

بررسی روابط ژنتیکی ارقام مختلف سویا با نشانگرهای DAF

علی اکبر شاه‌نجات‌بوشهری، بهمن یزدی‌صمدی و سیروس عبدالمیشانی
به ترتیب استادیار و استادان گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

تاریخ پذیرش مقاله ۷۹/۱/۳۱

خلاصه

روش DAF با استفاده از آغازگرهای چند نوکلئوتیدی می‌تواند ارقام را از یکدیگر متمایز و روابط بین ژنوتیپ‌های کاملاً نزدیک را مشخص نماید. در این تحقیق بر اساس بکارگیری نشانگرهای DAF، میزان خویشاوندی ۲۱ رقم سویا مورد بررسی قرار گرفت. نوارهای ظاهر شده بر روی ژل‌ها از نظر حضور و عدم حضور، بررسی و با تشکیل ماتریس دو دویی، روابط بین ارقام توسط ضرایب تطابق ساده مورد سنجش قرار گرفت. از طریق ادغام بر حسب متوسط گروه، ارقام در دو دسته با ضرایب تشابه متنوعی از ۰/۶۹۳ تا ۰/۸۸۹ دسته‌بندی شدند. این آزمایش نشان داد که رقمهای زراعی تحت بررسی از تنوع ژنتیکی زیادی برخوردار بوده و گسترش پایه ژنتیکی رقمها به وسیله ادغام ژنوتیپ‌های پر عملکرد غریبه، نیازی جدی به شمار می‌رود. همچنین معلوم شد که DAF قادر به ارائه نشانگرهایی است که بخوبی می‌تواند در انگشت نگاری و بررسی میزان نزدیکی ارقام سویا مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: DAF، PCR، نشانگرهای مولکولی، چند شکلی، سویا

مقدمه

شناسایی و بکارگیری ریخته‌های ارثی^۱ متفاوت در اصلاح یک گیاه دارای اهمیت ویژه‌ای است. با برخورداری از توان توصیف ژنتیکی رقمها و یا دودمانهای (لاین‌های) اصلاحی، کارایی حفظ خلوص ژنتیکی، شناسایی دقیق ریخته‌های ارثی و برآورد روابط ژنتیکی به نحو قابل توجهی افزایش می‌یابد. در برنامه‌های اصلاحی از اطلاعاتی که در زمینه روابط ژنتیکی در داخل و بین گونه‌ها وجود دارد، در جهت سازماندهی مجموعه‌ها، شناسایی گروه‌های نامتجانس محصولات و انتخاب والدین تلاقیها استفاده می‌گردد. هم‌اکنون، در این راستا نشانگرهای مولکولی ابزار قدرتمندی را در اختیار متخصصین اصلاح نباتات قرار داده‌اند.

اولین نوع نشانگر مولکولی RFLP^۲ بود که در سویا به کار گرفته شد (۱۳ و ۱۱) ولی به دلیل کمبود بروز چند شکلی در این گیاه از موفقیت بدست آمده در سایر محصولات برخوردار نگردید (۲۲). با بررسیهای گسترده‌ای که بر مبنای این نشانگر صورت گرفته معلوم شده است که میزان چند شکلی در سویا در حد پائینی است (۱۲ و ۱۳). این امر را می‌توان به ماهیت خود گشن بودن و همچنین محدود بودن تنوع در خزانه ژنی مواد اصلاحی منتسب کرد (۱ و ۱۶). در حال حاضر، با پیدایش فناوری آغازگرهای اختیاری نظیر DAF^۳ (۴ و ۲۵) و RAPD^۴ (۲۶) محدودیت شناسایی ژنوتیپ‌ها به منظور برآورد روابط ژنتیکی آنها به طور قابل ملاحظه‌ای مرتفع گردیده است. بر خلاف RFLP، فنون

1. Germplasm

2. Restriction Fragment Length Polymorphism

3. DNA Amplification Fingerprinting

4. Random Amplified polymorphic DNA

غریبه را بررسی کردند. در بررسی دیگری تامسون و همکاران (۲۴) یکی از اهداف تحقیق خود را بر شناسایی قطعات فوق‌العاده چند شکل RAPD برای استفاده همگانی در تجزیه تنوع ژنتیکی سویا پایه‌گذاری کردند. علاوه بر سویا، روش DAF در مطالعه انگشت نگاری علت صد پا^۳ (۲۵)، بررسی روابط گونه‌ها و ارقام در جنس اطلسی^۴ (۸) و مطالعاتی نظیر بررسی منشاء، تأیید ارقام، گواهی بذر و حفاظت رقمی در مرغ^۵ (۵) به کار رفته است.

هدف از این تحقیق بررسی میزان فاصله ژنتیکی رقمهای زراعی سویا و لزوم توجه به گسترش پایه ژنتیکی آنها است.

مواد و روشها

مواد گیاهی: از بذر ۲۱ رقم زراعی شامل استیل^۶، هارکور^۷، کلارک^۸، هابیت^۹، هیل^{۱۰}، سنچری^{۱۱}، سمس^{۱۲}، بلاک‌هاک^{۱۳}، بونوس^{۱۴}، کالاند^{۱۵}، گرگان، هک^{۱۶}، سحر، زان^{۱۷}، کلمبوس^{۱۸}، فار^{۱۹}، SRF-450 جهش یافته، SRF-450، ویلیامز^{۲۰} جهش یافته، ویلیامز و یونیون^{۲۱} در این تحقیق استفاده گردید.

استخراج DNA: استخراج DNA بر مبنای روش دلاپورتا و همکاران (۹) صورت گرفت. حدود ۰/۱۵ گرم از بافت لپه سبز به همراه ۵۰۰ میکرو لیتر از بافر استخراج کننده (تریس^{۲۲} ۱۰۰ میلی مول با pH=۸، EDTA^{۲۳} ۵۰ میلی مول با pH=۸، سدیم کلرید ۵۰۰ میلی مول و SDS^{۲۴} ۱/۲۵ درصد) در یک هاون چینی کوبیده شد. مواد استخراج شده به یک تیوب اپندرف ۱/۵ میلی لیتری منتقل و به مدت ۱۵ دقیقه در حمام ۶۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت. پس از افزودن ۲۰۰ میکرو لیتر از پتاسیم استات ۵ مول به هر تیوب، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای صفر قرار گرفتند. در مرحله بعد، نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه (۱۳۰۰۰ rpm) سانتریفوژ شده و ۶۰۰ میکرو لیتر ایزوپروپانول اضافه گردید. کلاف DNA تشکیل شده در حد فاصل ایزوپروپانول و نمک بوسیله سانتریفوژ رسوب داده شد. پس از شستشو با اتانول ۷۰ درصد و خشک کردن، DNA استخراج شده در ۳۰۰ میکرو لیتر TE^{۲۵} (تریس ۱۰ میلی مول و

آغازگرهای اختیاری مبتنی بر تکثیر آنزیمی قطعات مختلف DNA به وسیله یک آغازگر دلخواه است که نتیجه آن تولید قطعات متعددی از DNA می‌باشد. از این نوع انگشت نگاری در شناسایی ارقام بهره‌گیری می‌شود.

روش DAF مبتنی بر PCR تک آغازگری است که در آن قطعات تکثیر شده DNA بر اساس اندازه در ژل پلی‌اکریل‌امید از هم جدا و توسط رنگ آمیزی با نیترات نقره قابل رؤیت می‌شوند. مزایای روش DAF بر فنون RFLP و RAPD عبارتند از: تفکیک بهتر قطعات تکثیر شده، حساسیت بیشتر در آشکار سازی DNA و ثبت دائمی DNA در ژل‌های خشک شده، به طوری که می‌توان در آینده برای تکثیر مجدد و همسانه سازی از آنها استفاده کرد. روش DAF تعداد زیادی نشانگر ژنتیکی تولید می‌کند زیرا عملاً تعداد نامحدودی مکان ژنی را آشکار می‌کند (۱۱). DAF قادر به کشف تفاوت در بسیاری از موجودات مانند حیوانات، گیاهان و باکتری‌ها می‌باشد. این روش هم چنین موجودات کاملاً نزدیک مانند ایزوله‌های باکتریایی، ارقام گیاهی، رگه‌های ایزوژن، جهشهای خود بخودی یا مصنوعی و افراد انسانی را از هم تمیز می‌دهد (۳).

ارزیابیهای مبتنی بر تکثیر DNA به طور موفقیت آمیزی در بررسی روابط خویشاوندی گونه‌ها و شناسایی ارقام به کار رفته است. دلدی و همکاران (۱۰)، با استفاده از تجزیه و تحلیل RAPD و ریزماهوره‌ها^۱، تنوع ژنتیکی ۱۸ ژنوتیپ انتخابی سویا در یک برنامه اصلاحی را بررسی کردند و نتیجه گرفتند که در صورت عدم اطلاع از شجره ارقام، به کارگیری تعداد معدودی نشانگر RAPD و ریزماهوره‌ها ابزار مطمئن و مفیدی برای ارزیابی است. پرابو و همکاران (۱۸) از طریق مطالعه روابط ژنتیکی ۱۰ ژنوتیپ سویا با فنون DAF و RFLP و شجره‌ای^۲ گزارش کردند که هر سه روش ذکر شده در زمینه برآورد تنوع ژنتیکی از کارایی لازم برخوردارند. تامسون و همکاران (۲۳)، ضمن بررسی ۳۵ ژنوتیپ سویا با آغازگرهای RAPD به دسته‌بندی خوشه‌ای آنها پرداخته و امکان گسترش پایه محدود ژنتیکی ارقام از طریق ادغام ریخته‌های اثری

| | | | | | | |
|--------------------|---------------------------------|----------------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------|
| 1. Microsatellites | 2. Pedigree | 3. Centipedegrass | 4. Petunia | 5. Bermudagrass | 6. Steel | 7. Harcor |
| 8. Clark | 9. Habbit | 10. Hill | 11. Century 84 | 12. Semes | 13. Black Hawck | 14. Bonus |
| 15. Caland | 16. Hack | 17. Zane | 18. Colombus | 19. Faur | 20. Williams | 21. Union |
| 22. Tris | 23. Ethylenediamine tetraacetic | 24. Sodium dodecyl sulfate | 25. Tris-EDTA | | | |

الکترو، کار الکترو فورز ادامه یافت (۳).

پس از اینکه الکتروفورز انجام شد ژلهایی که پشت آنها فیلم پلی استری بود طبق روش بسام و همکاران (۲) رنگ آمیزی و در دمای اتاق خشک و دائمی گردید. با این روش ژلهای به مدت ۱۰ دقیقه در استیک اسید ۷/۵ درصد ثابت شدند و با آب مقطر سه بار و هر بار به مدت ۲ دقیقه شسته شدند، در مرحله بعد ژلهای به مدت ۲۰ دقیقه در نترات نقره قرار گرفتند. سپس سریعاً با آب مقطر شسته شدند. برای ظهور، فیلمها در محلول ظاهر کننده وارد و به این کار در استیک اسید ۷/۵ درصد سرد خاتمه داده شد. سپس ژلهای با آب مقطر شسته و در مرحله نهایی به مدت ۵ دقیقه در محلول ضد ترک قرار داده شدند.

تجزیه دادهها: هر یک از قطعات DNA تکثیر شده به عنوان یک صفت در نظر گرفته شد و حضور و عدم حضور آنها به ترتیب با اعداد یک و صفر نمایش و در ماتریس دودویی وارد گردید. از روش ضرایب تطابق^۴ ساده (۲۱) برای محاسبه تشابه بین هر یک از زوجهای ژنوتیپی استفاده شد. روش ضرایب تطابق ساده میزان شباهت بین جفت‌های مختلف را از فرمول $S_{ij} = (a+d)/(a+b+c+d)$ محاسبه می‌کند. در فرمول مذکور a بیانگر تعداد حالات یک - یک، b و c معادل تعداد حالات صفر - یک و یک - صفر و d تعداد حالات صفر - صفر است پس با این روش اگر دو رقم یک نوار را نداشته باشند نیز یک نوع شباهت به وجود می‌آید. برای محاسبه ماتریس تشابه^۵ بر مبنای ضرایب تطابق ساده، از نرم افزار آماری SPSS^۶ استفاده و دندوگرام مربوط ترسیم گردید. به منظور نیل به یک خوشه طبقاتی^۷ ماتریس تشابه در نرم‌افزار ذکر شده تجزیه گردید. روشی که برای ادغام جفت‌گروهها به کار رفت UPGM^۸ بود که در آن ادغام بوسیله اتصال میانگین حسابی گروه^۹ صورت می‌گیرد (۱۹). لازم به ذکر است که روش خوشه طبقاتی، با محاسبه فاصله هر فرد از سایر افراد شروع می‌شود و سپس گروههای افراد با استفاده از فرآیند تجمعی تشکیل می‌گردند.

نتایج و بحث

در ارزیابی ابتدایی، به ترتیب ۱۷ و ۳۴ آغازگر ریز - سنجافی

EDTA ۱ میلی مول) حل گردید و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. کیفیت DNA توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل SHIMADZU UV-VIS RECORDING SPECTROPHOTOMETER UV-160A تعیین گردید. تکثیر DNA: مجموعاً ۹ آغازگر از شرکت UBC^۱ و ۸ آغازگر از نوع ریز-سنجافی^۲ (۷) برای مطالعه چند ریختی (پلی مورفیسم) به کار رفت. حجم واکنش ۲۵ میکرولیتری مورد استفاده عبارت بود از: ۱۴/۸ میکرولیتر آب مقطر سترون، ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش ۱۰ برابر غلیظ و حاوی منیزیم کلرید ۲۵ میلی مول (تریس ۱۰۰ میلی مول، پتاسیم کلرید ۵۰۰ میلی مول با ۸/۳ = pH)، ۲ میکرولیتر مخلوط نوکلئوتیدی ۱/۲۵ میلی مول، ۰/۵ میکرو لیتر آغازگر UBC (۱۰ میکرومول) یا ۰/۵ میکرو لیتر آغازگر ریز - سنجافی (۳۰ میکرو مول)، ۰/۲ میکرو لیتر آنزیم تک پلی مراز ۵ واحد در میکرو لیتر (Boehringer Mannheim) و ۵ میکرو لیتر DNA الگو (۵ نانوگرم). غلظت‌های نهایی مواد به کار رفته عبارت بودند از: بافر: ۱x، منیزیم ۱/۵ میلی مول، مخلوط نوکلئوتیدی ۰/۱ میلی مول، آغازگر UBC: ۰/۲ میکرومول، آغازگر ریز - سنجافی: ۰/۶ میکرومول و غلظت تک پلی مراز: ۰/۲ نانوگرم. قطعات DNA در ترموسیکلر فارماسیا (Gene ATAQ Controller) با سه چرخه مختلف: یک چرخه (۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه)، ۴۵ چرخه (۹۲ درجه یک دقیقه، ۳۵ درجه یک دقیقه، ۷۲ درجه ۲ دقیقه) و یک چرخه (۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه) تکثیر گردید. قطعات تکثیر شده DNA در ژلهای عمودی (۱۰x۸ سانتی متر) پلی‌اکریل امید^۳ ۱۰٪ با ضخامت ۰/۴۵ میلی متر که پشت آنها فیلم‌های پلی‌استری (Gel Bond PAG film, FMC Bioproducts) بود تکثیر گردید. به هر تیوب حاوی قطعات تکثیر شده ۵۰ میکرو لیتر کلروفرم اضافه گردید. حباب تشکیل شده DNA به یک تیوب جدید وارد شد. ۳ میکرو لیتر DNA از این تیوب با ۳ میکرو لیتر لودینگ بافر (اوره ۵ مول و زیلن سیانول ۰/۰۲ درصد) مخلوط و نمونه گذاری در چاهکها صورت گرفت. ولتاژ الکتروفورز برابر ۳۰۰ ولت بود و تا رسیدن رنگ بالایی لودینگ بافر در زیر

1.University of British Columbia 2.Mini-hairpin 3.Polyacrylamide 4.Simple matching coefficient 5.Similarity matrix
6.Statistical Package for Social Science 7.Hierarchical cluster 8.Unweighted pair group method 9.Group arithmetic average linkage

فاصله تشابه تغییر یافته

| C A S E | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 |
|-----------------|-----|---------------------------------|---------------|-----------|---------|----|
| Label | Num | +-----+-----+-----+-----+-----+ | | | | |
| habbit | 4 | -+--+ | | | | |
| century | 6 | -+ +-+ | | | | |
| hill | 5 | ---+ +-+ | | | | |
| clark | 3 | -----+ +-----+-----+ | | | | |
| semes | 7 | -----+ | +-----+-----+ | | | |
| harcor | 2 | -----+-----+ | | | | |
| steel | 1 | -----+-----+ | | | | I |
| srf-mutant | 18 | -----+-----+ | | | | I |
| williams | 19 | -----+ +-----+ | | | | I |
| williams-mutant | 20 | -----+ +-----+ | | | | I |
| srf | 17 | -----+-----+ | +--+ | | | I |
| union | 21 | -----+-----+ | +-----+ | | | I |
| colombus | 15 | -----+-----+ | | | I | I |
| faur | 16 | -----+-----+ | | | I | I |
| sahar | 13 | -+-----+ | | | +-----+ | |
| zane | 14 | -+ +-----+ | | | I | |
| gorgan | 11 | -----+-----+ | +--+ | | I | |
| calland | 10 | -----+-----+ | +--+ | +--+ | I | |
| hack | 12 | -----+-----+ | | I +-----+ | | |
| bonus | 9 | -----+-----+ | | I | | |
| blawk hawck | 8 | -----+-----+ | | | | |

شکل ۱ - دندوگرام ۲۱ رقم سویا بر مبنای نشانگرهای DAF

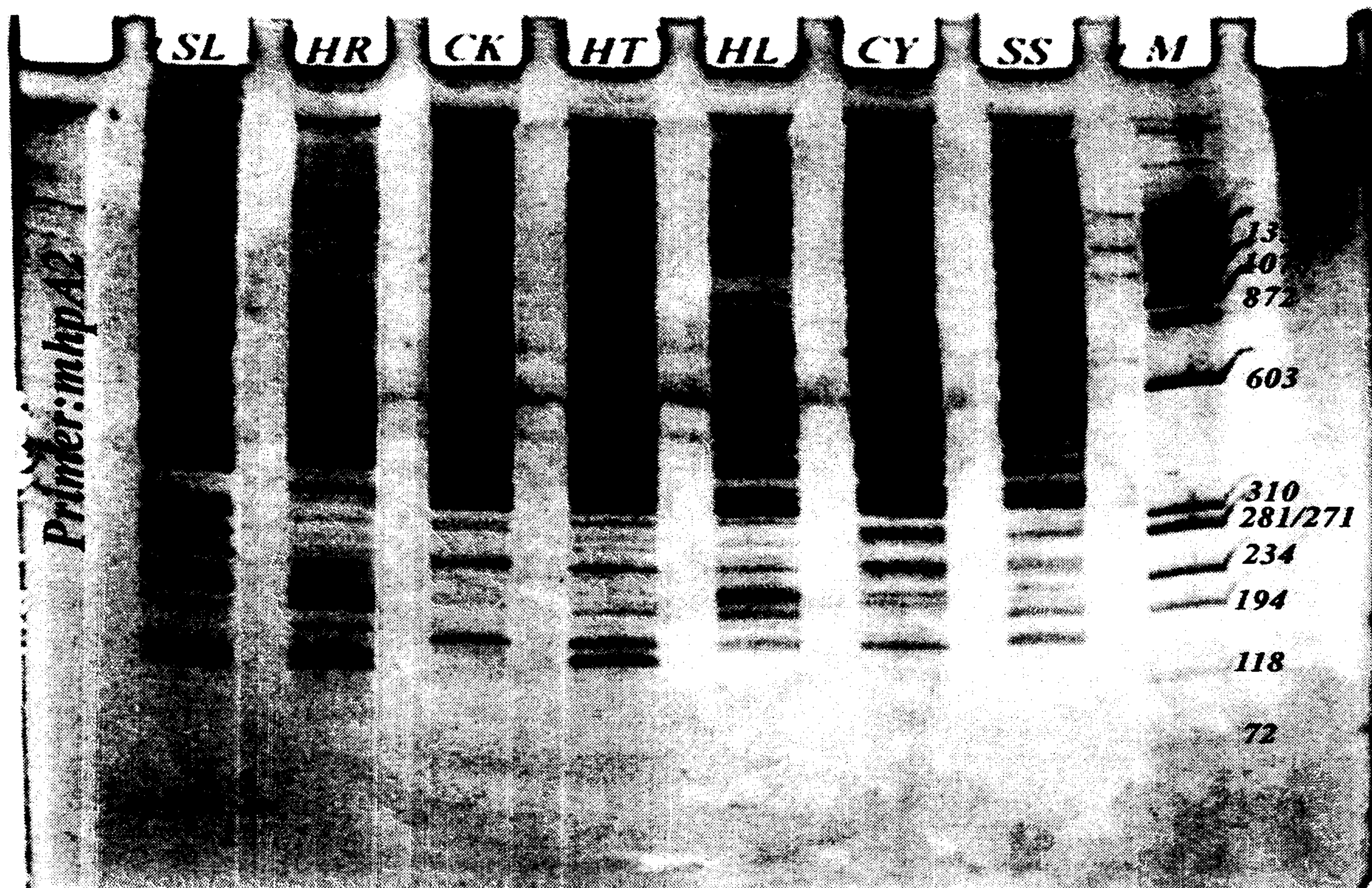
می‌توانند طیف وسیعی از مولکولهای DNA از جمله پلاسمید، حیوان و انسان را تکثیر نمایند. با اینکه بطور نظری انتظار می‌رفت که آغازگرهای کوتاهتر (ریز - سنجاقی) فرآورده‌های تکثیر یافته بیشتری نسبت به آغازگرهای بلندتر تولید نمایند ولی در عمل عکس این انتظار رخ داد. آغازگرهای کوتاهتر بخصوص زمانی که با جفت شدن بازهای داخل حلقه خود ثبات پیدا می‌کنند در جابجایی حلقه سنجاق سری با مشکل بیشتری مواجه‌اند. بنابراین در عمل، فرآورده‌های تکثیر شده واقعی نسبت به کل مکانهایی که آغازگر می‌تواند متصل شود کمتر است (۱۱).

محاسبه تشابه در ضرائب تطابق ساده با دامنه متغیری از ۰/۶۹۳ تا ۰/۸۸۹ و با فاصله‌ای از ۰/۱۱۱ تا ۰/۳۰۷ نشان داد که بیشترین و کمترین تشابه به ترتیب بین ژنوتیپ‌های سنچری و هییت و ژنوتیپ‌های یونیون و استیل وجود دارد (جدول ۱). در تجزیه خوشه‌ای، ۲۱ رقم زراعی سویا به دو زیر خوشه تقسیم شدند (شکل ۱). زیر خوشه دوم شامل ۷ عضو است که ژنوتیپ استیل به طور

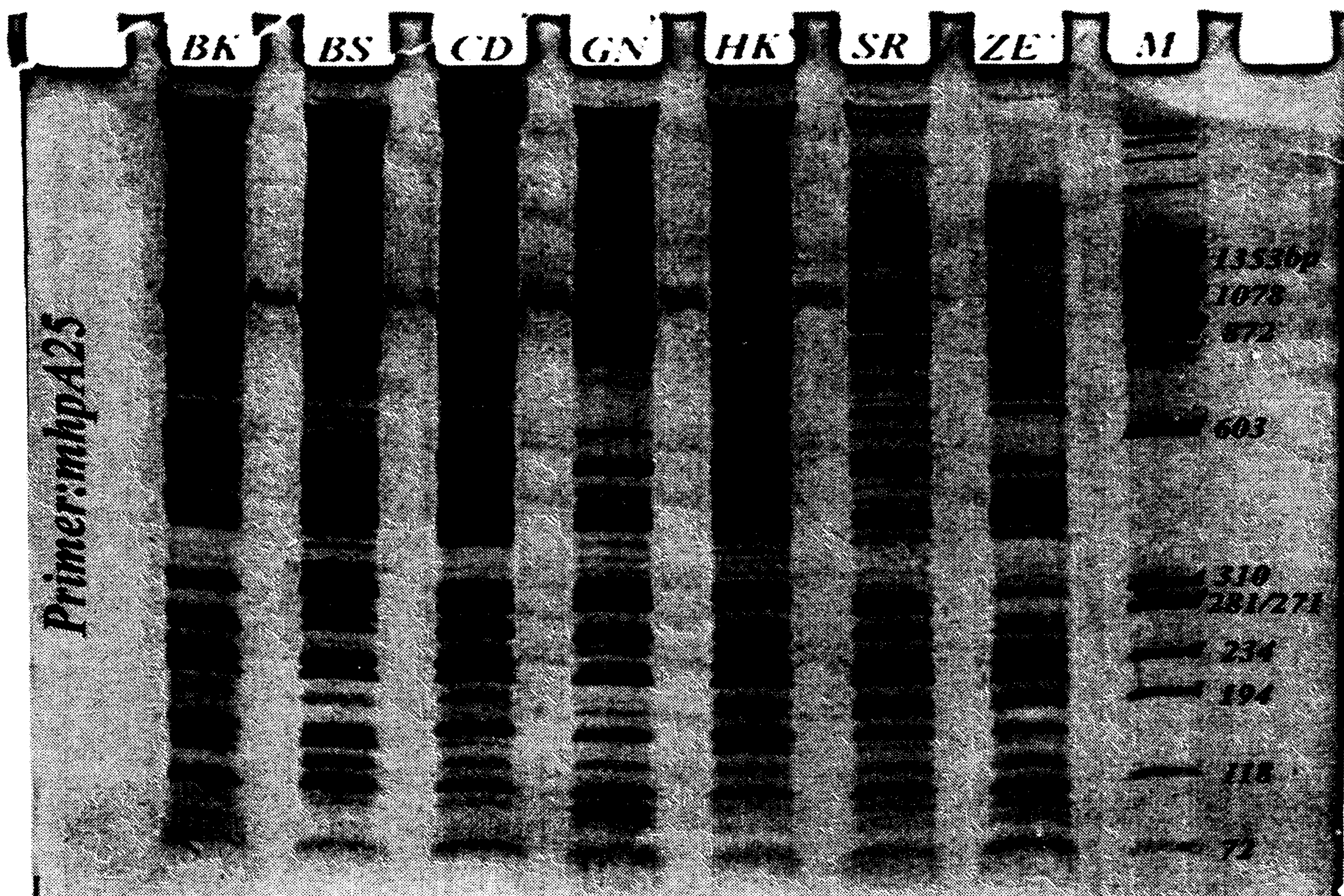
و ۱۰ نوکلئوتیدی انتخاب گردید. بقیه آغازگرها بطور کلی فاقد نوار و یا فاقد نوارهای با ثبات بودند. این گروه از آغازگرهای انتخاب شده مجموعاً ۲۴۷۶ نوار قابل امتیاز دهی تولید کرد (شکل‌های ۲، ۳، ۴ و ۵) که در محدوده تقریبی ۱۰۰ الی ۱۸۶۰ جفت بازی واقع شدند. لازم به ذکر است که چرخه‌های همانند سازی ۲ دقیقه بوده و آنزیم پلی‌مراز تک^۱ در شرایط بهینه در هر دقیقه ۱ kb از DNA را تکثیر می‌کند، بنابراین طول قطعات بدست آمده اندکی کوتاهتر است. بطور کلی متوسط تعداد نوار در آغازگر معادل ۱۴۵/۵۸ و متوسط تعداد نوار از ۵/۵ تا ۷/۹۴ متغیر بود. متوسط تعداد نوار در آغازگر برای آغازگرهای ریز - سنجاقی و ۱۰ نوکلئوتیدی به ترتیب برابر ۱۴۲/۵ و ۱۴۸/۴ بود. دو رقم ایرانی گرگان و سحر به ترتیب با میانگین ۵ و ۵/۶۴ حاوی کمترین میزان نواردهی بودند. هر دو رقم ضمن چند شاخه بودن برای برداشت مکانیزه مناسب‌اند و در مناطق گرگان و گنبد کشت می‌شوند. آغازگرهای غیر معمول و با ثبات ریز سنجاقی، حاوی یک توالی متغیر در پایانه ۳' خود هستند که

جدول ۱: ماتریس تشابه ارقام سویا بر مبنای ضرایب تطابق ساده در داده‌های حاصل از فرآورده‌های DAF

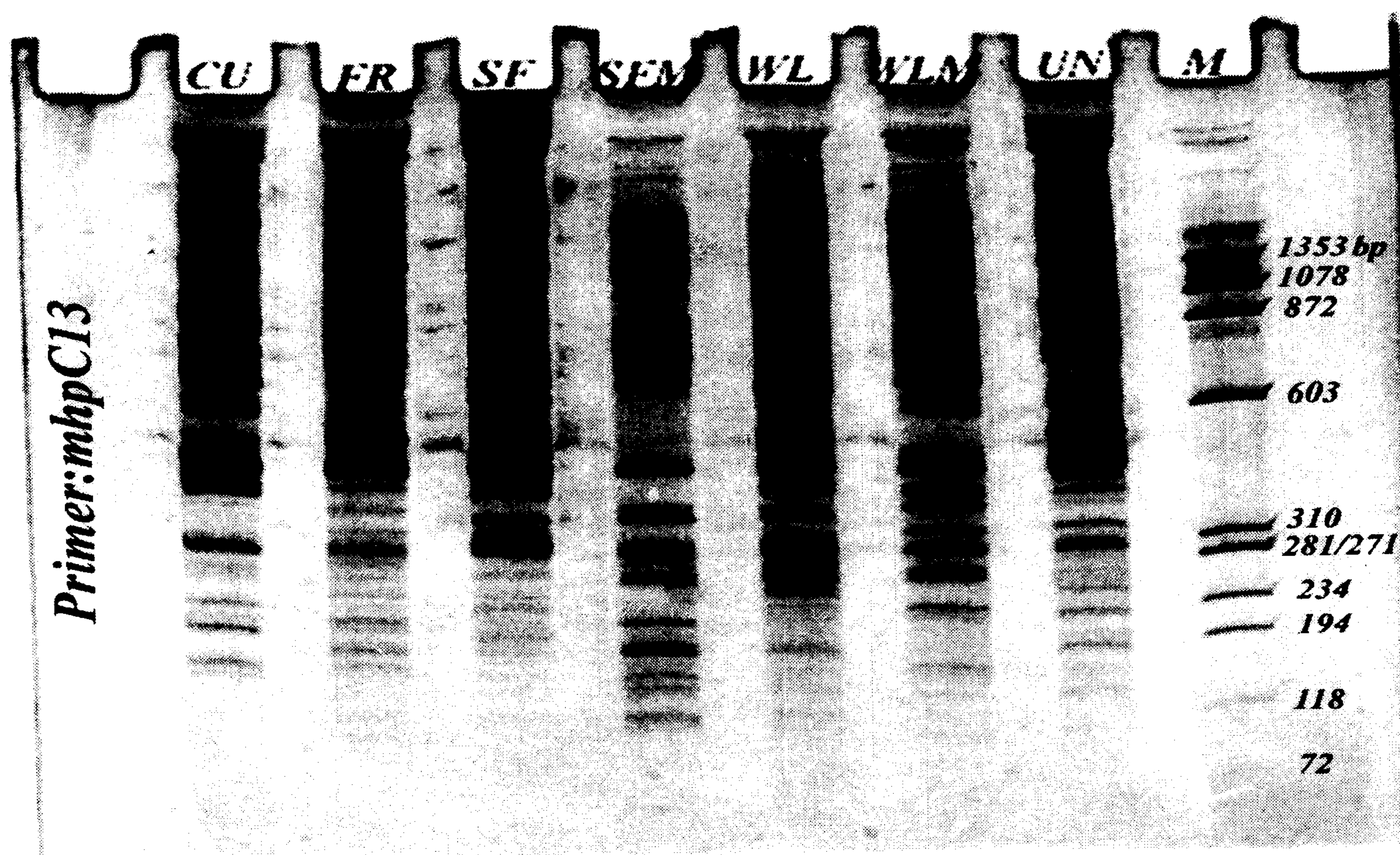
| | ۱ | ۲ | ۳ | ۴ | ۵ | ۶ | ۷ | ۸ | ۹ | ۱۰ | ۱۱ | ۱۲ | ۱۳ | ۱۴ | ۱۵ | ۱۶ | ۱۷ | ۱۸ | ۱۹ | ۲۰ | |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
| استیل (۱) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| هارکور (۲) | ۰/۷۸۰ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| کلارک (۳) | ۰/۷۷۶ | ۰/۸۲۰ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| هیت (۴) | ۰/۷۹۸ | ۰/۸۲۱ | ۰/۸۸۴ | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| هیل (۵) | ۰/۷۷۰ | ۰/۸۴۸ | ۰/۸۷۵ | ۰/۸۷۶ | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| سنجری (۶) | ۰/۷۷۹ | ۰/۸۲۵ | ۰/۸۶۸ | ۰/۸۸۹ | ۰/۸۸۰ | | | | | | | | | | | | | | | | |
| سمس (۷) | ۰/۷۶۳ | ۰/۸۱۶ | ۰/۸۴۷ | ۰/۸۷۱ | ۰/۸۶۸ | ۰/۸۸۲ | | | | | | | | | | | | | | | |
| بلاک هاک (۸) | ۰/۷۰۳ | ۰/۷۳۷ | ۰/۷۱۶ | ۰/۷۱۴ | ۰/۷۲۲ | ۰/۷۰۶ | ۰/۷۳۲ | | | | | | | | | | | | | | |
| بونوس (۹) | ۰/۶۹۸ | ۰/۷۲۹ | ۰/۷۱۸ | ۰/۷۱۲ | ۰/۷۲۷ | ۰/۷۰۸ | ۰/۷۱۹ | ۰/۷۹۹ | | | | | | | | | | | | | |
| کالاند (۱۰) | ۰/۷۱۹ | ۰/۷۵۳ | ۰/۷۳۲ | ۰/۷۲۳ | ۰/۷۴۰ | ۰/۷۱۹ | ۰/۷۳۳ | ۰/۸۰۲ | ۰/۸۲۰ | | | | | | | | | | | | |
| گرگان (۱۱) | ۰/۷۵۰ | ۰/۷۸۱ | ۰/۷۶۳ | ۰/۷۵۷ | ۰/۷۷۹ | ۰/۷۴۸ | ۰/۷۷۱ | ۰/۸۱۶ | ۰/۸۲۱ | ۰/۸۲۷ | | | | | | | | | | | |
| هک (۱۲) | ۰/۶۹۴ | ۰/۷۲۸ | ۰/۷۱۴ | ۰/۷۰۳ | ۰/۷۱۸ | ۰/۷۱۲ | ۰/۷۱۶ | ۰/۷۷۳ | ۰/۷۹۸ | ۰/۸۲۹ | ۰/۸۱۵ | | | | | | | | | | |
| سحر (۱۳) | ۰/۷۳۵ | ۰/۷۷۴ | ۰/۷۵۵ | ۰/۷۴۹ | ۰/۷۵۷ | ۰/۷۴۵ | ۰/۷۵۲ | ۰/۸۰۴ | ۰/۸۱۱ | ۰/۸۲۷ | ۰/۸۵۸ | ۰/۸۴۰ | | | | | | | | | |
| زان (۱۴) | ۰/۷۲۰ | ۰/۷۵۷ | ۰/۷۴۰ | ۰/۷۳۷ | ۰/۷۴۷ | ۰/۷۲۸ | ۰/۷۳۹ | ۰/۷۸۱ | ۰/۷۹۱ | ۰/۸۱۵ | ۰/۸۴۶ | ۰/۸۲۵ | ۰/۸۸۳ | | | | | | | | |
| کلمبوس (۱۵) | ۰/۷۲۰ | ۰/۷۳۷ | ۰/۷۳۳ | ۰/۷۳۴ | ۰/۷۲۹ | ۰/۷۲۰ | ۰/۷۳۴ | ۰/۷۴۴ | ۰/۷۴۹ | ۰/۷۴۳ | ۰/۷۷۱ | ۰/۷۳۵ | ۰/۷۵۴ | ۰/۷۵۴ | | | | | | | |
| فار (۱۶) | ۰/۶۹۶ | ۰/۷۲۴ | ۰/۷۰۸ | ۰/۷۱۲ | ۰/۷۱۲ | ۰/۷۰۳ | ۰/۷۱۷ | ۰/۷۳۷ | ۰/۷۲۷ | ۰/۷۲۵ | ۰/۷۵۷ | ۰/۷۳۳ | ۰/۷۵۹ | ۰/۷۵۷ | ۰/۸۰۱ | | | | | | |
| اس-آر-اف (۱۷) | ۰/۷۰۴ | ۰/۷۳۳ | ۰/۷۱۹ | ۰/۷۲۳ | ۰/۷۲۰ | ۰/۷۲۲ | ۰/۷۲۶ | ۰/۷۴۰ | ۰/۷۲۶ | ۰/۷۴۲ | ۰/۷۷۳ | ۰/۷۳۲ | ۰/۷۷۰ | ۰/۷۵۸ | ۰/۷۹۰ | ۰/۸۱۰ | | | | | |
| اس آر-اف M (۱۸) | ۰/۷۲۹ | ۰/۷۶۵ | ۰/۷۵۴ | ۰/۷۵۳ | ۰/۷۵۳ | ۰/۷۳۹ | ۰/۷۵۴ | ۰/۷۷۰ | ۰/۷۷۵ | ۰/۷۴۸ | ۰/۸۰۷ | ۰/۷۷۴ | ۰/۸۰۲ | ۰/۸۱۰ | ۰/۸۰۵ | ۰/۷۹۳ | ۰/۸۴۶ | | | | |
| ویلیامز (۱۹) | ۰/۷۱۶ | ۰/۷۵۲ | ۰/۷۳۳ | ۰/۷۳۴ | ۰/۷۳۷ | ۰/۷۱۶ | ۰/۷۳۹ | ۰/۷۳۹ | ۰/۷۵۲ | ۰/۷۳۵ | ۰/۷۸۸ | ۰/۷۴۰ | ۰/۷۶۹ | ۰/۷۷۱ | ۰/۸۰۱ | ۰/۸۱۱ | ۰/۸۲۵ | ۰/۸۶۸ | | | |
| ویلیامز موتان (۲۰) | ۰/۷۰۳ | ۰/۷۳۹ | ۰/۷۲۳ | ۰/۷۲۷ | ۰/۷۳۴ | ۰/۷۱۶ | ۰/۷۳۲ | ۰/۷۵۲ | ۰/۷۳۷ | ۰/۷۵۰ | ۰/۷۷۹ | ۰/۷۴۳ | ۰/۷۷۱ | ۰/۷۸۱ | ۰/۸۰۱ | ۰/۸۰۹ | ۰/۸۳۰ | ۰/۸۵۰ | ۰/۸۴۱ | | |
| یونیون (۲۱) | ۰/۶۹۳ | ۰/۷۳۲ | ۰/۷۱۳ | ۰/۷۰۹ | ۰/۷۱۷ | ۰/۷۰۳ | ۰/۷۱۲ | ۰/۷۲۷ | ۰/۷۲۲ | ۰/۷۳۸ | ۰/۷۷۱ | ۰/۷۳۰ | ۰/۷۵۹ | ۰/۷۶۱ | ۰/۷۹۹ | ۰/۷۸۱ | ۰/۸۰۲ | ۰/۸۱۰ | ۰/۸۰۱ | ۰/۸۳۱ | |



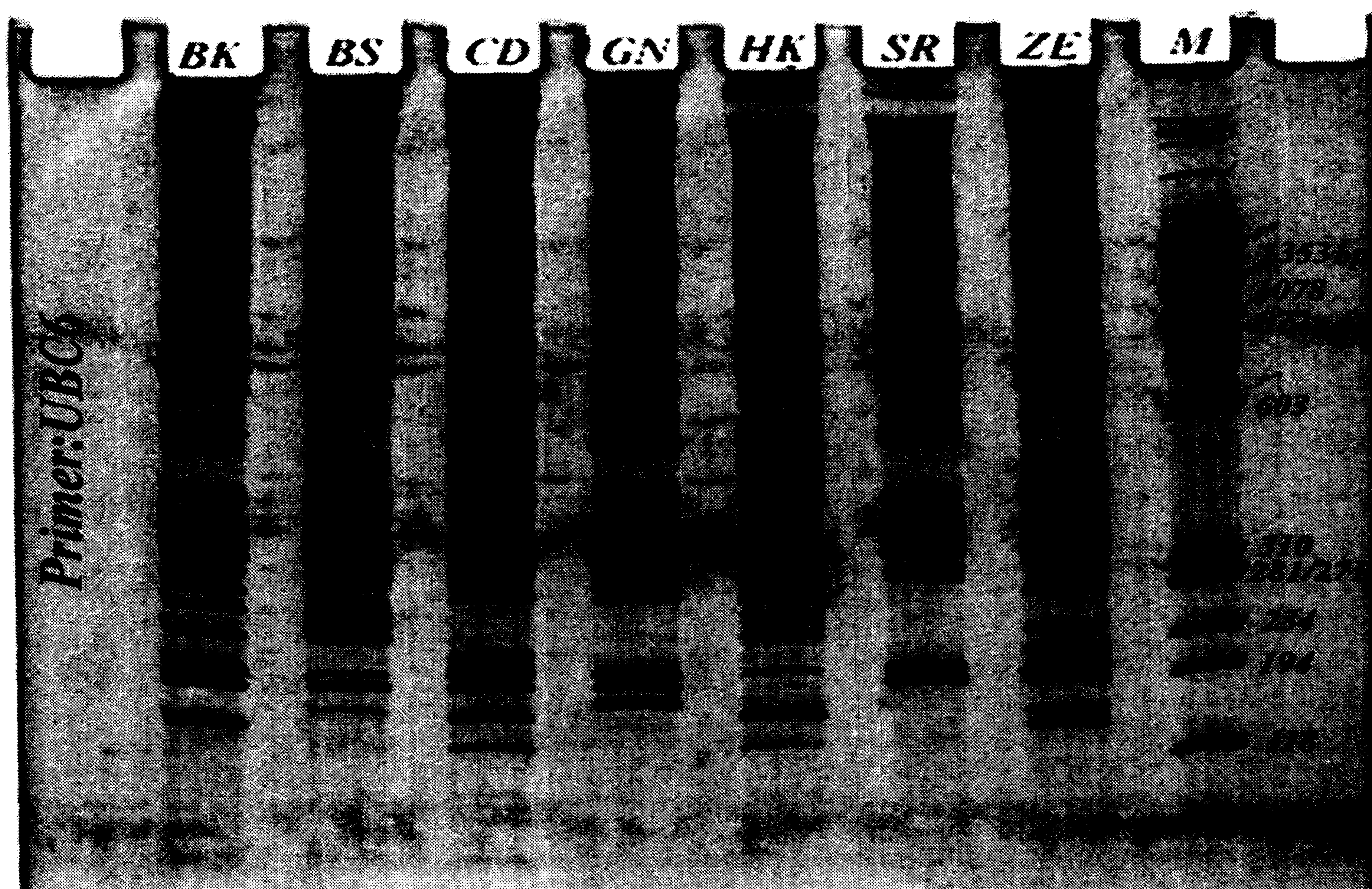
شکل ۲ - فرآورده های DAF در ژنوتیپ های استیل (SL)، هارکور (HR)، کلارک (CK)، هاییت (HT)، هیل (HL)، سنجری (CY) و سمس (SS). M: نشانگر اندازه ۱۷۴ ϕ X و آغازگر مورد استفاده ریز سنجاقی A۲ می باشد.



شکل ۳ - فرآورده های DAF در ژنوتیپ های بلاک های (BK)، بنوس (BS)، کالاند (CD)، گرگان ۳ (GN)، هک (HK)، سحر (SR) و زان (ZE). M: نشانگر اندازه ۱۷۴ ϕ X و آغازگر مورد استفاده ریز سنجاقی A۲۵ می باشد.



شکل ۴ - فرآورده های DAF در ژنوتیپ های کلمبوس (CU)، فار (FR)، اس آراف (SF)، اس آراف جهش یافته (SFM)، ویلیامز (WL)، ویلیامز جهش یافته (WLM) و یونیون (UN): نشانگر اندازه ۱۷۴ ϕX و آغازگر مورد استفاده ریز سنجاقی C۱۳ می باشد.



شکل ۵ - فرآورده های DAF در ژنوتیپ های بلاک هاگ (BK)، بونوس (BS)، کالاند (CD)، گرگان ۳ (GN)، هک (HK)، سحر (SR) و زان (ZE): نشانگر اندازه ۱۷۴ ϕX و آغازگر مورد استفاده ریز سنجاقی UBC۶ می باشد.

اساس نشانگرهای RAPD به عمل آمده گیاهان معرفی شده‌ای یافت شده‌اند که از نظر عملکرد قادر به رقابت با ارقام زراعی می‌باشند (۲۴). بنابر این چنین تحقیقاتی می‌تواند نقطه آغازی در جهت ارتقاء تنوع ژنتیکی بکار رود.

یکی از اهداف این تحقیق، بهینه کردن و مطالعه استعداد به کارگیری نشانگرهای DAF در ارائه تصویری روشن از وسعت زمینه ژنتیکی ارقام معروف سویا بود. در مقایسه با سایر روشهای بررسی چند شکلی و قرابت ژنوتیپها (خصوصیات ظاهری و ایزوزیمی)، این نوع فن آوری از تکرار پذیری برخوردار بوده و نسبت به سایر نشانگرهای DNA از حساسیت فوق العاده‌ای برخوردار است. در این روش تعداد نوار قابل ظهور DNA بسیار قابل توجه است.

با توجه به بهینه شدن روش DAF برای سویا در این تحقیق هم اکنون این امکان فراهم است که بر مبنای بکارگیری تعدادی آغازگر و از طریق تکثیر قطعاتی از DNA ژنومی، گروهی از آغازگرهای شاخص را برای تفکیک و شناسایی ارقام مختلف در آینده پیدا نمود. تهیه اثر انگشت رقمی با موفقیت در محصولاتی نظیر پنبه (۱۷)، آفتابگردان (۱۵)، کرفس (۲۷)، سیب (۱۴) و غیره به کار گرفته شده است. در این آزمایش بعضی از آغازگرها از این نظر استعداد خوبی بروز داده‌اند.

REFERENCES

1. Apuya, N., B., Frazier, P. keim, E.J. Roth, and K.J. Lark. 1988. Restriction length polymorphisms as genetic markers in soybeans *Glycin max* (L.) Merr. *Theor. Appl. genet.* 75: 889-901.
2. Bassam, B.J., G. Caetano- Anolles, and P. Gresshoff. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gel. *Anal. Biochem.* 196: 80-83.
3. Caetano - Anolles, G, and B.J. Bassam. 1993. DNA amplification fingerprinting using arbitrary oligonucleotide primers. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 42: 189-198
4. Caetano - Anolles, G, B.J. Bassam, and P.M Gresshoff. 1991b. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio/Technol.* 9: 553-556.
5. Caetano - Anolles, G., L.M. Callahan, and P.M. Gresshoff. 1997. The origin of bermudagrass (*Cynodon*) off - types inferred by DNA amplification fingerprinting. *Crop Sci.* 37: 81-87.
6. 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.

انفرادی در یک گروه و ژنوتیپهای هارکور، سمس، کلارک، هیل، سنچری و هییت نیز در گروه دیگر گرد آمده‌اند. زیر خوشه سوم حاوی دو گروه متمایز و اکثریت بیش از ۵۰ درصدی ژنوتیپهای تشکیل دهنده آن از ارقام حاوی گروه رسیدگی ۳ می‌باشند (شکل ۱). با توجه به ضرایب تشابه بدست آمده از روش ضرایب تطابق ساده (جدول ۱)، میانگین این ضرایب $0/763$ و حداقل و حداکثر آن $0/693$ و $0/889$ می‌باشد. همانطور که قبلاً اشاره شد دو رقم ایرانی سحر و گرگان از نظر کم بودن تعداد نوارهای تولیدی تشابه نزدیکی با یکدیگر نشان دادند. با اینکه با کم شدن تعداد نوارها احتمال ایجاد نوارهای مشترک کمتر می‌شود، ولی شباهت بالای ژنتیکی ($0/858$) آنها را در مجاورت هم قرار داده است.

با توجه به میانگین ضرایب تشابه نسبتاً بالای مشاهده شده در این تحقیق ($0/763$) و سایر بررسیها (۱۰ و ۲۴)، جستجو در جهت یافتن ژرم پلاسماهای متنوع تر نیاز اساسی به شمار می‌رود. معمولاً استفاده از ژرم پلاسماهای غریبه در اصلاح نباتات عمدتاً محدود به معرفی و ادغام ژنهای مقاومت به بیماری و حشرات در ارقام تجاری است. با اینکه کوشش‌هایی به منظور بالا بردن تنوع ژنتیکی با ژرم پلاسماهای غریبه صورت گرفته است ولی این مساعی تاثیر چندانی در تقویت تنوع نداشته است (۲۰) که دلیل آن به ضعف خصوصیات زراعی ژرم پلاسماهای غریبه نسبت داده می‌شود. قابل ذکر است که بر اساس تحقیقاتی که در زمینه چند شکلی و بر

Theor. Appl. Genet. 91: 228-235

7. Caetano - Anolles, G., and P.M. Gresshoff. 1994. DNA amplification fingerprinting using arbitrary mini - hairpin oligonucleotide primers. *Bio/Technology*. 12: 619-623.
8. Cerny, T.A , G. Caetano - Anolles , and R.N. Trigiana. 1996. Molecular phylogeny and DNA amplification fingerprinting of petunia taxa. *Theor. Appl. Genet.* 92: 1009-1016.
9. Dellaporta, S.L., J. Wood, and J.B. Hicks. 1983. Aplant DNA minipreparation: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.
10. Doldi, M.L., J. Vollmann, and T. Lelley. 1997. Genetic diversity in soybean as determined by RAPD and microsatellite analysis. *Plant Breeding* 116: 331-335.
11. Gresshoff, P.M. 1994. *Plant genome analysis*. CRC Press Inc.
12. Keim, P.T., W. Beavis, J. Shupp, and R.Freesten. 1992. Evaluation of soybean RFLP marker diversity in adapted germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 85: 205-212.
13. Keim, P., R.C. Shoemaker, and R.G. Palmer. 1989. Restriction fragment length polymorphism diversity. *Theor. Appl. Genet.* 77: 786-792.
14. Koller, B., A. Lehmann, J.M. McDermott, and C. Gessler. 1993 . Identification of apple cultivars using RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 85: 901- 904
15. Lawson, W.R., R.J. Henry, J.K. Kochman., and G.A. Kong. 1994. Genetic diversity in sunflower (*Heliathus annuus L.*) as revealed by random amplified polymorphic DNA analysis. *Aust. J. Agric. Res.* 45: 1319-1327.
16. Morgante, M., A. Rafalski, P. Biddle, S. Tingey, and A.M. Olivieri . 1994. Genetic mapping and variability of seven soybean simple sequence repeat loci. *Genome* 37: 763-769.
17. Multani, D.S., and B.R. Lyon. 1995. Genetic fingerprinting of Australian cotton cultivar with RAPD markers. *Genome* 38: 1005-1008
18. Prabhu, R.R., D. Webb, H. Jessen, S.L. Smith, and P.M. Gresshoff. 1997. Genetic relatedness soybean genotypes using DNA amplification fingerprinting (DAF), RFLP, and pedigree. *Crop Sci.* 37: 1590-1595.
19. Sneath, P.H., and R.R. Sokal. 1973. *Numerical taxonomy*. W.H. Freeman and Co., San Francisco.
20. Sneller, C.H. 1994. Pedigree analysis of elite soybean lines. *Crop Sci.* 34: 1515-1522.
21. Sokal, R.R., and C.D. Michener. 1958. A Statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kans. Sci. Bull.* 38: 1409-1438.
22. Tanksley, S.D. , N.D. Young, A.H. Paterson, and M.W. Benierbale. 1989. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Bio/Technology*. 7: 257-264.
23. Thompson, J.A., and R.L. Nelson. 1998. Core set of primers to evaluate genetic diversity in soybean. *Crop Sci.* 38: 1356-1362.

24. Thompson, J.A, R.L. Nelson and L.O. Vodkin. 1998. Identification of diverse soybean germplasm using RAPD markers. *Crop Sci.* 38: 1348-1355.
25. Weaver, K.R., L.M. Callahan, G. Caetano - Anolles, and P.M. Gresshoff. 1955. DNA amplification fingerprinting and hybridization analysis of Centipedegrass. *Crop Sci.* 35: 881-885.
26. Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
27. Yang, X., and C.F. Quiros. 1993. Identification and classification of celery with RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 86: 205-212.

**Assessment of Genetic Relationship Among Soybean Cultivars
Using DNA Amplification Fingerprinting (DAF)**

**A. A. SHAHNEJAT BUSHEHRI, B. YAZDI SAMADI
AND C. ABD-MISHANI**

**Assistant Professor and Professors, Faculty of Agriculture,
University of Tehran, Karaj, Iran.**

Accepted April, 19, 2000

SUMMARY

DNA amplification fingerprinting (DAF) with arbitrary oligonucleotide primers can identify cultivars and specify relationships between closely related plant accessions. The genetic relationships among 21 cultivars of soybean were investigated using DAF markers as discriminating characters. Resolved bands were scored for their presence or absence in a binary matrix and relationships among cultivars calculated using simple matching coefficient. The results have assisted in the development of a dendrogram suggesting genetic relationships among genotypes. Cluster analysis by unweighted pair group method using arithmetic averages showed that 21 cultivars can be placed in two main groups with a similarity ranging from 0.693 to 0.889. Variability observed had a narrow genetic base and it is necessary to expand the diversity of the soybean genetic base with exotic germplasm. The results also indicated that DAF technology can generate molecular markers that can be used reliably for DNA fingerprinting of important cultivars. This tool could be useful in determining relationships as well as diversity and also in the identification of soybean varieties.

Key words: DAF, PCR, Molecular markers, Polymorphism, Soybean, Genetic fingerprinting.