-۶۲۵)

مطالعه تنوع ژنتیکی سویا از طریق تجزیه و تحلیل RAPD و DAF

علی‌اکبر شاه‌نجات بوشهری
استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران
تاریخ پذیرش مقاله ۸۱/۸/۸

خلاصه

با توجه به مزایای فراوان نشانگرهای مولکولی، ژنوتیپ‌سنجی بر مبنای این نشانگرها امروزه کاملا متداول و برای تشخیص چند شکلی ابزارهای متنوعی در اختیار می‌باشد. هدف از این تحقیق، مقایسه روش‌های RAPD و DAF در تخمین فاصله ژنتیکی ارقام سویا بود که در آن آغازگرهای متعددی از هر یک از نشانگرها استفاده گردید. نوارهای رنگ‌آمیزی شده بر روی ژل‌ها از نظر حضور و عدم حضور مطالعه و روابط ارقام با روش ضرایب تطابق ساده مورد بررسی واقع شد. رابطه ارقام در روش DAF (۷۰٤ / الی ۰/۸۹۹) نسبت به RAPD (۰/٥٦۱ الی ۰/۸٥٤) بالاتر برآورد گردید و مکان‌های ژنی بسیار زیادتری در DAF آشکار گشت. داده‌های حاصل از روش DAF و داده‌های توام حاصل از دو روش به نحو مطلوب‌تری ارقام را دسته‌بندی کردند، به طوری که ارقام ایرانی بالاترین شباهت را با هم نشان دادند. روش DAF تفاوت چندانی از نظر هزینه با RAPD ندارد و ضمن داشتن مزایایی مانند سهولت آن فارغ از معایب ذاتی RAPD است. دقت، وضوح بسیار بالا و محتوای اطلاعاتی کافی در این آزمایش استفاده از این روش را توصیه و کاملا توجیه می‌نماید. نتیجه مشترکی که از دو روش به دست آمد آن است که تشابه ارقام بالا بوده و از تنوع ژنتیکی قابل ملاحظه‌ای برخوردار نیستند.

واژه‌های کلیدی: سویا، نشانگرهای DNA، تنوع ژنتیکی، DAF و RAPD.

مقدمه

فناوری‌های جدید مولکولی موجب گردیده است که دامنه ارزیابی چند شکلی برای اهدافی مانند نقشه‌های ژنتیکی، اصلاح نباتات مبتنی بر نشانگرها، انگشت نگاری ژنومی و تشخیص روابط ژنتیکی گسترش پیدا نماید. این فناوری‌ها در برگیرنده فنونی نظیر RFLP [1]، RAPD [2]، SSR [3] و DAF [4] می‌باشد که چند شکلی را از طریق ارزیابی توالی‌های DNA کل ژنومی آشکار می‌سازد. در طبیعت DNA موجودات را می‌توان حداقل با یک آغازگر تکثیر و با بررسی الگوهای به دست آمده به اثرنگاری و گروه‌بندی آنها پرداخت. روشهای کاوش ژنوم متعدد و چند منظوره هستند و راندمان تکثیر DNA در آنها متفاوت است، بنابراین هر یک نیازهای خاصی را برآورده می‌سازد. در دهه گذشته از فناوری‌های مبتنی بر آغازگرهای اختیاری نظیر DAF و RAPD به طور گسترده‌ای برای شناسایی ژنوتیپ‌ها و تحقیق در روابط ژنتیکی به کار رفت، که اساس آنها استفاده از یک آغازگر اختیاری برای تکثیر قطعات مختلف DNAاست(۷).

مقایسه همزمان فنون مولکولی مختلف در تحقیقات زیادی صورت پذیرفته است. پاول و همکاران (۱۹۹۶) با بررسی چهار روش RFLP، RAPD،AFLP و SSR در ژنوم ۱۲ رقم سویا به ارزیابی خصوصیات این نشانگرها پرداختند. دلدی و همکاران (۱۹۹۷) با استفاده از نشانگرهای RAPD و SSR تنوع ژنتیکی ۱۸ ژنوتیپ سویا را بررسی نموده و نتیجه گرفتند که در صورت عدم اطلاع از شجره ارقام به کارگیری تعداد معدودی نشانگر از انواع مذکور، ابزار مطمئن و مفیدی برای ارزیابی است. پرابو و همکاران (۱۹۹۷) از طریق مطالعه روابط ژنتیکی ۱۰ ژنوتیپ سویا با فنون DAF و RFLP و شجره‌ای گزارش کردند که هر

1 . Restriction Fragment Lenghth Polymorphism
2 . Random Amplyfied Polymorphic DNA
3 . Simple Sequence Repeat
4 . DNA amplification Fingerprinting

سه روش مذکور در خصوص برآورد تنوع ژنتیکی از کارایی لازم برخوردارند. پچیک و همکاران (۱۹۹۸)،۳۳ اینبرد لاین ذرت را با چهار روش RFLP، RAPD، SSR و AFLP مقایسه و گروه‌بندی نمودند. هالدن و همکاران (۱۹۹۴) با ارزیابی نشانگرهای RFLP و RAPD به مقایسه لاین‌های جنس براسیکا پرداختند. لی و فرینر (۱۹۹۳) با نشانگرهای RFLP و RAPD تنوع ژنتیکی در داخل و بین درختان تبریزی را بررسی نمودند.

هدف از این تحقیق بررسی روابط ژنتیکی ارقام سویا با فنون DAF و RAPD و مقایسه داده‌های حاصل از این دو روش بود.

مواد و روشها

مواد گیاهی

از بذر ۲۱ رقم زراعی سویا شامل استیل، هارکور، کلارک، هابیت، هیل، سنچری، سمس، بلاک هاک، بونوس، کالاند، گرگان، هک، سحر، زان، کلمبوی، فار، SRF-450، SRF-450 موتان، ویلیامز، ویلیامز موتان و یونیون در این بررسی استفاده شد.

استخراج و تکثیر DNA

استخراج DNA بر مبنای روش دلاپورتا و همکاران (۱۹۸۳) صورت گرفت. از بین تعداد زیادی آغازگر، تعداد ۸ آغازگر ده نوکلئوتیدی و ۸ آغازگر از آغازگرهای ریزسنجاقی[1] مناسب برای این تحقیق انتخاب شد. حجم واکنش ۲۵ میکرولیتری مورد استفاده عبارت بود از: ۱۴/۸ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش ۱۰ برابر، ۰/۵۷ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی‌مول، ۲ میکرولیتر مخلوط نوکلئوتیدی ۱/۲۵ میلی‌مول، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر ده نوکلئوتیدی (۱۰ میکرومول) و ۰/۵ میکرولیتر آغازگر ریزسنجاقی (۳۰ میکرومول)، ۰/۲ میکرولیتر آنزیم تک پلی‌مراز ۵ واحد / میکرولیتر و ۵ میکرولیتر DNA الگو (۵ نانوگرم). قطعات DNA با سه چرخه مختلف (یک چرخه شامل ۹۴ درجه به مدت ۲ دقیقه، ۴۵ چرخه شامل ۹۲ درجه یک دقیقه، ۳۵ درجه یک دقیقه، ۷۲ درجه ۲ دقیقه و یک چرخه شامل ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه) تکثیر گردید.

قطعات DNA در روش DAF در ژل‌های عمودی (۱۰×۸) سانتی‌متر پلی اکریلامید ۱۰٪ با ضخامت ۰/۴۵ میلی متر که پشت آنها فیلم‌های پلی‌استری بود تکثیر گردید و با روش بسام و همکاران (۱۹۹۱) رنگ‌آمیزی و در دمای اتاق خشک و دایمی گردید. ولتاژ الکتروفورز معادل ۳۰۰ به طور ثابت بود. قطعات DNA در روش RAPD در ژل‌های آگارز ۱/۵٪، بافر TAE و ولتاژ ثابت ۷۰ الکتروفورز گردید. ژل‌ها با ۰/۵ میکروگرم / میلی‌لیتر اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی و پس از قرار گرفتن بر روی نوار فرابنفس (۳۰۲ نانومتر) از آنها عکسبرداری گردید.

تجزیه داده‌ها

رتبه‌بندی داده‌ها به صورت حاضر و غایب (۱ یا ۰) برای هر نوار انجام گرفت و از روش ضرایب تطابق ساده برای محاسبه تشابه بین هر یک از زوج‌های ژنوتیپی استفاده گردید. برای محاسبه ماتریس تشابه بر اساس روش ضرایب تطابق ساده از نرم‌افزار SPSS استفاده و دندروگرام مربوطه ترسیم گردید. روش ادغام گروه‌های UPGMA بود.

نتایج و بحث

در RAPD آغازگرهای انتخاب شده مجموعا ۸۴۴ نوار تولید کردند (شکل ۱) که ۶۷۶ نوار پلی‌مورفیک بودند. تعداد نوار در آغازگر از ۵۸ تا ۱۰۷ متغیر و تغییرات تنوع از ۰/۵۶۱ تا ۰/۸۵۴ (جدول ۱) متفاوت بودند. در روش DAF آغازگرهای انتخاب شده ۱۱۴۰ نوار تولید کردند (شکل ۲). تعداد نوار در آغازگر ۱۰۷ تا ۱۹۴ متغیر بود. درجه تشابه از ۰/۷۰۴ تا ۰/۸۹۹ (جدول ۲) متغیر بود. در بررسی توأم داده‌های حاصل از دو روش مذکور طیف تنوع از ۰/۶۸۸ تا ۰/۸۶۶ (جدول ۳) تفاوت نشان داد.

این تحقیق به منظور بررسی کارآیی فنون مولکولی مختلف در ارزیابی ژنوتیپ‌های سویا انجام گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده در روش DAF تعداد مکان‌های ژنی خیلی بیشتری نسبت به RAPD آشکار گشت. وضوح بسیار بالای DAF علاوه بر آشکار نمودن تعداد واقعی مکان‌های تکثیر شده تکرارپذیری الگوهای نواری را هم به همراه داشت. تفکیک پروضوح و سیستم رنگ‌آمیزی مناسب DNA در آشکار نمودن فرآورده‌هایی با مقیاسی در سطح پیکوگرم امری حیاتی است ک این امر از خصوصیات ذاتی روش DAF می‌باشد. تجزیه‌خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها بر اساس درجه تشابه برآورد خوبی را از روابط ارقام در اختیار قرار می‌دهد. نتایج این تجزیه‌ها در شکل‌های ۳، ۴ و ۵ آمده

1 . miniharipin

جدول ۱- ماتریس تشابه ارقام سویا بر اساس ضرایب تطابق ساده در داده‌های حاصل از RAPD

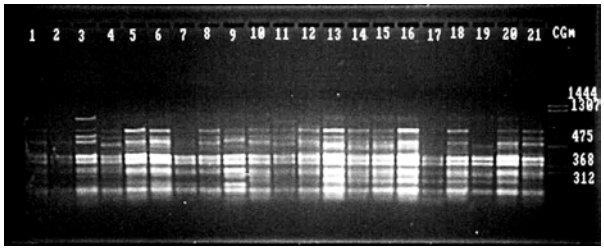
ژنوتیپ	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱٤	۱٥	۱٦	۱۷	۱۸	۱۹	۲۰
استیل(۱)																				
هارکور(۲)	۰/۸٥٤																			
کلارک(۳)	۰/۸٥٤	۰/۸۰٥																		
هابیت(٤)	۰/۸٥٤	۰/۸۲۹	۰/۸٥٤																	
هیل(٥)	۰/۷۲۰	۰/۷۹۳	۰/۷٦۸	۰/۷۹۳																
سنچری(٦)	۰/٦۹٥	۰/٦۹٥	۰/۷٦۸	۰/۷٦۸	۰/۸۰٥															
سمس(۷)	۰/٦۷۱	۰/۷۲۰	۰/٦۷۱	۰/۷۲۰	۰/۷۰۷	۰/۷۳۲														
بلاک‌هاک(۸)	۰/٦۸۳	۰/٦۸۳	۰/۷۳۲	۰/۷۰۷	۰/۷٦۸	۰/۷٤٤	۰/٦۷۱													
بونوس(۹)	۰/۷۲۰	۰/٦۹٥	۰/۷۲۰	۰/٦۹٥	۰/۷۰۷	۰/۷٥٦	۰/٦۳٤	۰/٦۷۱												
کالاند(۱۰)	۰/۷٤٤	۰/٦۹٥	۰/۷٦۸	۰/۷٤٤	۰/٦۸۳	۰/۷٥٦	۰/٦٥۹	۰/٦۷۱	۰/۷۳۲											
گرگان(۱۱)	۰/٦۸۳	/٦۸۳	۰/۷٥٦	۰/۷۳۲	۰/۷٤٤	۰/۸۱۷	۰/۷٦۸	۰/۷٥٦	۰/۷٤٤	۰/۷٤٤										
هاک(۱۲)	۰/۷۲۰	۰/٦۷۱	۰/۷٤٤	۰/۷۲۰	۰/۷٥٦	۰/۷۳۲	۰/۷۰۷	۰/۷۲۰	۰/۷٥٦	۰/۷٥٦	۰/۸۱۷									
سحر(۱۳)	۰/٥٦۱	/٦۱۰	۰/٦٥۹	۰/٦۱۰	۰/٦۷۱	۰/٦٤٦	۰/٦٤٦	۰/٦۳٤	۰/٦۹٥	۰/٥۹۸	۰/۷۳۲	۰/٦۹٥								
زان(۱٤)	۰/٦۷۱	۰/٦٤٦	۰/۷۲۰	۰/٦۷۱	۰/٦۸۳	۰/۷۰۷	۰/٥۸٥	۰/٦۹٥	۰/۸۰٥	۰/۷۰۷	۰/۷۹۳	۰/۷۸۰	۰/۷٦۸							
کلمبوس(۱٥)	۰/٦۹٥	۰/۷۲۰	۰/٦٤٦	۰/٦۷۱	۰/۷۰۷	۰/٦٥۹	۰/٦٥۹	۰/٥۹۸	۰/۷۳۲	۰/٦۸۳	۰/٦۹٥	۰/۷٥٦	۰/٦۹٥	۰/۷۳۲						
فار(۱٦)	۰/٦۸۳	۰/٦٥۹	۰/٦۳٤	۰/٦۸۳	۰/۷٤٤	۰/٦۷۱	۰/٦۲۲	۰/۷۰۷	۰/۷۲۰	۰/٦۲۲	۰/۷۳۲	۰/۷۹۳	۰/۷۰۷	۰/۸۱۷	۰/۷۲۰					
اس.آر.اف(۱۷)	۰/٦۲۲	۰/٦٤٦	۰/٦٤٦	۰/٦٤٦	۰/٦٥۹	۰/٦۱۰	۰/٦۱۰	۰/٦٤٦	۰/٦۸۳	۰/٦۳٤	۰/٦۷۱	۰/٦۸۳	۰/٦۹٥	۰/۷۰۷	۰/۷۰۷	۰/٦۷۱				
اس.آر.آف-م(۱۸)	۰/٦٤٦	۰/٦۷۱	۰/٦۹٥	۰/٦۹٥	۰/۷۳۲	۰/٦۸۳	۰/٦۳٤	۰/٦۷۱	۰/۷٥٦	۰/٦۸۳	۰/۷٤٤	۰/۷۳۲	۰/۷٤٤	۰/۸۰٥	۰/۷۳۲	۰/۷۹۳	۰/٦۸۳			
ویلیامز(۱۹)	۰/٦۷۱	۰/۷۲۰	۰/٦٤٦	۰/۷۲۰	۰/۷۰۷	۰/٦۸۳	۰/٦۸۳	۰/٦٤٦	۰/۷۳۲	۰/٦۳٤	۰/۷٦۸	۰/۷٥٦	۰/۷٤٤	۰/٦۲۹	۰/۷۰۷	۰/۸٤۱	۰/٦٥۹	۰/۷۸۰		
ویلیامز-م(۲۰)	۰/٦۲۲	۰/٦٤٦	۰/٦۷۱	۰/٦۹٥	۰/٦۸۳	۰/٦۸۳	۰/٦۸۳	۰/٦۷۱	۰/۷۳۲	۰/٦۱۰	۰/۷٤٤	۰/٦۸۳	۰/۷٤٤	۰/۷٥٦	۰/٦۳٤	۰/۷٦۸	۰/٦۳٤	۰/۷۰۷	۰/۸۰٥	
یونیون(۲۱)	۰/٦۹٥	۰/۷۲۰	۰/٦۹٥	۰/۷۲۰	۰/۷۰۷	۰/٦٥۹	۰/٦۱۰	۰/۷٤٤	۰/٦۸۳	۰/٦۱۰	۰/۷٤٤	۰/۷۰۷	۰/۷۲۰	۰/۷٥٦	۰/٦۸۳	۰/۷۹۳	۰/۷۳۲	۰/۷٥٦	۰/۷۸۰	۰/٦۸۳

جدول ۲- ماتریس تشابه ارقام سویا بر اساس ضرایب تطابق ساده در داده‌های حاصل از DAF

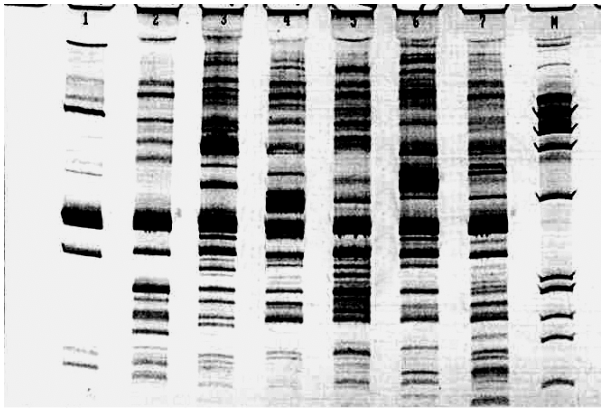
ژنوتیپ	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱٤	۱٥	۱٦	۱۷	۱۸	۱۹	۲۰
استیل(۱)																				
هارکور(۲)	۰/۷٦۲																			
کلارک(۳)	۰/۷٦۷	۰/۸۰۸																		
هابیت(٤)	۰/۷۸۷	۰/۸۰۸	۰/۸٤۳																	
هیل(٥)	۰/۷۷۷	۰/۸٤۳	۰/۸٤۳	۰/۸٤۸																
سنچری(٦)	۰/۷٥۹	۰/۸۰٥	۰/۸۲۰	۰/۸٤٦	۰/۸٤۱															
سمس(۷)	۰/۷٥۹	۰/۸۱۰	۰/۸۰٥	۰/۸٤۱	۰/۸۳۰	۰/۸٤۸														
بلاک‌هاک(۸)	۰/۷۱٦	۰/۷٥۷	۰/۷۳۷	۰/۷٤۲	۰/۷٥۲	۰/۷۲٤	۰/۷٦٥													
بونوس(۹)	۰/۷۱٦	۰/۷٥۲	۰/۷٥۲	۰/۷٤۲	۰/۷٦۲	۰/۷٤۹	۰/۷٥٤	۰/۸۲۳												
کالاند(۱۰)	۰/۷۱۹	۰/۷٤۹	۰/۷۲۹	۰/۷۲۹	۰/۷٥۹	۰/۷۲۷	۰/۷٤۲	۰/۸۰۰	۰/۸۳٥											
گرگان(۱۱)	۰/۷٥۹	۰/۷٥۸	۰/۷٥٤	۰/۷٦٥	۰/۸۰۰	۰/۷٦۲	۰/۷۸۷	۰/۸۱٥	۰/۸٤٦	۰/۸۲۳										
هاک(۱۲)	۰/۷۱۹	۰/۷۷۰	۰/۷٤۹	۰/۷۳۹	۰/۷۷٥	۰/۷٥۷	۰/۷٦۲	۰/۸۰۰	۰/۸٤٦	۰/۸۳۳	۰/۸٤۸									
سحر(۱۳)	۰/۷۷٥	۰/۸۱۰	۰/۷۸٥	۰/۷۷٥	۰/۸۰۰	۰/۷۷۷	۰/۷۸۷	۰/۸۲۰	۰/۸٤٦	۰/۸٤۸	۰/۸۹۹	۰/۸۷۸								
زان(۱٤)	۰/۷٥۲	۰/۷۹۷	۰/۷٦۷	۰/۷٦۷	۰/۷۹۲	۰/۷٥۹	۰/۷۸۰	۰/۷۹۷	۰/۸۳۳	۰/۸۱٥	۰/۸۷۱	۰/۸٥٦	۰/۸۸۱							
کلمبوس(۱٥)	۰/۷۲۹	۰/۷۳٤	۰/۷۳٤	۰/۷٤۹	۰/۷۳۹	۰/۷۲۲	۰/۷٤۲	۰/۷٤٤	۰/۷٥٤	۰/۷۱٦	۰/۷٥۷	۰/۷۳۲	۰/۷٥۷	۰/۷٥۹						
فار(۱٦)	۰/۷۲۲	۰/۷٥۷	۰/۷۳۲	۰/۷٤۲	۰/۷٤۷	۰/۷۳٤	۰/۷٤٤	۰/۷٥۲	۰/۷٥۲	۰/۷٤٤	۰/۷۷٥	۰/۷٦٥	۰/۷۸۰	۰/۷۸۲	۰/۸۱٥					
اس.آر.اف(۱۷)	۰/۷۳۲	۰/۷۷۲	۰/۷٤۷	۰/۷٦۲	۰/۷٦۲	۰/۷٥٤	۰/۷٦٥	۰/۷٥۷	۰/۷٥۲	۰/۷٤٤	۰/۷۸٥	۰/۷٥٤	۰/۷۸٥	۰/۷۸۲	۰/۸۱۰	۰/۸۳۸				
اس.آر.آف-م(۱۸)	۰/۷٥۲	۰/۷۸۷	۰/۷٦۷	۰/۷۷۷	۰/۷۸۲	۰/۷٦٥	۰/۷۷٥	۰/۷۷۲	۰/۷۸۲	۰/۷٤۹	۰/۷۹۰	۰/۷٦٥	۰/۸۰۰	۰/۸۰۳	۰/۸۲۰	۰/۸۰۸	۰/۸٦۳			
ویلیامز(۱۹)	۰/۷۳٤	۰/۷۷۰	۰/۷٤۹	/۷۷۰	۰/۷۷۰	۰/۷٤۷	۰/۷۸۲	۰/۷٤۹	۰/۷٥٤	۰/۷۲۷	۰/۷۷۲	۰/۷٤۷	۰/۷۸۲	۰/۷۸۰	۰/۸۲۳	۰/۸۱۰	۰/۸٦۱	۰/۸۷۱		
ویلیامز-م(۲۰)	۰/۷۱۱	۰/۷٦۲	۰/۷۳۷	۰/۷٥۲	۰/۷٦۲	۰/۷۲۹	۰/۷٥۹	۰/۷٥۲	۰/۷٦۲	۰/۷٥٤	۰/۷٦٥	۰/۷٤۹	۰/۷۷۰	۰/۷۷۲	۰/۸۰٥	۰/۸۳۳	۰/۸٦۸	۰/۸٤۳	۰/۸٥٦	
یونیون(۲۱)	۰/۷۰٤	۰/۷٤٤	۰/۷۲٤	۰/۷۲۹	۰/۷٤٤	۰/۷۱٦	۰/۷۳۲	۰/۷۲٤	۰/۷٤۹	۰/۷۱٦	۰/۷٥۷	۰/۷٤۲	۰/۷٥۷	۰/۷٦٥	۰/۸۲۳	۰/۸۱٥	۰/۸۲۰	۰/۸۳۰	۰/۸۳۳	۰/۸٥۱

جدول ۳- ماتریس تشابه ارقام سویا بر اساس ضرایب تطابق ساده در داده‌های حاصل از RAPD و DAF

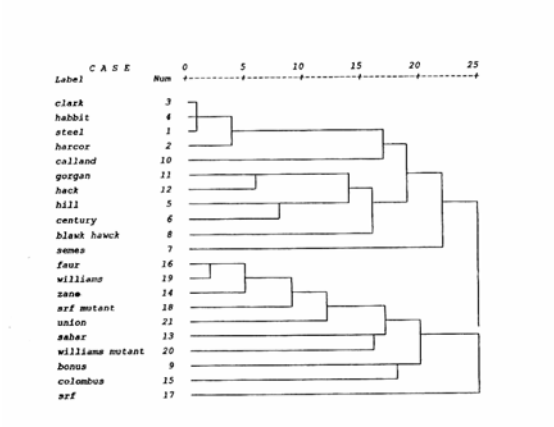
ژنوتیپ	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱٤	۱٥	۱٦	۱۷	۱۸	۱۹	۲۰
استیل(۱)																				
هارکور(۲)	۰/۷۷۲																			
کلارک(۳)	۰/۷۷٦	۰/۸۰۲																		
هابیت(٤)	۰/۷۹۳	۰/۸۰٦	۰/۸٤۱																	
هیل(٥)	۰/۷٦۱	۰/۸۳۰	۰/۸۲٥	۰/۸۳٤																
سنچری(٦)	۰/۷٤۱	۰/۷۸۰	۰/۸۰٦	۰/۸۲۸	۰/۸۳۰															
سمس(۷)	۰/۷۳۷	۰/۷۸۹	۰/۷۷٦	۰/۸۱٥	۰/۸۰٤	۰/۸۲۳														
بلاک‌هاک(۸)	۰/۷۰۳	۰/۷۳۷	۰/۷۲۸	۰/۷۲۸	۰/۷٤۸	۰/۷۲۰	۰/۷٤۱													
بونوس(۹)	۰/۷۰۹	۰/۷۳٥	۰/۷۳۹	۰/۷۲٦	۰/۷٤٦	۰/۷٤٤	۰/۷۲٦	۰/۷۹۱												
کالاند(۱۰)	۰/۷۱٦	۰/۷۳۳	۰/۷۲۸	۰/۷۲٤	۰/۷۳۹	۰/۷۲٤	۰/۷۲۰	۰/۷۷۲	۰/۸۱۳											
گرگان(۱۱)	۰/۷۳۹	۰/۷٦۱	۰/۷٤۸	۰/۷٥۲	۰/۷۸٤	۰/۷٥٦	۰/۷۷۸	۰/۸۰۰	۰/۸۲۳	۰/۸۰٤										
هاک(۱۲)	۰/۷۱۱	۰/۷٤٦	۰/۷٤۱	۰/۷۲۸	۰/۷٦٥	۰/۷٤٦	۰/۷٤٦	۰/۷۸۰	۰/۸۲٥	۰/۸۱٥	۰/۸۳۸									
سحر(۱۳)	۰/۷۳۱	۰/۷٦۹	۰/۷٥٦	۰/۷۳۹	۰/۷۷۲	۰/۷٤۸	۰/۷٥٦	۰/۷۸۲	۰/۸۱٥	۰/۸۰۰	۰/۸٦٦	۰/۸٤۳								
زان(۱٤)	۰/۷۳۱	۰/۷٦٥	۰/۷٥۲	۰/۷٤٤	۰/۷٦۷	۰/۷٤٤	۰/۷۳۹	۰/۷۷٤	۰/۸۲۳	۰/۷۹۱	۰/۸٥۳	۰/۸۳۸	۰/۸٥۸							
کلمبوس(۱٥)	۰/۷۱٦	۰/۷۲٤	۰/۷۱۱	۰/۷۲۸	۰/۷۲٦	۰/۷۰۳	۰/۷۲۰	۰/۷۱۱	۰/۷٤٤	۰/۷۰۳	۰/۷۳۹	۰/۷۲۸	۰/۷۳۹	۰/۷٤۸						
فار(۱٦)	۰/۷۰۷	۰/۷۳۳	۰/۷۰۷	۰/۷۲٤	۰/۷۳۹	۰/۷۱٦	۰/۷۱٦	۰/۷۳۷	۰/۷۳۹	۰/۷۱٦	۰/۷٦۱	۰/۷٦۳	۰/۷٦۱	۰/۷۸۲	۰/۷۹۳					
اس.آر.اف(۱۷)	۰/۷۰٥	۰/۷٤٤	۰/۷۲۲	۰/۷۳٥	۰/۷۳۷	۰/۷۲۲	۰/۷۳۱	۰/۷۳۱	۰/۷۳۳	۰/۷۱۸	۰/۷٥۹	۰/۷۳٥	۰/۷٦۳	۰/۷٦۳	۰/۷۸۷	۰/۸۰٤				
اس.آر.آف-م(۱۸)	۰/۷۲٦	۰/۷٦۱	۰/۷٤۸	۰/۷٥٦	۰/۷٦۷	۰/۷٤٤	۰/۷٤٤	۰/۷٤۸	۰/۷۷۲	۰/۷۳۱	۰/۷۷٦	۰/۷٥۲	۰/۷۸٤	۰/۷۹۷	۰/۸۰۰	۰/۸۰۰	۰/۸۲۸			
ویلیامز(۱۹)	۰/۷۱٦	۰/۷٥٤	۰/۷۲٤	۰/۷٥٤	۰/۷٥۲	۰/۷۲۸	۰/۷٥۹	۰/۷۲٤	۰/۷٤٤	۰/۷۰۳	۰/۷٦٥	۰/۷٤۱	۰/۷٦۹	۰/۷۸۲	۰/۷۹۷	۰/۸۱۰	۰/۸۲۱	۰/۸٥۱		
ویلیامز-م(۲۰)	۰/٦۸۸	۰/۷۳٥	۰/۷۱۸	۰/۷۳٥	۰/۷٤۱	۰/۷۱۳	۰/۷۳۹	۰/۷۳۱	۰/۷٥۰	۰/۷۲۲	۰/۷٥٤	۰/۷۳۱	۰/۷٥۹	۰/۷٦۳	۰/۷٦۹	۰/۸۱۷	۰/۸۲۳	۰/۸۱٥	۰/۸٤۳	
یونیون(۲۱)	۰/٦۹٤	۰/۷۳۳	۰/۷۱۱	/۷۲۰	۰/۷۳۱	۰/٦۹۸	۰/۷۰۳	۰/۷۲۰	۰/۷۳۱	۰/٦۹۰	۰/۷٤۸	۰/۷۲۸	۰/۷٤٤	۰/۷٥٦	۰/۷۹۳	۰/۸۰٦	۰/۸۰۰	۰/۸۱۳	۰/۸۱۹	۰/۸۱۷



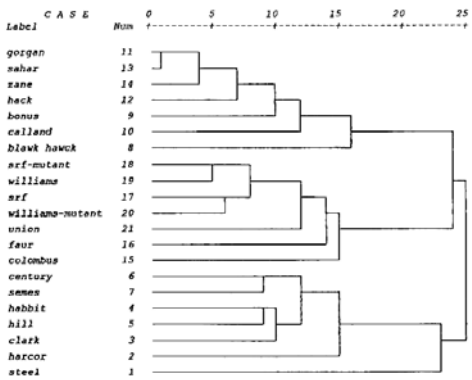
شکل ۱- نمونه‌ای از ژل RAPD با آغازگر نوکلئوتیدی UBC82



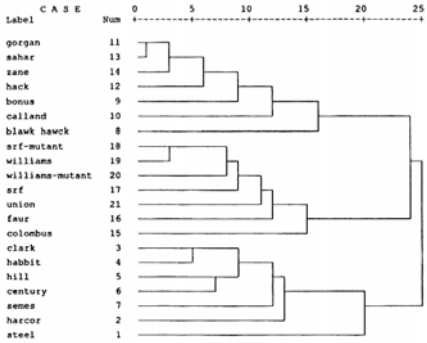
شکل ۲- نمونه‌ای از ژلDAF با اغازگرریز سنجاقی B7



شکل ۳- دندوگرام ۲۱ رقم سویا بر اساس نشانگرهای RAPD



شکل ۴- دندوگرام ۲۱ رقم سویا بر اساس نشانگرهای DAF



شکل ۵- دندوگرام ۲۱ رقم سویا بر اساس دو نشانگرRAPD وDAF

است. با بررسی کلاسترها در تجزیه RAPD بیشترین شباهت را ارقام استیل با هابیت و کلارک (۰/۸۵۴) با هم نشان می‌دهند. در صورتی که در تجزیه کلاستر با روش DAF بالاترین شباهت را ارقام ایرانی سحر و گرگان (۰/۸۹۹) با هم نشان می‌دهند. این نتیجه در تجزیه داده‌های توأم دو روش به کار رفته در این آزمایش با بالاترین میزان (۰/۸۶۶) مجددا تایید شده است. حداقل رابطه خویشاوندی در روش DAF بین استیل و یونیون (۰/۷۰۴) است که تقریبا این حداقل رابطه در تجزیه توام داده‌های هر دو روش (۰/۶۹۴) نیز کاملا مشهود است. همان طور که از شکل‌های ۴ و ۵ پیداست داده‌های حاصل از روش DAF داده‌های توام دو روش ارقام را به نحو مطلوب‌تری دسته‌بندی کرده‌اند. در هر دو دندروگرام سه گروه مشخص قابل رؤیت است. در کلاستر اول ارقام ایرانی سحر و گرگان، هک، زان، بونوس، کالاند و بلاک‌هاک واقع هستند. کلاستر دوم در بر گیرنده رقم ویلیامز و موتان آن، SRF و موتان آن، و ارقام یونیون، فار و کلمبوس و در کلاستر سوم سنچری، سمس، کلارک، هابیت، هیل، هارکور و استیل قرار دارند. نتیجه مشترکی که از دو روش به دست آمد آن است که تشابه ارقام بالا بوده و تنوع قابل ملاحظه‌ای در بین آنها وجود ندارد.

ابزارهای ژنتیی مولکولی، تجزیه و تحلیل‌های گیاهی را غنای خاصی بخشیده است. روش‌هایی که DNA را بر اساس آغازگرهای اختیاری (DAF و RAPD) تکثیر می‌کنند کارآیی PCR را در تجزیه و تحلیل عملی ژنوم‌ها توسعه داده است. DAF با توجه به اینکه از آغازگرهای کوتاه‌تری استفاده می‌کند و در ژل آن اوره به کار می‌رود و رنگ آمیزی آن با نیترات نقره

است و همچنین بر خلاف RAPD در آن نسبت غلظت مولاری آغازگر/ الگو در واکنش بالا است، با تولید تعداد زیادی نشانگر عملا تعداد نامحدودی مکان ژنی را آشکار می‌کند. الگوهای نواری DAF کاملا مطمئن و فارغ از تولید نوارهای غیر واقعی است. در پژوهشها، آغازگرهای ریزسنجاقی به نحو مؤثری در انگشت نگاری قطعات کوچک نظیر فرآورده‌های PCR (۱-۰/۲ کیلوباز)، پلاسمیدها (۵-۲ کیلوباز) و انگشت نگاری‌های حاصل از تکثیرهای انتخابی DNA (۲۰-۱۵ کیلوباز) و قطعات ژنومی کلون شده (۲۵۰-۵۰ کیلوباز) به کار رفته است (۲، ۴، ۱۰، ۱۵، ۱۶). آغازگرهای ریز سنجاقی و ۱۰ نوکلئوتیدی با موفقیت در تشخیص چند شکلی گیاهان گوناگون مانند سنتیپدگراس (۱۷)، برموداگراس (۳) و سویا (۶) به کار رفته است. گاهی اوقات لازم است که توان تشخیص موجودات در سطوح مختلف تاکسونومی (مثلا گونه یا زیرگونه) افزایش و یا کاهش یابد که در این راستا معمولا از روشهای مختلف مولکولی با توان‌های متفاوت استفاده می‌شود.

در مجموع می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که به کارگیری مکانیسم‌های متعدد در بررسی پلی‌مورفیسم درک بهتری را از ارتباط ژنومی ژنوتیپ‌ها در اختیار قرار می‌دهد. روش DAF تفاوت چندانی از نظر هزینه با RAPD ندارد و ضمن داشتن مزایایی مانند سهولت آن فارغ از معایب ذاتی RAPD است. روش RAPD به نحو بارزی تحت تنوعات محیطی است به طوری که محققین را به سمت استفاده از فنون دیگر سوق داده است. عدم نیاز به مواد رادیواکتیو و دانستن اطلاعات قبلی در مورد توالی‌های DNA، دسترسی به محتوای اطلاعاتی بسیار بالا، تکرارپذیری و وضوح زیاد در روش DAF، استفاده از این روش را توصیه و کاملا توجیه می‌کند.

سپاسگزاری

این پژوهش مستخرج از طرح مطالعه تنوع ژنتیکی سویا از طریق تجزیه و تحلیل RAPD و DAF به شماره ۷/۵/۳/۵۰۹ می‌باشد که با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تهران انجام شده و بدینوسیله قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Bassam , B. J., G. Caetano – Anoles, and P. Gressoff. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in Polyacrylamide gel. Anal. Biochem. 196: 80-83.
2. Caetano – Anolles, G., and P. M. gresshoff. 1994. DNA amplification fingerprinting using mini hairpin oligonucleotide primers. Bio/technology 12: 1011-1026.
3. Caetano – Anolles, G., L. M. Callahan, and P. E. Williams. 1995 DNA amplification fingerprinting analysis of bermudagrass (Cynodon): Genetic relationships between species and interspecific crosses. Theor. Appl. Genet. 91: 228-235.
4. Caetano – Anolles, G. 1999. High genome wide mutation rates in vegetatively propagated bermudagrass. Molecular biology 8: 1211-1224.
5. Dellaporta, S. L., J. Wood, and J. B. Hicks. 1983. A plant DNA minipreparation: version II Plant Mol. Biol. Rep 1: 19-21.
6. Doldi, M. L., J. Volmann, and T. Lelly. 1997. Genetic diversity in soybean as determined by RAPD and microsatellite analysis. Plant Breeding 116: 331-335.
7. Gresshoff, P. M. 1994. Plant genome analysis. CRC Press Inc.
8. Hallden, C., N. O., Nilisson, I. M., Rading, and T. Saell. 1994. Evaluation of RFLP and RAPD markers in comparison of Brassica napus breeding lines. Theor. Apple. Genet. 88: 123-128.
9. Henry, R. J. 2001. Plant genotyping, The DNA fingerprinting of plants. CABI publishing.
10. Kolchinsky, A. M., R. P. Funke, and P. m. Gresshoff. 1993. DAF- amplified fragments can be used as marker for DNA from pulse field gels. Biotechniques 14: 400-403.
11. Li, Z., and G. R. Furnier. 1993. Comparison of allozyme, RFLP, and RAPD markers for revealing genetic variation within and between trembling aspen and bigtooth aspen. Theor. Appl. Genet 87: 97-105.

12. Pejic, I. P. Ajmone – Marsan, M. Morgante, V. Kozumplick, P. Castiglioni, G. Taramino & M. Motto. 1998. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSR, and AFLPs. Theor. Appl. Genet. 97: 1248-1255.
13. Powell, W., M. Morgante, C. H. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey and A. Rafalski. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsattellite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding 2: 225-238.
14. Prabhu, R. R., D. Webb, H. Jessen, S. L. Smith, and P. M. Gresshoff. 1997. Genetic relatedness of soybean genotypes using DNA amplification fingerprinting (DAF), RFLP, and pedigree. Crop Sci., 37: 1590-1595.
15. Starma, T. W., and S. Abbitt. 1997. Evaluating genetic relationships of geranium using arbitrary signatures from amplification profiles. Hot. Science 32: 1288-1291.
16. Trigaiano, R. N., M. C. Scott. And G. Caetan- Anolles. 1998. Genetic signatures from amplification profiles characterize DNA mutation in somatic and radiation – induced sports of chrysanthemum. Journal of the American Society of Horticultural science 123: 642-646.
17. Weaver, K. R., L. M. Callahan, G. Caetano, and P. M. Gresshoff. 1995. DNA amplification fingerprinting and hybridization analysis of Centipedgrass. Crop Sci: 35: 881-885.

Genetic Diversity in Soybean as Determined by RAPD and DAF Markers

A. A. SHAHNEJAT BUSHEHRY
Assistant Professor, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran
Accepted Oct., 30, 2002

SUMMARY

Given numerous molecular marker advantages, at present, marker–based genotyping has been extensively adoped by plant breeders. In this study, using DAF and RAPD technology, relationships of several soybean cultivars were evaluated through simple matching Coefficients. Similarity of cultivars in DAF method (0.704-0.899) was higher than in RAPD (0.561-0.854). Cultivars were better classified by both DAF and combined data (DAF and RAPD), so that Iranian cultivars of the highest relationship occupied the same group. DAF technology allowed studying of soybean genomic DNA with greater resolution, more informative content and free from inherent disadvantages in RAPD.

Key words: Soybean, DNA markers, Genetic variation, DAF & RAPD.