# مطالعه ساختار ژنتیکی توده‌های بومی سویا ( *Glycin max* (L.) Merr.) و تغییرات آن در طی حفاظت در مزرعه با استفاده از نشانگرهای RAPD و صفات مورفوفنولوژیکی

**محمدرضا عباسی[1*]، شوئیچی فوکوئوکا[2] و کاورو ابانا[2]**

[1] **ایران، مشهد، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی ومنابع طبیعی خراسان رضوی، بخش تحقیقات علوم زراعی باغی**

[3] **ژاپن، سوکوبا، موسسه تحقیقات علوم کشاورزی-زیستی، بانک ژن گیاهی ملی ژاپن، آزمایشگاه بررسی تنوع ژنتیکی**

تاریخ دریافت: ۹۷/۳/۷ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۲۴

## چکیده

اطلاع از وضعیت حفاظت منابع ژنتیکی گیاهی در هر کشور از عوامل بسیار مؤثر در پیشبرد تحقیقات به‌نژادی است. این تحقیق برای بررسی کارآیی حفاظت در مزرعه در حفظ تنوع ژنتیکی توده‌های بومی سویا با استفاده از صفات مولکولی و مورفوفنولوژیکی در طی دو دوره جمع‌آوری با فاصله ۱۰ سال در کشور ژاپن انجام شد. با کشت ۲۸ توده سویا در مزرعه صفات مورفوفنولوژیکی‌شان بر اساس دسکریپتورهای استاندارد ارزیابی شد. در آزمایشات مولکولی، DNAی ۸۰ نمونه گیاهی به روش CTAB استخراج و با استفاده از ۲۴ آغازگر ده تایی گزینش شده واکنش RAPD-PCR انجام شد. داده‌های به دست آمده از واکنش RAPD-PCR در تجزیه خوشه‌ای و برآورد تغییر پذیری ژنتیکی توسط نرم افزارهای NTSYS و SPSS مورد استفاده قرار گرفتند. تجزیه خوشه‌ای قرابت ژنتیکی توده‌های قدیم و جدید را نشان داد. فقط در یک توده تک‌بوته‌های قدیم و جدید در دو خوشه کاملاً مجزا از یکدیگر قرار گرفتند. در مورد اخیر برخی از صفات مورفولوژیکی نیز در توده قدیم متفاوت با توده جدید بودند. ضریب تغییر پذیری ژنتیکی در درون توده‌های جدید (به جز در یک مورد) بیشتر از توده‌های قدیم بود. به دلیل خودگشنی بسیار بالا در سویا (۹۹/۹ درصد)، عامل این افزایش در توده‌های جدید مبادله بذر بین کشاورزان بوده است. همچنین مشخص گردید که ساختار ژنتیکی توده‌های بومی برخلاف واریته اصلاح شده به شدت ناهمگن می‌باشند. در نهایت بایستی گفت که *حفاظت در مزرعه* به ویژه اگر خزانه بذری کشاورز کم باشد، نمی‌تواند به طور کامل ساختار ژنتیکی ذخایر توارثی را در طی زمان حفظ نماید.

**واژه های کلیدی:** تغییر پذیری ژنتیکی، تجزیه خوشه‌ای، حفاظت در مزرعه

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۵۱۳۳۴۰۹۱۴۲ ، پست الکترونیکی: m.abbasi@areeo.ac.ir

## مقدمه

هر گونه گیاهی دارای جمعیتها و افراد متعددی است که بسته به نوع پراکنش آن در مناطق خاصی از جهان (گونه‌های اندمیک) و یا در سراسر کره خاک (گونه‌های جهان وطن) پراکنده می‌باشند. بدیهی است که تمامی افراد و ژنوتیپهای یک گونه بسته به اینکه در چه اقلیم یا ریز اقلیمهایی تکامل یافته باشند دارای صفات متفاوتی هستند. به مجموعه ژنوتیپهای بیان کننده این صفات (مورفوولوژیک، فیزیولوژیک، فنولوژیک و ...) که در یک گونه وجود دارند تنوع ژنتیکی آن گونه گفته می‌شود. لذا تمامی افراد و ژنوتیپهای موجود در یک گونه که در مکانهای مختلفی پراکنش دارند ذخایر توارثی آن گونه را تشکیل می‌دهند. اطلاع از وضعیت حفاظت منابع ژنتیکی

در هر کشور از عوامل بسیار مؤثر در پیشبرد تحقیقات کاربردی است (۱۲).

حفاظت به عنوان یک سیستم مدیریت منابع تعریف شده است که طی آن بیشترین سود و منفعت برای نسل حاضر حاصل گردد بدون اینکه به سود نسلهای آینده آسیب و ضرری برسد (۱۸). لذا توده های بومی برای نسلهای آینده بایستی حفظ شوند چون آنها پناهگاه و لنگرگاه تنوع صفات مهم برای برنامه های به نژادی آینده و برای سیستمهای جدید کشاورزی هستند، به علاوه این توده‌ها منعکس کننده هویت فرهنگی گروه معینی از مردم هستند(۶ و ۸).

حفاظت از ذخایر ژنتیکی روشهای گوناگونی دارد و در حال حاضر در قسمتهای مختلف جهان انجام می‌شود که عبارت از: الف- حفاظت در رویشگاه اصلی: ب- حفاظت در خارج از رویشگاه اصلی، که به صورتهای ۱- نگهداری بذر در سردخانه (بانک بذر): ۲- نگهداری در باغهای کلکسیون ۳- نگهداری در شیشه ۴- نگهداری در شرایط فرا سرد برای دانه گرده و DNA ج- حفاظت در مزرعه (۲، ۳، ۴ و ۸)، هستند. گرچه روش اخیر بنا به نظر Hurka و همکاران (۲۰۰۳) (۱۳) یکی از روشهای نگهداری در رویشگاه اصلی است ولی از آنجا که این روش حفاظت از ذخایر توارثی توده‌های بومی هر منطقه توسط زارعین در مزرعه و مکانهای نگهداری بذر زارع است، می‌تواند به عنوان حالت گذار یا پلی بین نگهداری در رویشگاه و خارج از رویشگاه در نظر گرفته شود.

هرکدام از روشهای حفاظت بیان شده در بالا توانایی و یا محدودیتهایی برای حفاظت منابع ژنتیکی گیاهی دارند. مقالات زیادی در خصوص انواع روشهای حفاظت در رویشگاه و خارج از رویشگاه به زبان فارسی (۲، ۳ و ۴) و یا انگلیسی (۹، ۱۱، ۱۹، ۲۱ و ۲۲) به چاپ رسیده است. ولی در خصوص روش حفاظت در مزرعه اگرچه به زبان انگلیسی مقالات مناسبی وجود دارد (۷، ۲۰ و۲۳) ولی مقالات فارسی در بررسی سوابق دیده نشد.

تنوع ژنتیکی گونه‌های گیاهی غالباً در توده‌های بومی همان گونه حفظ می‌شوند. اهمیت توده‌های بومی گیاهان زراعی در حفظ اکوسیستمهای کشاورزی و همچنین به عنوان منبعی برای به‌نژادی مبرهن است. حفاظت در مزرعه دارای فواید فردی (برای کشاورز) و اجتماعی می‌باشد. از نقطه نظر مزایای فردی به امنیت غذایی و درآمد حاصل از این فرآیند برای کشاورز می‌توان اشاره کرد. در صورتی که از بعد اجتماعی، دسترسی به تنوع ژنتیکی برای استفاده در گیاهان زراعی در مدیریت شرایط متغیر محیطی ضرورتی انکار ناپذیر است. این فرآیند به شرکت فعال کشاورزان و همچنین وجود مشوقهای لازم برای آنها بستگی دارد. در ۲۰ سال گذشته فعالیتهای زیادی در حوزه حفاظت در مزرعه با مشارکت مراکز تحقیقاتی و کشاورزان در محصولات زراعی مختلف انجام شده است (۷). از جمله در یک بررسی در کشور غنا مشخص شده است که استفاده زیاد از علف کشهای سیستیمیک، فعالیتهای چوپانان و فقدان دانش حفاظت از بذور مهمترین عواملی هستند که توسط کشاورزان به عنوان عوامل فرسایش ژنتیکی توده‌های بومی‌شان در طی حفاظت در مزرعه بیان شده است (۲۰).

احتمال رانش ژنتیکی در هر کدام از روشهای حفاظت در صورت عدم رعایت استانداردها و شرایط مربوطه دور از انتظار نمی‌باشد. در روش حفاظت در مزرعه به دلیل اهتمام کشاورزان به حفاظت و نگهداری از بذور خودشان احتمال رانش ژنیتکی به نظر کمتر می‌رسد (۷). با این وجود بایستی درستی این روش نیز برای حفاظت منابع ژنتیکی مورد بررسی قرار گیرد. جنبه‌های مختلف حفاظت در مزرعه در طی تحقیقات انجام شده در خارج کشور بررسی شده است. کشت سویا تاریخچه طولانی در کشور ژاپن داشته و همچنین مصارف گوناگونی در رژیم غذایی مردم

این کشور در حال حاضر دارد. لذا کشاورزان ژاپنی به حفظ و حراست از بذور محلی آن اهتمام ویژه‌ایی نشان می‌دهند. این توده‌ها توسط کشاورزان عمدتاً به روش حفاظت در مزرعه نگهداری می‌شوند. بانک ژن ملی ژاپن پروژه جمع آوری و حفاظت از منابع ژنتیکی گیاهی بومی ژاپن را در دستور کار داشته است. این پروژه جمع آوری جامعی از مواد گیاهی این کشور به صورت بذر در دهه ۱۹۸۰ و متعاقب آن در دهه ۱۹۹۰ را انجام داده است. در این پروژه منابع ژنتیکی حبوبات از جمله سویا و همچنین ارزن به طور کامل جمع آوری شدند (۲۱). با توجه به انجام این پروژه و وجود اطلاعات مناسب از داده‌های جمع آوری آن در بانک اطلاعاتی مربوطه (۱۹)، لذا تحقیق حاضر کارآیی حفاظت در مزرعه را با استفاده از صفات مولکولی و مورفوفنولوژیکی در این گیاه در طی دو دوره جمع‌آوری با حداقل ۱۰ سال فاصله (دهه‌های ۱۹۸۰ و ۱۹۹۰) بررسی می‌نماید. لازم به ذکر است که حفاظت در مزرعه در کشور ایران برای محصولات متفاوتی از جمله توده‌های بومی یونجه زراعی (۳) و همچنین شبدر ایرانی (۴) در حال حاضر در حال اجرا است، لذا یافته‌های این تحقیق می‌تواند کمک مؤثری به متخصصین بانک ژن گیاهی ایران برای تدوین استراتژیهای مؤثر مربوطه برای حفاظت از منابع ژنتیکی بومی داخلی نماید.

## مواد و روشها

این آزمایش در مزرعه و آزمایشگاه بررسی تنوع ژنتیکی بانک ژن گیاهی ملی ژاپن در مؤسسه تحقیقاتی NIAS صورت گرفت. تعداد ۲۸ توده جمع آوری شده (جدول۱) که در بانک ژن ژاپن نگهداری می‌شوند (۲۱) در مزرعه تحقیقاتی در بهار کشت شدند. تعداد شش توده از مجموعه در سال ۱۹۸۹ (به عنوان توده قدیمی) و جمع آوری مجدد آنها در ۱۹۹۹ (به عنوان توده جدید) صورت گرفته بود (جدول۱). هر توده بر روی یک خط به طول ۲ متر و عرض ۵۰ سانتیمتر کشت گردید. در طی آزمایش از سموم شیمیایی و کود شیمیایی استفاده نشد. وجین به طور دستی انجام شد و در صورت عدم بارندگی، آبیاری به طور نشتی انجام شد. همچنین صفات مورفوفنولوژیکی تک بوته‌ها طبق دستورالعملهای استاندارد (همچنان که در قسمت نتایج جدول ۴ توضیح داده شده است) مورد ارزیابی قرار گرفتند (۱۴).

در بررسیهای مولکولی، مجموعاً ۸۰ نمونه DNA پس از استخراج به روش تغییر یافتهCTAB با استفاده از نشانگرRAPD آنالیز شدند (۱۷). شش توده گیاهی که در دو دوره (۱۹۸۹ و ۱۹۹۹) از شش کشاورز جمع‌آوری شده بودند (جدول۱) به همراه یک رقم اصلاحی به صورت تک بوته (از هر توده ۵ تک بوته) در آزمایشات استفاده شدند (مجموعاً ۱۳ توده به صورت تک بوته). پانزده توده گیاهی دیگر (از مناطق مختلف ژاپن و چین) هرکدام به عنوان رفرانس و به صورت نمونه بالک (۵ بوته از هر توده به صورت مخلوط) استفاده شدند (جدول ۱). تعداد ۵ برگچه جوان به وزن تقریبی ۰/۶ گرم از هر گیاه در نمونه گیری انفرادی یا از ۵ گیاه در نمونه گیری مخلوط در هر توده برای استخراجDNA استفاده شدند. نود و هفت پرایمر ۱۰بازی بر اساس تجربیات قبلی موجود در آزمایشگاه بر روی سویا مورد استفاده قرار گرفتند و ۲۴ آغازگری (جدول۲) که بهترین چندشکلی را تولید می‌کردند و قابلیت نمره‌دهی بالایی داشتند برای تهیه قطعات RAPDگزینش شدند. لازم به ذکر است در ابتدا هرآغازگر توسط هشت نمونه DNAی استخراج شده از هشت توده مختلف آزمایش گردید و سپس بهترین آغازگرها (۲۴ آغازگر) انتخاب شدند. DNAی نمونه‌ها توسط MJ Research Inc Model PTC-100-96V و Model PTC-200 طبق برنامه دمایی (جدول۳) تکثیر شدند. برای انجام هر واکنش PCR مواد: آب مقطر استریل (۵/۴ µl)، بافر (۱ µl)، $MgCl_2$ (۰/۸ µl)، هر کدام از dNPTها (۰/۲ µl)، آغازگر (۰/۵ µl)، آنزیم پلیمراز Tag (۰/۲ µl) و DNA

(۲ µl) مورد استفاده قرار گرفتند. قطعات تکثیر شده DNA توسط ژل آگارز ۱/۴ درصد در ۰/۵ برابر بافر تریس-بورات EDTA (بافر TBE) جدا شدند و سپس توسط اتیدیوم بروماید (۳و۸- دی آمینو-۵- اتیل-۶- فنیل فنان‌تریدینیوم بروماید) رنگ آمیزی شده و تحت نور ماورا بنفش مرئی و سپس عکس برداری شدند.

ماتـریسی از صفـر و یک به ترتیب برای عـدم و یا وجـود قطعات چندشکلی DNA حاصل از هر آغازگر بر اساس نیمرخ حاصل از الکتروفورز ایجاد گردید.

جدول ۱- مشخصات ژرم پلاسمهای سویای استفاده شده در آزمایشRAPD

| روش نمونه برداری | تعداد نمونه | شماره پاسپورت | نوع توده | نوع کلکسیون | شماره کلکسیون | نام توده بومی | شماره در آزمایش |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| تک بوته | 5 | 03023927 | توده بومی | جدید | NC000001 | AOMAME | G001 |
| تک بوته | 5 | 00083324 | Landrace | قدیم | NC92J0208 | AOMAME | G002 |
| تک بوته | 5 | 03023900 | توده بومی | new | NC000015 | AODAIZU | G013 |
| تک بوته | 5 | 00083327 | توده بومی | قدیم | NC92J0302 | AODAIZU | G014 |
| تک بوته | 5 | '03013447 | توده بومی | جدید | NC000019 | MOCHIMAME | G016 |
| تک بوته | 5 | 00079828 | توده بومی | قدیم | 880088 | MOCHIMAME | G017 |
| تک بوته | 5 | '03013428 | توده بومی | جدید | NC000025 | AOMAME | G022 |
| تک بوته | 5 | 00079818 | توده بومی | قدیم | 880068 | AOMAME | G023 |
| تک بوته | 5 | | توده بومی | جدید | NC000043 | HIYASHIMAME | G029 |
| تک بوته | 5 | 00083313 | توده بومی | قدیم | | HIYASHIMAME | G030 |
| تک بوته | 5 | | توده بومی | جدید | NC000066 | HITASHIMAME | G039 |
| تک بوته | 5 | 00083312 | توده بومی | قدیم | 860090 | HITASHIMAME | G040 |
| تک بوته | 5 | | Improved | ref | | TAMAHOMARE | G066 |
| توده‌ای | 1 | 00083323 | توده بومی | ref | NC92J0207 | AOMAME | G052 |
| توده‌ای | 1 | 00079835 | توده بومی | ref | 880103 | AOMAME | G059 |
| توده‌ای | 1 | 00083320 | توده بومی | ref | 880101 | AOMAME | G062 |
| توده‌ای | 1 | 00079761 | توده بومی | ref | 870208 | HIYAKASHIMAME | G064 |
| توده‌ای | 1 | 00079819 | توده بومی | ref | 880071 | AOMAME | G069 |
| توده‌ای | 1 | 00079813 | توده بومی | ref | 880060 | HIYAKASHIMAME | G077 |
| توده‌ای | 1 | '00083256 | توده بومی | ref | | HIYASHIMAME | G083 |
| توده‌ای | 1 | '00083309 | توده بومی | ref | | HITASHIMAME | G090 |
| توده‌ای | 1 | '00033152 | توده بومی | ref | | AOKAWAHIGU | G097 |
| توده‌ای | 1 | '00092706 | توده بومی | ref | | AOMAME | G112 |
| توده‌ای | 1 | | Improved | ref | | ENREI | G133 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| G163 | Heukdaelip | ref | توده بومی | '00033342 | 1 | توده‌ای |
| G165 | TekkyoSeitou | ref | توده بومی | '00033555 | 1 | توده‌ای |
| G167 | Si Li Huang | ref | توده بومی | '00039073 | 1 | توده‌ای |
| G173 | HaiMame | ref | توده بومی | '00031683 | 1 | توده‌ای |

جدول ۲- توالی آغازگرهایی که واضحترین چندشکلی را نشان دادند و در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفتند

| آغازگر | توالی | آغازگر | توالی |
|---|---|---|---|
| P10 | GTCCTCTGAA | P226 | CCAGACAAGC |
| P40 | GGCGGACTGT | P231 | ATCAAGCTGC |
| P42 | CCGGACTGAG | P235 | CCACTCACGG |
| P54 | CGTAGCGCGA | P242 | TGCAGTCGAA |
| P60 | CATCGGCCCT | P246 | GTTTCCGGTG |
| P152 | GTTTCGCTCC | P251 | CCCGATCCAC |
| P158 | GGTGACGCAG | P254 | AAGAGCCCGT |
| P160 | TGGGGGACTC | P263 | GCCCATACCT |
| P186 | AGACCCAGAG | P265 | GAGGACAAAG |
| P204 | CGCCACGTTC | P277 | GCGGGAGACC |
| P216 | GGTGATGTCC | P283 | GAAGGCTCTG |
| P219 | CAGTCGCGTG | P301 | GCTGGACATC |

جدول ۳- برنامه دمایی استفاده شده برای PCR

| مراحل | دما (°C) | مدت (min) |
|---|---|---|
| Denature | 93.5 | 1:00 |
| Annealing | 36 | 2:00 |
| Extension | 72 | 3:00 |
| Repeats | 45 | |
| Delay | 72 | 7:00 |
| Post inc. | 5 | 5:00 |
| | 10 | 99.99 |

قطعاتی که دارای وزن مولکولی مشابه ولی شدت رنگ متفاوتی بودند یکسان در نظر گرفته می‌شدند. داده‌های این ماتریس در تجزیه خوشه‌ای مورد استفاده قرار گرفتند. این تجزیه به روش UPGMA انجام شد. همچنین ضریب عدم تشابه ژنتیکی نمونه‌ها به عنوان برآوری از تغییر پذیری ژنتیکی در درون توده‌ها و بین توده‌ها محاسبه گردید. در صفات موفوفنولوژیکی پارامترهای آماری پراکندگی و تمایل به مرکز در در مجموعه محاسبه گردید. همچنین ضریب تغییرات و شاخص شنون به ترتیب به عنوان برآورد کننده میزان تنوع در صفات کمی و کیفی استفاده شدند. جهت محاسبه ضریب تغییرات از فرمول زیر استفاده شد:

$$CV\% = (sd/X)*100$$

که sd انحراف معیار استاندارد و X میانگین صفت می‌باشد و برای محاسبه شاخص شنون ازفرمول زیر استفاده گردید:

$$H = -\sum_{i=1}^{i=n}(Pi * LnPi)$$

که در این فرمول، H شاخص شنون، n تعداد گروهها در هر صفت و Pi فراوانی هر گروه در آن صفت می‌باشد. تجزیه ها توسط نرم افزارهای آماری NTSYS و SPSS انجام شدند.

## نتایج و بحث

پارامترهای آماری تمایل به مرکز و پراکندگی صفات مورفوفنولوژیکی توده‌های سویا در جدول۴ نشان داده شده است. تعداد روز تا گلدهی از ۴۰ تا ۱۰۴ روز با میانگین ۶۲ روز در تغییر بود. طول دمبرگ از ۱۳۸ تا ۳۶۰ میلی

متر با میانگین ۲۵۱ میلی متر متغیر بود. همچنان که ضریب تغییرات و شاخص شنون نشان دادند تنوع مناسبی برای اکثر صفات ارزیابی شده در نمونه‌ها دیده شد. در صفات کیفی رنگ پوسته بذر با شاخص شنون ۱/۶ و رنگ برگ با شاخص ۰/۰۶۸۶ به ترتیب کمترین و بیشترین تنوع را نشان دادند در صورتی که بین صفات کمی تعداد گیاهان سبز شده با ضریب تغییرات ۲۷ درصد بیشترین و نسبت طول برگچه مرکزی به عرض آن با ضریب تغییرات ۱۰/۷ کمترین تنوع را نشان دادند (جدول۴). در برخی موارد بعضی صفات مورفوفنولوژیکی توده‌های قدیم و جدید متفاوت بودند که در ادامه به آن اشاره خواهد شد.

جدول ۴- پارامترهای آماری تمایل به مرکز و پراکندگی صفات مورفوفنولوژیکی توده‌های سویا

| صفت | بیشینه | کمینه | انحراف معیار | میانگین | ضریب تغییرات٪ | شاخص شنون |
|---|---|---|---|---|---|---|
| تعداد روز تا گلدهی | ۱۰۴ | ۴۰ | ۱۴/۷۹ | ۶۲/۷ | ۲۳/۶ | |
| طول دمبرگ(mm) | ۳۶۰ | ۱۳۸ | ۵۶/۸۱ | ۲۵۱/۸ | ۲۲/۶ | |
| رنگ استاندارد گل+ | ۹ | ۱ | | | | ۰/۷۶۰۱ |
| رنگ کرک ساقه++ | ۲ | ۱ | | | | ۰/۶۶۶۳ |
| رنگ هیلوم بذر+++ | ۹ | ۴ | | | | ۱/۰۵۸۴ |
| تعداد گیاه جوانه زده | ۱۵ | ۳ | ۳/۱۵ | ۱۱/۴۵ | ۲۷/۵ | |
| رنگ محور زیر لپه++++ | ۹ | ۱ | | | | ۰/۸۸۹۳ |
| رنگ برگ+++++ | ۲ | ۱ | | | | ۰/۰۶۸۶ |
| نسبت طول به عرض برگچه مرکزی | ۱/۹۳ | ۱/۱۹ | ۰/۱۶ | ۱/۵ | ۱۰/۷ | |
| رنگ پوسته بذر++++++ | ۹ | ۲ | | | | ۱/۶۶۱۷ |

+۱ = سفید تا ۹ = صورتی

++۱ = سفید و ۲= قهوه‌ای

+++۲= زرد روشن ۳= زرد ۴= قهوه‌ای ۵= قهوه‌ای سوخته ۶= سبز ۷= خاکستری تیره ۸= سیاه ۹= سایر

++++۱= سبز ۵= سبز ارغوانی ۷= ارغوانی کم رنگ ۹= ارغوانی

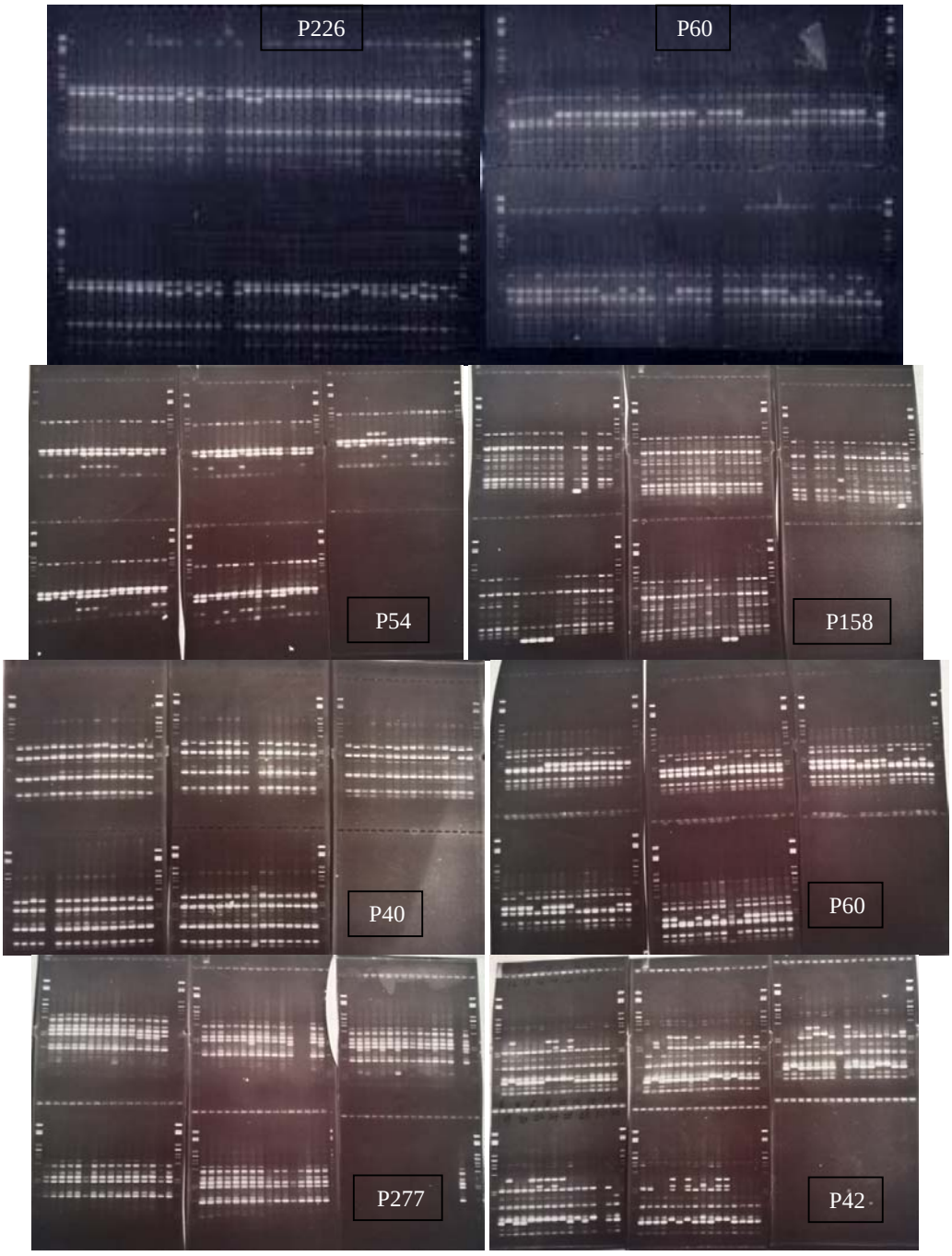
+++++۱= سبز زرد ۲ = سبز

++++++۱= سفید مایل به زرد ۲ زرد ۳= سبز پریده ۴= سبز ۵= قهوه‌ای پریده ۶= قهوه‌ای ۷= خاکستری تیره ۸= سیاه ۹= سایر

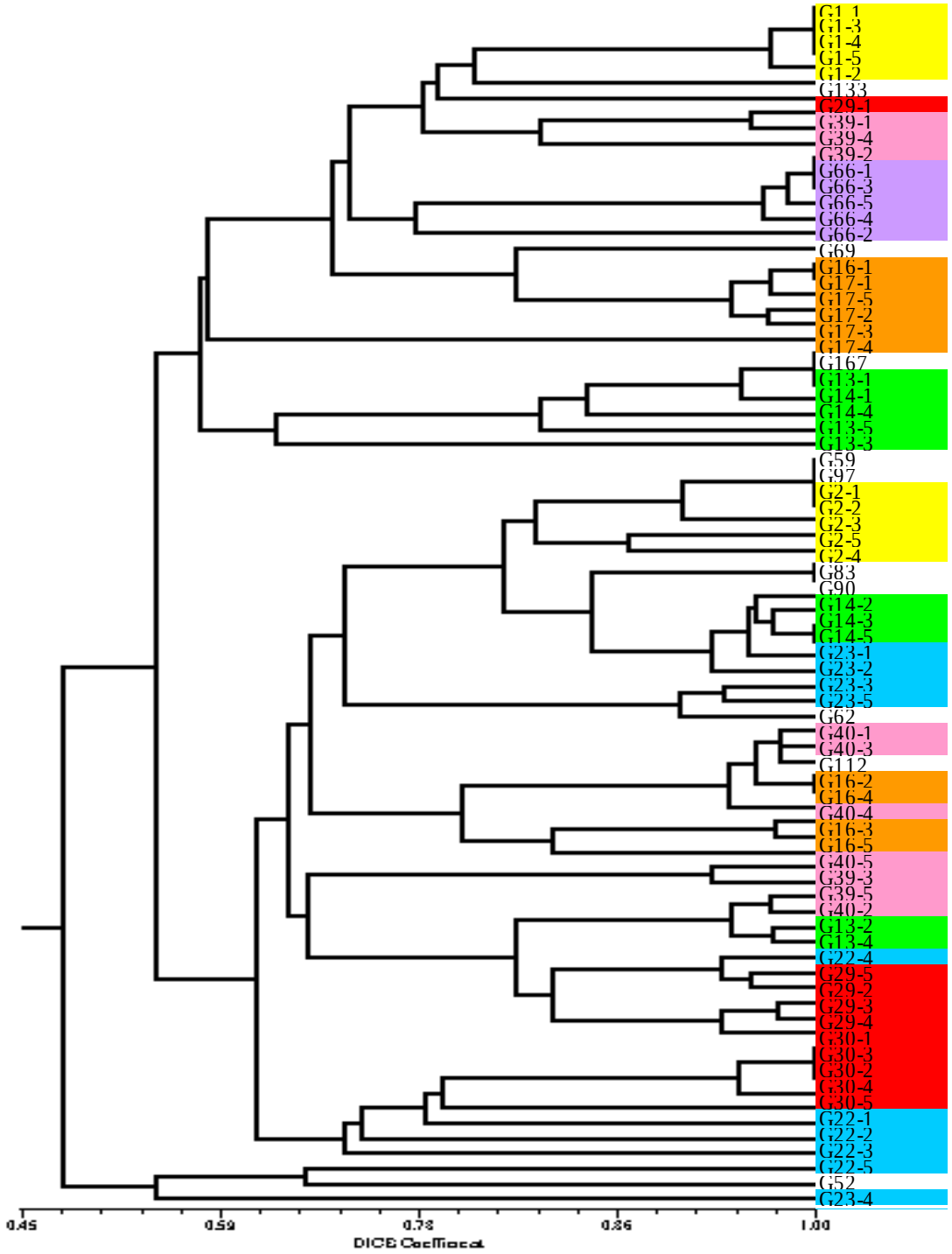
روشهای مولکولی مبتنی بر آغازگرهای تصادفی(همانند RAPD) در بررسی تنوع ژنتیکی برخی از گیاهان همانند گلرنگ (۵) مورداستفاده قرار گرفته است، همچنین آغازگرهای نیمه تصادفی اینترونی-اگزونی در گندم برای بررسی تنوع ژنتیکی (۱) استفاده شده است. در بررسی مولکولی مطالعه حاضر از نشانگر مولکولی RAPD استفاده شد. در بررسیهای مولکولی مجموعاً ۳۹ باند قابل نمره‌دهی حاصل از ۲۴ آغازگر مختلف حاصل شد (شکل۱). دندروگرام حاصل از داده‌های مولکولی در شکل ۲ نشان داده شده است. اعداد ۱ تا ۵ در دندروگرام نشان دهنده تک بوته‌ها در هر توده می‌باشند. بعضی از تک بوته‌های موجود در هر دو توده قدیم و جدید در محلهای نزدیکی در دندروگرام حاصل ظاهر شدند. به عنوان مثال توده‌های G29 و G30 (با نام هیاشی‌مامه) یک توده هستند که از یک مکان (کشاورز) در طی دو دوره (۱۹۸۹ و ۱۹۹۹) جمع آوری شده‌اند. در این توده‌ها فقط یک تک بوته به عنوان G29-1 در یک خوشه دیگر و نزدیک توده‌های G39، G133 و G1 قرار گرفت (شکل ۲).

سطح تغییر پذیری ژنتیکی در درون هر توده بر اساس داده‌های مولکولی حاصل از ۵ تک بوته محاسبه شد. بر این

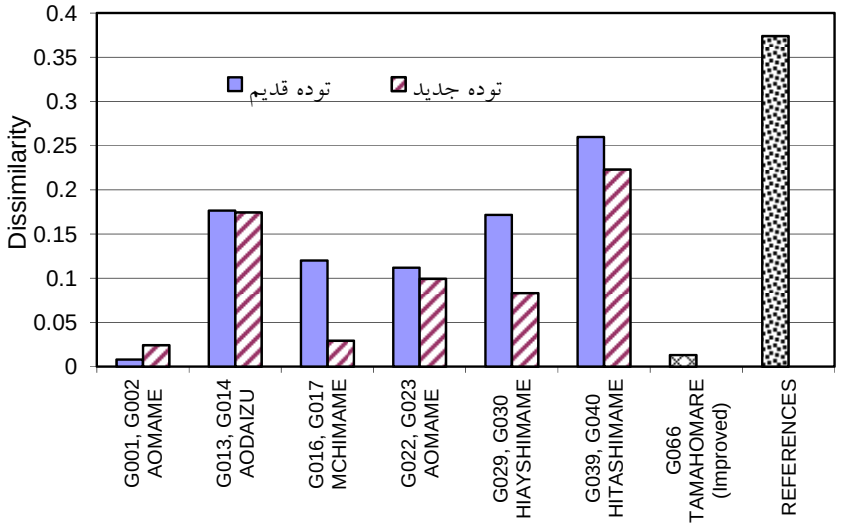
اساس، الگوهای مختلفی از تغییرات را در بین توده‌های جمع‌آوری شده از کشاورزان مختلف نشان داد (شکل ۳). به عنوان مثال متوسط تغییر پذیری ژنتیکی برای توده G30 برابر با ۰/۰۸۳۲ به دست آمد در صورتی که برای توده G29 (که جمع آوری جدید از G30 است) برابر با ۰/۱۷۱۷ (۴۸ درصد بیشتر از توده قدیمی آن) بود (شکل ۳).




شکل۱- الکتروفورز ژل آگارز قطعات RAPD حاصل از آغازگرهای ذکر شده در هر ژل (P60, P226, P158, P54,P60, P40, P42, P277) با استفاده از DNA هشتاد نمونه سویا، دو نوار ابتدا و انتهای هر ژل نشانگر اندازه DNA (۱۰۰ bp) هستند




شکل۲- دندروگرام حاصل از داده‌های مولکولی (قطعات RAPD) در ۸۰ نمونه DNA توده‌های قدیم و جدید سویا با روش UPGMA، رنگهای مشابه نشان دهنده توده‌های دریافتی از یک کشاورز در دو زمان مختلف است، اعداد ۱ تا ۵ نشان دهنده عدد تک بوته در توده قدیم یا جدید است.




شکل۳- برآورد تغییر پذیری ژنتیکی درون توده‌های قدیم، جدید سویا، نمونه اصلاح شده و توده‌های مرجع

این تغییرات عمدتا به دلیل بروز عدم تشابه در توده جدید نسبت به توده قدیم بود. این تغییرات می‌تواند با این فرضیه توضیح داده شوند که بذر نمونه‌های اصلی در طی زمان مخلوط شده باشند. همچنین از آن جا که مقدار دگرگشنی در سویا کمتر از ۰/۱ درصد است لذا این رویداد نمی‌تواند ناشی از دگرگرده افشانی با گیاه بیگانه باشد. با توجه به ورود ژنهای جدید به خزانه ژنی اولیه و بروز آنها در شرایط محیطی جدید، همچنان که Thomas و همکاران (۲۰۱۱) نشان داده‌اند (۲۳) این عمل که در تبادل بذری در فرآیند حفاظت در مزرعه یک رویداد مرسوم است، می‌تواند منجر به فرآیند تکاملی جدید در توده‌های قدیمی شود.

نمونه‌های جدید (G1) و قدیم (G2) از توده آمومه، در دو کلاستر کاملا مجزا ظاهر شدند (شکل۲). از آنجایی که تمام ۵ تک بوته در هر دو توده جدید و قدیم آمومه به شدت دارای DNA مشابهی بودند، لذا اشتقاق G1 از G2 غیر محتمل به نظر می‌رسد. توجیه این مطلب این می‌باشد که در طی زمان برخلاف خواسته کشاورز بذر آن تغییر داده شده است. مطابق با مصاحبه‌های انجام شده با کشاورزان چنین رویدادی کاملا عادی می‌باشد. به دلیل آن که ذخیره بذری آنها کم بوده و در برخی از سالها که به دلیل سرما یا سایر موارد بذور کشت شده‌شان از بین می‌رود، آنها اقدام به دریافت بذری با همان نام از سایر کشاورزان می‌نمایند. لذا ساختار ژنتیکی بذر دریافتی جدید ممکن است با بذر قدیمی متفاوت باشد هر چند که هر دو یک نام را دارند، تحقیق حاضر چنین واقعیتی را اثبات کرد. این یافته با نظرات Thomas و همکاران (۲۰۱۱) در ارتباط با فرآیند حفاظت در مزرعه همخوانی دارد (۲۳).

در توده موچی‌مامه، تمام تک بوته‌های توده قدیمی (G17) به همراه یک تک بوته از توده جدید آن (G16-1) نزدیک هم و دریک خوشه ظاهر شدند در صورتی که ۴ تک بوته دیگر G16 در یک خوشه دیگر ظاهر شدند (شکل۲). در این مورد آلودگی بذری و یا جا به جایی توده‌ها در طی زمان می‌تواند دلیلی برای این تفاوت باشد. از آنجایی که فقط بوته ۵ از توده جدید با توده قدیمی مشابه است، لذا حدود ۸۰ درصد از خزانه ژنتیکی توده قدیمی با مواد

جدید جا به جا شده است. همچنین این اختلاف با مقایسه درجه تغیر پذیری ژنتیکی درون هر توده نیز می‌تواند توضیح داده شود (شکل ۳). به عبارت دیگر سطح تغییر پذیری ژنتیکی در درون توده جدید (۰/۱۲۰۱) در مقایسه با توده قدیمی آن (۰/۰۲۹۴) بیشتر بود. همچنان که بیان شد در این خصوص اینترواکشن بذر به خزانه بذری کشاورز می‌تواند عامل این رویداد باشد. در صورتی که گزینش نمی‌تواند عاملی برای آن باشد چون که گزینش معمولاً باعث کاهش تغییر پذیری ژنتیکی در درون یک توده می‌شود (۱۰، ۱۲ و ۲۳).

توده قدیمی هیتاشی‌مامه (G40) تا اندازه‌ای غیریکنواخت بود، چون که در دو توده جدید و قدیم آن در حدود ۱۰ باند از باندهای RAPD اختلاف نشان دادند. درمقایسه با توده جدید، توده قدیمی آن تا حدودی حفظ شده بود چون که دو تک بوته توده جدید (G39-3, G39-5) در خوشه مشابه با خوشه مواد قدیمی ظاهر شدند. سه تک بوته دیگر از توده جدید (G39-1, 39-2, 39-4) با همدیگر ظاهر شدند (شکل۲). آلودگی بذری همانند آنچه که در بالا ذکر شد می‌تواند توضیحی برای ظهور تک بوته‌های قدیم و جدید در نتایج تجزیه خوشه‌ای برای توده هیتاشی‌مامه باشد. همچنین در خصوص توده آودایی‌زو (G13, G14) و آمومه (G22 , G23) چنین تفسیری وجود دارد.

مطابق با شکل ۲ سطح تغییر پذیری ژنتیکی در توده‌های بومی سویا معمولاً بیشتر از واریته اصلاح شده سویا (G66) بود. گزینش منجر به کم شدن سطح تغییر پذیری ژنتیکی در درون توده در تبدیل آن به واریته اصلاحی می‌شود (۱۲). متوسط ضریب عدم تشابه در بین ۱۵ نمونه مرجع برابر با ۰/۳۷۳۹ به دست آمد. این مقدار حدود ۳۰ برابر نمونه اصلاح شده ولی فقط حدود ۱/۵ برابر توده‌های بومی بود. این یافته ناهمگنی بالای DNA را در توده‌های بومی سویا در مقابل واریته اصلاح شده نشان داد.

ارزیابی موفولوژیکی در هر کدام از جفت مقایسات توده‌های قدیم و جدید گاهاً اختلافاتی نشان دادند. به عنوان مثال در G1 و G2 رنگ کرک ساقه به ترتیب سفید و قهوه‌ای بود. در G13 و G14 تعداد روز تا گلدهی تفاوت داشت. رنگ استاندارد گل، رنگ محور زیر لپه و تعداد روز تا گلدهی در توده‌های G16 و G17 متفاوت بود. همچنین توده‌های G22 و G23 در رنگ کرک ساقه، رنگ دمبرگ و تعداد روز تا گلدهی متفاوت بودند. در صورتی که توده‌های G29 و G30 در اکثر صفات مورفوفنولوژیکی به جز در صفت رنگ استاندارد گل مشابه بودند. در این صفت توده G29 فقط دارای رنگ سفید بود در صورتی که توده G30 دارای دو رنگ سفید و ارغوانی بود. در توده‌های G39 و G40 تمام صفات مورفوفنولوژیکی متفاوت از یکدیگر بودند. بنابراین از نظر این صفات برخی از زوج مقایسات در بین توده‌های جدید و قدیم مشابه نبودند و این داده‌ها با نتایج حاصل از تشابه DNA تا حدودی همخوانی داشت. با این وجود بایستی توجه داشت که به کارگیری صفات مورفوفنولوژیکی اگرچه تفاوتهایی را در بین توده‌های جدید و قدیم در برخی موارد نشان می‌داد ولی به دقت به کارگیری نشانگرهای مولکولی RAPD نمی‌توانست به طور مناسبی آلودگی و تغییرات ژنیتکی را در بین توده‌های قدیم و جدید توضیح دهد (شکل۲) . از طرفی به کارگیری تکنیک RAPD در مقایسه با تکنیکهای دیگر مبتنی بر DNA به دلیل سرعت، سادگی و ارزانی به عنوان روش مناسب برای مطالعه حفاظت در مزرعه پیشنهاد می‌شود. با توجه به اعلام نیاز به روشهای مختلف تجزیه‌ایی (ژنتیکی و اجتماعی) که طی تبادل بذری در فرآیند حفاظت در مزرعه توسط محققین مختلف (۲۳) اعلام شده است، این مقاله توانسته است روش مناسبی برای بررسی ژنتیکی مواد در فرآیند تبادل بذور در طی حفاظت در مزرعه ارائه دهد.

حفاظت در مزرعه فعالیتی است که طی آن کشاورزان توده‌های بومی خودشان را حفظ می‌کنند. مبادله بذر بین

کشاورزان روستاهای مختلف بخشی از فعالیت آنها در طی فرآیند حفاظت در مزرعه می‌باشد. مطابق با مصاحبه‌های انجام شده توده‌های سویا در مقایسه با برنج و ارزن به نسبت بیشتری توسط کشاورزان در کشور ژاپن حفاظت می‌شوند. ولی مطالعه حاضر نشان داد که ساختار ژنتیکی توده‌ها در طی این فرآیند به سرعت تغییر می‌یابد. لذا حفاظت در مزرعه ممکن است نتواند ساختار ژنتیکی ژنوتیپها را حفظ نماید. نتایج این تحقیق با بررسی Nyadanu و همکاران در سال ۲۰۱۶ (۲۰) بر روی گیاهان کم بهره‌برداری شده و فراموش شده در غنا همخوانی دارد. این محققین نیز بر کارآیی کم حفاظت در مزرعه بر حفظ ساختار ژنتیکی توده‌های بومی گیاهان مختلف در غنا تأکید کردند.

بر اساس یافته‌های این تحقق می‌توان نتیجه گرفت که برای محصولاتی که کشاورزان بذر کمی از آن را در خزانه بذری خود نگهداری می‌کنند، حفاظت در مزرعه می‌تواند همراه با تغییر در ساختار ژنتیکی توده‌های حفاظت شده باشد. لذا همچنان که Nyadanu و همکاران (۲۰)، Bellon و همکاران (۷) و Wang و (۲۴) همکاران تأکید کردند بایستی به روشهای مختلفی از جمله حفاظت در مزرعه برای حفظ تمامیت ژنتیکی یک محصول توجه شود. از طرفی بایستی در مصاحبه با کشاورزان در داخل کشور و همچنین در تعیین استراتژی حفاظت محصولات به این نکته توجه داشت. با توجه به تأثیر زیاد بعد انسانی در طی فرآیند حفاظت در مزرعه (۱۶)، از مهمترین سوالاتی که بایستی از کشاورز در خصوص توده‌های بومی نگهداری شده‌اش پرسید، مقدار خزانه بذری و همچنین تبادل و تعداد تبادل بذر با سایر کشاورزان است. لذا در صورتی که کشاورزی تبادل بذر با سایرین داشته باشد، تا حدود زیادی آمیختگی ژنتیکی بین توده نگهداری شده و توده دریافتی وجود خواهد داشت، هر چند که چنین توده‌هایی دارای نام مشابهی باشند. همچنین وجود ناهمگنی ژنتیکی بالا در توده‌های بومی حتی گیاهانی خود گشن همانند سویا پتانسیل و ارزش بالای ژنتیکی این محصولات را برای به نژادی و گزینش صفات مناسب نشان می‌دهد، و همچنان که Jiri و همکاران در ۲۰۱۷ (۱۵) نشان داده اند، فرآیند حفاظت در مزرعه در گیاهان مختلف زراعی به دلیل وجود ناهمگنی بالای ژنتیکی در این گیاهان می‌تواند بهره برداری از این منابع را برای نیل به امنیت غذایی به ویژه در مواجه با شرایطی که بر اثر تغییرات آب و هوایی ایجاد می‌شوند را به دنبال داشته باشد. بنابراین یکبار دیگر در تحقیق جاری ارزش توده‌های بومی برای بهره‌برداری نشان داده شد.

**قدردانی**

بدین وسیله نویسندگان از آژانس همکاریهای بین المللی ژاپن (JICA)، مؤسسه ملی تحقیقات علوم زیستی کشاورزی ژاپن (NIAS) و مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کشور که در فراهم شدن بستر این تحقیق سهم عمده‌ای داشته‌اند تشکر و سپاسگزاری می‌نمایند.

## منابع

۱- اسماعیلی احمد ، نظریان فیروزآبادی فرهاد ، سمیعی کامران و دریکوند رضا. ۱۳۹۶. بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ های گندم دیم با استفاده ازآغازگرهای نیمه تصادفی اینترونی-اگزونی. پژوهشهای سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران) جلد ۳۰ ، شماره ۲ صفحات ۱۱۷ تا ۱۲۶.

۲- شفاالدین س، ۱۳۸۶. جمع آوری ذخایر توارثی گیاهی. ژنتیک نوین جلد۳ صفحات ۱۶-۵.

۳- عباسی م، میرآخورلی ع، مهدی پور ع، حسن زاده ع، کنعانی ر، علی تبار ر، مختارپور ح، صفایی ه، فتحی ا، خاکیزاد غ، نادعلی ف، نخعی آ، کمال الدین عباسی م، دادفر س، حا ج قلی زاده ق، طاهریون غ، صفری س، حمزه نژاد ع، عبادوز غ، جهانبازی ف، سامانی م، مقدم ع، قنواتی ف، سلطانی ع، دارخال ه، واعظی ش،کرج۱۳۹۴. منابع ژنتیکی یونجه ایران: جستجو، جمع آوری،

حفاظت و مراکز تنوع. پژوهش و سازندگی ( نشریه زراعت)، شماره ۱۰۶، صفحات ۶۳-۵۵.

۴- عباسی م، میرآخورلی ع، مهدی پور ع، حسن زاده ع، کنعانی ر، علی تبار ر، مختارپور ح، صفایی ه، فتحی ا، خاکیزاد غ، نادعلی ف، نخعی آ، کمال الدین عباسی م، دادفر س، حا ج قلی زاده ق، طاهریون غ، صفری س، حمزه نژاد ع، عبادوز غ، زمانیان م، جهانبازی ف، سامانی م، دارخال ه، ۱۳۹۱. جمع آوری بذر و شناسایی مراکز تنوع ذخایر ژنتیکی جنس شبدر در ایران. مجله الکترونیک تولید گیاهان زراعی، جلد ۵، شماره ۴، صفحات ۲۰۴-۱۹۱.

۵- قربانزاده نقاب م، افضل ر. ۱۳۹۴. ارزیابی تنوع ژنتیکی توده های ایرانی و ژنوتیپ های خارجی گلرنگ ( *Carthamus tinctorius* ) با استفاده از صفات مورفولوژیکی و نشانگر مولکولیRAPD . پژوهشهای سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران)، جلد ۲۸، شماره ۱، ، صفحات ۹۴ تا ۱۰۶.

6- Altieri, M.A. and Merrick, L., 1987. In situ conservation of crop genetic resources through maintenance of traditional farming systems. Economic Botany, 41(1): 86-96.

7- Bellon, M.R., Gotor, E. and Caracciolo, F., 2015. Conserving landraces and improving livelihoods: how to assess the success of on-farm conservation projects? International Journal of Agricultural Sustainability, 13(2): 167-182.

8- Brush, S.B., 2000. The issues of in situ conservation of crop genetic resources. Genes in the Field. On-Farm Conservation of Crop Diversity, IPGRI, IDRC, Lewis Publishers: 3-26.

9- Das, A., Varma, A., Pandey, R. and Chaudhury, R., 2017. Ex Situ Conservation Strategies in Litchi Germplasm, The Lychee Biotechnology. Springer, pp. 381-393.

10- Gaur, P M Mallikarjuna N, Knights T, Beebe S, Debouck D , Mejía A , Malhotra RS, Imtiaz M, Sarker A, Tripathi Sh and Gowda CLL. 2009. *Gene introgression in grain legumes*. In: International Conference on Grain Legumes: Quality Improvement , Value Addition and Trade, 14-16 Feb 2009, Kanpur, India

11- Guerrant, E.O., Fiedler, P., Havens, K. and Maunder, M., 2004. Revised genetic sampling guidelines for conservation collections of rare and endangered plants: Supporting Species Survival in the Wild. In Ex situ plant conservation: supporting species survival in the wild. Island Press.

12- Haussmann, B.I. and Parzies, H.K., 2009. Methodologies for generating variability. Part 1: Use of genetic resources in plant breeding. and farmer participation: P 107. In Eds (Ceccarelli S, E.P. Guimarães and E. Weltzien), Plant breeding and farmer participation, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy.

13- Hurka, H., Neuffer, B. and Friesen, N., 2003. Plant genetic resources in botanical gardens, XXI International Eucarpia Symposium on Classical versus Molecular Breeding of Ornamentals-Part II 651, pp. 35-44.

14- IBPGR, 1984. Descriptors for soybean. International Board for Plant Genetic Resources, Rom, Italy.

15- Jiri, O., Mafongoya, P.L. and Musundire, R., 2017. The use of underutilised crops and animal species in managing climate change risks. Eds (Mafongoya. and Ajayi): Indigenous knowledge systems and climate change management in Africa. p.115. Technical Centre for Agricultural and Rural, Cooperation ACP-EU (CTA), Wageningen, The Netherlands

16- Maxted, N, Guarino, L, Myer, L, Chiwona, E 2002. Towards a methodology for on-farm conservation of plant genetic resources. Genetic Resources and Crop Evolution 49, 31-46.

17- Monna, L. et al., 1994. Determinationof RAPD markers in rice and their conversion into sequence tagged sites (STSs) and STS-specific primers. DNA Research, 1(3): 139-148.

18- Nature, I.U.f.C.o., Resources, N. and Fund, W.W., 1980. World conservation strategy: Living resource conservation for sustainable development. Gland, Switzerland: IUCN.

19- Nevo, E., 1998. Genetic diversity in wild cereals: regional and local studies and their bearing on conservation ex situ and in situ. Genetic Resources and Crop Evolution, 45(4): 355-370.

20- Nyadanu, D., Aboagye ,L., Akromah, R. and Dansi, A., 2016. Agro-biodiversity and challenges of on-farm conservation: the case of plant genetic resources of neglected and underutilized crop species in Ghana. Genetic resources and crop evolution, 63(8): 1397-1409.

21- Okuno, K., Shirata, K., Niino, T. and Kawase, M., 2005. Plant genetic resources in Japan: platforms and destinations to conserve and utilize plant genetic diversity. Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ, 39(4): 231-237.

22- Schwartz, K.R., Parsons, E.C.M., Rockwood, L. and Wood, T.C., 2017. Integrating In-Situ and Ex-Situ Data Management Processes for Biodiversity Conservation. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 5: 120, 5:120. doi: 10.3389/fevo.2017.00120.

23- Thomas, M, Dawson, JC, Goldringer, I, Bonneuil, C 2011. Seed exchanges, a key to analyze crop diversity dynamics in farmer-led on-farm conservation. Genetic Resources and Crop Evolution 58, 321-338.

24- Wang, Y., Shahid, M.Q., Ghouri, F., Baloch, F.S., Wang, Y. and Huang, H., 2015. Evaluation of the geographical pattern of genetic diversity of Glycine soja and Glycine max based on four single copy nuclear gene loci: For conservation of soybean germplasm. Biochemical Systematics and Ecology, 62, pp.229-235.

# Genetic structure of soybean landraces (*Glycinmax* (L.) Merr.) and its changes during *on-farm* conservation

**Abbasi M.R.[1], Fukuoka Sh.[2] and Ebana K.[2]**

**[1] Dept. of Seed and Plant Improvement, Agricultural and Natural Resources Research Center of Khorasan-e Razavi, Agricultural- Research-Education & Extension Organization (AREEO), Mashhad, I.R.of Iran**

**[2] Plant Genetic Diversity Lab., National Plant Genebank, National Institute for Agrobiological Science, Tsukuba, Japan**

## Abstract

One of the main issues in plant breeding is the knowledge of situation of conservation in plant genetic resources. This research was conducted to study on on-farm conservation efficiency by using molecular markers and morpho-phenological traits in soybean landraces. The subjected plants had been collected in two times with 10 years intervals. Twenty-eight accessions were planted in a field and subsequently characterized their traits according to standard descriptors. Eighty samples of DNA were extracted by the CTAB method, then RAPDs fragments were produced using 24 10-mer(base) selected-primes. Data was used in the cluster analysis as well as to estimate genetic variability within accessions using NTSYS and SPSS softwares. These analyses showed the genetic relationships among accessions. In the dendrogram, only in one accession the individuals in the new and old accessions appeared in the different clusters. These two accessions were different in their morpho-phenological traits too. Genetic variability coefficients in the new landraces were higher than the old ones, exception to one landrace. As soybean is highly self-pollinated (99.9%) crop, high genetic variability in the new landraces could not due to allo-pollination by foreign pollen. But, it could be because of seed exchange by farmers. In this research was shown that the genetic variability coefficient within the improved line is too much less than landraces. Also, this research showed that on-farm conservation could not conserve genotypes, on the other hand this type of conservation will cause some changes in genetic structures of genetic resources during the times.

**Key words:** Genetic variability, cluster analysis, on-farm conservation