

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

علی اکبر 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 کاملاً 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 (۷۰۴ / الی ۰/۸۹۹) نسبت به RAPD (۰/۵۶۱ الی ۰/۸۵۴) بالاتر برآورد گردید و مکان‌های ژنی بسیار زیادتری در DAF آشکار گشت. داده‌های حاصل از روش DAF و داده‌های توأم 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 کاملاً 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، RAPD و DAF.

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 برگزیده فنونی نظیر RFLP^۱، RAPD^۲، SSR^۳ و DAF^۴ 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 DNA است (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 Length Polymorphism
2. Random Amplified Polymorphic DNA
3. Simple Sequence Repeat
4. DNA amplification Fingerprinting

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 مجموعاً 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 کارایی 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 که 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

سه روش مذکور در خصوص برآورد تنوع ژنتیکی از کارایی لازم برخوردارند. پجیک و همکاران (۱۹۹۸)، ۳۳ اینبرد لاین ذرت را با چهار روش RAPD، RFLP، SSR و AFLP مقایسه و گروه‌بندی نمودند. هالدن و همکاران (۱۹۹۴) با ارزیابی نشانگرهای RAPD و RFLP 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.

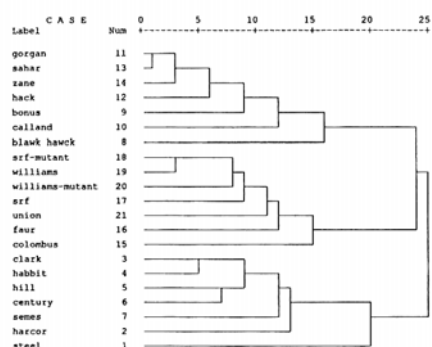
استخراج و تکثیر DNA

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^۱ 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 پلی‌اکریلامید ۱۰٪ با ضخامت ۰/۴۵ میلی‌متر که

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

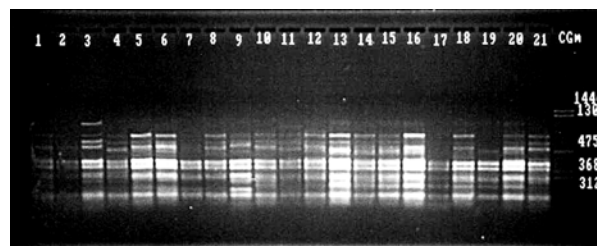
	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸	۱۹	۲۰
یونیون(۱۸)	۵۹/۰	۰/۸۰	۵۹/۰	۰/۸۰	۵۹/۰	۰/۸۰	۵۹/۰	۰/۸۰	۵۹/۰	۰/۸۰	۵۹/۰	۰/۸۰	۵۹/۰	۰/۸۰	۵۹/۰	۰/۸۰	۵۹/۰	۰/۸۰	۵۹/۰	۰/۸۰
ویلیامز-م(۲۰)	۱۲/۰	۶۳/۰	۱۸/۰	۵۹/۰	۳۷/۰	۳۷/۰	۳۷/۰	۳۷/۰	۳۷/۰	۳۷/۰	۳۷/۰	۳۷/۰	۳۷/۰	۳۷/۰	۳۷/۰	۳۷/۰	۳۷/۰	۳۷/۰	۳۷/۰	۳۷/۰
ویلیامز(۱۹)	۱۸/۰	۰/۸۰	۶۳/۰	۱۲/۰	۳۷/۰	۳۷/۰	۳۷/۰	۳۷/۰	۳۷/۰	۳۷/۰	۳۷/۰	۳۷/۰	۳۷/۰	۳۷/۰	۳۷/۰	۳۷/۰	۳۷/۰	۳۷/۰	۳۷/۰	۳۷/۰
اس.آر.آف-م(۱۸)	۶۴/۰	۱۸/۰	۵۹/۰	۰/۸۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰
اس.آر.آف(۱۷)	۱۲/۰	۶۳/۰	۱۸/۰	۵۹/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰
فار(۱)	۳۷/۰	۵۹/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰
کلیموس(۵۱)	۵۹/۰	۰/۸۰	۶۳/۰	۱۲/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰
زان(۱۴)	۱۸/۰	۰/۸۰	۶۳/۰	۱۲/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰
سحر(۳۱)	۱۶/۰	۰/۸۰	۶۳/۰	۱۲/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰
هاک(۲۱)	۱۸/۰	۰/۸۰	۶۳/۰	۱۲/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰
گرگان(۱۱)	۳۷/۰	۱۸/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰
کلاک(۱۰)	۳۳/۰	۵۹/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰
بونوس(۶)	۰/۸۰	۵۹/۰	۰/۸۰	۵۹/۰	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰
پلاک‌هاک(۸)	۳۷/۰	۳۷/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰
سمس(۷)	۱۸/۰	۰/۸۰	۶۳/۰	۱۲/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰
سنجری(۶)	۵۹/۰	۰/۸۰	۶۳/۰	۱۲/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰
هیل(۵)	۰/۸۰	۳۷/۰	۰/۸۰	۳۷/۰	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰	۰/۸۰
کلاک(۳)	۳۵/۰	۰/۸۰	۶۳/۰	۱۲/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰
هاییت(۴)	۳۵/۰	۰/۸۰	۶۳/۰	۱۲/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰
هارکور(۲)	۳۵/۰	۰/۸۰	۶۳/۰	۱۲/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰	۳۳/۰
ژنوتیپ	۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸	۱۹	۲۰



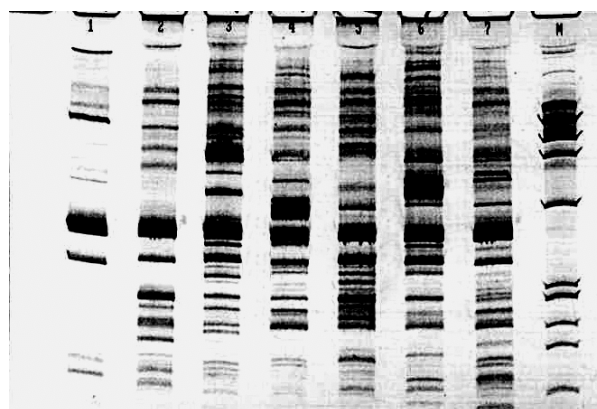
شکل ۵- دندوگرام ۲۱ رقم سویا بر اساس دو نشانگر RAPD و DAF

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) مجدداً تایید شده است. حداقل رابطه خویشاوندی در روش DAF بین استیل و یونیون (۰/۷۰۴) است که تقریباً این حداقل رابطه در تجزیه توأم داده‌های هر دو روش (۰/۶۹۴) نیز کاملاً مشهود است. همان‌طور که از شکل‌های ۴ و ۵ پیداست داده‌های حاصل از روش DAF داده‌های توأم دو روش ارقام را به نحو مطلوب‌تری دسته‌بندی کرده‌اند. در هر دو دندوگرام سه گروه مشخص قابل رؤیت است. در کلاستر اول ارقام ایرانی سحر و گرگان، هک، زان، یونوس، 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.

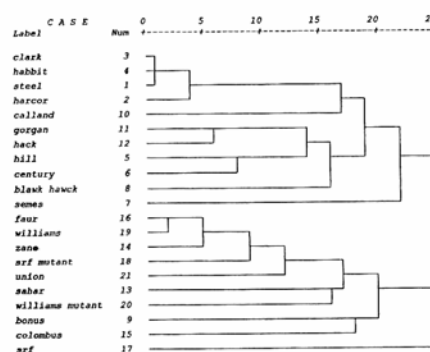
ابزارهای ژنتیکی مولکولی، تجزیه و تحلیل‌های گیاهی را غنای خاصی بخشیده است. روش‌هایی که DNA را بر اساس آغازگرهای اختیاری (RAPD و DAF) تکثیر می‌کنند کارآیی PCR را در تجزیه و تحلیل عملی ژنوم‌ها توسعه داده است. DAF با توجه به اینکه از آغازگرهای کوتاه‌تری استفاده می‌کند و در ژل آن اوره به کار می‌رود و رنگ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



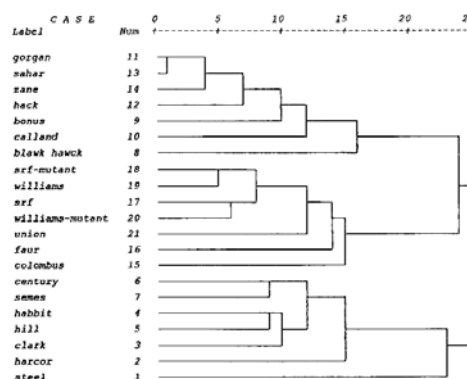
شکل ۱- نمونه‌ای از ژل RAPD با آغازگر نوکلئوتیدی UBC82



شکل ۲- نمونه‌ای از ژل DAF با آغازگر ریز سنچاقی B7



شکل ۳- دندوگرام ۲۱ رقم سویا بر اساس نشانگرهای RAPD



شکل ۴- دندوگرام ۲۱ رقم سویا بر اساس نشانگرهای DAF

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 کاملاً 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.

است و همچنین بر خلاف RAPD در آن نسبت غلظت مولاری آغازگر/الگو در واکنش بالا است، با تولید تعداد زیادی نشانگر عملاً تعداد نامحدودی مکان ژنی را آشکار می‌کند. الگوهای نواری DAF کاملاً مطمئن و فارغ از تولید نوارهای غیر واقعی است. در پژوهشها، آغازگرهای ریزسنجاقی به نحو مؤثری در انگشت نگاری قطعات کوچک نظیر فرآورده‌های PCR (۱-۲) 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 (مثلاً گونه یا زیرگونه) افزایش و یا کاهش یابد که در این راستا معمولاً از روشهای مختلف مولکولی با توان‌های متفاوت استفاده می‌شود. در مجموع می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که به کارگیری

REFERENCES

1. Bassam, B. J., G. Caetano – Anoles, and P. Gresshoff. 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., Nilsson, 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 (microsatellite) 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 adopted 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.