

## بررسی تنوع ژنتیکی لاین‌های جهش یافته سویا با قدرت تثبیت ازت بالا با

### استفاده از نشانگر ملکولی RAPD

مهدی یونسی حمزه‌خانلو<sup>۱</sup>، علی ایزدی دربندی<sup>۲\*</sup>، محمد طاهر حلاجیان<sup>۳</sup>، نجات پیرولی  
بیرانوند<sup>۴</sup>، عباس مجدآبادی<sup>۵</sup>

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

۳، ۴ و ۵- به ترتیب مربیان و استادیار پژوهشکده سازمان انرژی اتمی ایران

\*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Aizady@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۳/۲۹)

#### چکیده

در این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی نسل هفتم (M<sub>7</sub>) ۳۳ لاین جهش یافته سویا با تثبیت ازت بالا حاصل از پرتوتایی رقم مادری L17 با اشعه گاما به همراه دو رقم تجاری ویلیامز و کلارک و رقم مادری L17 با استفاده از ۱۰ آغازگر تصادفی RAPD حاصل انجام گرفت که مجموعاً ۱۰۴ باند قابل امتیازدهی بدست آمد. از بین این ۱۰۴ باند ۳۴ باند یک شکل و بقیه (۷۰ باند) چند شکل بودند. برای برآورد شباهت بین لاین‌های بررسی شده و ارقام تجاری و مادری از ضریب تشابه جاکارد استفاده شد. میزان تشابه در بین افراد بررسی شده بین ۰/۱۷-۰/۷۹ متغیر بود. بر اساس ماتریس تشابه، لاین جهش یافته شماره ۳۲ (M32) مشابه‌ترین لاین به رقم مادری و لاین جهش یافته شماره ۹ (M9) دورترین لاین جهش یافته نسبت به رقم مادری بود. گروه بندی ژنوتیپ‌ها به روش تجزیه خوشه‌ای و با استفاده از الگوریتم CL (دورترین همسایه) لاین‌ها و ارقام بررسی شده در هفت گروه مختلف قرار گرفتند. با توجه به تنوع بالایی که لاین‌های جهش یافته از خود نشان دادند این لاین‌ها می‌توانند در برنامه‌های آتی اصلاح نباتات برای توسعه ارقام مورد نظر استفاده شوند

#### واژه‌های کلیدی

تنوع ژنتیکی،  
جهش یافته،  
سویا،  
RAPD.

#### مقدمه

سویا (*Glycine max* L.) از گیاهان مهم زراعی و با ارزش‌های فراوان در تأمین نیازهای غذایی بشر است. از این جهت شناسایی منابع ژنتیکی اولیه و تلاش در ایجاد ذخایر ژنتیکی با ارزش جدید می‌تواند رهیافت بسیار مهم اصلاحی باشد. تنوع ژنتیکی به منزله‌ی ماده اولیه فعالیت‌های اصلاح نباتات است و جهش این تنوع ژنتیکی را افزایش می‌دهد. نتایج حاصل از بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای مولکولی نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی در گیاه سویا نسبت به سایر گیاهان محدودتر است. گزارش شده که در هر مکان ژنی سویا معمولاً فقط دو الل چند شکلی طولی قطعات محدود شده (RFLP) وجود دارد (۲، ۳). هنگامی که تنوع ژنتیکی به واسطه استفاده از روش‌های متداول اصلاح نباتات محدود گردد، جهش‌های القائی می‌تواند مهم‌ترین روش برای توسعه تنوع ژنتیکی در مواجهه با شرایط تنگنا باشد.



تکثیر نمود که ۷۰ باند از بین آن‌ها (۶۷ درصد) چند شکل بودند (جدول ۱). میانگین چندشکلی به دست آمده با ۱۰ آغازگر ۶۷ درصد بود. میانگین PIC به دست آمده برابر با ۰/۸۰۱ بود. میزان PIC برای ۱۰ نشانگر بررسی شده بین ۰/۷۴ تا ۰/۸۷ متغیر بود. PIC نه تنها با در نظر گرفتن تعداد ال‌های یک مکان ژنی بلکه با در نظر گرفتن فراوانی نسبی این ال‌ها یک برآوردی از قدرت تمیز هر نشانگر را ارائه می‌کند. مقدار PIC به دست آمده بیانگر قدرت تشخیص بالای آغازگرهای استفاده شده می‌باشد ضریب همبستگی کوفتیک<sup>۳</sup> (بین ماتریس تشابه جاکارد و ماتریس کوفتیک) ۰/۷۸ بود. ضریب همبستگی کوفتیک بالای ۰/۹ نشانه کارایی بالای تجزیه خوشه‌ای می‌باشد. و هرچه ضریب همبستگی کمتر از ۰/۸ باشد نشانگر عدم کارایی مطلوب تجزیه خوشه‌ای می‌باشد ولی در مورد نشانگرهای مولکولی ضریب همبستگی کوفتیک ملاک نیست و معمولاً پایین است (۱۵) لذا ضریب همبستگی کوفتیک به دست آمده در این تحقیق قابل قبول می‌باشد. با توجه به دندروگرام حاصل از روش CL یا دورترین همسایه‌ها (شکل ۱) لاین‌های بررسی شده (لاین‌های جهش‌یافته، ارقام تجاری و رقم والدی L17) در ۷ گروه مختلف قرار گرفتند که ضریب تشابه بین آن‌ها از ۰/۱۷ تا ۰/۷۹ متغیر بود. گروه اول شامل ۱۳ فرد بود که لاین‌های جهش‌یافته در کنار رقم مادری (L17) قرار گرفته بودند. گروه دوم شامل ۱۳ لاین جهش یافته بود.

### <sup>3</sup>Cophenetic correlation

ثابت ۸۰ به مدت ۸۰ دقیقه الکتروفورز گردیدند. ژل‌ها با محلول ۰/۵ میکروگرم/میکرولتر اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شدند و پس از قرار گرفتن در زیر نور فرابنفش (۲۶۰ نانومتر) عکس برداری از آن‌ها انجام گردید. محاسبات آماری برای تجزیه داده‌های حاصل از نشانگر RAPD ابتدا به خاطر کیفی بودن ماهیت آن‌ها ماتریس صفر و یک تشکیل شد. باندهای یک شکل که در تمام افراد تکثیر شده بودند، از تجزیه حذف شدند. ماتریس داده‌ها که در آن ردیف‌ها نماینده لاین‌ها و ستون‌ها نماینده نشانگرها بودند در نرم افزار NTSYS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای محاسبه ماتریس تشابه در اندازه‌گیری شباهت بین ژنوتیپ‌ها از ضریب تشابه جاکارد<sup>۱</sup> استفاده شد. در این تحقیق روش CL<sup>۲</sup> یا دورترین همسایه‌ها برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها به کار برده شد. برای به دست آوردن درصد چند شکلی تعداد قطعات چند شکل بر تعداد قطعات کل تقسیم شد و در عدد ۱۰۰ ضرب گردید. برای محاسبه PIC از فرمول روبرو استفاده شد،  $H_e = 1 - \sum P_i^2$  که  $H_e$  هتروزیگوسیتی مورد انتظار یا همان PIC می‌باشد و  $P_i$  فراوانی آل نام می‌باشد.

### نتایج و بحث

نتایج تکرار واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) نشان داد که در شرایط تکثیری یکسان الگوی باندهای RAPD بطور مشابه خواهد بود. واکنش PCR با ۱۰ آغازگر تعداد ۱۰۴ باند قابل نمره‌دهی را

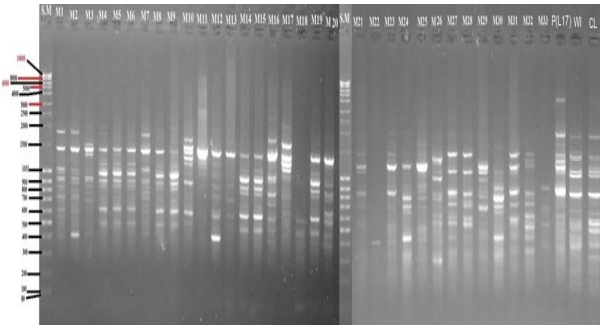
<sup>1</sup> Jaccard

<sup>2</sup> Complete linkage

جدول ۱- درجه چندشکلی و اطلاعات مربوط به آغازگرهای استفاده شده برای لاین‌های بررسی شده

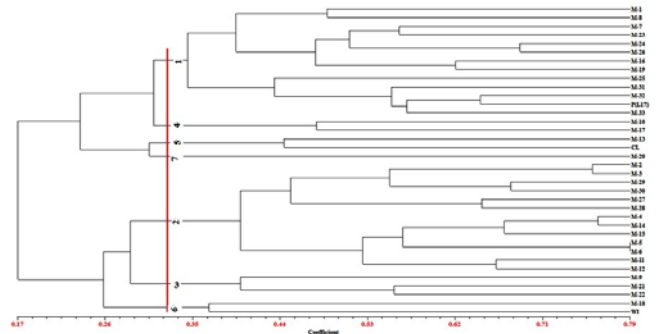
شماره	آغازگر	توالی (۵'-۳')	مجموع قطعات	تعداد قطعات چند شکل	درصد چند شکلی	PIC
۱	OPA-01	CAGGCCCTTC	۶	۵	۸۳	۰/۷۷
۲	OPA-02	TGCCGAGCTG	۱۱	۷	۶۴	۰/۷۹
۳	OPA-03	AGTCAGCCAC	۱۲	۷	۵۸	۰/۸۰
۴	OPA-04	AATCGGGCTG	۹	۴	۴۴	۰/۷۳
۵	OPA-05	AGGGGTCTTG	۱۱	۸	۷۳	۰/۸۷
۶	OPA-07	GAAACGGGTG	۱۲	۱۰	۸۳	۰/۸۳
۷	OPA-08	GTGACGTAGG	۱۱	۹	۸۲	۰/۸۶
۸	OPA-09	GGGTAACGCC	۱۱	۷	۶۴	۰/۸۰
۹	OPA-10	GTGATCGCAG	۱۰	۶	۶۰	۰/۷۴
۱۰	OPA-11	CAATCGCCGT	۱۱	۷	۶۴	۰/۸۲
			۱۰۴	۷۰	۶۷	۰/۸۰۱

کدام از آغازگرها بین ۶ (OPA-01) تا ۱۲ باند (OPA-03, OPA-) متغیر بود که میانگین باندها ۱۰/۴ باند برای هر آغازگر بود. این نتیجه تقریباً با نتایج وایوز و پاول (۱۶) مطابقت دارد که نشان داده بودند اکثر آغازگرهای ۱۰ تایی در گیاهان قادر به تولید ۲ تا ۱۰ محصول تکثیری مختلف هستند.



شکل ۲- الگوی بانندی برای لاین‌های جهش یافته (M1-M33)، رقم مادری (P) و ارقام تجاری ویلیامز (WI) و کلارک (CL) حاصل از آغازگر OPA-09. S.M نشان دهنده نشانگر اندازه می‌باشد با توجه به شکل رقم مادری (P) شامل بانندی می‌باشد که در لاین‌های جهش یافته حذف شده است.

با توجه به دندروگرام CL و تنوع بانندی موجود، تفکیک لاین‌های جهش یافته از ارقام تجاری (ویلیامز و کلارک) و رقم مادری (L17) و قرار گرفتن آن‌ها در هفت گروه مختلف می‌تواند به واسطه جهش (حذف یا اضافه شدن) در مکان‌های اتصال آغازگرها باشد. بر اساس شکل (۲) در محصول PCR رقم مادری حاصل از آغازگر OPA09 بانندی حدود ۳ کیلو باز به‌طور انحصاری دیده می‌شود که این باند در سایر لاین‌های جهش یافته وجود ندارد و حذف شده است. همسانه‌سازی و تعیین توالی این فراورده و معرفی آن به‌عنوان یک نشانگر<sup>۱</sup> SCAR می‌تواند مناسب باشد. این نشانگر را جهت شناسایی رقم والدی از لاین-های جهش یافته به راحتی می‌توان استفاده کرد. افزون بر این تعیین توالی و جستجوی مشابهت‌های آن در بانک اطلاعاتی می‌تواند مقدمه‌ای برای بررسی‌های تکمیلی ژنتیک برگشتی و تعیین نقش احتمالی آن باشد. در این بررسی با استفاده از ۷۰ باند چند شکل امتیازبندی ژنوتیپ‌ها انجام شد. تنوع موجود در شدت باندها و حذف برخی از باندها می‌تواند با میزان باند تولید شده از



شکل ۱- دندروگرام CL برای ۳۳ لاین جهش یافته، دو رقم تجاری ویلیامز (WI) و کلارک (CL) و رقم مادری (P) بر اساس نشانگرهای RAPD

گروه سوم و چهارم هر کدام به ترتیب شامل سه و دو لاین جهش یافته بود. گروه پنجم شامل رقم تجاری کلارک (CL) و لاین جهش یافته شماره ۱۳ (M13) بود. گروه ششم شامل رقم تجاری ویلیامز (WI) و لاین جهش یافته شماره ۱۸ (M18) بود. گروه هفتم فقط شامل لاین جهش یافته شماره ۲۰ (M20) بود. با توجه به ماتریس تشابه جاکارد لاین جهش یافته شماره ۳۲ (M32) با ضریب تشابه ۰/۶۴۳ مشابه‌ترین لاین به رقم مادری (L17) بود. لاین جهش یافته شماره ۹ (M9) که در گروه سوم قرار گرفته است با ضریب تشابه ۰/۲۶۲ دورترین لاین جهش یافته نسبت به رقم مادری (L17) بود. در بین لاین‌های بررسی شده لاین‌های جهش یافته شماره ۵ (M5) و شماره ۶ (M6) با ضریب تشابه ۰/۷۹۴ و لاین جهش یافته شماره ۹ (M9) و رقم تجاری کلارک (CL) با ضریب تشابه ۰/۱۷۵، به ترتیب مشابه‌ترین و دورترین (متفاوت‌ترین) لاین‌ها نسبت به هم دیگر بودند. با اینکه لاین‌های جهش یافته با استفاده صفات مورفولوژیکی قابل شناسایی از لاین مادری و ارقام تجاری هستند ولی در مواردی که تعداد افراد زیاد است و اثرات محیطی وجود دارد، می‌تواند باعث ایجاد محدودیت‌هایی شود. استفاده از نشانگرهای مولکولی به عنوان روش جایگزین می‌تواند بر این مشکل فائق آید. القاء جهش با استفاده از اشعه‌های یونزا با اثرات متقابل اشعه با گیاه شروع می‌شود. تغییر ژنتیکی با استفاده از اشعه‌های یونزا بواسطه یونیزاسیون و تحریک مولکول DNA ایجاد می‌شود. اشعه‌های یونزا بر روی مواد وراثتی دو اثر دارد: جهش ژنی و شکست کروموزومی. القاء جهش با افزایش تنوع ژنتیکی مرتبط می‌باشد و در برنامه‌های اصلاح نباتات به کار می‌رود. تعداد باندهای تولید شده توسط هر

<sup>۱</sup> SCAR: Sequence Characterized Amplified Region

DNA الگو بعد از جهش، در ارتباط باشد که تعداد مکان‌های اتصال آنزیم Taq پلیمرز را تغییر می‌دهد. ظهور باندهای جدید معمولاً به واسطه تغییرات ساختاری (شکست، جابجایی، حذف و ...) DNA می‌باشد. راینا و همکاران (۱۷) گزارش کردند که چندشکلی نشانگر RAPD در اکوتیپ‌های مختلف مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی بادام زمینی ۴۲/۷ درصد می‌باشد که این تنوع به واسطه جهش در DNA هسته‌ای می‌باشد. سوفرامانین و همکاران (۱۸) جهش‌های حذفی و اضافه شده بیشتری را در بلک گرم<sup>۱</sup> در مقایسه با رقم مادری مشاهده کردند که لاین‌های جهش یافته با استفاده از اشعه گاما ایجاد شده بودند. نتیجه مشابه نشان داد که جهش یافته‌ها نسبت به والدین باندهای بیشتری را نشان دادند (۱۹). پرتوتابی اشعه گاما منجر به افزایش شکست‌ها در DNA می‌شود. این شکست‌ها می‌تواند با استفاده از تغییرات در الگوهای باندهای RAPD شناسایی شوند (۱۳). مکان‌های RAPD تنوع زیادی از الگوی باندهای DNA را نشان دادند به طوری که ۲۷ درصد تغییرات حاصل ناشی از دو آغازگر OPA-07 و OPA-08 بود. وجود چنین تنوعی در بین این لاین‌ها و ارقام تجاری و مادری نشان دهنده پتانسیل بالای اشعه‌های یونزا برای ایجاد تنوع در گیاهانی مانند سویا می‌باشد. همان‌طوری که قبلاً مشخص شده بود این لاین‌ها از نظر تثبیت ازت نسبت به رقم مادری برتری داشته‌اند (۱) و لذا دستیابی به تنوع ژنتیکی و اثبات این تنوع (تنوع بین لاین‌های جهش یافته و رقم تجاری) می‌تواند مسیر روشنی را برای بهره‌برداری هرچه بیشتر و کاربردی‌تر این لاین‌ها در پیش روی اصلاح‌گران قرار دهد تا با دیدی بازتر و روشن‌تر به استفاده از این لاین‌ها بپردازند. در این ارتباط محققان مختلفی از این ابزار برای سنجش تنوع القا شده توسط اشعه گاما استفاده کرده‌اند تا بتوانند نحوه تأثیر و میزان تنوع القا شده را با استفاده از گروه بندی افراد و سنجش میزان دوری افراد نسبت به رقم مادری بسنجند و در نهایت از آن‌ها برای اهداف مختلف بهره ببرند (۲۰، ۲۱، ۶، ۱۲). تنوع الگوی باندهای حاصل از آغازگرهای تصادفی که بین لاین‌های جهش یافته و

<sup>۱</sup> Black gram

مادری وجود داشت نشان دهنده وجود تنوع ژنتیکی مشخص آن-هاست. یعنی جهش در نقاط اتصال این آغازگرها تغییراتی ایجاد کرده است که منجر به تفاوت محصولات PCR تولید شده از لاین‌های جهش یافته و مادری شده است. تجزیه خوشه‌ای بر اساس نشانگر RAPD به خوبی این تنوع و اختلاف را نشان داد و گروه لاین‌های جهش یافته را از رقم مادری و ارقام تجاری جدا کرد. تجزیه خوشه‌ای بر اساس نشانگر ژنتیکی تنوع موجود بین لاین‌های جهش یافته، تجاری و رقم مادری را آشکار ساخت. این تحقیق نشان داد که نشانگرهای مولکولی مانند RAPD برای بررسی تنوع ژنتیکی لاین‌های جهش یافته مناسب می‌باشد زیرا تجزیه خوشه‌ای با استفاده از نشانگر RAPD باعث تفکیک گروه-های زیادی شد. نشانگر RAPD با اندازه حدود ۳ کیلو باز منحصراً در رقم مادری مشاهده شد که قابل تبدیل به نشانگر SCAR است. با توجه به تنوعی که این لاین‌ها از لحاظ نشانگر ژنتیکی بررسی شده نشان دادند پیشنهاداتی را می‌توان به این شرح ارائه داد. شناسایی لاین‌های جهش یافته‌ای که فاصله ژنتیکی زیادی با رقم مادری داشته باشند می‌تواند منجر به شناسایی لاین-های جهش یافته با ژن‌های مطلوبی شود که این لاین‌ها سازگاری بهتری را نسبت به رقم والدی و ارقام تجاری در شرایط تنش‌های زیستی و غیر زیستی از خود نشان دهند. همچنین با توجه به اینکه قبلاً مشخص شده بود که این لاین‌ها دارای صفات مطلوب و برتری از جمله تثبیت بیولوژیک نیتروژن بالاتر نسبت به والد خود می‌باشند (۱) می‌توان باندهای اختصاصی مرتبط با این صفت را در جهش یافته‌های با خصوصیات گره‌زایی و تثبیت ازت بالا مشخص نمود. مقدار PIC محاسبه شده نشان دهنده قدرت تمیز بالای آغازگرهای استفاده شده می‌باشد. لاین‌های جهش یافته حاضر می‌توانند در شرایط مزرعه‌ای برای مقاومت به انواع بیماری‌ها و پاتوژن‌ها مورد ارزیابی قرار گیرند و لاین‌های مقاوم انتخاب شوند. با ایجاد لاین‌های مقاوم به پاتوژن‌ها و بیماری‌ها سموم کمتری مصرف می‌شود و در نهایت آسیب جدی به اکوسیستم کشاورزی وارد نمی‌شود.

## منابع

1. یرولی بیرانوند ن، عباسعلیان ح، موسوی شلمانی م ا و صیادی ر (۱۳۸۵) ارزیابی تثبیت بیولوژیک نیتروژن برخی موتانت‌های گیاه سویا حاصل از پرتو دهی با اشعه گاما. نهمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران- دانشگاه تهران- پردیس ابوریحان.
2. Keim P , Schupp J M, Travis S E, Clayton K, Zhu T, Shi L, Ferreira A, and Webb D M (1997) A high density soybean genetic map based on AFLP markers *Crop Science* 37: 537-543
3. Skorupska H T , Shoemaker R C, Warner A, Shipe E R and Bridges W C(1993) Restriction fragment length polymorphism in soybean germplasm of the southern USA *Crop Sci* 33:1169-1176
4. Rahman S M , Takagi V, Kubota K, Miyamoto K and Kawakita V(1995) High oleic acid mutant in soybean induced by X-ray irradiation *Biosci Biotech Biochem* 59: 922-933
5. Villavicencio A L C H , Araujo M M, Baldasso J G, Aquino S, Konietzny U and Greiner R(2004) Irradiation influence on the detection of genetic-modified Soybeans *Radiation Physics and Chemistry* 71 (2004) 489-492
6. Atak Ç, Alikemanoglu S, Acik L, and Canbolat Y(2004) Induced of plastid mutations in soybean plant (*Glycine max* L Merrill) with gamma radiation and determination with RAPD *Mutation research* 556:35-44
7. Jain S M (2005) Major mutation-assisted plant breeding programs supported by FAO/IAEA Plant Cell Tiss Org Cult 82:113-123
8. Khan M H , and Tyagi S D(2009) Studies on induction of chlorophyll mutations in soybean, *Glycine max* (L ) Merrill *Front Agric China* 2009, 3(3): 253-258
9. Manjaya J G , Suseelan K N, Gopalakrishna T, Pawar S E and Bapat V A(2007) Radiation induced variability of seed storage proteins in soybean [*Glycine max* (L ) Merrill] *Food Chemistry* 100, 1324-1327
10. Kumar S, Prasad K V and Choudhary M L(2006) Detection of genetic variability among chrysanthemum radiomutants using RAPD markers *Current Sci* 90:1103-1118
11. Caetano-Anolles G, Bassam B J and Gresshoff P M(1991) DNA amplification fingerprinting using very as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietals identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species *Genome* 44: 763-772
12. Raisheed M S , Asad S, Iqbal M J, Mukhter Z, Zaffar Y and Malik K A(2001) Polymorphic studies employing RAPD analysis in stress-induced variants of sugarcane developed through in-vitro techniques *Pak Sugar J* 16(6): 15-26
13. Senthamizh S B , Ponnuswami V and Kavitha P S(2008) Use of RAPD assay for the detection of mutation changes in caonla (*Embllica officinalis* Gaertn ) *Adv Nat Appl Sci* 2(3): 129-134
14. Sharma R , Mahila H R, Mohapatra T, Bhargava S C and Sharma M M(2003) Isolating Plant Genomic DNA Without Liquid Nitrogen *Plant Molecular Biology Reporter* 21: 43-50
15. Rohlf F J (1987)NTSYS-pc: Micro-computer programs for numerical taxonomy and multivariate analysis. *Amer. Statistician*, 41:330.
16. Waugh R and Powell W(1992) Using RAPD Markers for Crop Improvement *Trends Biotech*,10: 186-190
17. Raina S N , Rani V, Kojima T, Ogihara Y, Singh K P and Devarumath R M(2001) RAPD and ISSR fingerprints 18. Souframanien J, Pawar S E and Rucha A G(2002) Genetic variation in gamma ray induced mutants in black gram as revealed by RAPD and ISSR markers *Indian J Genet* 4: 291-295
19. Banerjee H , Pai R A, and Sharma R P(1999) Restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA analysis of chickpea accessions *Biol Plant* 42: 197-208.
20. Ganapathi T R , Sidha M, Suprasanna P , Ujjappa K M, Bapat V A and D'Souza S F(2008) Field performance and RAPD analysis of gamma-irradiated variants of banana cultivar 'Giant Cavendish' (AAA) *Int J Fruit Sci* 8(3): 147-159
21. Wendt S N , Peters J A, Oliveira A C, Bobrowski V L, Cosa E L C , Madrugá C S and Vighi I L(2001) Plant regeneration and molecular characterization of potato cultivar Macaca, obtained from gamma irradiation explants *J New Seeds*, 3(2): 17-37