



اعتبارسنجی نشانگرهای منتخب تحمل به تنش خشکی در ژنوتیپ‌های سویا در شرایط نرمال و تنش خشکی

احمدرضا دادرسی^۱، حبیب‌ا... سمیع‌زاده^۲ و حسین صبوری^۳

۱- دانش‌آموخته مقطع دکتری دانشگاه گیلان و استادیار پژوهشی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان زنجان

۲- دانشیار، دانشگاه گیلان، (نویسنده مسؤل: hsamizadeh@yahoo.com)

۳- دانشیار، دانشگاه گنبدکاووس

تاریخ پذیرش: ۹۴/۸/۹

تاریخ دریافت: ۹۴/۶/۱

چکیده

اعتبارسنجی نشانگرهای پیوسته به QTL‌های شناسایی شده قبل از انجام انتخاب به کمک نشانگر به عنوان یک گام ضروری محسوب می‌شود. در تحقیق حاضر با استفاده از ۱۲۱ رقم و لاین پیشرفته سویا و کشت در دو محیط نرمال و تحت تنش خشکی در دو منطقه رشت و گنبد کاووس اقدام به اعتبارسنجی ۲۱ نشانگر ریزوماهواره مرتبط با تحمل به تنش خشکی شد. در بررسی جمعیت از لحاظ میزان تنوع ژنتیکی، متوسط تعداد الل به ازای هر نشانگر، ۵/۵۳ الل و متوسط محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC)، ضریب تنوع ژنتیکی نی (H) و شاخص شانون (I)، به ترتیب ۰/۷۳، ۰/۷۷ و ۱/۵۷ برآورد شد که مقدار بالای این آماره‌ها، نشان‌دهنده توانایی این نشانگرها در تفکیک ژنوتیپ‌های مورد مطالعه است. تجزیه ساختار و تجزیه خوشه‌ای بترتیب بر اساس روش بیزی و اتصال همسایگی افراد را به سه زیرجمعیت و سه گروه تقسیم نمودند. نتایج تجزیه ارتباطی بین نشانگرهای ریزوماهواره و صفات مرتبط با عملکرد با استفاده از روش‌های GLM و MLM با سه مدل آماری نشان داد که نشانگرهای Satt454، Satt345، Satt210، Sat_292، Satt142، Satt339، Satt249 و Satt458 در این زمینه ژنتیکی به تأیید رسیدند و به عنوان تأثیرگذارترین نشانگرها تعیین شدند. بالاترین درصد توجیه تغییرات صفات مربوط به نشانگرهای Sat_292 و Satt454 بود که بیش از ۱۸ درصد از تغییرات وزن دانه در کل غلاف‌های بوته را بترتیب در شرایط نرمال و تنش خشکی تبیین نمودند.

واژه‌های کلیدی: انتخاب به کمک نشانگر، تجزیه خوشه‌ای، تجزیه ساختار، تنوع ژنتیکی، ریزوماهواره

مقدمه

سویای زراعی (*Glycine max*) که قبل از سال ۱۹۴۰ به طور عمده برای علوفه کشت می‌شد، امروزه پس از ذرت و گندم مقام سوم را از نظر تولید دانه و از نظر ارزش غذایی پس از ذرت دومین رتبه را در کشور آمریکا دارد و در کشورهای مثل آمریکا گیاه دانه‌ای مهمی تلقی می‌شود (۲). بر اساس گزارش فائو سطح زیر کشت سویا در جهان در سال ۲۰۱۲ حدود ۱۰۴۹۹۷۲۵۳ هکتار با میانگین عملکرد ۲۳۰۳ کیلوگرم در هکتار و در ایران در سال ۲۰۱۲ حدود ۸۰۰۰۰ هکتار و با میانگین عملکرد حدود ۲۵۰۰ کیلوگرم در هکتار بوده است (۱۱).

بررسی تنوع ژنتیکی برای اهداف مختلف به‌نژادی از جمله حفظ و نگهداری ژرم‌پلاسم‌های موجود، انتخاب و گزینش آلل‌های مطلوب و در نهایت بهبود صفات به عنوان یک بستر پایه‌ای و اساسی محسوب می‌شود. در پژوهشی با هدف بررسی تنوع ژنتیکی و تجزیه ارتباطی از یک جمعیت بزرگ سویا با ۱۵۹ ژنوتیپ انجام شد. ارزیابی تنوع ژنتیکی با استفاده از ۵۵ نشانگر ریزوماهواره که در طول ژنوم پراکنده بودند نشان داد که تنوع ژنتیکی به میزان ۰/۸۰۶ و تعداد ۷۸۱ آلل با متوسط ۹/۴ الل برای هر نشانگر در این مجموعه وجود دارد که نشان‌دهنده اطلاعات و تنوع ژنتیکی بالا در آنها بود. تجزیه ساختار نیز کلیه ژنوتیپ‌ها را به چهار گروه تقسیم کرد. تجزیه ارتباطی نیز منجر به شناسایی ۲۱ نشانگر ریزوماهواره شد که به طور معنی‌داری با صفات مختلف مرتبط بودند. گوپتا

و همکاران (۱۳) اظهار داشتند نتایج بدست آمده در بررسی تنوع ژنتیکی و تجزیه ارتباطی می‌تواند برای حفظ و کاربرد ژرم‌پلاسم سویا بسیار مفید باشد.

امروزه غلبه بر محدودیت‌های محیطی از جمله تنش خشکی در همه گیاهان از جمله سویا با توجه به اهمیت و ارزش غذایی آن، از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. تاکنون روش‌های متعددی برای انتخاب تحمل به خشکی در سویا بکار گرفته شده که می‌توان اندازه‌گیری عملکرد در شرایط تنش خشکی در طی فصل رشد (۳۰،۱۲) ارزیابی ژنوتیپ‌ها در محیط‌های کنترل شده نظیر گلخانه و آزمایشگاه (۲۸،۲۷) و استفاده از آبیاری تکمیلی برای ایجاد محیط‌های رطوبتی مختلف برای مقایسه تظاهر ژنوتیپ‌ها (۲۸) و در دهه اخیر انتخاب به کمک نشانگر (۲۳،۲۰) را نام برد.

پیچیدگی کنترل ژنتیکی تحمل به تنش خشکی به‌نژادگران را به استفاده از روش‌های مولکولی در کنار روش‌های سنتی بهبود این صفت سوق می‌دهد. شناسایی QTL‌های کنترل‌کننده صفات مرتبط با تحمل به تنش خشکی با استفاده از نشانگرهای مولکولی از جمله روش‌های به‌نژادی مولکولی است که از نتایج آن پس از طی مراحل تأیید می‌توان در برنامه‌های اصلاحی متعدد مثل انتخاب به کمک نشانگر استفاده نمود. تاکنون چندین پژوهش برای شناسایی QTL‌های کنترل‌کننده صفات مرتبط با تحمل به تنش خشکی در سویا صورت گرفته است (۳۳،۸،۹،۶،۲۱،۳). در پژوهشی با استفاده از سه جمعیت لاین‌های اینبرد نوترکیب

لزوم مکان‌یابی QTL‌های کنترل‌کننده صفات مرتبط با تحمل به تنش خشکی، باید این نواحی به همراه نشانگرهای پیوسته شناسایی شده تعیین اعتبار گردند. این تحقیق نیز در راستای اعتبار سنجی نشانگرهای کاندیدای تحمل به تنش خشکی در ژنوتیپ‌های سویا در دو منطقه رشت و گنبد کاووس طرح‌ریزی شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی شامل ۱۰۰ لاین پیشرفته (نسل F7) به همراه ۲۱ رقم سویا (مجموعاً ۱۲۱ ژنوتیپ) بود که در دو محیط نرمال و تحت تنش خشکی در دو منطقه رشت و گنبد کاووس در سال زراعی ۱۳۹۳ کشت شد. اطلاعات ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است.

و نشانگرهای مولکولی DArT شناسایی QTL برای سه صفت مرتبط با تحمل به خشکی یعنی میزان هدایت غشا، محتوای آب نسبی برگ در طول تنش و بهبود و برگشت گیاه پس از تنش انجام شد. نتایج نشان داد در سه جمعیت ۶ گروه لینکاژی به صورت مشترک با تحمل به خشکی مرتبط می‌باشند (۳۳).

علی‌رغم مکان‌یابی QTL‌های متعدد، از آنجاییکه QTL‌ها برای صفات مختلف با استفاده از زمینه‌های ژنتیکی مختلف شناسایی می‌شوند لذا مستقیماً برای به‌نژادگران قابل استفاده نیستند و هنوز یک شکاف بین اصول بنیادی و تحقیقات کاربردی در این زمینه وجود دارد (۵). در این راستا تعیین اعتبار QTL‌ها و تأیید نشانگرهای پیوسته به این نواحی شناسایی شده یک گام اساسی و ضروری قبل از انجام برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر است (۲۲). لذا علاوه بر

جدول ۱- اطلاعات ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در تحقیق حاضر

Table 1. Information of studied genotypes in present research

مشخصات	ردیف	مشخصات	ردیف	مشخصات	ردیف
کاسپین	۸۳	Sahar × Gorgan 3 (1)	۴۲	Nemaha × Savoy (1)#	۱
سحر	۸۴	Sahar × Gorgan 3 (3)	۴۳	Nemaha × Savoy (2)	۲
کنول	۸۵	Hamilton × Katoul (3)	۴۴	Nemaha × Savoy (4)	۳
ویلیامز	۸۶	Hamilton × Katoul (2)	۴۵	Nemaha×Savoy (5)	۴
SG20	۸۷	Sahar × Katoul (3)	۴۶	Kottman × Kitimisharo (1)	۵
صفی آبادی	۸۸	Sahar × Katoul (4)	۴۷	Kottman × Kitimisharo (2)	۶
L504	۸۹	Sahar × Katoul (5)	۴۸	Kottman × Kitimisharo (3)	۷
سلکسیون ۷	۹۰	Sahar × Katoul (7)	۴۹	Spry × Kitimisharo (1)	۸
سلکسیون ۵۳	۹۱	Sahar × Katoul (8)	۵۰	Spry × Kitimisharo (2)	۹
سلکسیون ۵۵	۹۲	Sahar × Katoul (9)	۵۱	Spry × Kitimisharo (4)	۱۰
سلکسیون ۸۱	۹۳	Hamilton × Gorgan 3 (3)	۵۲	Spry × Kitimisharo (5)	۱۱
سلکسیون ۱۰۶	۹۴	Williams × Katoul (9)	۵۳	Charleston × Mustang (1)	۱۲
سلکسیون ۱۷۰	۹۵	Williams × Katoul (5)	۵۴	Charleston × Mustang (2)	۱۳
Hamilton × Sepid (8)	۹۶	Williams × Katoul (4)	۵۵	Charleston × Mustang (3)	۱۴
Sahar × Sepide (1)	۹۷	Sahar × Williams (8)	۵۶	Spry × Savoy (3)	۱۵
Sepide × T1SRF (5)	۹۸	Williams × Katoul (2)	۵۷	Spry × Savoy (4)	۱۶
Hamilton × Fora (3)	۹۹	Sahar × Williams (10)	۵۸	Spry × Savoy (5)	۱۷
Hamilton × K778 (3)	۱۰۰	Sahar × K778 (1)	۵۹	Williams × K778 (3)	۱۸
Sahar × K779 (5)	۱۰۱	Sahar × K778 (3)	۶۰	Williams × K778 (4)	۱۹
Sepide × K778 (3)	۱۰۲	Sahar × K778 (7)	۶۱	Williams × K778 (5)	۲۰
For a × Macon (3)	۱۰۳	Clary × Nigeria (10)	۶۲	Williams × Hamilton (1)	۲۱
For a × LD 10 (1)	۱۰۴	Sahar × Hamilton (3)	۶۳	Williams × Hamilton (2)	۲۲
Williams × K778 (2)	۱۰۵	Sahar × Hamilton (4)	۶۴	Williams × Hamilton (3)	۲۳
Crawford × Lan (3)	۱۰۶	Sahar × Hamilton (8)	۶۵	Williams × Hamilton (4)	۲۴
Crawford × Vilana (4)	۱۰۷	Graham × Nigeria (9)	۶۶	Hamilton × Katoul (12)	۲۵
Williams × Vilana (4)	۱۰۸	Sahar × Hamilton (10)	۶۷	Hamilton × Williams (2)	۲۶
Mustang × Delsoy 4210	۱۰۹	Graham × Nigeria (2)	۶۸	Hamilton × Williams (3)	۲۷
Spry × Savoy	۱۱۰	Clary × Nigeria (9)	۶۹	Gorgan3 × K778 (1)	۲۸
Pershing × Epps	۱۱۱	Graham × Nigeria (8)	۷۰	Gorgan3 × K778 (2)	۲۹
Williams × Diana (1)	۱۱۲	Graham × Nigeria (8)	۷۱	Gorgan3 × K778 (3)	۳۰
Sahar × Collombus (4)	۱۱۳	Graham × Nigeria (5)	۷۲	Gorgan3 × K778 (8)	۳۱
Sahar × Collombus (13)	۱۱۴	Clary × Nigeria (5)	۷۳	Gorgan 3 × K778 (9)	۳۲
Sahar × Crawford (1)	۱۱۵	Clary × Nigeria (3)	۷۴	Gorgan3×K778 (10)	۳۳
Black Williams × Lan (4)	۱۱۶	H7	۷۵	Gorgan3 × K778 (11)	۳۴
Black Williams × Epps (10)	۱۱۷	L17	۷۶	Gorgan3 × K778 (12)	۳۵
Sahar × K188(5)	۱۱۸	WEb	۷۷	Gorgan3 × Williams (2)	۳۶
Sahar × Hamilton (1)	۱۱۹	PE	۷۸	Gorgan3 × Williams (4)	۳۷
Sahar ×LBK (1)	۱۲۰	DW	۷۹	Gorgan3 × Williams (7)	۳۸
DPK×Fora(1)	۱۲۱	M7	۸۰	Hamilton × Katoul (8)	۳۹
		M9	۸۱	Hamilton × Katoul (4)	۴۰
		ساری	۸۲	Gorgan3 × Katoul (4)	۴۱

*: برای هر لاین، تلاقی تشکیل دهنده آن به همراه شماره لاین مربوطه در نسل F7 در داخل پرانتز آورده شده است.

پس از امتیازدهی نوارها، محتوای اطلاعات چندشکل (PIC) با استفاده از نرم‌افزار Power Marker و سایر آماره‌های تنوع ژنتیکی شامل تعداد آل‌های موثر، شاخص نی و شاخص شانون (۳۰) با استفاده از نرم‌افزار PopGene (۳۴) محاسبه شدند. در ادامه ماتریس ژنتیکی شباهت با ضرایب مختلف همانند جاکارد^۱، ضریب تطابق ساده^۲ و نی^۳، تشکیل گردید و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها، طبق الگوریتم‌های مختلف تجزیه خوشه‌ای مانند ادغام بر حسب متوسط گروه‌ها^۴، اتصال همسایگی^۵، دورترین همسایگی^۶ و نزدیکترین همسایگی^۷ با استفاده از نرم‌افزارهای مختلف مثل، GGT2 و NTSYSp انجام شد و مناسب‌ترین دندروگرام براساس معیارهای مختلف مثل ضریب همبستگی کوفنتیک^۸ و ساختار مناسب دندروگرام با حداقل زنجیره‌ای شدن افراد تعیین گردید. تعداد گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای با استفاده از بیشترین فاصله محل ادغام شاخه‌ها در دندروگرام صورت گرفت و گروه‌های مختلف با رنگ متمایز نشان داده شد.

به منظور انجام تجزیه ارتباط ابتدا ماتریس ساختار ژنتیکی ژنوتیپ‌ها با استفاده از نرم‌افزار STRUCTURE (۲۵) تشکیل گردید. در این نرم‌افزار با توجه به اینکه در مورد ساختار جمعیت اطلاعات قبلی در دست نبود بنابراین تعداد بهینه K با انجام شبیه‌سازی تعیین گردید. برای این منظور تعداد K از ۱ تا ۱۰ در نظر گرفته شد و انجام شبیه‌سازی با طول دوره ۱۰۰۰۰۰ Burnin و تعداد تکرار ۱۰۰۰۰۰ MCMC صورت پذیرفت. پس از انجام شبیه‌سازی برای تعیین تعداد بهینه K (تعداد گروه‌ها) از دو ستون خلاصه شده K و LnP(D) برای محاسبات استفاده گردید و برای هر K، میانگین L(K) و انحراف معیار (Stdev) تکرارها محاسبه گردید. بعد از آن تفاضل میانگین تکرارها برای گروه‌های مجاور به صورت گروه بالاتر منهای گروه پایین‌تر و به نام L(K) تعیین و سپس تفاضل L(K) برای گروه‌های مجاور و به نام L^۲(K) محاسبه گردید که در نهایت از این محاسبات K تعیین شد. در صورتی که نمودار دو طرفه K و K رسم گردد نقطه اوج منحنی همان تعداد بهینه K خواهد بود (۱۰). در نهایت ماتریس Q (نتایج حاصل از ساختار جمعیت) از نرم‌افزار STRUCTURE استخراج شد و برای انجام تجزیه ارتباط بین داده‌های فنوتیپی و ژنوتیپی با استفاده از نرم‌افزار TASSEL 4.1.2 (۴) استفاده شد. در نرم‌افزار TASSEL از سه مدل آماری با دو روش GLM و MLM استفاده شد که این مدل‌ها در جدول ۲ ارائه شده است.

طرح آزمایشی مورد استفاده بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار بود. هر کرت آزمایشی دارای سه ردیف به طول دو متر با فاصله خطوط کاشت ۳۵ و فاصله بوته‌ها روی ردیف، ۱۰ سانتی‌متر بود. در طی دوره رشد برای مبارزه با علف‌های هرز، وجین دستی و همچنین علف کش سوپرگالانت استفاده شد. عملیات کاشت برای هر دو محیط (تنش آبی و بدون تنش آبی) و هر دو منطقه یکسان و بصورت دستی انجام شد. اولین آبیاری بلافاصله پس از کاشت صورت گرفت. برای محیطی که آبیاری نرمال داشت، مقدار آب آبیاری و دوره تناوب با توجه به روابط موجود در منابع (۱) به گونه‌ای اعمال شد که رطوبت خاک در محدوده رطوبتی ظرفیت زراعی تا حداکثر تخلیه رطوبتی باقی بماند و آبیاری در محیط تنش تا استقرار گیاه در زمین (حدود ۵ تا ۶ برگی) مطابق محیط بدون تنش انجام شد و پس از آن، تنش آبی اعمال شد. زمان اعمال تنش برابر با شرایط رطوبتی ۲۵ درصد تخلیه از رطوبت ظرفیت زراعی در نظر گرفته شد. تعیین این زمان نیز با نمونه‌برداری از خاک از عمق ۳۰ سانتی‌متر برای تعیین میزان رطوبت انجام شد. به منظور جلوگیری از اثر بارندگی در مزرعه تحت تنش خشکی در منطقه رشت، از پوشش پلاستیکی استفاده شد. پس از رسیدگی صفات مختلف مربوط به عملکرد از جمله تعداد کل غلاف در بوته، تعداد دانه در هر غلاف، تعداد دانه در کل بوته، وزن کل بوته، وزن کل غلاف‌ها در بوته، وزن دانه در کل غلاف‌ها در بوته و وزن صد دانه اندازه‌گیری شد. به منظور انجام آزمایشات مولکولی، ابتدا از برگ‌های جوان و سالم در مرحله انتهایی رشد رویشی نمونه تهیه شد و استخراج DNA انجام گرفت (۲۶). کمیت و کیفیت DNA با استفاده از اسپکتروفوتومتر و ژل آگارز تعیین و سپس DNAها با نسبت‌های مناسب و مورد نیاز رقیق‌سازی شدند. انتخاب نشانگرهای SSR پیوسته به QTLهای کنترل‌کننده صفات مرتبط با تحمل به تنش خشکی بر اساس اطلاعات پایگاه اطلاعاتی <http://soybase.org> و مقالات معتبر به تعداد ۲۵ نشانگر انجام شد. از این تعداد ۲۱ نشانگر الگوی نواری قابل امتیازدهی تولید کردند که در تجزیه و تحلیل مورد استفاده قرار گرفت.

انجام PCR، براساس دمای اتصال هر آغازگر انجام شد (۱۷). در ادامه DNA حاصل از تکثیر نشانگرها توسط الکتروفورز عمودی با استفاده از ژل پلی‌اکریل‌امید واسرشته‌ساز شش درصد تفکیک و با روش رنگ‌آمیزی نیترات نقره (۲۹) قابل رویت گردید. سرانجام داده‌های مولکولی نمونه‌ها از لحاظ نشانگرهای مورد استفاده به ثبت رسیدند.

جدول ۲- سه مدل آماری استفاده شده برای انجام تجزیه ارتباطی نشانگرهای ریزماهوره و صفات فنوتیپی
Table 2. The used three models to Association analysis between SRR markers and phenotypic traits

مدل	مجموعه داده مورد استفاده
۱: MLM	Phenotype + SSR + K + Q
۲: MLMa	Phenotype + SSR + Kb
۳: GLMc	Phenotype + SSR + Qd

a: مدل خطی مخلوط، b: داده‌های خویشاوندی حاصل از مشابهت کلی افراد از لحاظ زمینه ژنتیکی ناشی از خویشاوندی، c: مدل خطی عمومی و d: داده‌های ساختار جمعیت یا اصل و نسب استنباط شده از افراد

1- Jaccard	2- Simple matching coefficient	3- Nei	4- UPGMA
5- Neighbor Joining	6- Complete Linkage	7- Single Linkage	
8- Cophentic	9- Markov Chain Monte Carlo		

نتایج و بحث

بررسی آماره‌های تنوع ژنتیکی و تجزیه ساختار

آماره‌های تنوع ژنتیکی نشانگرهای ریزماهواره مورد بررسی در جدول ۳ نشان داده شده است. همانگونه که مشاهده می‌شود در کل ۱۱۶ آلل شناسایی شد که به طور متوسط به ازای هر نشانگر ۵/۵۳ الل برآورد می‌گردد. دقت در نتایج بیانگر این است که بالاترین محتوای اطلاعات چندشکلی یا PIC به نشانگرهای Satt454، Satt458 و Sat-418 با مقدار PIC برابر یا بیش از ۰/۸۰ اختصاص دارد. این نشانگرهای از شاخص شانون و ضریب تنوع ژنتیکی نی بالا هم برخوردار بودند. شاخص شانون برای این نشانگرها بالاتر از ۱/۷۶ و ضریب تنوع ژنتیکی بالاتر از ۰/۸۲ برآورد شد. بعد از این نشانگرها، Satt210 و Sat-292 در مرتبه بعدی اهمیت قرار داشتند. متوسط PIC، ۰/۳۷ برآورد شد. نشانگرهای Sat-343 و Satt471 نیز از لحاظ آماره‌های تنوع پایین‌ترین مقدار را نسبت به سایر نشانگرها بدست آوردند. در این نشانگرها سایر آماره‌ها از جمله شاخص شانون، ضریب تنوع ژنتیکی نی و تعداد آلل موثر نیز نسبت به دیگر نشانگرها پایین‌تر بود. میزان متوسط ضریب تنوع ژنتیکی نی و شاخص شانون به ترتیب ۰/۷۷ و ۱/۵۷ برآورد شد و در مجموع با توجه به حصول تعداد آلل متوسط و همچنین مقادیر PIC و سایر آماره‌های تنوع ژنتیکی قابل توجه برای نشانگرها، در مقایسه با سایر مطالعات مشابه (۱۶، ۱۵، ۷) می‌توان اظهار داشت نشانگرهای مورد استفاده قادر بودند ژنوتیپ‌های سویا در تحقیق حاضر را به طور مناسبی تفکیک نمایند. همچنین وجود تنوع آلی قابل توجه در این جمعیت بر اساس نشانگرهایی که پیوسته به نواحی کنترل‌کننده صفات مرتبط با خشکی هستند نشان‌دهنده این واقعیت است که می‌توان بر اساس اطلاعات مولکولی در تلفیق با اطلاعات فنوتیپی در شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی امیدوار بود.

نتایج تجزیه ساختار با استفاده از نرم‌افزار STRUCTURE در شکل ۱ و ۲ و جدول ۴ ارائه شده است. جدول ۴ آماره‌های محاسبه شده برای تعیین مقدار K برای ژنوتیپ‌های سویا را نشان می‌دهد و شکل ۱ نمودار دو طرفه

برای تعیین بهینه K را نشان می‌دهد. در این شکل مقدار K و K از نتایج مربوط به شبیه‌سازی در نرم‌افزار STRUCTURE استخراج گردید. مقدار بهینه K نقطه اوج منحنی است که با توجه به نمودار، بهترین K در این مطالعه ۳ می‌باشد. در واقع تجزیه ساختار نشان داد که تعداد خوشه‌هایی که پارامتر K را به حداکثر خود می‌رساند برابر ۳ می‌باشد و ۱۲۱ رقم و لاین سویا به سه گروه تقسیم‌بندی شدند. تعداد ۴۵، ۲۷ و ۳۹ ژنوتیپ به ترتیب به گروه‌های ۱ تا ۳ منتسب شدند و تعداد ۱۰ ژنوتیپ به صورت مخلوط شناسایی شدند. دندروگرام تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها (به صورت نمایش تابیسی) بر اساس اطلاعات نشانگرهای ریزماهواره در شکل ۳ ارائه شده است. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس بیشترین فاصله محل ادغام خوشه‌ها در دندروگرام، ژنوتیپ‌ها را به سه گروه تقسیم نمود که با رنگ‌های متمایز نشان داده شده است. مقایسه نتایج تجزیه خوشه‌ای و تجزیه ساختار در پژوهش حاضر نیز بیانگر این حقیقت است که علی‌رغم مطابقت‌های قابل توجهی بین این دو تجزیه در زیرگروه‌های کوچک، اما نمی‌توان مطابقت کامل بین آنها مشاهده نمود. در مقایسه کلی این دو نوع تجزیه بر روی داده‌های حاصل از نشانگرهای مولکولی عنوان شد یک جمعیت مورد مطالعه می‌تواند از لحاظ ساختار ژنتیکی که ناشی از تفاوت فراوانی آلی و آماره F رایت^۱ است به زیر گروه‌های مختلف تقسیم گردد. نتایج گروه‌بندی بر اساس ساختار ژنتیکی می‌تواند متفاوت یا مشابه با گروه‌بندی با استفاده از تجزیه خوشه‌ای باشد. چون در تجزیه خوشه‌ای ابتدا ماتریس شباهت بین افراد تشکیل می‌گردد و سپس از الگوریتم خاصی برای گروه‌بندی استفاده می‌شود که می‌تواند به روش‌های مختلفی انجام گیرد. مدل پیشنهاد شده در نرم‌افزار STRUCTURE (۲۵)، خوشه‌هایی از افراد با استفاده از روش بیزی^۲ و بر اساس ژنوتیپ آنها در چندین مکان ژنی تشکیل می‌شود. روش بیزی اطلاعات منشاء ژنوتیپ‌ها را بیش از روش‌های گروه‌بندی دیگر مثل تجزیه خوشه‌ای یا تجزیه به بردارهای اصلی مدنظر قرار می‌دهد (۲۴).

جدول ۳- آماره‌های تنوع ژنتیکی محاسبه شده برای نشانگرهای ریزماهوره مورد بررسی

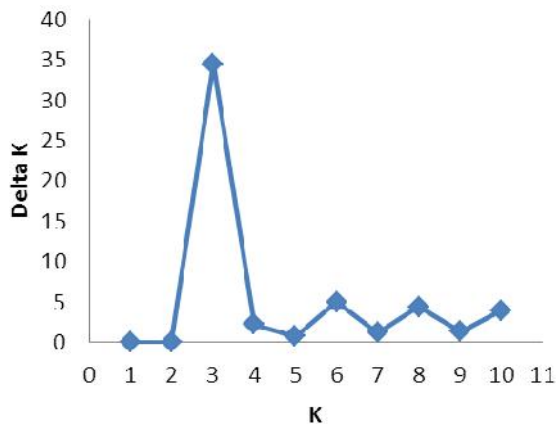
Table 3. Calculated genetic variation statistics for used SRR markers

نشانگر	فراوانی الی	تعداد ال	تعداد ال مؤثر	PIC	ضریب Nei (H)	شاخص Shannon (I)
Sat_343	-/۴۲	۳	۲/۸۸	-/۵۸	-/۶۵	۱/۰۸
Sat_345	-/۳۸	۵	۳/۹۷	-/۷۱	-/۷۵	۱/۴۹
Satt339	-/۳۳	۵	۳/۷۹	-/۶۹	-/۷۴	۱/۴۴
Sat_091	-/۳۴	۶	۴/۳۳	-/۷۳	-/۷۷	۱/۵۹
Satt572	-/۳۷	۴	۳/۵۸	-/۶۷	-/۷۲	۱/۳۳
Satt471	-/۵۹	۳	۲/۰۵	-/۴۲	-/۵۲	-/۸۲
Satt454	-/۲۲	۶	۵/۶۴	-/۸۰	-/۸۲	۱/۷۶
Satt648	-/۲۹	۶	۴/۷۷	-/۷۶	-/۷۹	۱/۶۶
Sat_171	-/۳۶	۵	۴/۲۳	-/۷۳	-/۷۶	۱/۵۳
Sat_312	-/۲۵	۵	۴/۷۴	-/۷۵	-/۷۹	۱/۵۸
Satt210	-/۳۷	۷	۵/۵۱	-/۷۹	-/۸۲	۱/۸۱
Satt478	-/۲۷	۶	۴/۸۴	-/۷۶	-/۷۹	۱/۶۷
Satt302	-/۳۲	۵	۴/۰۱	-/۷۱	-/۷۵	۱/۴۵
Satt142	-/۲۶	۶	۴/۴۱	-/۷۸	-/۸۲	۱/۷۴
Satt317	-/۲۲	۶	۵/۳۴	-/۷۸	-/۸۱	۱/۷۲
Satt249	-/۳۴	۶	۵/۰۱	-/۷۷	-/۸۰	۱/۶۷
Satt287	-/۳۵	۵	۴/۰۱	-/۷۱	-/۷۵	۱/۴۸
Satt458	-/۳۳	۷	۶/۲۱	-/۸۲	-/۸۴	۱/۸۸
Satt154	-/۲۹	۶	۴/۹۳	-/۷۷	-/۸۰	۱/۶۸
Sat_292	-/۲۷	۷	۵/۴۵	-/۷۹	-/۸۲	۱/۷۹
Sat_418	-/۲۱	۷	۶/۳۰	-/۸۲	-/۸۴	۱/۸۷
جمع	-/۴۸	۱۱۶	۹۶/۸۸	۱۵/۳۴	۱۶/۱۵	۳۳/۰۴
میانگین	-/۳۱	۵/۵۳	۴/۶۲	-/۷۳	-/۷۷	۱/۵۷

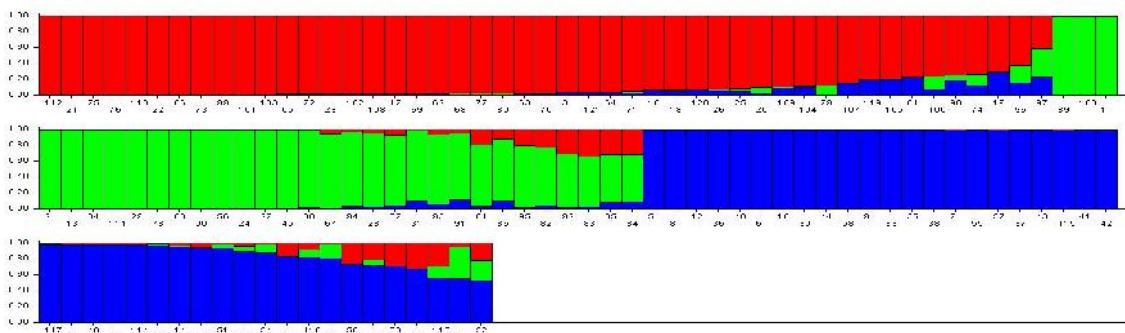
جدول ۴- آماره‌های محاسبه شده برای مقادیر بهینه K با استفاده از نرم‌افزار STRUCTURE

Table 4. Estimated parameter for optimum K values by using STRUCTURE

K	L(k)	Stdev	L'(K)	L''(K)	[L''K]	Delta K
۱	-۷۷۲۲/۳	۱/۲۲	-	-	-	-
۲	-۷۱۷۷/۱	۶۱/۰۹	۵۴۵/۱۸	-/۳۳	-/۳۳	-/۰۰
۳	-۶۶۳۱/۶	۴/۴۷	۵۴۵/۵۲	-۱۵۴/۳۳	۱۵۴/۳۳	۳۴/۵۱
۴	-۶۴۰/۴۲	۲۴/۶۸	۳۹۱/۱۸	-۵۵/۲۸	۵۵/۲۸	۲/۳۴
۵	-۵۹۰۴/۵۲	۵۸/۰۵	۳۳۵/۹۰	-۴۳/۹۸	۴۳/۹۸	-/۷۶
۶	-۵۶۱۲/۶	۳۶/۱۴	۲۹۱/۹۲	-۱۸۲/۱۲	۱۸۲/۱۲	۵/۰۴
۷	-۵۵۰۲/۸	۱۵۱/۴۹	۱۰۹/۸۰	۱۸۱/۷۰	۱۸۱/۷۰	۱/۲۰
۸	-۵۲۱۱/۳	۳۵/۶۶	۲۹۱/۵۰	-۱۵۸/۲۵	۱۵۸/۲۵	۴/۴۴
۹	-۵۰۷۸/۰۵	۹۴/۵۷	۱۳۳/۲۵	۱۲۵/۶۵	۱۲۵/۶۵	۱/۳۳
۱۰	-۴۸۱۹/۱۵	۶۵/۵۲	۲۵۸/۹۰	-۲۵۸/۹۰	۲۵۸/۹۰	۳/۹۵

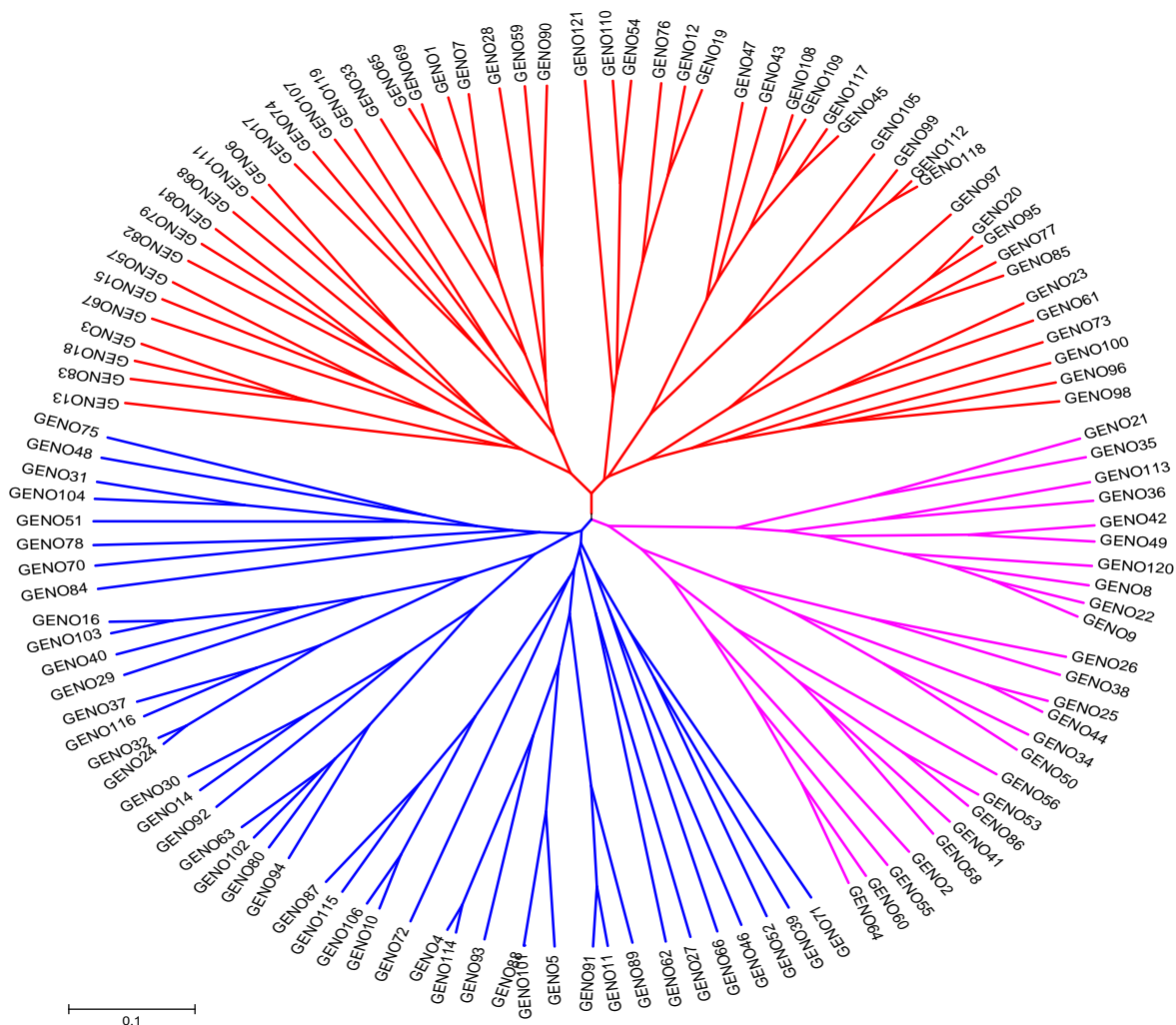


شکل ۱- نمودار دو طرفه برای تعیین مقدار بهینه K
Figure 1. Two-dimensional scatter for determine optimum value of K



شکل ۲- بار پلات ساختار جمعیت مستخرج از STRUCTURE و ۲۱ نشانگر ریزماهوره که در سه بخش رنگی تقسیم شده است. شماره و مشخصات ژنوتیپ‌ها در جدول ۱ آورده شده است

Figure 2. Extracted population structure bar plot from STRUCTURE and the 21 SRR markers distributed in three-color sections. Genotype information are indicated in Table 1



شکل ۳- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های سویا (به شکل نمایش تابشی) به روش اتصال همسایگی با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره. شماره و مشخصات ژنوتیپ‌ها در جدول ۱ آورده شده است

Figure 3. Dendrogram of different soybean genotypes based on SSR markers using neighbor joining similarity matrix. Genotype information are indicated in Table 1

در این مطالعه متوسط محتوای اطلاعات چند شکلی ۰/۶۱۶ برآورد شد و تعداد الل متوسط مربوط به جمعیت‌های متعلق به کره، چین، ژاپن و جنوب شرقی آسیا بترتیب برابر با ۱۳/۴، ۹، ۵/۴ و ۶/۵ بدست آمد. لی و همکاران (۱۵) بر اساس نتایج تجزیه ساختار، ژنوتیپ‌های کره را منفک از ژنوتیپ‌های چین گروه‌بندی کردند و آنها را به پنج زیرجمعیت تقسیم نمودند و اظهار داشتند ژنوتیپ‌های کشور کره با داشتن تنوع ژنتیکی بالا یک ذخیره آلی ارزشمند برای برنامه‌های اصلاحی سویا محسوب می‌گردند.

تجزیه ارتباطی

نتایج تجزیه ارتباطی بین نشانگرهای ریزماهوره و صفات مربوط به عملکرد برای محیط نرمال و تحت تنش بترتیب در جدول ۵ و ۶ ارائه شده است. در مقایسه بین دو منطقه از لحاظ نشانگرهای شناسایی شده تطابق قابل توجهی وجود دارد و غالباً نشانگرهای معنی‌دار برای هر دو منطقه ردیابی شدند. در مقایسه مدل‌های آماری نیز بر طبق انتظار تعداد نشانگرهای شناسایی شده در مدل‌های MLM کمتر از GLM بودند. اگر تجزیه ارتباطی، بدون شناسایی ساختار ژنتیکی جمعیت مورد بررسی انجام گیرد، منجر به شناسایی روابط کاذب بین نشانگر و QTL خواهد شد. لذا از اطلاعات حاصل از نتایج ساختار ژنتیکی می‌توان در انجام تجزیه ارتباط استفاده نمود تا از شناسایی بخشی از پیوستگی‌های کاذب که ممکن است به دلیل تفاوت در ساختار جمعیت باشد ممانعت به عمل آید (۱۳).

بررسی تنوع ژنتیکی به منظور حفاظت از منابع و ذخایر ژنتیکی موجود به ویژه در ژنوتیپ‌های وحشی یکی از اساسی‌ترین برنامه‌های به‌نژادی محسوب می‌گردد، در این راستا در مطالعه دیگری تنوع ژنتیکی ۹۰ ژنوتیپ سویا که از نواحی وسیع جغرافیایی از دو کشور چین و کره جمع‌آوری شده بودند، از لحاظ ۴۹ نشانگر SSR مورد بررسی قرار گرفت. آنها ضریب تنوع ژنتیکی نی برای ژنوتیپ‌های چین و کره را بترتیب مقادیر ۰/۷۶ و ۰/۷۲ برآورد نمودند و عنوان نمودند تنوع ژنتیکی بسیار بالایی در جمعیت‌های هر دو کشور وجود دارد که هر کدام به عنوان خزانه ژنتیکی واحد برای بهبود این گیاه قابل بهره‌برداری است (۱۶).

در پژوهشی (۷) ساختار و تنوع ژنتیکی ۱۰۰ ژنوتیپ سویا در چین را با استفاده از ۵۳ نشانگر ریزماهوره مورد بررسی قرار دادند. این محققین در کل ۲۹۶ آلل با متوسط ۵/۶ آلل برای هر نشانگر SSR و متوسط محتوای اطلاعات چندشکلی متغیر ۰/۵۷۳ برآورد نمودند. در مطالعه آنها تجزیه ساختار، کلیه ژنوتیپ‌ها را به ۸ زیرجمعیت و تجزیه خوشه‌ای با روش UPGMA به ۱۱ زیرگروه تقسیم نمود. آنها اظهار داشتند مقایسه دقیق‌تر تجزیه ساختار و تجزیه خوشه‌ای بیانگر مطابقت قابل توجه بین آنهاست. اکسش‌هایی که در یک خوشه قرار گرفتند از لحاظ منشاء، رنگ بذر یا شجره قرابت قابل توجهی داشتند.

در یک پژوهش گسترده در کره، تعداد ۶۴۴ ژنوتیپ سویا را از لحاظ ۷۵ نشانگر ریزماهوره مورد تجزیه ژنتیکی قرار دادند.

جدول ۵- نتایج تجزیه ارتباطی شامل سطح معنی‌داری (P) و ضریب تبیین (R²) بین نشانگرهای ریزماهواره و صفات مختلف در شرایط نرمال در دو منطقه

Table 5. The result of association analysis including level of significance (P) and coefficient of determination (R²) between SSR markers and different traits in non-stress condition in two locations

شماره نشانگر	رشت						گنبد					
	۳ مدل GLM		۲ مدل MLM		۱ مدل MLM		۳ مدل GLM		۲ مدل MLM		۱ مدل MLM	
	P	R ²	P	R ²	P	R ²	P	R ²	P	R ²	P	R ²
Satt471	-/۰.۴۵	-/۰.۶۶	-	-	-	-	-/۰.۰۳	-/۰.۰۹	-	-	-	-
Sat_418	-/۰.۱۸	-/۰.۱۱۸	-	-	-	-	-/۰.۴۹	-/۰.۱۰۳	-	-	-	-
Satt454	-/۰.۰۲	-/۰.۱۲۵	-/۰.۰۳	-/۰.۱۶۱	-/۰.۲۳	-/۰.۱۳۶	-/۰.۰۰	-/۰.۱۸۱	-/۰.۰۰۸	-/۰.۱۴۰	-/۰.۱۰	-/۰.۱۳۰
Sat_292	-/۰.۳۳	-/۰.۱۱۹	-	-	-	-	-/۰.۰۲	-/۰.۱۷۵	-	-	-	-
Sat_345	-/۰.۴۶	-/۰.۵۱	-/۰.۳۶	-/۰.۵۸	-/۰.۴۷	-/۰.۵۲	-/۰.۰۹	-/۰.۱۳۶	-/۰.۱۸	-/۰.۱۲۰	-/۰.۱۶	-/۰.۱۲۰
Satt154	-	-	-	-	-	-	-/۰.۲۳	-/۰.۹۸	-/۰.۴۵	-/۰.۵۴	-	-
Satt287	-	-	-	-	-	-	-/۰.۲۳	-/۰.۸۵	-	-	-	-
Satt454	-/۰.۴۰	-/۰.۱۰۳	-/۰.۴۹	-/۰.۸۳	-	-	-/۰.۰۴	-/۰.۱۰۲	-/۰.۰۴	-/۰.۱۲۷	-	-
Satt471	-/۰.۲۷	-/۰.۱۱۰	-	-	-	-	-/۰.۲۰	-/۰.۱۱۹	-	-	-	-
Sat_345	-/۰.۱۶	-/۰.۹۴	-/۰.۱۶	-/۰.۹۰	-	-	-/۰.۲۴	-/۰.۷۹	-/۰.۳۲	-/۰.۸۵	-	-
Satt287	-/۰.۳۷	-/۰.۹۱	-	-	-	-	-/۰.۲۷	-/۰.۱۱۰	-	-	-	-
Satt454	-/۰.۱۰	-/۰.۹۲	-/۰.۱۴	-/۰.۱۱۰	-	-	-/۰.۰۶	-/۰.۱۰۲	-/۰.۱۶	-/۰.۱۲۰	-	-
Satt471	-/۰.۲۲	-/۰.۱۰۶	-	-	-	-	-/۰.۰۵	-/۰.۱۳۳	-	-	-	-
Satt572	-	-	-	-	-	-	-/۰.۴۸	-/۰.۷۹	-	-	-	-
Satt210	-/۰.۱۰	-/۰.۱۶۲	-/۰.۰۶	-/۰.۱۸۲	-/۰.۳۴	-/۰.۱۰۲	-/۰.۰۰	-/۰.۱۷۷	-/۰.۰۱	-/۰.۱۶۹	-/۰.۰۱	-/۰.۱۶۶
Sat_091	-/۰.۱۳	-/۰.۱۱۶	-/۰.۲۱	-/۰.۹۰	-/۰.۴۴	-/۰.۵۲	-/۰.۱۷	-/۰.۱۰۶	-/۰.۲۲	-/۰.۹۵	-/۰.۳۴	-/۰.۶۲
Satt142	-/۰.۴۸	-/۰.۹۸	-/۰.۱۲	-/۰.۱۱۳	-	-	-/۰.۲۳	-/۰.۱۳۰	-	-	-	-
Satt471	-/۰.۴۶	-/۰.۶۷	-/۰.۴۲	-/۰.۸۶	-	-	-	-	-	-	-	-
Satt418	-/۰.۰۶	-/۰.۱۰۲	-	-	-	-	-/۰.۰۷	-/۰.۱۷۵	-	-	-	-
Satt312	-/۰.۲۲	-/۰.۱۰۶	-/۰.۲۶	-/۰.۷۹	-	-	-/۰.۱۱	-/۰.۱۶۳	-/۰.۱۳	-/۰.۱۱۷	-	-
Satt471	-/۰.۴۸	-/۰.۸۳	-/۰.۱۲	-/۰.۱۱۳	-	-	-/۰.۱۳	-/۰.۱۱۷	-/۰.۱۸	-/۰.۱۰۶	-	-
Satt454	-/۰.۳۲	-/۰.۱۰۷	-/۰.۳۵	-/۰.۱۳۳	-/۰.۲۴	-/۰.۱۴۵	-/۰.۰۲	-/۰.۱۵۴	-/۰.۳۲	-/۰.۱۰۷	-/۰.۱۹	-/۰.۱۲۲
Satt142	-/۰.۰۶	-/۰.۱۸۲	-/۰.۰۷	-/۰.۱۰۲	-	-	-/۰.۰۷	-/۰.۱۵۸	-/۰.۲۶	-/۰.۱۲۷	-/۰.۳۸	-/۰.۱۲۰
Sat_091	-/۰.۱۳	-/۰.۱۱۷	-	-	-	-	-/۰.۰۱	-/۰.۱۲۵	-	-	-	-
Sat_292	-/۰.۱۶	-/۰.۹۴	-	-	-	-	-/۰.۱۰	-/۰.۱۳۳	-	-	-	-
Sat_345	-/۰.۰۶	-/۰.۱۲۵	-/۰.۱۷	-/۰.۱۰۶	-	-	-/۰.۲۲	-/۰.۹۵	-/۰.۱۸	-/۰.۱۰۰	-	-
Satt471	-/۰.۴۳	-/۰.۶۸	-	-	-	-	-/۰.۴۶	-/۰.۶۷	-	-	-	-
Satt454	-/۰.۳۵	-/۰.۹۹	-/۰.۰۵	-/۰.۱۴۸	-/۰.۳۱	-/۰.۱۱۵	-/۰.۱۲	-/۰.۱۱۳	-/۰.۱۲	-/۰.۹۶	-/۰.۰۸	-/۰.۱۰۷
Satt572	-/۰.۲۱	-/۰.۱۰۱	-	-	-	-	-/۰.۰۹	-/۰.۱۱۱	-	-	-	-
Satt142	-/۰.۱۲	-/۰.۱۴۵	-	-	-	-	-/۰.۰۶	-/۰.۱۳۳	-	-	-	-
Satt210	-/۰.۴۲	-/۰.۹۸	-	-	-	-	-/۰.۰۰	-/۰.۲۲۱	-	-	-	-
Sat_345	-/۰.۲۱	-/۰.۹۰	-	-	-	-	-/۰.۱۱	-/۰.۱۳۶	-	-	-	-
Sat_292	-/۰.۴۸	-/۰.۱۱۵	-/۰.۱۲	-/۰.۱۴۵	-/۰.۰۴	-/۰.۱۸۹	-/۰.۲۰	-/۰.۸۶	-/۰.۳۳	-/۰.۹۰	-	-
Sat_292	-/۰.۱۰	-/۰.۷۶	-/۰.۱۳	-/۰.۷۶	-/۰.۲۳	-/۰.۶۵	-/۰.۰۲	-/۰.۹۶	-/۰.۰۷	-/۰.۸۶	-/۰.۰۸	-/۰.۸۴
Satt454	-/۰.۳۸	-/۰.۸۱	-	-	-	-	-/۰.۲۰	-/۰.۱۰۳	-	-	-	-
Satt142	-/۰.۰۱	-/۰.۱۷۶	-	-	-	-	-/۰.۰۳	-/۰.۱۷۶	-	-	-	-
Sat_345	-/۰.۲۷	-/۰.۱۱۰	-	-	-	-	-/۰.۱۱	-/۰.۱۴۸	-	-	-	-

† توضیح مدل‌های ۱ تا ۳ در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۶- نتایج تجزیه ارتباطی شامل سطح معنی‌داری (P) و ضریب تبیین (R^2) بین نشانگرهای ریزوماهواره و صفات مختلف در شرایط تنش خشکی در دو منطقه

Table 6. The result of association analysis including level of significance (P) and coefficient of determination (R^2) between SSR markers and different traits in stress condition in two locations

شماره	رشت		گنبد کاووس		نشانگر	صفت							
	مدل ۳ GLM P R2	مدل ۲ MLM P R2	مدل ۱ MLM P R2	مدل ۳ GLM P R2			مدل ۲ MLM P R2	مدل ۱ † MLM P R2					
	۰/۰۰۶	۰/۱۲۶	۰/۰۱۴	۰/۱۰۵		Sat_345							
	۰/۰۳۸	۰/۰۷۹	۰/۰۱۴	۰/۰۹۴	۰/۰۲۵	۰/۰۷۱	۰/۰۴۹	۰/۰۷۹	۰/۰۲۶	۰/۰۸۱	۰/۰۱۲	۰/۰۹۷	Satt339
	۰/۰۱۱	۰/۱۱۵	۰/۰۰۵	۰/۱۵۲	۰/۰۲۵	۰/۱۰۷	۰/۰۱۳	۰/۱۳۱	-	-	-	-	Satt249
	۰/۰۳۶	۰/۱۱۷	۰/۰۲۳	۰/۱۳۶	-	-	۰/۰۱۹	۰/۱۳۵	-	-	-	-	Satt478
	۰/۰۴۹	۰/۰۹۷	۰/۰۱۶	۰/۱۳۳	۰/۰۲۸	۰/۰۷۵	۰/۰۱۴	۰/۱۴۱	۰/۰۲۸	۰/۰۹۱	۰/۰۳۲	۰/۰۷۱	Satt458
	۰/۰۱۶	۰/۰۹۴	۰/۰۱۶	۰/۰۹۰	۰/۰۲۴	۰/۰۷۹	۰/۰۲۲	۰/۰۸۴	۰/۰۲۲	۰/۱۳۱	۰/۰۳۴	۰/۱۰۲	Satt339
	۰/۰۲۷	۰/۱۱۰	-	-	-	-	۰/۰۱۴	۰/۱۴۲	۰/۰۳۵	۰/۱۰۶	-	-	Satt249
	۰/۰۳۰	۰/۱۱۹	-	-	-	-	۰/۰۱۲	۰/۱۴۵	-	-	-	-	Sat_343
	۰/۰۳۷	۰/۰۹۱	۰/۰۴۱	۰/۰۹۲	۰/۰۵۰	۰/۰۸۸	۰/۰۲۴	۰/۱۲۹	-	-	-	-	Satt458
	۰/۰۳۸	۰/۰۸۸	-	-	-	-	۰/۰۵۰	۰/۰۹۸	-	-	-	-	Sat_343
	۰/۰۰۲	۰/۱۴۹	۰/۰۱۵	۰/۱۰۵	-	-	۰/۰۱۹	۰/۱۱۹	-	-	-	-	Sat_345
	۰/۰۱۵	۰/۱۱۲	۰/۰۱۷	۰/۱۰۶	۰/۰۲۲	۰/۰۹۷	۰/۰۰۲	۰/۱۵۲	۰/۰۳۹	۰/۱۰۲	۰/۰۵۰	۰/۰۹۸	Satt339
	۰/۰۲۹	۰/۱۱۲	-	-	-	-	۰/۰۲۹	۰/۱۰۹	-	-	-	-	Sat_091
	۰/۰۳۸	۰/۰۹۵	۰/۰۲۱	۰/۱۱۷	-	-	۰/۰۰۷	۰/۱۴۳	-	-	-	-	Satt249
	۰/۰۰۷	۰/۱۲۷	-	-	-	-	۰/۰۱۰	۰/۱۳۵	۰/۰۳۴	۰/۱۰۲	-	-	Satt454
	۰/۰۱۵	۰/۱۲۵	۰/۰۱۹	۰/۱۰۴	-	-	۰/۰۴۸	۰/۱۱۱	-	-	-	-	Satt458
	۰/۰۰۵	۰/۱۳۴	۰/۰۲۴	۰/۰۹۸	۰/۰۱۶	۰/۱۰۵	۰/۰۴۱	۰/۱۰۱	۰/۰۴۹	۰/۰۹۵	-	-	Sat_345
	۰/۰۰۳	۰/۱۴۱	۰/۰۱۰	۰/۱۱۸	۰/۰۰۷	۰/۱۲۳	۰/۰۲۵	۰/۰۶۴	۰/۰۴۵	۰/۱۱۲	-	-	Satt339
	۰/۰۴۰	۰/۱۰۶	۰/۰۱۴	۰/۱۲۶	۰/۰۴۸	۰/۰۹۵	۰/۰۰۷	۰/۱۴۱	۰/۰۰۸	۰/۱۳۱	-	-	Sat_091
	۰/۰۳۶	۰/۰۸۳	۰/۰۳۷	۰/۰۷۲	-	-	۰/۰۳۴	۰/۱۱۳	۰/۰۰۸	۰/۱۲۱	-	-	Satt454
	۰/۰۰۴	۰/۱۲۵	۰/۰۴۳	۰/۱۱۴	-	-	۰/۰۲۲	۰/۱۳۱	-	-	-	-	Satt648
	۰/۰۱۰	۰/۱۲۱	۰/۰۱۰	۰/۱۱۲	-	-	۰/۰۳۶	۰/۰۹۰	-	-	-	-	Sat_345
	۰/۰۰۵	۰/۱۳۲	۰/۰۱۴	۰/۱۰۵	-	-	۰/۰۱۴	۰/۱۴۱	-	-	-	-	Satt339
	۰/۰۰۳	۰/۱۲۸	۰/۰۰۲	۰/۱۳۳	-	-	۰/۰۴۲	۰/۱۰۳	-	-	-	-	Satt648
	۰/۰۱۲	۰/۱۳۶	۰/۰۱۰	۰/۱۱۲	-	-	۰/۰۰۱	۰/۱۶۶	۰/۰۰۷	۰/۱۴۲	-	-	Satt454
	۰/۰۲۱	۰/۱۰۷	-	-	-	-	۰/۰۳۵	۰/۱۰۶	-	-	-	-	Sat_091
	۰/۰۰۷	۰/۱۲۸	-	-	-	-	۰/۰۳۱	۰/۱۲۳	-	-	-	-	Satt142
	۰/۰۱۰	۰/۱۱۷	۰/۰۰۸	۰/۱۱۷	-	-	۰/۰۲۵	۰/۰۶۴	۰/۰۰۷	۰/۱۴۱	-	-	Sat_345
	۰/۰۰۱	۰/۱۵۰	۰/۰۰۱	۰/۱۷۲	-	-	-	-	-	-	-	-	Satt339
	۰/۰۲۵	۰/۱۲۷	۰/۰۲۰	۰/۱۱۸	-	-	۰/۰۰۷	۰/۱۲۸	-	-	-	-	Satt142
	۰/۰۳۶	۰/۰۹۰	۰/۰۴۴	۰/۱۱۷	۰/۰۰۱	۰/۱۵۴	۰/۰۰۰	۰/۱۸۳	۰/۰۰۵	۰/۱۴۸	۰/۰۰۱	۰/۱۸۳	Satt454
	۰/۰۲۰	۰/۱۱۰	۰/۰۴۳	۰/۱۱۴	-	-	۰/۰۰۴	۰/۱۵۱	۰/۰۲۳	۰/۱۱۵	۰/۰۴۳	۰/۱۰۱	Satt317
	۰/۰۱۹	۰/۱۰۹	۰/۰۰۵	۰/۱۳۳	-	-	۰/۰۰۸	۰/۱۲۱	-	-	-	-	Sat_292
	۰/۰۰۱	۰/۱۶۵	-	-	-	-	۰/۰۴۱	۰/۱۱۸	-	-	-	-	Satt648
	۰/۰۱۲	۰/۰۷۲	۰/۰۱۹	۰/۰۶۹	۰/۰۲۷	۰/۰۶۳	۰/۰۴۷	۰/۰۴۷	۰/۰۴۸	۰/۰۹۳	۰/۰۵۰	۰/۱۱۰	Sat_345
	۰/۰۰۹	۰/۱۲۸	۰/۰۳۴	۰/۱۰۷	۰/۰۰۱	۰/۱۴۴	۰/۰۰۵	۰/۱۳۴	۰/۰۲۶	۰/۰۶۴	-	-	Satt454
	۰/۰۱۳	۰/۱۳۳	-	-	-	-	۰/۰۱۰	۰/۱۱۶	-	-	-	-	Satt458
	۰/۰۱۹	۰/۱۰۴	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Sat_292
	۰/۰۲۷	۰/۰۹۷	-	-	-	-	۰/۰۲۲	۰/۱۱۶	-	-	-	-	Satt339

† توضیح مدل‌های ۱ تا ۳ در جدول ۲ ارائه شده است.

که نزدیک به ۱۹ درصد از تغییرات وزن دانه در کل غلاف‌ها در بوته را تبیین نمود.

در محیط تحت تنش خشکی مهم‌ترین و تاثیرگذارترین نشانگرها برای صفات تعداد غلاف و تعداد دانه در غلاف و کل بوته عبارت بودند از Satt339، Satt249 و Satt458 که برای هر سه صفت غالباً در هر سه مدل معنی‌دار شناسایی شدند و از سوی دیگر این نشانگرها در محیط نرمال با هیچ کدام از صفات ارتباط معنی‌دار نداشتند. برای صفات مرتبط با وزن بوته، غلاف و دانه در غلاف در محیط تحت تنش نشانگرهای Satt345، Satt339 و Satt454 برای هر چهار

از بین نشانگرهای معنی‌دار برای صفات تعداد غلاف و تعداد دانه در غلاف و کل بوته در محیط نرمال، نشانگرهای Satt454، Satt345 و Satt210 تاثیرگذارتر از سایر نشانگرها بودند و غالباً در هر سه مدل معنی‌دار شناسایی شدند. از بین نشانگرهای معنی‌دار برای صفات مرتبط با وزن بوته، غلاف و دانه در غلاف در این محیط نشانگرهای Sat_292، Satt454، Satt142 و Satt345 برای اکثر صفات معنی‌دار برآورد شدند که می‌تواند نشانه‌ای بر وجود پلیوتروپی یا پیوستگی نواحی ژنومی کنترل کننده صفات باشد. بالاترین درصد توجیه تغییرات صفات مربوط به نشانگر Sat_292 بود

مربوط به عملکرد در هر دو منطقه و غالباً در هر سه مدل معنی‌دار برآورد شد. همچنین نشانگر Satt300 در مجاورت نشانگر Satt454 بر روی گروه لینکاژی A1 قرار دارد که در پژوهش حاضر به عنوان یکی از مؤثرترین نشانگرهای مرتبط با اکثر صفات در هر دو محیط شناسایی شد.

طبق نتایج بدست آمده از مطالعات پیشین، برخی نشانگرهای معنی‌دار در تحقیق حاضر مثل Satt458، برای صفاتی مثل کارایی فسفر و صفات مرتبط با ریشه (۱۹)، نشانگر Satt091 برای وزن غلاف و وزن خشک گیاه (۳۲) به عنوان نشانگرهای پیوسته به QTL معرفی شدند. همچنین در پژوهشی که به منظور شناسایی QTL‌های پایدار، با استفاده از مکان‌یابی به کمک چند زمینه ژنتیکی به همراه ارزیابی در چند محیط انجام شد، محققین به کمک دو جمعیت لاین‌های اینبرد نوترکیب سویا مشتق از تلاقی ارقام ژاپنی و آمریکایی Ohsuzu × Athow (PI 595926) و Tachinagaha (PI 561396) × 593654 برنامه مکان‌یابی QTL را در دو منطقه آکیتا و کیوتو در ژاپن در طی سال‌های ۲۰۰۷ تا ۲۰۱۱ به انجام رساندند. در نهایت یک QTL بزرگ اثر (qSw17-1) ارزشمند و پایدار برای وزن تک دانه بر روی کروموزوم ۱۷ و در حدفاصل نشانگرهای Sat_292 و Sat_284 شناسایی شد. این QTL توانست (در محیط‌های مختلف) بین ۹/۴ تا ۲۰/۹ درصد از تغییرات فنوتیپی وزن تک دانه را با یک اثر الل غالب برای افزایش وزن دانه، توجیه نماید (۱۴). نشانگر Sat_292 در تحقیق حاضر به عنوان یکی از نشانگرهای مهم تأثیرگذار در صفات مرتبط با وزن دانه در شرایط نرمال شناسایی شد که می‌تواند دال بر اعتبار و اهمیت این ناحیه ژنومی در کنترل این صفت باشد.

نشانگرهایی که پیوستگی آنها با QTL‌های کنترل‌کننده صفات موردنظر در زمینه‌های ژنتیکی مختلف به تأیید رسیده باشد، به عنوان کاندید ارزشمند برای انتخاب به کمک نشانگر در راستای بهبود صفت محسوب می‌شوند. این روش، انتخاب را برای به ویژه صفاتی که اندازه‌گیری پرهزینه، زمان‌بر و مشکل دارند تسریع می‌بخشد. نشانگرهای Satt454، Satt345، Satt210، Sat_292، Satt142، Satt339، Satt249 و Satt458 که در پژوهش‌های پیشین به عنوان نشانگرهای پیوسته به صفات مرتبط با تحمل به تنش خشکی معرفی شده بودند در زمینه ژنتیکی مورد استفاده در این پژوهش نیز به تأیید رسیدند و به عنوان مهمترین و تأثیرگذارترین نشانگرها تعیین شدند. همچنین تعدادی از نشانگرها در هیچ کدام از شرایط برای هیچ کدام از صفات معنی‌دار برآورد نشدند و این می‌تواند نشان‌دهنده اهمیت کمتر این نشانگرها در این زمینه ژنتیکی باشد.

صفت معنی‌دار شناسایی شدند. بالاترین درصد توجیه تغییرات به نشانگر Satt454 اختصاص داشت که بیش از ۱۸ درصد از تغییرات وزن دانه در کل غلاف‌های بوته را توجیه نمود. بدیهی است احتمال می‌رود این نشانگرها بتوانند کاندیدای بسیار مناسب و امیدوارکننده در برنامه‌های به نژادی تحمل به تنش خشکی مثل انتخاب به کمک نشانگر در سویا باشند. این نشانگرها در تحقیقات پیشین (۸، ۹۶) نیز به عنوان نشانگرهای پیوسته به صفات مرتبط با تحمل به خشکی معرفی شدند. همچنین در برخی از این مطالعات (۹) اعتبارسنجی QTL‌ها نیز با انجام آزمایش در مزرعه و گلخانه صورت گرفت. در این پژوهش که با بررسی ۱۸۴ لاین خویش آمیخته نوترکیب حاصل تلاقی Kefeng1 و Nannong1138-2 تحت شرایط تنش کمبود آب و شرایط نرمال در مزرعه و گلخانه انجام شد تعداد ۱۹ QTL در ارتباط با عملکرد دانه در بوته در هر دو شرایط تنش و نرمال و تعداد ۱۰ QTL در ارتباط با شاخص حساسیت به خشکی شناسایی شد. نشانگرهای پیوسته به این QTL‌ها که با نشانگرهای معنی‌دار در پژوهش حاضر مشترک بود عبارت بودند از Sat-345، Satt142، Satt249 و Satt458 که از نشانگرهای مهم شناسایی شده در محیط تنش بودند. آنها اظهار داشتند شناسایی QTL‌های مشترک برای عملکرد دانه در بوته و شاخص حساسیت به خشکی در چند محیط مختلف می‌تواند به طور قابل توجهی باعث بهبود بازده انتخاب در شرایط تنش خشکی در سویا باشد. در مطالعه دیگری با استفاده از همان جمعیت، ۱۷ QTL برای صفات مرتبط با وضعیت آب برگ در شرایط تنش خشکی در مزرعه و گلخانه ردیابی شد. دو QTL برای ضریب پژمردگی برگ (بر روی گروه پیوستگی A2 در حدفاصل نشانگرهای Satt589- BE820148 و I-AW132402) و یک QTL برای صفت میزان از دست دادن آب در برگ قطع شده بود (بر روی گروه پیوستگی H در حدفاصل نشانگرهای Satt317-Satt142) به صورت پایدار در هر دو شرایط مزرعه و گلخانه وجود داشتند (۸). در مقایسه با پژوهش حاضر هر دو نشانگر Satt317 و Satt142 از جمله نشانگرهای معنی‌دار در چند مدل برای صفت وزن دانه در کل بوته در شرایط تنش بودند.

همچنین در پژوهش دیگری با استفاده از لاین‌های اینبرد نوترکیب حاصل از تلاقی PI416937 و 'Benning' اقدام به شناسایی QTL‌های مرتبط با خشکی و هدایت هیدرولیکی محدودشده در برگ سویا شد و چهار QTL در مجاورت نشانگرهای Satt339، Satt300، Satt478 و Satt175 شناسایی شدند که با چند صفت در ارتباط بودند (۶). در مقایسه با تحقیق حاضر، نشانگر Satt339 برای اکثر صفات

منابع

1. Alizadeh, A. 2011. Soil, Water, Plant Relationship. Ferdowsi University of Mashhad, Iran, 722 pp (In Persian).
2. Arzani, A. 2011. Breeding Field Crops-Fourth Edition. Isfahan University of Technology Publication Center, 627 pp (by John Milton; Sleper, David Allen Poehlman).
3. Bhatnagar, S.C., A. King, L. Purcell and J.D. Ray. 2005. Identification and Mapping of Quantitative Trait Loci Associated with Crop Responses to Water-deficit Stress in Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. International annual meeting, 18-25 pp. Salt Lake City, UT.
4. Bradbury, P.J., Z. Zhang, D.E. Kroon, T.M. Casstevens, Y. Ramdoss and E.S. Buckler. 2007. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*, 23: 2633-2635.
5. Burton, J. and L. Miranda. 2013. Soybean Improvement: Achievements and Challenges. *Ratarstvo i Povrtarstvo*, 50: 44-51.
6. Carpentieri-Pipolo, V., A. Pipolo, H. Abdel-Haleem, H. Boerma and T. Sinclair. 2012. Identification of QTLs associated with limited leaf hydraulic conductance in soybean. *Euphytica*, 186: 679-686.
7. Dong, D., X. Fu, F. Yuan, P. Chen, S. Zhu, B. Li, Q. Yang, X. Yu and D. Zhu. 2014. Genetic diversity and population structure of vegetable soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) in China as revealed by SSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 61: 173-183
8. Du, W.J., S.X. Fu and D.Y. Yu. 2009a. Genetic analysis for the leaf pubescence density and water status traits in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Plant Breeding*, 128: 259-265.
9. Du, W.J., M. Wang, S. Fu and D. Yu. 2009b. Mapping QTLs for seed yield and drought susceptibility index in soybean (*Glycine max* L.) across different environments. *Journal of Genetics and Genomics*, 36: 721-731.
10. Evanno, G., E. Reganut and J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.
11. FAO. 2014. Food Agriculture Organization statistics on line. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>
12. Faraji, A. 2014. Evaluation the Response of Soybean (*Glycin Max* L.) Genotypes to Drought Stress. *Journal of crop breeding*, 6: 27-40 (In Persian).
13. Gupta, P.K., S. Rustgi and P.L. Kulwal. 2005. Linkage disequilibrium and association studies in higher plants: Present status and future prospects. *Plant Molecular Biology*, 57: 461-485.
14. Kato, S., T. Sayama, K. Fujii, S. Yumoto, Y. Kono, T.Y. Hwang, A. Kikuchi, Y. Takada, Y. Tanaka, T. Shiraiwa. 2014. A major and stable QTL associated with seed weight in soybean across multiple environments and genetic backgrounds. *Theoretical and Applied Genetics*, 127: 1365-1374.
15. Lee, GA, Y.M. Choi, J.Y. Yi, J.W. Chung, M.C. Lee, K.H. Ma, S.Y. Lee, J.W. Cho and J.R. Lee. 2014. Genetic Diversity and Population Structure of Korean Soybean Collection Using 75 Microsatellite Markers. *Korean Journal of Crop Science*, 59: 492-497.
16. Lee, JD, T.D. Vuong, H. Moon, J.K. Yu, R. Nelson, H.T. Nguyen and J.G. Shannon. 2011. Genetic diversity and population structure of Korean and Chinese soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] accessions *Crop Science*, 51: 1080-1088.
17. Li, D., T.W. Pfeiffera and P.L. Corneliusb. 2008. Soybean QTL for yield and yield components associated with glycine soja alleles. *Crop Science Society of America*, 48: 571-581.
18. Li, Y.H., M.J.M. Smulders, R.Z. Chang and L.J. Qiu. 2011. Genetic diversity and association mapping in a collection of selected Chinese soybean accessions based on SSR marker analysis. *Conservation Genetics*, 12: 1145-1157.
19. Lian, Q., C. Xiaohui, M. Mantong, Y. Xiaolong and L. Hong. 2010. QTL analysis of root traits as related to phosphorus efficiency in soybean. *Annals of Botany*, 106: 223-234.
20. Malekmohamad, Z., H. Sabori, A. Biabani and E. Hezarjaribi. 2016. Study of genetic diversity of soybean (*Glycine max*) using ISSR markers. *Journal of crop breeding*, 8: 124-133 (In Persian).
21. Monteros, M.J., G. Lee, A.M. Missaoui, T.E. Carter and H.R. Boerma. 2006. Identification and confirmation of QTL conditioning drought tolerance in Nepalese soybean. The 11th Biennial Conference on the Molecular and Cellular Biology of the Soybean, Abstract PI471938. Lincoln, USA.
22. Nicholas, F.W. 2006. Discovery, validation, and delivery of DNA markers. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 46: 155-158.
23. Pathan, M.S., J.D. Lee, J.G. Shannon and H.T. Nguyen .2007. Recent advances in breeding for drought and salt stress tolerance in soybean. *In: Advances in molecular-breeding toward drought and salt tolerant crops*. Jenks MA, Hasegawa PM and Jain SM (eds), Springer USA.
24. Pocovi, M.I. and J.A. Mariotti. 2015. A bayesian approach to inferring the genetic population structure of sugarcane accessions from INTA (Argentina). *Chilean journal of agricultural research*. 75: 152-159.
25. Pritchard, J.K., M. Stephens and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.
26. Saghai Maroof, M.A., R.M. Biyashev, G.P. Yang, Q. Zhang and R.W. Allard. 1994. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barely species diversity, chromosomal location, and population dynamics, proceeding of the National Academy of Sciences. USA. 91: 5466-5570.
27. Samnonsa, D.J., D.B. Peters and T. Himowitz. 1979. Screening soybeans for drought resistance. II. Drought box procedure. *Crop Science*, 19: 719.
28. Samnonsa, D.J., D.B. Peters and T. Himowitz .1980. Screening soybeans for tolerance to moisture stress: a field procedure. *Field Crop Research*, 3: 321.

29. Sanguinetti, C.J., E. Dias Neto and A.J.G. Simpson. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 17: 915-919.
30. Shannon, C.E. and W. Weaver. 1963. *The mathematical theory of communication*. University of Illinois Press, Urbana, Ill.
31. Soliman-Mona, M. 2003. Effect of some irrigation region on water consumptive use on growth analysis for some soybean cultivars. *Agric. Mansora Univ. Journal of Agricultural Science*, 28: 4849-4258.
32. Vieira, A.J.D., D.A.D.E. Oliveira, T.C.B. Soares, I. Schuster, N.D. Piovesan, C.A. Martínez, E.G.D.E. Barros and M.A. Moreira. 2006. Use of the QTL approach to the study of soybean trait relationships in two populations of recombinant inbred lines at the F7 and F8 generations. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18: 281-290.
33. Vu Hang, T.T., A. Kilian, A.T. James, L.M. Bielig and R.J. Lawn. 2015. Use of DArT molecular markers for QTL analysis of drought-stress responses in soybean. II. Marker identification and QTL analyses. *Crop and Pasture Science*, 66: 817-830.
34. Yeh, F.C., R.C. Yang, T.B.J. Boyle, Z.H. Ye and J.X. Mao. 1997. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Alberta, Canada.

Validation of Candidate Markers Drought Tolerance in Soybean Genotypes under Normal and Drought Stress Condition

Ahmad Reza Dadras¹, Habibollah Samizadeh² and Hossein Sabouri³

1- Former Ph. D. Student, University of Guilan and Research Assistant Professor,
Zanjan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center

2- Associate Professor, University of Guilan (Corresponding author: hsamizadeh@yahoo.com)

3- Associate Professor, Gonbad-Kavous University

Received: August 23, 2015

Accepted: October 31, 2015

Abstract

The validity test of the linked markers to identified QTLs is as a necessary step before performing marker assisted selection. In the present study were conducted validity test of 21 microsatellite markers associated to drought tolerance using 121 soybean varieties and advanced lines and planting in two condition normal and under drought stress at two regions Rasht and Gonbad-Kavous. In investigation of population genetic diversity, the average of allele number per marker, 5.53 alleles and average of polymorphic information content (PIC), Nei genetic diversity coefficient (H) and Shannon index (I) were estimated 0.73, 0.77 and 1.57 respectively that high values of these statistics shows their ability to separate studied varieties and lines. The structure and cluster analysis based on bayesian approach and neighbor joining method assigned the cases to three subpopulation and three groups respectively. The association analysis between microsatellite markers and yield related traits using GLM and MLM by three statistic models revealed Satte454, Satt345, Satte210, Sat_292, Satt142, Satt339, Satt249 and Satt458 were confirmed in this genetic background and identified as the most effective markers. The highest percent of variation explanation were dedicated to Sat_292 and Satt454 with more than 18 percent variation explanation of seed weight in all plant pods in normal and drought condition respectively.

Keyword: Cluster analysis, Genetic diversity, Marker assisted selection, Microsatellite, Structure analysis