جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۲، شماره ۴، سال ۱۳۸۰(۷۴۵-۷۳۷)

بررسی تنوع ژنتیکی ارقام مختلف گلرنگ با استفاده از روش RAPD-PCR

رضا معالی امیری[1]، بهمن یزدی صمدی[2]، محمدرضا قنادها[3] و سیروس عبدمیشانی[4]
۱ الی ٤- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استاد، دانشیار و استاد گروه زراعت
و اصلاح نباتات دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران
تاریخ پذیرش مقاله ۸۰/۲/۱۹

خلاصه

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ارقام گلرنگ تعداد ۲۸ ژنوتیپ آن مورد آزمایش قرار گرفت. در انجام RAPD از ۱۰۰ آغازگر[1] ده نوکلئوتیدی استفاده شد. ۱۱ آغازگر نوارهای مشخصی تولید کردند که در محاسبات واردشد و در نهایت ۲۸۳ نوار به عنوان نشانگر معرفی شدند که محدوده‌ای بین ۳۰۰ تا ۲٤۰۰ جفت باز را شامل می‌شد. دندروگرام‌ها بر اساس ضریب تشابه جاکارد[2] و فاصله اقلیدسی[3] و به روش UPGMA [4] رسم شدند. در روش ضریب تشابه جاکارد ژنوتیپ‌ها به پنج گروه تقسیم شدند که شامل ارقام خارجی، توده‌های ایرانی، توده‌های وحشی، توده‌های پاییزه وتوده سربند بود. برای تایید فنوگرام موجود، کلاستر بندی بر اساس فاصله اقلیدسی انجام گرفت ولی ساختار کلی فنوگرام تغییری نکرد. در هر دو روش عدم تطابق بین تنوع ژنتیکی و جغرافیایی مشاهده شد. این امر ناشی از آن است که جدایی جغرافیایی تنها عامل به وجود آورنده تنوع ژنتیکی نمی‌باشد. توده‌های وحشی همان طور که پیش بینی می‌شد گروهی مجزا از توده‌ها و ارقام زراعی تشکیل و تنوع بالایی را نیز نشان دادند. توده‌های اصلاح شده نیز گروه مجزایی در میانه کلاستر بین توده‌های ایرانی و ارقام خارجی تشکیل دادند. روش تجزیه کلاستر با استفاده از صفات مورفولوژیکی و بر اساس فاصله اقلیدسی و به روش UPGMA انجام گرفت و تطابق نسبتاً خوبی بین کلاستر بندی بر اساس صفات کیفی (نشانگر مولکولی) و صفات کمی (نشانگر مورفولوژیکی) دیده شد. در این نوع کلاستر بندی همان طور که در کلاستر بندی قبلی نیز دیده شد بعضی ژنوتیپ‌های ایرانی همیشه در گروه ارقام خارجی قرار گرفتند. این امر قرابت و خویشاوندی آنها را با ارقام خارجی نشان می‌دهد. همچنین در این نوع تجزیه کلاستر، ژنوتیپ‌های با آب و هوای مناطق مختلف در یک گروه قرار گرفتند که نظریه بالا مبنی بر عدم وجود تطابق بین تنوع ژنتیکی و جغرافیایی را تایید می‌کند و سرانجام اینکه نشانگر RAPD ابزار مناسبی برای مطالعه تنوع ژنتیکی در گلرنگ می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، گلرنگ، DNA، PCR، RAPD.

---

1 . Primer
2 . Jaccard's similarity coefficient
3 . Euclidean distance coefficient
4 . Unweighted pair – group method with arithmetic averages

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

ارزیابی جمعیت‌های زراعی و وحشی در نگهداری و بکارگیری شایسته از ژرم‌پلاسم‌های مناسب ضروری به نظر می‌رسد (۶ و ۱۵). در واقع بهبود وضع ژنتیکی هر موجود وابسته به وجود و وسعت تنوع ژنتیکی آن است. برنامه‌های اصلاحی فعلی و آینده نه تنها نیازمند دسترسی به این تنوع‌ها می‌باشد بلکه وابسته به نگهداری و مدیریت صحیح حفظ و استفاده از آنها نیز هست (۲۳).

بررسی تنوع ژنتیکی، متخصصین اصلاح نباتات را در شناسایی ظرفیت ژنتیکی صفات مرتبط با اهداف اصلاحی مهم آن، یاری می‌نماید و مطالعه الگوپذیری و تبعیت تنوع ژنتیکی از تنوع جغرافیایی و اقلیمی ژنوتیپ‌ها، نشان دهنده سازگاری‌های احتمالی آنها با محیط‌های متفاوت می‌باشد (۱۳).

در مقایسه با سایر محصولات زراعی مطالعه تنوع ژنتیکی و توارث صفات در جمعیت‌های مختلف گلرنگ اندک بوده و اکثراً بر اساس مطالعه مورفولوژیکی و معدودی نیز بر اساس مطالعات بیوشیمیایی بوده است. در مقایسه با روش‌های دیگر تجزیه تنوع ژنتیکی مثل ایزوزایم‌ها یا صفات مورفولوژیکی، نشانگرهای DNA حساس، تکرارپذیر و از نظر تکنولوژیکی رواج بیشتر پیدا کرده‌اند (۲۶). صفات مورفولوژیکی بر اساس صفات اندازه‌گیری شده در مزرعه یا گلخانه بوده که از یک طرف معیارهای صحیح و بدون ابهام را کمتر ارائه می‌دهند و از طرف دیگر چون مربوط به شرایط رشد گیاه می‌باشند بررسی آنها هم از نظر هزینه به صرفه نیست و هم اینکه نسبت به شرایط محیطی آسیب‌پذیر می‌باشند (۱۱). در مواردی دیده شده است که تغییر در توالی‌ها ایجاد تغییر فنوتیپی در گیاه نکرده است (۱۰). روشهای ایزوزایم و پروتئین‌های ذخیره‌ای نیز دارای محدودیت بوده و تنوع کمی بین ژنوتیپ‌های خویشاوند نزدیک نشان می‌دهند (۱۶، ۱۰، ۸ و ۴). به علاوه ایزوزایم‌ها و پروتئین‌های دیگر ممکن است تحت تاثیر محیط، بافت و دوره رشد گیاهی باشند (۱۸ و ۱۱).

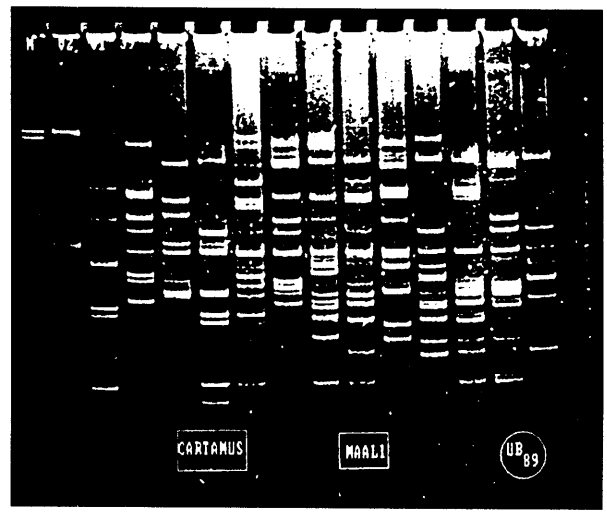
با پیشرفت تکنولوژی روشی که بتواند بر این مشکلات غلبه کند و همچنین اطلاعات بیشتری را برای محقق فراهم کند نشانگرهای مبتنی بر DNA هستند که ژنوتیپ‌ها را توصیف می‌کنند نه فنوتیپ‌ها را (۷). در آن میان RFLP برای مطالعه مستقیم DNA ارائه شد ولی بکارگیری آن نیز دارای محدودیتهای استفاده از مواد رادیواکتیو، هزینه بالا، زمان طولانی، مقدار کم چند شکلی، نیاز به همسانه‌سازی و اطلاعات توالی DNA، خلوص بالای DNA و غیره است (۶). برای رفع این مشکلات نشانگرهای مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نظیر RAPD معرفی شد (۲۵، ۲۲، ۱۹ و ۶) که در آن آغازگرهای مختلف و از جمله آغازگرهای ۱۰-۸ نوکلئوتیدی استفاده می‌شود. همچنین بر خلاف روشهای استاندارد که جهت طراحی و ساخت آغازگرها به اطلاعات اولیه در زمینه توالی قطعه مورد نظر نیاز می‌باشد در این روش برای رفع این مشکل که در اکثر گیاهان توالی‌های ژنوم هنوز مشخص نشده است از آغازگرهایی با توالی‌های اختیاری استفاده می‌شود (۴). ماهیت فرآورده‌های تکثیر شده به توالی‌های آغازگر، طول آغازگر و توالی‌های DNA بستگی دارد.

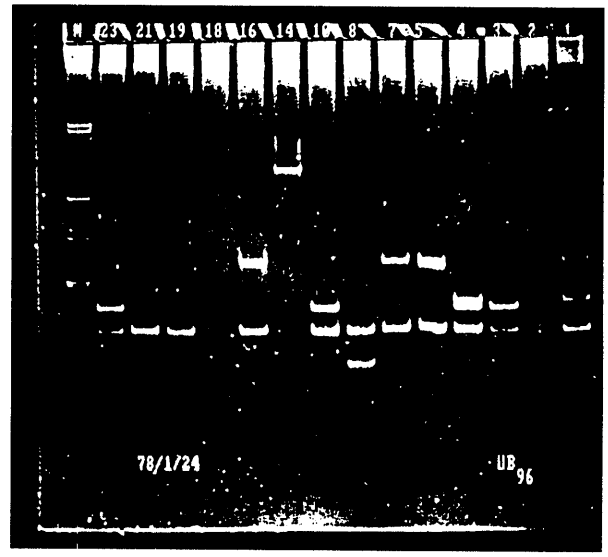
ولش و همکاران (۲۴) در مطالعه چند شکلی‌ها با آغازگرهای اختیاری ثابت کردند که این روش می‌تواند بین نژادهای تقریباً همه موجودات به کار رود و در شناسایی و بررسی نژادها با ارزش باشد. رامسی و همکاران (۱۷) نژادهای پاتوژن پژمردگی قارچ ورتیسیلیوم داهلیه[1] را با استفاده از RAPD شناسایی و طبقه بندی کردند در حالیکه روش تکثیر، توالی یابی و هضم برشی توالی‌های DNA ریبوزومی خاص قادر به شناسایی ایزوله‌های این پاتوژن نبود ولی تجزیه RAPD تمایزهای معنی‌داری بین این ایزوله‌ها آشکار ساخت. اقبال و همکاران (۱۲) تکنیک RAPD را برای ارزیابی تنوع ژنتیکی تعدادی از واریته‌های تجاری پنبه به کار بردند همچنین هوف و همکاران (۱۰) از این تکنیک برای مطالعه تنوع ژنتیکی در ارقام چاودار استفاده کردند. در مطالعات دیگر نیز (۶، ۹، ۲۳ و ۲۵) این روش ابزار با ارزشی برای مطالعه و شناسایی تنوع ژنتیکی شناخته شده است.

با توجه به اهداف مورد مطالعه و همچنین امکانات در دسترس در این مطالعه از نشانگرهای مولکولی RAPD برای مطالعه تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌ها و ژرم‌پلاسم‌های مختلف گلرنگ و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها و مقایسه گروه‌بندی‌ها بر اساس مولکولی با گروه‌بندی‌ها بر اساس نشانگرهای مورفولوژیکی استفاده شد. لازم به ذکر است که بر اساس بررسی منابع مطالعه

1 . Verticillium dahliae

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد





شکل ۱- نوارهای DNA ارقام مختلف گلرنگ
الف- مربوط به آغازگر ۸۹ که فراوانی نوار بیشتری نشان می‌دهد.
ب- مربوط به آغازگر ۹۶ که فراوانی نوار کمتری نشان می‌دهد.

مولکولی RAPD بر روی گیاه گلرنگ برای اولین بار انجام شده و مقاله‌ای در این زمینه دیده نشده است و این تحقیق می‌تواند نقطه شروعی برای تحقیقات مولکولی وسیعتر در این زمینه باشد.

مواد و روشها

در این تحقیق ۲۸ ژنوتیپ گلرنگ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران مورد ارزیابی قرار گرفت. جدول ۱ اسامی ژنوتیپ‌ها و منشاء آنها را نشان می‌دهد. برای استخراج DNA از لپه‌های چندین بذر به صورت مخلوط[1] مطابق روشی که توسط دلاپورتا و همکاران (۶) تصحیح شده بود، استفاده شد که بهترین زمان برای گرفتن نمونه حدود ۹-۷ روز پس از جوانه‌زنی بود. برای بررسی کیفیت و کمیت DNA از دستگاه اسپکتروفتومتر و مطالعه طیف جذبی DNA در طول موجهای ۲۶۰ و ۲۸۰ استفاده شد. نمونه‌هایی که دارای نسبت جذب اشعه ماوراء بنفش $\frac{260}{280}$ حدود ۱/۸ تا ۲ بودند برای PCR انتخاب شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در دستگاه ترموسایکلر فارماسیا انجام گرفت که شامل: تغییر طبع اولیه[2] ۹۴ °c (۲ دقیقه)، [تغییر طبع ۹۲ °c (۱ دقیقه)، اتصال[3] ۳۵ °c (۱ دقیقه)، بسط[4] ۷۲ °c (۲ دقیقه) که سه مرحله حاضر ۴۵ دور برنامه‌ریزی شده است]، بسط نهایی[5] ۷۲ °c (۵ دقیقه)، تعداد ۱۰۰ آغازگر از دسته ۱۰۰-۱ (جدول ۲) با توالی اختیاری از دانشگاه برتیش کلمبیا[6] بکار رفت و سایر مواد لازم از شرکت سیناژن تامین شد. حجم واکنش PCR برای یک نمونه ۲۵ میکرولیتری شامل ۲۲/۱۳ میکرولیتر آب، بافر واکنش (۱۰x) ۲/۵ میکرولیتر، نوکلئوتیدها ۳/۵ میکرولیتر به غلظت ۰/۱ میلی‌مول از هر کدام، کلرید منیزیم (به غلظت ۰/۹۵ میلی‌مول) ۰/۵۷ میکرولیتر، آغازگر ۱ میکرولیتر با غلظت ۰/۲ میکرومول و آنزیم تک پلیمراز ۰/۲ میکرولیتر با غلظت ۱-۰/۸ واحد بود. به هر تیوب ۳۰ میکرولیتر روغن معدنی جهت جلوگیری از تبخیر اضافه شد. الکتروفورز نمونه‌ها با دستگاه الکتروفورز Bio-Rad و به وسیله ژل پلی اکریل آمید ۶٪ با ابعاد ۱۶×۲۰ سانتی‌متر و با ولتاژ ثابت ۲۰۰ ولت به مدت ۲/۵ ساعت انجام شد و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید زیر نور UV عکس‌برداری شد و سپس نتایج مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

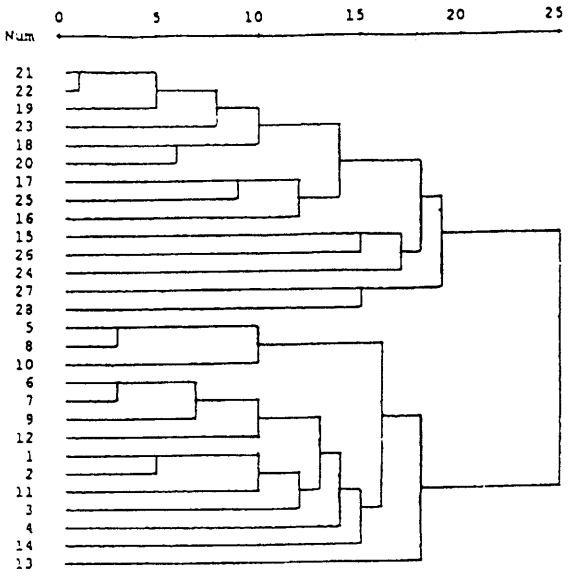
برای تجزیه آماری داده‌ها به روش میانگین از ضریب تشابه جاکارد و فاصله اقلیدسی استفاده شد (۶، ۱۴، ۲۰ و ۲۱) و دندروگرام بر اساس روش UPGMA رسم گردید. همچنین به

1 . bulk
2 . initial denature
3 . annealing
4 . extension
5 . Final extension
6 . The University of British Columbia

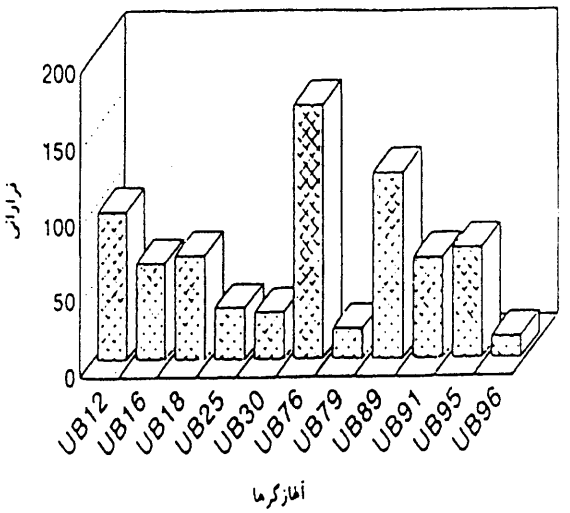
جدول ۱- اسامی ژنوتیپ‌ها و منشاء آنها

شماره رقم	نام رقم	منشأ	شماره رقم	نام رقم	منشأ
۱	اصفهان ۵	ایران	۱۷	محلی ۱ تبریز	ایران
۲	مراغه	ایران	۱۸	Rancho	FAO
۳	آذربایجان ۹	ایران	۱۹	NS1016	FAO
۴	مهریز	ایران	۲۰	FO2	چین
۵	کردستان	ایران	۲۱	Aceteria	FAO
۶	آق کند میانه	ایران	۲۲	Tomejic	"
۷	ترکمنچای	ایران	۲۳	295	ایران
۸	نیشاپور	ایران	۲۴	279	ایران
۹	مرند	ایران	۲۵	K.A.72	FAO
۱۰	کرمان	ایران	۲۶	LRV5151	"
۱۱	جیرفت	ایران	۲۷	وحشی کرج*	ایران
۱۲	تفت	ایران	۲۸	وحشی داراب*	ایران
۱۳	سربند	ایران			
۱۴	اردکان	ایران			
۱۵	تفرش	ایران			
۱۶	کردستان	ایران			

* منظور گونه وحشی *C. oxyacantha* است.



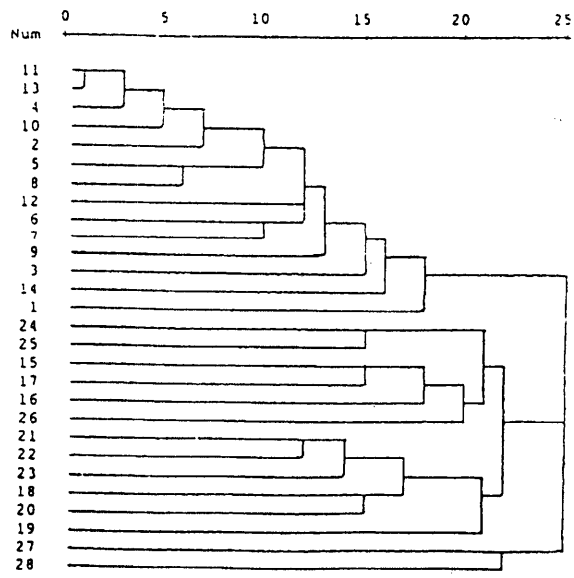
شکل ۳- دندروگرام فاصله ژنتیکی ۲۸ ژنوتیپ بر مبنای ضریب تشابه جاکارد



شکل ۲- فراوانی نوارها در هر آغازگر

جدول ۲- آغازگرهای مورد استفاده و توالیهای نوکلئوتیدی آنها

UB PRIMERS		
1)CCTGGGCTTC	34)CCGGCCCCAA	67)GAGGGCGAGC
2)CCTGGGCTTG	35)CCGGGGTTAA	68)GAGCTCGCGA
3)CCTGGGCTTA	36)CCCCCCTTAG	69)GAGGGCAAGA
4)CCTGGGCTGG	37)CCGGGGTTTT	70)GGGCACGCGA
5)CCTGGGTTCC	38)CCGGGGAAAA	71)GAGGGCGAGG
6)CCTGGGCCTA	39)TTAACCGGGC	72)GAGCACGGGA
7)CCTGGGGGTT	40)TTACCTGGGC	73)GGGCACGCGA
8)CCTGGCGGTA	41)TTAACCGGGG	74)GAGCACCTGA
9)CCTGCGCTTA	42)TTAACCCGGC	75)GAGGTCCAGA
10)GGGGGGATTA	43)AAAACCGGGC	76)GAGCACCAGT
11)CCCCCCTTTA	44)TTACCCCGGC	77)GAGCACCAGG
12)CCTGGGTCCA	45)TTAACCCCGG	78)GAGCACTAGC
13)CCTGGGTGGA	46)TTAAGGGGGC	79)GAGCTCGTGT
14)CCTGGGTTTC	47)TTCCCCAAGC	80)GTGCTCTAGA
15)CCTGGGTTTG	48)TTAACGGGGA	81)GAGCACGGGG
16)GGTGGCGGGA	49)TTCCCCGAGC	82)GGGCCCGAGG
17)CCTGGGCCTC	50)TTCCCCGCGC	83)GGGCTCGTGG
18)GGGCCGTTTA	51)CTACCCGTGC	84)GGGCGCGAGT
19)GCCCGGTTTA	52)TTCCCGGAGC	85)GTGCTCGTGC
20)TCCGGGTTTG	53)CTCCCTGAGC	86)GGGGGGAAGG
21)ACCGGGTTTC	54)GTCCCAGAGC	87)GGGGGGAAGC
22)CCCTTGGGGG	55)TCCCTCGTGC	88)CGGGGGATGG
23)CCCGCCTTCC	56)TGCCCCGAGC	89)GGGGGCTTGG
24)ACAGGGGTGA	57)TTCCCCGAGG	90)GGGGGTTAGG
25)ACAGGGCTCA	58)TTCCCGGAGC	91)GGGTGGTTGC
26)TTTGGGCCCA	59)TTCCGGGTGC	92)CCTGGGCTTT
27)TTTGGGGGGA	60)TTGGCCGAGC	93)GGGGGGAAAG
28)CCGGCCTTAA	61)TTCCCCGACC	94)GGGGGGAACC
29)CCGGCCTTAC	62)TTCCCCGTCG	95)GGGGGGTTGG
30)CCGGCCTTAG	63)TTCCCCGCCC	96)GGCGGCATGG
31)CCGGCCTTCC	64)GAGGGCGGGA	97)ATCTGCGAGC
32)GGGGCCTTAA	65)AGGGGCGGGA	98)ATCCTGCCAG
33)CCGGCTGGAA	66)GAGGGCGTGA	99)ATCCCCTGGG
		100)ATCGGGTCCG



شکل ۴- دندروگرام فاصله ژنتیکی برای ۲۸ رقم بر مبنای فاصله اقلیدسی

کمک صفات مورفولوژیکی (جدول ۳) نیز دندروگرام بر اساس فاصله اقلیدسی و به روش UPGMA تهیه شد.

جدول ۳- صفات مورفولوژیکی اندازه‌گیری شده

A: تعداد روز تا رسیدگی فیزیولوژیک	I: تعداد روز تا اولین گلدهی
B: ارتفاع بوته	J: تعداد روز تا ۵۰ درصد گلدهی
C: قطر غوزه	K: محتوای پروتئین کنجاله
D: تعداد دانه در غوزه	L: محتوای پروتئین دانه
E: تعداد غوزه در بوته	M: وزن هزار دانه
G: محتوای روغن	N: عملکرد تک بوته
H: وزن دانه‌های یک غوزه	

نتایج و بحث

واکنش RAPD با ۲۸ ژنوتیپ انجام شد. فرآورده‌های تکثیر سطح بالایی از چند شکلی را در ژنوتیپ‌ها نشان داد (شکل ۱). ۱۱ آغازگر از تعداد کل آغازگرها نوارهای بلی مورفیک مشخصی تولید کرد و تعداد کل نوارهایی که توسط این آغازگرها تولید شد ۷۶۰ نوار بود که از آن تعداد ۲۸۳ نوار به عنوان مارکر بررسی شد که دارای محدوده ۳۰۰ تا ۲۴۰۰ جفت باز بودند (شکل ۲). این ۱۱ آغازگر UB12، UB16، UB18، UB25 ، UB30، UB76، UB79، UB89، UB91، UB95، UB96 بود. دو آغازگر UB74 و UB78 قطعات یک شکل و نامشخص تولید کردند که حذف شدند.

بر اساس ضریب تشابه جاکارد ژنوتیپ‌ها در فاصله ژنتیکی ۱۷ به ۵ دسته گروه‌بندی شدند (شکل ۳). ارقام خارجی Aceteria، Tomejic، NS1016، Rancho، FO2 ، ۲۹۵، محلی تبریز، کردستان و K.A.72 در یک گروه قرار گرفتند. در گروه دیگر ارقام تفرش LRV_{5151} و ۲۷۹ قرار گرفتند. گروه سوم توده‌های وحشی کرج و داراب و گروه چهارم سایر توده‌های ایرانی به جز سربند بود که گروه پنجم را تشکیل می‌داد. گروه‌بندی توده‌های ایرانی در دسته‌های مختلف کلاستربندی فوق نشان می‌دهد که تطابق خوبی بین تنوع ژنتیکی و تنوع جغرافیایی وجود ندارد. علت این امر احتمالاً این است که اکثر توده‌ها از شهرستانهای مختلف دارای یک منشاء بوده و تنها مهاجرت‌ها و انتقال‌های جغرافیایی موجب نامگذاری متفاوت آنها شده است. ارقام ۲۷۹ و LRV_{5151} پاییزه هستند که در یک گروه قرار می‌گیرند. گروه اول همه تیپ بهاره (به جز ۲۹۵ و K.A.72) است که اکثراً پر روغن و بی‌خار می‌باشند اگر چه ۲۹۵ و K.A.72 پاییزه هستند

ولی از درون توده‌های بهاری انتخاب شده‌اند که این خویشاوندی نسبی آنها را نشان می‌دهد.

توده سربند اگر چه توده ایرانی بوده و مجزا از سایر توده‌ها است ولی نزدیک‌ترین فاصله را با بقیه توده‌های بومی ایران دارد. دندروگرام بیشترین شباهت را بین دو رقم Tomejic و Aceteria نشان می‌دهد که جدول ماتریس ضریب تشابه جاکارد نیز این مطلب را تایید می‌کند.

همان طور که مشاهده شد برای اکثر ارقام ایرانی (گروه چهارم) و ارقام خارجی تفاوت نواری چشمگیری وجود دارد که در این مورد می‌توان در انتخاب لاین‌ها برای دو رگ گیری لاینهایی که دارای تفاوت زیادتری هستند اقدام کرد. لازم به ذکر است که همیشه نمی‌توان بر اساس مبداء جغرافیایی لاین‌ها را برای شرکت در دورگ‌گیری انتخاب کرد و باید با مطالعات ژنتیکی این کار را انجام داد. تلاقی بین ژنوتیپ‌های یک گروه تفرق مطلوبی از نظر صفات و عملکرد نشان نخواهد داد. برای تنظیم برنامه تلاقی باید والدین مشهوری را که از گروه‌های مختلف یک کلاستر هستند انتخاب کرد. هر چه این والدین مشهور و مناسب از هم دورتر باشند، هتروزیس قویتری در نتاج ظاهر خواهد شد. در چنین شرایطی تنوع بیشتر شده و قادر خواهیم بود که مقاومت‌ها و صفات مطلوب را از منابع مختلف در یک رقم جمع کنیم و پایه ژنتیکی ارقام حاصل از نتایج آنها را قویتر نموده و زمینه آسیب‌پذیری ژنتیکی را کاهش دهیم. بدیهی است لاینهایی را که از گروه‌های دور جهت دورگ‌گیری به عنوان والد انتخاب می‌کنیم باید دارای صفات مطلوبی مانند مقاومت به بیماریها، مقاومت به خوابیدگی، عملکرد بالا و سازگاری بیشتر، میزان درصد روغن دهی و غیره باشند.

برای تایید نتایج فوق و همچنین مقایسه این روش با سایر روش‌ها گروه‌بندی ارقام گلرنگ با استفاده از فاصله اقلیدسی نیز انجام گرفت که نتایج فوق را تایید نمود (شکل ۴). مطابق این روش ارقام در فاصله ژنتیکی ۲۲ (مطابق شکل) به چهار گروه تقسیم شده‌اند. در این کلاستر بندی در گروه اول اکثر توده‌های بومی بهاره از مکان‌های مختلف جغرافیایی قرار گرفتند که عدم وجود رابطه بین تنوع ژنتیکی با تنوع جغرافیایی را نشان می‌دهد. در گروه دوم نیز ارقام اصلاح شده پاییزه، محلی ۱ تبریز و کردستان قرار گرفته‌اند و گروه بعدی شامل ارقام خارجی و ۲۹۵ می‌باشد که مشابه با روش کلاستربندی قبلی است. با اینکه توده‌های محلی ۱ تبریز و کردستان جدا از ارقام خارجی قرار گرفته‌اند ولی نزدیکترین گروه‌ها را به آنها تشکیل می‌دهند. در گروه چهارم نیز توده‌های وحشی کرج و داراب قرار دارند و این دو در انتهای کلاستر و جدا از سایر توده‌ها و ارقام زراعی قرار گرفته‌اند. جدول ۴ فاصله ژنتیکی ارقام را بر اساس فاصله اقلیدسی نشان می‌دهد که کمترین فاصله مربوط به ارقام جیرفت و سربند می‌باشد.

کلاستربندی بر اساس صفات مورفولوژیکی نیز برای ۱۳ صفت انجام گرفت. تجزیه کلاستر برای ۲۲ ژنوتیپ بر اساس فاصله اقلیدسی و UPGMA انجام شد (شکل ۵). در گروه اول ژنوتیپ‌های تفرش، محلی ۱ تبریز و کردستان قرار گرفتند که در گروه‌بندی قبلی نیز در یک گروه بودند. این موضوع قرابت و خویشاوندی آنها را نشان می‌دهد. ژنوتیپ‌های کردستان و کردستان ۱ در هر دو دندروگرام در کنار ارقام خارجی گروه‌بندی شدند که این مطلب توسط باقری (۲) نیز تایید شد. در گروه‌های دیگر نیز ژنوتیپ‌های مربوط به نواحی مختلف جغرافیایی قرار دارند که در کلاستربندی قبلی نیز این مطلب تایید و معلوم شد که عدم تطابق بین تنوع ژنتیکی و جغرافیایی وجود دارد که این نتیجه توسط باقری (۲)، یزدی صمدی و عبدمیشانی (۲۷) نیز گزارش شده است. در گروه آخر ژنوتیپ‌های مراغه و میانه از یک منطقه آب و هوایی قرار دارند که در بررسی‌های کیفی (مطالعه مولکولی) نیز این دو در یک گروه قرار داشتند. به طور کلی کلاستربندی بر اساس صفات کیفی و کمی (مورفولوژیکی) تطابق نسبتاً خوبی با هم دارند.

اطلاع از فاصله‌های ژنتیکی می‌تواند در برنامه‌های اصلاحی مخصوصاً در انتخاب والدین برای تلاقیها مفید باشد. روش RAPD ابزار مناسبی درجهت تشخیص تنوع داخل گونه‌ای و روابط ژنتیکی بین گونه‌ای برای استفاده در اصلاح گونه‌ها ارائه می‌دهد.

جدول ۴- فاصله ژنتیکی ارقام بر اساس فاصله اقلیدسی

Case	Squared Euclidean Distance																	
	1	2	3	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1:																		
2:	31.0																	
3:	38.0	33.0																
4:	39.0	28.0	35.0															
5:	47.0	32.0	41.0															
6:	41.0	32.0	39.0	40.0														
7:	44.0	31.0	36.0	35.0	31.0													
8:	48.0	37.0	44.0	25.0	41.0	30.0												
9:	49.0	38.0	41.0	36.0	38.0	33.0	33.0											
10:	42.0	29.0	40.0	29.0	37.0	32.0	28.0	37.0										
11:	31.0	20.0	29.0	28.0	30.0	27.0	29.0	30.0	23.0									
12:	43.0	32.0	37.0	42.0	36.0	33.0	37.0	40.0	31.0	30.0								
13:	39.0	28.0	31.0	28.0	34.0	31.0	29.0	34.0	23.0	18.0	30.0							
14:	41.0	32.0	39.0	38.0	38.0	45.0	43.0	42.0	41.0	34.0	42.0	36.0						
15:	54.0	43.0	50.0	45.0	53.0	48.0	50.0	55.0	46.0	37.0	51.0	35.0	51.00					
16:	62.0	47.0	56.0	51.0	59.0	54.0	54.0	61.0	52.0	43.0	55.0	41.0	55.00	42.0				
17:	62.0	49.0	54.0	49.0	61.0	54.0	52.0	57.0	50.0	43.0	49.0	39.0	51.00	38.0	40.0			
18:	63.0	50.0	57.0	52.0	62.0	55.0	55.0	60.0	51.0	44.0	54.0	44.0	58.00	37.0	47.0	41.0		
19:	66.0	57.0	64.0	57.0	65.0	62.0	62.0	63.0	62.0	51.0	63.0	53.0	61.00	52.0	52.0	50.0	51.00	
20:	60.0	47.0	54.0	49.0	57.0	52.0	50.0	57.0	48.0	41.0	51.0	41.0	53.00	46.0	48.0	46.0	37.00	46.0
21:	64.0	49.0	56.0	47.0	61.0	54.0	48.0	57.0	48.0	43.0	53.0	41.0	55.00	48.0	48.0	40.0	45.00	44.0
22:	57.0	46.0	57.0	44.0	56.0	47.0	47.0	56.0	49.0	42.0	56.0	42.0	58.00	47.0	45.0	43.0	42.00	41.0
23	61.0	46.0	55.0	48.0	54.0	49.0	49.0	56.0	47.0	40.0	50.0	40.0	52.00	45.0	47.0	39.0	44.00	45.0
24	54.0	43.0	52.0	47.0	57.0	50.0	50.0	55.0	46.0	39.0	51.0	39.0	51.00	42.0	46.0	50.0	45.00	52.0
25:	59.0	44.0	53.0	50.0	58.0	55.0	55.0	60.0	51.0	42.0	50.0	42.0	56.00	49.0	45.0	39.0	48.00	53.0
26:	56.0	45.0	52.0	49.0	57.0	52.0	54.0	55.0	48.0	41.0	53.0	41.0	51.00	40.0	46.0	46.0	49.00	54.0
27:	67.0	54.0	57.0	48.0	62.0	53.0	57.0	58.0	47.0	44.0	54.0	42.0	62.00	49.0	51.0	51.0	52.00	61.0
28:	62.0	47.0	56.0	45.0	51.0	50.0	48.0	55.0	44.0	39.0	49.0	41.0	55.00	48.0	52.0	50.0	47.00	58.0

Case	Squared Euclidean Distance								
	20	21	22	23	24	25	26	27	28
1:									
2:									
3:									
4:									
5:									
6:									
7:									
8:									
9:									
10:									
11:									
12:									
13:									
14:									
15:									
16:									
17:									
18:									
19:									
20:									
21:	36.0								
22:	39.0	33.00							
23	37.0	35.00	38.00						
24	48.0	44.00	47.00	45.0					
25:	43.0	45.00	52.00	44.0	37.0				
26:	50.0	52.00	49.00	47.0	42.0	47.0			
27:	51.0	53.00	52.00	50.0	49.0	58.0	49.00		
28:	46.0	50.00	51.00	43.0	48.0	45.0	50.00	47.00	

REFERENCES

مراجع مورد استفاده

۱. باقری، ا. ۱۳۷۷. بررسی تنوع ژنتیکی در جمعیت‌های بومی گلرنگ ایران. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی. دانشگاه تهران.

۲. قره یاضی، ب. ۱۳۷۵. کاربرد نشانگرهای دی آن آ در اصلاح نباتات. چهارمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران.

3. Bustos, A. B., C. Casanova, C. Soler, N. Jeuve. 1998. RAPD variation in wild populations of four species of the genus Hordeum (Poaceae). Theor. Appl. Genet. 96: 101-111.
4. Callow, J. A., B. V. Ford – Loyd, H. J. Newbury. 1997. Biotechnology and Plant Genetic Resources. Conservation and Use. CAB international.
5. Chan, K. F., M. Sun. 1997. Genetic diversity and relationships detected by isozyme and RAPD analysis of crop and wild species of Amaranthus. Theor. Appl. Genet. 95: 865-873.
6. DellaPorta, S. L., J. Wood and J. B. Hicks 1983. A Plant DNA minipreparation, version 11. Plant mol. Biol. Rep. 1: 19-21.
7. Gunter, L. E., G. A. Tuskan, S. D. Wullsch Leger. 1996. Diversity among Populations of switgrass based on RAPD markers. Crop Sci. 39: 1017-1022.
8. Huff, D. R. 1997. RAPD characterization of heterogeneous perennial ryegrass cultivars. Crop Sci. 37: 557-594.
9. Hu, J., C. F. Quiros. 1991. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. Plant Cell Reports. 10: 505-511.
10. Iqbal, M. J., N. Aziz, N. A. Saeed, Y. Zafar, K. A. Malik. 1997. Genetic diversity evaluation of some elite cotton varieties by RAPD analysis. Theor. Appl. Genet. 94: 139-144.
11. Kato, K., & H. Yokoyama . 1992. Geographical variation in heading characters among wheat landraces, Triticum aestivum L., and its implication for their adaptability. Theor. Appl. Genet. 84: 259-265.
12. Link, W., C. Dixkens, M. Singh, M. Schwall. 1995. Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germplasm revealed by RAPD markers. Theor. Appl. Genet. 90: 27-32.
13. Loarce, Y., R. Gallego, E. Ferrer. 1996. A comparative analysis of the genetic relationships between rye cultivars using RFLP and RAPD markers. Euphytica. 88: 107-115.
14. Lu, R., G. H. Rank. 1996. Use of RAPD analyses to estimate population genetic parameters in the alfalfa leaf – cutting bee Megachile rotundata. Genome 39: 655-663.
15. Ramsay, J. R., D. S. Multani, B. R. Lyen. 1996. RAPD – PCR identification of Verticillium dahliae isolates with differential Pathogenecity on cotton. Aust. J. Agrc. Res. 47: 681-693.
16. Santalla, M., J. B. Power, M. R. Davey. 1988. Genetic diversity in mung bean germplasm revealed by RAPD markers. Plant Breeding 117: 473-487.
17. Tatineni, V., R. G. Cantrell, D. D. Davis. 1996. Genetic diversity in Elite cotton germplasm determined by morphological characteristics and RAPDS. Crop Sci. 36: 186-192.
18. Thormann, C. E., M. E. Ferreira, L. E. A. Camargo. 1994. Comparision of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. Theor. Appl. Genet. 88: 973-980.
19. Virk, P. S., B. V. Ford – Loyd, M. T. Jackson, H. S. Pooni, T. P. Clemeno H. J. Newbury. 1996. Prediction of quantitative variation within rice germplasm using molecular markers. Heredity 76: 296-304.
20. Wachira, F. N., R. Waugh, C. A. Hackett, W. Powell. 1995. Detection of genetic diversity in tea (Camellia Sinensis) using RAPD markers. Genome 38: 201-210.
21. Waugh, R., W. Powell. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. Trends in Biotechnology 10: 186-191.
22. Welsh, J., C. Peterson, M. McClelland . 1991. Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse application to strain identification and genetic mapping. Nucleic Acid Research 19: 303-306.
23. Williams, J. G. K, A. R. Kubelik, K. A. Livak, J. A. Rafalski, S. V. Tingey. 1990. DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful are useful as genetic markers. Nucleic Acids. Res. 18: 6531-6535.
24. Yang, X., C. F. Quiros. 1995. Characterizing the celery genome with DNA – based genetic markers. J. Am. Soc. Hort. Sci. 120: 747-751.
25. Yazdi-Samadi, B. and C. Abd- Mishani. 1991. Cluster analysis in Safflower. Proceeding of Indian Society of Oilseed Research 119-126.

Detection of DNA Polymorphism in Landrace Populations of Safflower in Iran Using RAPD-PCR Technique

R. MAALI AMIRI[1], B. YAZDI-SAMADI[2], M.R.GHANADHA[3] AND C. ABD-MISHANI[4]

1,2,3&4- Former Graduate Student, Professor, Associate Professor and Professor, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran.

Accepted. May.9, 2001

SUMMARY

RAPD technique was used to detect genetic diversity of 28 safflower genotypes including Iranian landraces, wild and several exotic genotypes. One hundred random decamer primers were used in amplification reactions. Eleven of the primers produced polymorphic bands. In general, 283 RAPD markers were found. Amplified DNA fragments ranged in size from 300 to 2400 bp. Jaccard's similarity coefficient and Euclidean distances were used to produce a cluster diagram by means of the unweighted pair – group method with arithmetic averages (UPGMA). Cluster analysis divided the genotypes into 5 clusters, using Jaccard's similarity cofficient. Cluster consisted of exotic genotypes, Iranian landraces, wild genotypes, winter and Sarband types. To confirm the above phenogram, cluster analysis was used based on Euclidean distance method and the UPGMA algorithm. It was found that both techniques produced similar results. In both cases, no relationship was found between genetic and geographical diversity. The clusters based on RAPD markers correlate fairly well with classification scheme based on morphological traits. In clusters, produced by both techniques, some landraces and exotic genotypes are classified together within one group. The approach used holds promise for the classification of safflower germplasm, identification of safflower landraces and its wild relatives as well as application of molecular markers in safflower breeding programs. It is suggested that RAPD marker is useful to study DNA polymorphism in safflower.

Key word: Safflower, DNA, PCR, RAPD.