



"مقاله پژوهشی"

تجزیه ارتباطی صفات مهم کمی و مورفولوژیکی در ارقام و لاین‌های پیشرفته سویا با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره

علی قربانی پور^۱ و بابک ربیعی^۲

۱- گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، (نویسنده مسوول: Ghorbanipur.ali@gmail.com)

۲- گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۶/۲۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۲

صفحه: ۱۰۸ تا ۱۱۸

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: ارزش اقتصادی یک رقم به صفات مختلف آن بستگی دارد و از این رو اطلاع دقیق از رفتار ژنتیکی و شناسایی مکان‌های ژنومی دخیل در کنترل این صفات می‌تواند به به‌نژادگر در اصلاح ارقام کمک کند.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، ارتباط و پیوستگی بین نشانگرهای ریز ماهواره با برخی از صفات مهم زراعی و مورفولوژیکی در ۱۳۰ ژنوتیپ مختلف سویا از طریق مدل‌های ارتباطی شامل مدل خطی عمومی (GLM) و مدل خطی مختلط (MLM) در سال ۱۳۹۴ مورد ارزیابی قرار گرفت. صفات مورد مطالعه شامل ارتفاع بوته، طول غلاف، تعداد غلاف در بوته، تعداد دانه در غلاف، وزن دانه، وزن صد دانه و عملکرد دانه بودند.

یافته‌ها: در تجزیه تنوع مولکولی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بر اساس نشانگرهای ریز ماهواره، ۸۷ آلل توسط نشانگرهای مورد استفاده تکثیر شد که از این تعداد ۸۵ آلل (۹۷/۷ درصد) چند شکل بودند. بر اساس نتایج تجزیه تنوع ژنتیکی میانگین تعداد آلل مؤثر، شاخص شانون، محتوی اطلاعات چند شکل و تنوع ژنی نئی به ترتیب ۱/۷، ۰/۵۲، ۰/۶۲ و ۰/۴۸ برآورد شد. بر اساس نتایج تجزیه ساختار، سه زیر جمعیت احتمالی ($K=3$) در ژرم پلاسزم مورد مطالعه شناسایی شد که ۳۴ ژنوتیپ (۲۶/۱۵ درصد) به ساختار اول، ۴۳ ژنوتیپ (۳۳/۰۷ درصد) به ساختار دوم و ۴۴ ژنوتیپ (۳۳/۸۴ درصد) به ساختار سوم تعلق داشتند و ۹ ژنوتیپ (۶/۹۲ درصد) نیز ساختار مخلوط داشتند که نتایج حاصل از رسم بار پلات نیز آن را تأیید کرد. در تجزیه ارتباطی با دو روش GLM و MLM به ترتیب ۳۳ و ۳۵ نشانگر، ارتباط معنی‌داری را با صفات مورد مطالعه نشان دادند. تعدادی از نشانگرهای ریز ماهواره دارای ارتباط معنی‌داری با چند صفت بودند (مانند ارتباط نشانگر Satt460 با صفات ارتفاع بوته، طول غلاف، تعداد دانه در غلاف و وزن صد دانه) که می‌تواند ناشی از آثار پلی‌تروپی و یا پیوستگی نواحی ژنومی دخیل در کنترل این صفات باشد. ارتباط چند نشانگر با یک صفت خاص (مانند ارتباط نشانگرهای Satt361، Satt359، Satt_124 و Sct_028 با صفت عملکرد دانه) نیز نشان‌دهنده توارث کمی و پلی‌ژنیک این صفت باشد که هر کدام از آن‌ها سهمی مشخص از تنوع صفت را کنترل می‌کنند.

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی نتایج نشان داد که ضمن استفاده از نشانگرهایی به‌عنوان نشانگرهای مفید در ارزیابی تنوع ژنتیکی در سویا، نشانگرهایی نیز که پیوستگی بیشتری با نواحی ژنومی کنترل‌کننده این صفات داشتند، جهت اصلاح جمعیت از طریق انتخاب به کمک نشانگر معرفی می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: تجزیه ساختار، ژنوتیپ، عدم تعادل لینکاژی، عملکرد و اجزای عملکرد

مقدمه

ژنتیکی، مطالعه فیلوژنی، شناسایی ژرم پلاسزم و تهیه نقشه‌های ژنتیکی به‌کار رفته است (۲).

تجزیه ارتباطی که به تجزیه نامتعادلی پیوستگی نیز مرسوم است، مزیت‌های عمده‌ای نسبت به مکان‌یابی معمول ژن‌ها یا نقشه‌یابی QTL دارد. اولاً به دلیل اینکه در این‌گونه مطالعات از جوامع طبیعی استفاده می‌شود، تنوع ژنتیکی وسیع‌تری نسبت به جمعیت‌های حاصل از تلاقی دو والدی وجود دارد، دوم اینکه بسته به جمعیت، نقشه‌یابی ارتباطی دارای دقت بسیار بالاتری است، چرا که در این نوع نقشه‌یابی تمام رویدادهای میوزی که در طول تاریخچه تکاملی گیاه انباشته شده است در نظر گرفته می‌شود، در صورتیکه در روش معمول نقشه‌یابی تنها در تعدادی از نسل‌های تلاقی یا خودگشتی، میوز اتفاق می‌افتد (۱۸). از نقشه‌یابی ارتباطی به راحتی می‌توان در فرآیند انتخاب به کمک نشانگر استفاده کرد. این روش برای اولین بار در ژنتیک انسانی و برای صفاتی کیفی (مانند بیماری‌های ژنتیکی) مورد استفاده قرار گرفت، اما امروزه در جمعیت‌های گیاهی و جانوری نیز مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۷). تاکنون مطالعات قابل توجهی به منظور شناسایی آلل‌های مطلوب برای صفات مختلف با استفاده از روش تجزیه ارتباطی در سویا صورت گرفته است. از جمله، ژنی زیانگ و همکاران (۲۸) از نشانگرهای SSR برای پیدا کردن نشانگرهای پیوسته با صفات زراعی و کیفی

سویا (*Glycin max* L.) گیاهی است دیپلوئید ($2n=2x=40$)، یک‌ساله، دو لپه، از خانواده بقولات و زیر خانواده پروانه آسا (*Papilionoideae*)، که به دو صورت دانه‌ای و علوفه‌ای مورد کاشت و بهره‌برداری قرار می‌گیرد. سویا به دلیل دارا بودن پروتئین و روغن بالا، جایگاه ویژه‌ای را در میان گیاهان به خود اختصاص داده است. دانه سویا به طور متوسط ۴۰ درصد پروتئین و ۲۰ درصد روغن دارد که از لحاظ ارزش غذایی دانه در میان گیاهان مهم زراعی، دانه‌ای بی‌رقیب است (۳). طی سالیان اخیر شناسایی و بهره‌برداری سیستماتیک از تنوع طبیعی روش مهمی در پژوهش ژنومی گیاهان و به‌نژادی گیاهی بوده است (۴). از زمان کشف ساختار اولیه DNA تا به امروز، تعداد زیادی از نشانگرهای مولکولی که توانایی تمایز تنوع موجود در DNA ژنومی را دارند، بسط و گسترش داده شده است. امروزه نشانگرهای مولکولی برای اهداف خاص مانند بررسی تنوع ژنتیکی موجود در جمعیت و یا شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات مهم زراعی به‌طور وسیعی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۰). در میان نشانگرهای مولکولی قابل دسترس از نشانگرهای SSR در به‌نژادی ژنتیکی گیاهان استفاده زیادی شده است. نشانگر SSR به دلیل چندشکلی بالا، وراثت هم‌باز، پایداری و تکرارپذیری زیاد از نشانگرهای قابل اعتماد در بررسی تنوع

غلاف، تعداد دانه در بوته، وزن غلاف، وزن دانه، وزن صد دانه و عملکرد دانه در بوته مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند.

ارزیابی ژنتیکی

برای انجام ارزیابی‌های ژنوتیپی، سه تا چهار برگ تازه توسعه‌یافته از هر بوته در مرحله پنج برگی برداشت و در یک ورقه آلومینیومی نازک پیچیده شده و در ظرف مخصوص ازت مایع قرار داده شد. نمونه‌ها بعد از انتقال به آزمایشگاه در فریزر و در دمای -80°C درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای استخراج DNA ژنومی، نمونه‌ها به همراه ازت مایع در هاون چینی پودر شده و سپس پنج میلی‌گرم از پودر حاصل در تیوب‌های دو میلی‌لیتری ریخته شد. DNA ژنومی با استفاده از روش CTAB مطابق با روش سقای معروف و همکاران (۲۱) استخراج شد. به‌منظور تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده، از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد (۹۵V) به مدت ۴۵ دقیقه) استفاده شد. DNA ژنومی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با استفاده از نشانگرهای SSR جهت تجزیه تک نشانگری استفاده شد (جدول ۲).

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر اپندورف در حجم $15\mu\text{l}$ شامل: $21\mu\text{l}$ DNA ژنومی، $5/1\mu\text{l}$ PCR Buffer (10X)، $5/1\mu\text{l}$ dNTPs 1mM ، $1\mu\text{l}$ از هر یک از آغازگرهای پیشرو و پسرو، $2/1\mu\text{l}$ کلرید منیزیم 15mM میلی‌مولار، $1/1\mu\text{l}$ آنزیم Taq DNA Polymeras و $7/1\mu\text{l}$ آب مقطر استریل بود. چرخه حرارتی شامل، مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای 95°C درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و سپس 35°C چرخه حرارتی سه مرحله‌ای شامل، واسرشت‌سازی در دمای 94°C درجه به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای $60-45^{\circ}\text{C}$ درجه به مدت ۳۰ ثانیه (بسته به دمای اتصال آغازگر)، بسط آغازگرها در دمای 72°C درجه به مدت ۴۵ ثانیه بوده و در نهایت پس از پایان 35°C چرخه حرارتی فوق، نمونه‌ها در دمای 72°C درجه به مدت ۵ دقیقه جهت بسط نهایی قرار گرفتند (۱۶). برای تفکیک محصولات PCR از الکتروفورز افقی استفاده و محصول PCR روی ژل آگارز سه درصد (ابعاد ژل $8/5 \times 12 \times 28/5$ سانتی‌متر) با ولتاژ $90-80$ ولت به مدت ۱۲۰ دقیقه الکتروفورز و باندهای مربوطه تفکیک شدند. جهت بارگذاری نمونه‌ها روی ژل، مقدار شش میکرولیتر محصول PCR به همراه سه میکرولیتر محلول رنگی بارگذاری مخلوط و سپس محلول حاصل در هر یک از چاهک‌های ژل بارگذاری شدند. رنگ‌آمیزی با سیف استین (Safe stain) انجام شد (۱۶) و در نهایت ژل‌ها عکس‌برداری و سپس ذخیره شدند تا الگوی نواریندی نمونه‌های مورد مطالعه جهت تعیین ژنوتیپ آن‌ها بررسی شوند.

تجزیه داده‌ها

تجزیه‌های آماری انجام‌شده برای صفات شامل آماره‌های توصیفی بود. برای تجزیه تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای ریز ماهواره و ساختار جمعیت از روش‌های مختلفی استفاده شد. الگوهای نواری به‌صورت یک و صفر به‌ترتیب بر اساس وجود و عدم وجود باند در هر مکان امتیازدهی شدند. برای اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی از شاخص شانون، تنوع ژنی نئی، شاخص PIC و تعداد آلل مؤثر و

در گونه‌های زراعی و وحشی سویا با استفاده از تجزیه ارتباطی کمک گرفتند و به‌ترتیب ۲۷ و ۳۴ نشانگر پیوسته با این صفات را در این گونه‌ها شناسایی نمودند. دانگ و همکاران (۸) در پژوهشی ساختار و تنوع ژنتیکی ۱۰۰ ژنوتیپ سویا را با استفاده از ۵۳ نشانگر ریز ماهواره مورد بررسی قرار دادند و ۲۹۶ آلل با متوسط $5/6$ آلل برای هر نشانگر SSR و متوسط محتوای اطلاعات چندشکلی $0/573$ برآورد نمودند. در مطالعه آن‌ها تجزیه ساختار جمعیت، کلیه ژنوتیپ‌ها را به هشت زیر جمعیت تقسیم نمود. دادرس و همکاران (۷) با بررسی تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ‌های مختلف سویا از طریق نشانگرهای SSR، میانگین فراوانی آللی را $0/31$ ، میانگین تعداد آلل را برابر با $5/53$ عدد، میانگین تعداد آلل مؤثر را برابر با $4/62$ عدد، میانگین شاخص PIC را برابر با $0/73$ ، میانگین ضریب نئی را برابر با $0/77$ و میانگین شاخص شانون را $1/57$ برآورد کردند. تجزیه ساختار ژنتیکی جمعیت، ژنوتیپ‌ها را در سه گروه تقسیم‌بندی کرد. در این پژوهش تنوع ژنتیکی و همچنین نشانگرهای ریز ماهواره مرتبط با صفات مهم کمی و مرفولوژیک در برخی از ژنوتیپ‌های سویا با استفاده از روش تجزیه ارتباطی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و ارزیابی فنوتیپی

مواد گیاهی این تحقیق شامل ۱۴۴ ژنوتیپ سویا از گروه‌های رسیدگی مختلف (زود رس، متوسط رس و دیر رس) بود که از بانک ژن مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد. ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج در سال ۱۳۹۴ در قالب طرح لاتیس ساده با دو تکرار کشت شدند. لازم به ذکر است که تعداد ۱۴ ژنوتیپ به دلایل مختلفی بذور آن‌ها سبز نشد، بنابراین این پروژه با ۱۳۰ ژنوتیپ به اجرا درآمد که مشخصات ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است.

هر کرت شامل چهار خط به طول $2/5$ متر با فاصله بین خطوط 50 سانتی‌متر و فاصله بین بوته 10 سانتی‌متر بود. شخم اولیه به عمق 30 سانتی‌متر و دیسک به عمق 15 سانتی‌متر انجام شد و سپس تسطیح زمین توسط ماله صورت گرفت. کود نیتروژن به مقدار 150 کیلوگرم در هکتار از منبع اوره با توجه به نتایج آزمایش خاک به نسبت مساوی در سه مرحله شامل یک روز قبل از کاشت، زمان گل‌دهی و زمان غلاف‌دهی به کرت‌ها اضافه شد. کودهای فسفر و پتاسیم نیز به‌ترتیب از منبع فسفات آمونیوم و سولفات پتاسیم به مقدار 200 و 160 کیلوگرم در هکتار قبل از کاشت استفاده شدند. بذورهای ارقام مختلف سویا با سم کربوکسین تیرام (Carboxin Thiram) یک در هزار به مدت 20 دقیقه ضدعفونی و پس از شستشو با آب مقطر در عمق سه سانتی‌متر خاک کاشته شدند. اولین آبیاری سه روز قبل از کاشت و آبیاری‌های بعدی هفته‌ای یک‌بار انجام شد. کنترل علف‌های هرز به‌صورت دستی انجام شد. پس از رسیدگی بوته‌ها از هر کرت شش بوته به‌طور تصادفی انتخاب و صفات ارتفاع بوته، تعداد غلاف در بوته، طول غلاف، تعداد دانه در

به‌منظور محاسبه شاخص‌های تنوع از نرم‌افزار POPGENE ver 1.32 (۲۵) استفاده شد. برای انجام مکان‌یابی ارتباطی، ابتدا تجزیه ساختار جمعیت به‌منظور تشکیل ماتریس ساختار ژنتیکی ارقام و لاین‌های پیشرفته سویا با استفاده از نرم‌افزار Structure انجام شد (۲۰). با توجه به اینکه در مورد ساختار جمعیت اطلاعات قبلی در دست نبود، تعداد بهینه K (تعداد گروه‌ها یا زیر جمعیت‌ها) با انجام شبیه‌سازی تعیین شد. برای این منظور تعداد K از ۱ تا ۱۰ در نظر گرفته شد و انجام شبیه‌سازی با طول دوره burn-in ۱۰۰۰۰۰ و تعداد تکرار MCMC ۱۰۰۰۰۰ صورت پذیرفت. پس از انجام شبیه‌سازی برای تعیین تعداد بهینه K یا همان تعداد گروه‌ها، از روش ایوانو و همکاران (۹) استفاده شد، سپس درصد عضویت برای هر فرد در هر گروه با استفاده از این نرم‌افزار و مطابق روش اسپاتارو و همکاران (۲۲) صورت گرفت. مکان‌یابی ارتباطی با استفاده از مدل‌های آماری GLM و MLM با مجموعه اطلاعات ماتریس داده‌های فنوتیپی، ژنوتیپی، ماتریس ساختار (Q) و ماتریس خویشاوندی با استفاده از نرم‌افزار TASSEL 4.1.2 انجام گرفت.

پلی‌مرف استفاده شد. شاخص اطلاعات آلی شانون H_A بر اساس رابطه زیر محاسبه شد:

$$\sum p_i \ln p_i = -S H_A$$

که در این رابطه، p_i فراوانی وجود یا عدم وجود یک باند در یک مکان برای تمام افراد تشکیل‌دهنده یک گروه می‌باشد. تنوع ژنی نئی (H_s) از طریق رابطه زیر برآورد شد (۱۹).

$$H_s = \frac{1}{k} \sum_{s=1}^k H_{s_s} = \frac{1}{k} \sum_{s=1}^k [1 - q_s^2 - (1 - q_s)^2]$$

K تعداد کل مکان‌های ژنی و q_s فراوانی آلی هستند. شاخص محتوی اطلاعات چندشکلی (PIC) هر نشانگر با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید.

$$\sum_{i=1}^n p_i^2 - 1 = \text{PIC}$$

در این رابطه P_i فراوانی آلمین آل و n تعداد آل هر نشانگر است (۶). این شاخص می‌تواند بین صفر (برای آل‌های یک‌شکل در جمعیت) و یک (برای آل‌هایی که فراوانی آن‌ها در جمعیت برابر است) تغییر کند. تعداد آل‌های مؤثر (A_e) به صورت زیر محاسبه گردید (۱۲).

$$\frac{1}{\sum p_i^2} = A_e$$

جدول ۱- ژنوتیپ‌های سویای مورد مطالعه در این تحقیق

Table 1. Soybean genotypes of the studied in this research

شماره	ژنوتیپ	شماره	ژنوتیپ	شماره	ژنوتیپ	شماره	ژنوتیپ
۱	AGS 358 (3)	۳۴	A 3237	۶۷	Telar	۱۰۰	N.S-L-11-6
۲	AGS 359 (4)	۳۵	A 3935	۶۸	Nekador	۱۰۱	Mercory
۳	Hartwig	۳۶	Columbus	۶۹	Hatcheson	۱۰۲	Roanak
۴	Gloy	۳۷	Union	۷۰	Cliford	۱۰۳	Pance Vacka B
۵	2-L.80-5914	۳۸	Stressland-B	۷۱	Hood	۱۰۴	L.52
۶	B-R22 Bijelina	۳۹	Stressland-C	۷۲	Kaspian	۱۰۵	Sort 126 S.M.A.B
۷	LN 89-3394	۴۰	GN3074	۷۳	Sari	۱۰۶	ERFurt
۸	L.D 9	۴۱	Pek - Cak - taj	۷۴	AGS 346 (2)	۱۰۷	VINIMK 9186
۹	Kenwood	۴۲	Swift	۷۵	AGS (5)	۱۰۸	PA 83
۱۰	Fowler	۴۳	G.3× Hamilton (10)	۷۶	AGS 367 (6)	۱۰۹	VESTAG 97
۱۱	TN 4.94	۴۴	DPX × Yougetsu (2)	۷۷	AGS 364 (8)	۱۱۰	Hack
۱۲	Manacon	۴۵	DPX × Yougetsu (3)	۷۸	AGS 380 (9)	۱۱۱	Hadgson
۱۳	Fowler	۴۶	DPX × Darby (2)	۷۹	Doles	۱۱۲	CM - 1070
۱۴	Cysne	۴۷	DPX × Darby (3)	۸۰	GN2050	۱۱۳	S - 12 - 49
۱۵	Sort 62	۴۸	Williams × DPX (6)	۸۱	DI 74	۱۱۴	S.R.F × Columbus
۱۶	Sort 126 S.M.A.B	۴۹	Hamilton × Sahar (3)	۸۲	D42.14	۱۱۵	Budgoszkasz
۱۷	Wars zawska	۵۰	Hamilton × Nemaha (6)	۸۳	Linford	۱۱۶	Rounest
۱۸	Bonus	۵۱	9242	۸۴	Clean	۱۱۷	Poplu - 18 - 35
۱۹	Clean	۵۲	S 24 - 92	۸۵	LH-2500	۱۱۸	Tokyo Brown
۲۰	Stressland-A	۵۳	CX 232	۸۶	M 7	۱۱۹	Century 84
۲۱	5601-46-6-1 C	۵۴	Karbine	۸۷	TN 6.90	۱۲۰	RCAT ANGORA
۲۲	Harbinskaia 111-	۵۵	Harbinskaia 3971 B	۸۸	T 215	۱۲۱	S19 - 90
۲۳	Bean - Comet B	۵۶	Dikmanova - Cierna	۸۹	Kabalovskaja B	۱۲۲	Black Tokyo
۲۴	Delsoy 4210	۵۷	Dornburger	۹۰	Kabalovskaja	۱۲۳	Cul.9132
۲۵	Comet (NRM) B	۵۸	Banjaluka B	۹۱	8-L.65-3266	۱۲۴	AP - 1394
۲۶	B-R23 Bijelina	۵۹	Harasoy	۹۲	Black Hawck	۱۲۵	PRO - 280
۲۷	Bijelina 54/68	۶۰	Motte	۹۳	Illinois	۱۲۶	S 14 - H 4
۲۸	NS-16 B	۶۱	K.S 4895	۹۴	L.2	۱۲۷	SENTRY
۲۹	B-R3 (Bijelina)	۶۲	Essex	۹۵	S3-941-8-1-8	۱۲۸	Spirit
۳۰	Grangelb	۶۳	AGS 381 (10)	۹۶	L.8	۱۲۹	Salin
۳۱	Mishel	۶۴	TN 5.95	۹۷	Darby	۱۳۰	Interprise
۳۲	Calland	۶۵	Delsoy 4710	۹۸	NE-3297		
۳۳	Si-bi-va- 1207	۶۶	EJC (Edi. Jappan)	۹۹	ST.Pazova 54/18		

جدول ۲- مشخصات نشانگرهای ریز ماهواره مطالعه شده در این تحقیق

Table 2. characteristics of the studied microsatellite markers in this research

نام نشانگر	شماره کروموزوم	گروه لینکازی	دما اتصال (°C)	توالی پیشرو	توالی معکوس
S63880-CB	۲	B1	۶۳/۹	AGTCCTCCTCGCCAAACAAC	TTCATTTCATTTCCAAGCGGGT
Satt359	۲	B1	۶۲/۷	GCGAGAAAATAATCCTGCTCAA G	GCGTTTAAGTCCAATAACAAAGATAAC
S60211-TB	۲	B2	۴۵/۴	GAAGATCCTAACACGATGGCCG	TTCGTTGTTTCCTTCATTGCCG
Sat_287	۲	B2	۴۶/۷	GCGCATTCCCTATTTTATAGAAT GAGTAAAT	GCGCCATAATCAGCATGCACACCTTAT ATGG
Satt646	۲	C1	۴۹/۱	GCGGGGTATGAATTAATTAATGT AGAAT	GCGCCTTCAAAAATAATGACATATCA T
Satt190	۲	C1	۵۳/۸	GGGAGTGTGAACCTTACATTGTCT	GGGCCTTGAATTTTGTGCTAT
Satt607	۳	C1	۶۰/۸	GCGGTTTTCATCTGCAGTGATTA TTAT	GCGCCACTTAATTATTTTCAGATTAATT
Satt161	۴	C1	۵۶/۷	GGGTATATCAACATATCTTCACC TTTT	GGGCTGCTTGTTAATGTTTGTAGA
Sat_404	۴	C1	۵۵/۹	GCGGATGCGCTTAGCCAGAAGA TGAGT	GCGTTCTCCCCAATGTACATACTTCTA CCA
Satt661	۴	C1	۶۳/۹	TGATATGAGCAATGTAGTTCCTC T	TCCATGAAAAAGAGTTAGAATAGC
Satt361	۴	C1	۶۴/۹	GCGCGGTCAATGAATCGGGAGA CAC	GCGGTTTTCAGCGTTATTAAGTTTIG
Sat_077	۴	C1	۶۰/۱	GACACTTGTGGAATTACTCA	GGGTTGAAGACTTAAATTTGAAATCTC T
Satt399	۴	C1	۵۵/۴	AAGCCAACCTTATAATTCTTTCA T	ATATGGGCTTACTTACCCATCATAGA
Satt607	۴	C1	۶۳/۳	GCGGTTTCATCTGCAGTGATTA TTAT	GCGCCACTTAATTATTTTCAGATTAATT
Sat_416	۴	C1	۵۰/۴	GCGTAGTTTTTAAAGTT GA	GCGACATTGTGTGAGGGTAA
Sat_357	۴	C1	۵۵/۷	GCGAGGGTTAAGGTGTAGGTT GT	GCGCACCCTTTTGTTCCTTTTTG
Sct_028	۴	C2	۵۱/۸	TCGCCGGTACAAAAG	CGAATGAACAAACAAACA
Satt307	۴	C2	۶۰/۱	GCGCTGGCCTTTAGAAC	GCGTTGTAGGAAATTTGAGTAGTAAG
Satt079	۵	C2	۶۲/۱	AGTCGAAGATACACAATTAGAT	CTTTTAGACACAAATTTATCACT
Satt460	۶	C2	۴۴/۲	GCGCGATGGGCTGTTGGTTTTTA T	GCGCATACGATTTGGCATTTTCTATTG
Satt202	۶	C2	۵۷/۹	GGAATGCATGAGTATTAACCTCT TAT	GGGCTAACGAACATGTAACCTATCAAC
Satt460	۶	C2	۴۷/۹	GCGCGATGGGCTGTTGGTTTTTA T	GCGCATACGATTTGGCATTTTCTATTG
Sat_252	۶	C2	۵۹/۱	GCGTTTTCTGTCATGCTTTTGA ATTTT	GCGCAGGTCTCATACAAGTCATCATC T
Sat_238	۶	C2	۵۷/۹	GCGCTGAGACGTTTGTGATTGTT TGTA	GCGGTGCATGCAATCTTAGTAGATAT T
Satt644	۶	D1b	۵۹/۱	TATGCCTCAAACCACAAA	CAGGCCACCATTTTCTT
Satt041	۶	D1b	۶۳/۹	TGTTGTGTGGCTTTATTATT	TTAAGGTGGGATATGGTC
Sat_169	۱۱	D1b	۶۵/۹	ATTGTTAAATACTCCACATCAA TA	TTATGCTTTGTGTTTTCAGTT
Satt546	۱۲	D1b	۶۳/۴	TGAGCGATCAAGAAGCACTTA	TTTGATCGCATAACACTTTA
Satt428	۱۴	D1b	۷۳/۸	GCGTTGTGCTTAAGTGGTTGATT T	GCGGACCAGCTAGTTTTTAATGTG
Satt512	۱۵	E	۶۰/۸	AACGTCCTCAAGTCAAGTGCTA CA	GCCACATAGTTTTCATTTTCTCCA
Sat_124	۱۹	E	۶۳/۴	GGGTCCATTCACCTTTTGTACA ATAT	GGGAGTTCAAACATCCATTAGTGGTAT A

نتایج و بحث

آماره‌های توصیفی

جمعیت‌های متنوع‌تر از جمعیت‌های حاصل از تلاقی دو والد مشخص همانند ژنوتیپ‌های غیر خویشاوند جستجو می‌شوند. بنابراین، وقوع وقایع نوترکیبی در طول تاریخ تکاملی این جمعیت‌ها با تنوع زیاد که معمولاً چندین نسل دورتر از جد مشترک خود هستند، باعث شکست بلوک‌های عدم تعادل پیوستگی درون ژنوم می‌شوند. لذا وجود تنوع زیاد در جمعیت‌های مورد بررسی جهت وضوح و دقت بیشتر نتایج حاصله ضروری به نظر می‌رسد که این تنوع از نظر فنوتیپی و ژنوتیپی در جمعیت مورد مطالعه در این تحقیق مشاهده شد. وانگ و همکاران (۲۴) نیز در مطالعه مشابهی سطح بالایی از تنوع را برای بسیاری از ژنوتیپ‌های سویا گزارش کردند.

شاخص‌های مهم آماری صفات مورد مطالعه شامل حداقل، حداکثر، میانگین، دامنه تغییرات و ضریب تغییرات فنوتیپی در جدول ۳ ارائه شده است. بر اساس نتایج به‌دست آمده، بالاترین ضریب تغییرات مربوط به صفت عملکرد دانه در بوته (۲۶/۸۵ درصد) بود. نتایج این مطالعه بر اساس ارزیابی فنوتیپی و محاسبه شاخص‌های مختلف پراکندگی نشان داد که ژرم‌پلاسما سویا مورد مطالعه دارای تنوع بالایی از نظر بیشتر صفات می‌باشد که این تنوع می‌تواند در مطالعه تجزیه ارتباطی حاضر مفید واقع شود، زیرا در روش تجزیه ارتباطی عامل‌های مرتبط با چندشکلی‌های فنوتیپی در

جدول ۳- میانگین $\pm$ انحراف استاندارد (SD)، دامنه تغییرات، حداقل، حداکثر و ضریب تغییرات فنوتیپی اندازه‌گیری شده صفات در ۱۳۰ ژنوتیپ سویای مطالعه شده در این تحقیق

Table 3. Mean $\pm$ standard deviation (SD), range, minimum, maximum and phenotypic coefficient of variation of the measured traits in the 130 soybean genotypes studied in this research

صفات	میانگین $\pm$ انحراف استاندارد	دامنه تغییرات	حداکثر	حداقل	ضریب تغییرات فنوتیپی
ارتفاع بوته (cm)	۵۰/۰۷ $\pm$ ۱۵/۵۷	۶۷/۱۲	۹۸/۳۳	۳۲/۲۱	۱۸/۲۸
تعداد غلاف در بوته	۳۸/۷۸ $\pm$ ۱۱/۴۳	۶۴/۴۷	۸۲/۶	۱۸/۱۳	۱۲/۹۵
طول غلاف (cm)	۴/۰۶ $\pm$ ۰/۵۲	۳/۴۴	۵/۶	۲/۱۶	۱۶/۹۸
تعداد دانه در غلاف	۲/۸۹ $\pm$ ۰/۳۲	۲/۰۳	۳/۷	۱/۶۷	۱۳/۸
تعداد دانه در بوته	۱۱۱/۹ $\pm$ ۳۵/۶۳	۲۰۶/۸۸	۲۵۰/۰۱	۴۳/۱۳	۱۵/۵۷
وزن غلاف (g)	۰/۶۵ $\pm$ ۰/۱۵	۱/۱۱	۱/۴۱	۰/۰۳	۱۳/۵۹
وزن دانه (g)	۰/۱۹ $\pm$ ۰/۰۵	۰/۴۴	۰/۵۲	۰/۰۸	۱۹/۱۹
وزن صد دانه (g)	۱۵/۹۱ $\pm$ ۳/۵۳	۲۶/۳	۳۲/۲۳	۵/۹۳	۸/۴۶
عملکرد دانه (g/plant)	۲۱/۰۴ $\pm$ ۹/۶	۶۵/۵۵	۷۱/۹۰	۶/۳۵	۲۶/۸۵

تنوع ژنتیکی

معیارهای مختلفی از قبیل تنوع ژنتیکی نئی، شاخص شانون، محتوی اطلاعات چند شکلی (PIC)، تعداد آل مؤثر (N_e) و تعداد آل چند شکلی (N_p). برای هر کدام از آغازگرهای مورد استفاده در سطح جمعیت محاسبه شد (جدول ۴). تمام نشانگرهای مورد استفاده الگوی باندی واضح و قابل تفکیک و همچنین چندشکلی بالایی نشان دادند. نمونه‌ای از نوارهای ایجاد شده توسط نشانگر Sat_287 در شکل ۱ نشان داده شده است. در این مطالعه تنوع ژنتیکی ۱۳۰ ژنوتیپ سویا با استفاده از ۳۱ جفت آغازگر ریزماهوره ارزیابی شد. در کل ۸۷ آل توسط نشانگرهای مورد استفاده تکثیر شد که از این تعداد ۸۵ آل (۹۷/۷ درصد) چندشکل بودند. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) از ۰/۱۴ (آغازگر Sat_287) تا ۰/۸۸ (آغازگر Satt307) با میانگین ۰/۶۲ متغیر بود (جدول ۴). در این بررسی در کل مقادیر PIC برای بسیاری از نشانگرهای مورد استفاده زیاد بود که نشان‌دهنده انتخاب صحیح و کارایی بالای این نشانگرها می‌باشد. مقادیر بالای PIC برای نشانگرهای ریزماهوره در مطالعات دیگری نیز گزارش شده است (۷).

میانگین تعداد آل‌های مؤثر در کل ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بر اساس نشانگرهای ریز ماهواره ۱/۷ به دست آمد که از ۰/۸ (آغازگر Satt546) تا ۳/۶۴ (آغازگر Sat_416) متغیر بود. هنگامی که فراوانی‌های آلی یکسان هستند، تعداد آل‌های مؤثر به تعداد آل‌های مشاهده شده در یک مکان نزدیک می‌باشد. بنابراین تفاوت‌های زیاد بین این پارامترها نشان‌دهنده فراوانی پایین بعضی از آل‌ها می‌باشد، زیرا آن‌ها فقط در یک و یا تعداد کمی از افراد وجود دارند، به همین دلیل این پارامتر ممکن است در شناسایی آل‌های نادر مفید باشد. همچنین از آنجایی که یکی از معیارهای مهم در انتخاب آغازگرهای مناسب و سودمند، تعداد آل‌های مؤثر است (۲۷)، می‌توان از آغازگرهایی با تعداد آل مؤثر بیشتر مانند Sat_416 برای مطالعات بعدی به منظور بررسی سطح تنوع ژنتیکی موجود در ژنوتیپ‌های مختلف سویا استفاده نمود.

ضریب شانون نیز یکی دیگر از شاخص‌هایی بود که برای ارزیابی سطح چندشکلی و تنوع مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۴). دامنه عددی ضریب شانون نیز به‌عنوان یکی دیگر از شاخص‌های ارزیابی سطح چندشکلی آشکار شده توسط

نشانگرهای ریز ماهواره از ۰/۰۹ برای آغازگر Sat_238 تا ۰/۸۳ برای آغازگر Sat_287 با میانگین ۰/۵۲ متغیر بود. با وجود اینکه شاخص شانون به‌طور گسترده در مطالعات تنوع ژنتیکی استفاده می‌شود، اما هیچ چهارچوب نظری از ژنتیک جمعیت برای محاسبه این شاخص به‌عنوان کمیت تنوع وجود ندارد و از این‌رو شاخص شانون برای مطالعه تنوع ژنتیکی به ویژه به هنگام استفاده از نشانگرهای هم بارز پیشنهاد نمی‌شود؛ بنابراین به‌نظر می‌رسد مناسب‌ترین شاخص برای بدست آوردن یک دید کلی در مورد تنوع ژنتیکی در یک جمعیت برای نشانگرهای هم‌بارز، هتروزیگوسیتی و تنوع ژنی نئی باشد. میزان تنوع ژنی نئی از ۰/۰۵ (Sat_287) تا ۰/۷۹ (Sat_238)، با میانگین ۰/۴۸ متغیر بود (جدول ۴) که نشان‌دهنده سطح متوسط این پارامتر می‌باشد. در کل بالا بودن چندشکلی حاصل از محاسبه شاخص‌های مختلف تنوع در پژوهش حاضر را می‌توان به کارایی بالای این نشانگرها و نیز تفاوت‌های حقیقی ژنوتیپ‌های مورد بررسی نسبت داد. از طرفی با توجه به فراوانی بالای نواحی ریز ماهواره‌ای در یوکاریوت‌ها و همچنین تفاوت‌های زیاد تک نوکلئوتیدی در سطح ژنوم آن‌ها، استفاده از این روش مولکولی می‌تواند سطح بالایی از چندشکلی را آشکار سازد و وجود چنین سطح بالایی از تنوع بر مبنای شاخص‌های مختلف دور از انتظار نیست (۲۸). به هر حال نتایج حاصل از ارزیابی شاخص‌های مختلف تنوع در این تحقیق نشان داد که تنوع قابل توجه و زیادی بین ۱۳۰ ژنوتیپ مورد مطالعه سویا وجود دارد و در نتیجه به‌خوبی می‌توان از این جمعیت جهت انجام تجزیه ارتباطی استفاده کرد.

دادرس و همکاران (۷) میانگین فراوانی آلی را ۰/۳۱، میانگین تعداد آل برابر با ۵/۵۳ عدد، میانگین تعداد آل مؤثر برابر با ۴/۶۲ عدد، میانگین شاخص PIC برابر با ۰/۷۳، میانگین ضریب نئی برابر با ۰/۷۷ و میانگین شاخص شانون را ۱/۵۷ برآورد کردند که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت ندارد. لی و همکاران (۱۴) در مطالعه‌ای ضریب تنوع ژنتیکی نئی را برای ژنوتیپ‌های سویا در کشور چین و کره به‌ترتیب ۰/۷۶ و ۰/۷۲ برآورد و عنوان کردند که تنوع ژنتیکی بسیار بالایی در جمعیت‌های هر دو کشور وجود دارد که هر کدام به‌عنوان خزانه ژنتیکی واحد برای بهبود این گیاه قابل بهره‌برداری است. دانگ و همکاران (۸) متوسط محتوای

درصد) به گروه سوم (سبز) تعلق داشتند. اگر تجزیه ارتباطی بدون شناسایی گروه 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 ارتباطی استفاده نمود تا از شناسایی بخشی از پیوستگی‌های کاذب که ممکن است به دلیل تفاوت در ساختار جمعیت باشد ممانعت به عمل آید (۱۰). در مطالعه باس و همکاران (۵) در کلزا و دادرس و همکاران (۷) در سویا نیز ژنوتیپ‌های مختلف از طریق تجزیه ساختار جمعیت به سه زیر جمعیت تقسیم‌بندی شدند که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت داشت. در مطالعه لی و همکاران (۱۴) ژنوتیپ‌های سویا به پنج زیر گروه تقسیم شدند.

عدم تعادل لینکاژی

طبق نتایج این تحقیق در مورد میزان نامتعادلی پیوستگی می‌توان گفت که در حدود ۳۰ درصد از نشانگرهای مورد مطالعه دارای r^2 معنی‌دار و بزرگ‌تر از ۰/۱ بودند (شکل ۴). به این معنی که پیوستگی معنی‌دار و قوی بین این نشانگرها در جمعیت مورد مطالعه وجود داشته و این پیوستگی موجب انحراف از تعادل در فراوانی‌های ژنوتیپی و گامتی جمعیت شده است. بخش عمده‌ای از تنوع صفاتی که این نشانگرها با آن در ارتباط هستند توجیه می‌شود. در مطالعه ژئی و همکاران (۲۹) و دانگ و همکاران (۸) در گیاه سویا اکثر نشانگرهای مورد مطالعه دارای r^2 معنی‌دار و بزرگ‌تر از ۰/۱ بودند.

اطلاعات چندشکلی متغیر را ۰/۵۷۳ برآورد نمودند. واینر و همکاران (۱۱) میانگین شاخص PIC، میزان شاخص شانون و تعداد آلل مؤثر را در ژنوتیپ‌های مختلف سویا را به ترتیب برابر با ۰/۳۲۶، ۰/۳۸۷ و ۲/۵۴۳ عدد برآورد کردند. زینلی‌زاده تبریزی و همکاران (۲۶) در مطالعه خود میانگین شاخص PIC، ۰/۳۴ و تعداد آلل مؤثر را ۲/۸۶ عدد برآورد کردند. اختلافات نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج محققان دیگر را می‌توان به عوامل مختلفی از قبیل میزان تنوع در نمونه‌ها، روش آشکارسازی و اندازه نمونه نسبت داد.

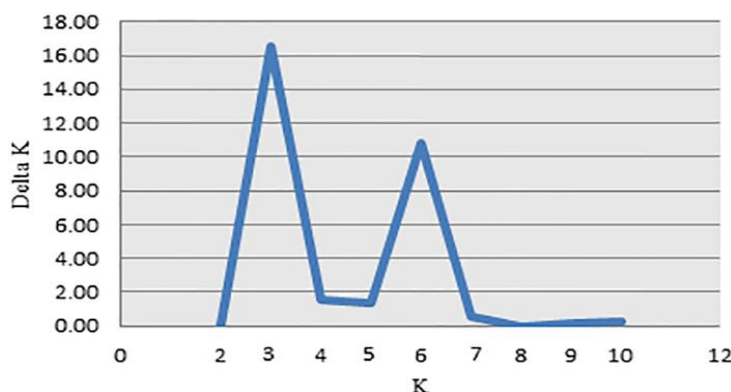
ساختار ژنتیکی جمعیت

نتایج تجزیه ساختار جمعیت با استفاده از نرم‌افزار Structure در شکل ۲ و ۳ ارائه شده است. شکل ۲ نمودار دو طرفه برای تعیین تعداد بهینه K را نشان می‌دهد. در این شکل مقدار K و ΔK 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 ΔK را به حداکثر خود می‌رساند برابر ۳ می‌باشد و ۱۳۰ ژنوتیپ سویا به سه گروه تقسیم‌بندی شدند. بر اساس نتایج ارائه‌شده در باریلات (شکل ۳)، ۹ ژنوتیپ (۶/۹۲ درصد) به گروه مخلوط (احتمال تعلق هر ژنوتیپ به هر یک از زیر گروه‌ها کمتر از ۰/۷ است، ۳۴ ژنوتیپ (۲۶/۱۵ درصد) به گروه اول (قرمز)، ۴۳ ژنوتیپ (۳۳/۰۷ درصد) به گروه دوم (آبی) و ۴۴ ژنوتیپ (۳۳/۸۴ درصد) به گروه سوم (سبز) تعلق داشتند.

جدول ۴- شاخص‌های تنوع برآورد شده در ژنوتیپ‌های سویای مورد مطالعه

Table 4. Diversity statistic of microsatellite markers in evaluated soybean cultivars.

نشانگر	تعداد آلل مشاهده شده	تعداد آلل پلی‌مرف (N_P)	تنوع ژنتیکی نئی (Nei)	شاخص شانون	شاخص PIC	تعداد آلل مؤثر (N_e)
S63880-CB	۲	۲	۰/۵۸	۰/۶۴	۰/۷۹	۱/۰۹
Satt359	۲	۲	۰/۱۲	۰/۱۸	۰/۲۶	۱/۱۵
S60211-TB	۲	۲	۰/۰۸	۰/۱۱	۰/۲	۱/۰۵
Satt_287	۳	۲	۰/۰۵	۰/۰۹	۰/۱۴	۱/۱
Satt646	۲	۲	۰/۴۸	۰/۵۸	۰/۶۴	۱/۲
Satt190	۲	۲	۰/۵۳	۰/۶۳	۰/۷۱	۱/۰۶
Satt607	۲	۲	۰/۴	۰/۴۴	۰/۶۸	۱/۱۲
Satt161	۲	۲	۰/۵۴	۰/۶	۰/۵۸	۱/۱
Satt_404	۳	۳	۰/۶۸	۰/۷۲	۰/۸۵	۱/۲۱
Satt661	۳	۳	۰/۵۶	۰/۶۱	۰/۷۴	۱/۵۸
Satt361	۳	۳	۰/۶۴	۰/۶۸	۰/۷۶	۲/۲
Satt_077	۲	۲	۰/۳۳	۰/۳۹	۰/۵۶	۱/۱۷
Satt399	۲	۲	۰/۴۹	۰/۵۵	۰/۶۲	۱/۰۸
Satt607	۲	۲	۰/۳۴	۰/۳۶	۰/۴۲	۱/۱۴
Satt_416	۵	۵	۰/۷۳	۰/۷۹	۰/۸۱	۳/۶۴
Satt_357	۵	۵	۰/۳	۰/۳۳	۰/۴۶	۲/۷۹
Sct_028	۵	۵	۰/۵۸	۰/۶	۰/۷۵	۳/۱۱
Satt307	۵	۵	۰/۷۳	۰/۷۷	۰/۸۸	۲/۵۸
Satt079	۵	۵	۰/۷۸	۰/۸	۰/۷۵	۳/۵
Satt460	۲	۲	۰/۶	۰/۶۳	۰/۷	۱/۱
Satt202	۲	۲	۰/۵۵	۰/۵۸	۰/۶۸	۱/۰۵
Satt460	۴	۴	۰/۲۸	۰/۳۲	۰/۴	۱/۲۳
Satt_252	۲	۲	۰/۴	۰/۴۳	۰/۵۵	۱/۱۴
Satt_238	۵	۵	۰/۷۹	۰/۸۳	۰/۸۵	۲/۵
Satt644	۵	۵	۰/۱	۰/۷۲	۰/۱۵	۳/۲۲
Satt041	۲	۲	۰/۶۷	۰/۷۱	۰/۸۳	۱/۱۸
Satt_169	۲	۲	۰/۶۵	۰/۶۹	۰/۸	۱/۱۱
Satt546	۲	۱	۰/۲۷	۰/۳	۰/۴۲	۰/۸
Satt428	۲	۲	۰/۲	۰/۲۳	۰/۳۹	۱/۲۳
Satt512	۲	۲	۰/۷۹	۰/۷۵	۰/۸۴	۱/۱۵
Satt_124	۲	۲	۰/۵۲	۰/۶۷	۰/۷۷	۱/۱
میانگین	۲/۸۵	۲/۸	۰/۴۸	۰/۵۲	۰/۶۲	۱/۷



شکل ۱- تعیین تعداد مناسب زیرجمعیت در ژنوتیپ‌های سویای مورد مطالعه ($K=3$) با نشانگرهای ریز ماهواره
Figure 1. Bilateral charts for determining the number of sub-populations in the studied soybean genotypes ($K=3$) based on microsatellite markers

بوته، نشانگرهای Satt546، Satt661، Satt079 و Satt202 با صفت تعداد غلاف در بوته، نشانگرهای Sat_287، Satt361، Satt079، S63880-CB و Satt460 با صفت طول غلاف، نشانگرهای S63880-CB، Satt646، Satt460 و Sat_238 با صفت تعداد دانه در غلاف، نشانگرهای Satt661، Satt607 و Sat_252 با صفت تعداد دانه در بوته، نشانگرهای Sct_028، S63880-CB، Satt644 و Sat_252 با صفت وزن دانه، نشانگرهای Satt460، Sat_252، S63880-CB و Satt644 با صفت وزن صد دانه و ارتباط نشانگرهای Satt359، Satt361، Sct_028 و Sat_124 با صفت عملکرد دانه معنی‌دار بود. نیز نشان‌دهنده توارث کمی و پلی‌ژنیک این صفات باشد که هر کدام از آن‌ها سهمی مشخص از تنوع صفت را کنترل می‌کنند. از طرفی کم بودن مقدار ضریب تبیین (R^2) برای اکثر نشانگرهای مرتبط نیز مؤید همین مطلب یعنی ماهیت چند ژنی صفات مورد مطالعه است، به‌طوری‌که هر ژن یا ناحیه ژنومی بخش کمی از تغییرات این صفات را توجیه می‌کند و همکاری بین چندین ژن و ناحیه ژنومی است که در نهایت موجب تظاهر این صفات کمی می‌شوند و طبیعتاً بخشی از تنوع هر یک از این صفات نیز تحت تأثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرند. بنابراین از این نشانگرها می‌توان در برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر در سویا استفاده کرد.

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج حاصل، ساختار ژنتیکی جمعیت به سه زیر جمعیت فرعی تقسیم شد که نتایج حاصل از رسم بار پلات نیز آن را تأیید کرد. نتایج تجزیه ارتباطی، ارتباط معنی‌دار بین ۳۳ و ۳۵ نشانگر را به‌ترتیب بر اساس روش‌های GLM و MLM با صفات مورد مطالعه نشان داد. تعدادی از نشانگرهای ریز ماهواره دارای ارتباط معنی‌داری با چند صفت بودند که می‌تواند ناشی از آثار پلی‌تروپی و یا پیوستگی نواحی ژنومی دخیل در کنترل این صفات باشد (۱۳). شناسایی نشانگرهای مشترک اهمیت زیادی در به‌نژادی گیاهان دارد، زیرا گزینش همزمان چند صفت را امکان‌پذیر می‌سازند (۲۳). بر اساس نتایج ارائه‌شده در جدول ۵ می‌توان اظهار داشت که ارتباط چند نشانگر با یک صفت خاص مانند ارتباط نشانگرهای Satt460، Sat_357 و Satt644 با صفت ارتفاع

تجزیه ارتباطی با مدل‌های GLM و MLM

به‌منظور شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات مورد ارزیابی در ژنوتیپ‌های سویا مورد مطالعه، تجزیه ارتباطی بر اساس مدل خطی عمومی (GLM) وابسته به ماتریس Q (ماتریس ضرایب احتمال عضویت هر فرد به هر یک از زیرجمعیت‌ها) و مدل خطی مختلط (MLM) وابسته به ماتریس‌های $Q+K$ (K : ماتریس روابط خویشاوندی) با استفاده از نرم‌افزار TASSEL 3.0 انجام گرفت. در کل بر اساس نتایج حاصل از مدل GLM، ۳۳ نشانگر ارتباط معنی‌داری ($p < 0.05$) با صفات مورد ارزیابی نشان دادند. بر اساس مدل MLM که از اطلاعات بیشتری نسبت به مدل GLM و در نتیجه ارزیابی کمتر نتایج استفاده می‌کند، تعداد ۳۵ مکان معنی‌دار مرتبط با صفات مورد ارزیابی در سطوح احتمال پنج و یک درصد شناسایی شد (جدول ۵).

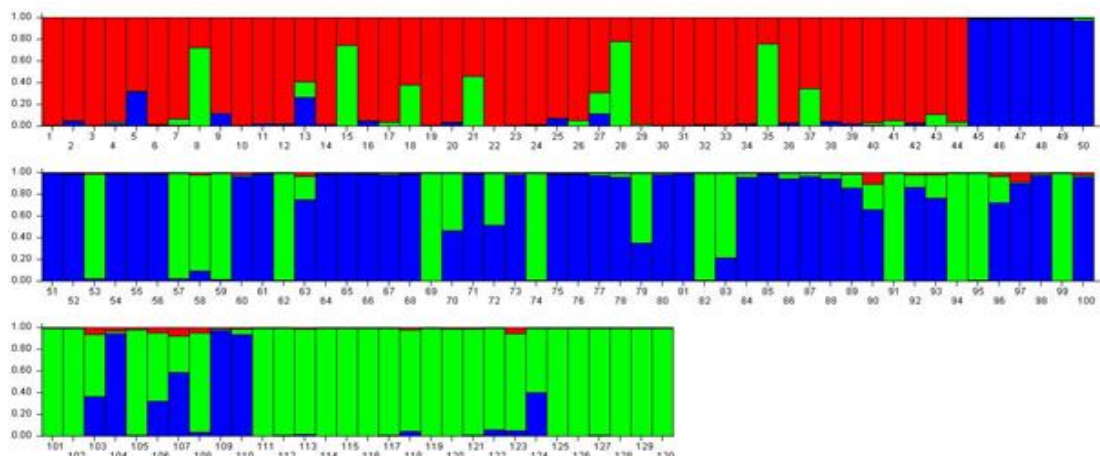
تعدادی نشانگر مشترک برای صفات مختلف در هر دو روش GLM و MLM در این تحقیق شناسایی شدند (جدول ۵) که شامل پیوستگی نشانگر Satt460 با صفات ارتفاع بوته، طول غلاف، تعداد دانه در غلاف و وزن صد دانه، نشانگر Satt644 با صفات ارتفاع بوته، وزن دانه و وزن صد دانه، نشانگر Satt661 با صفات تعداد غلاف و تعداد دانه در بوته، نشانگر Satt079 با صفات تعداد غلاف و طول غلاف، نشانگر Satt361 با صفات طول غلاف و عملکرد دانه، نشانگر S63880-CB با صفات طول غلاف، تعداد دانه در غلاف، وزن دانه و وزن صد دانه، نشانگر Sat_124 با صفات طول غلاف، وزن غلاف و عملکرد دانه، نشانگر Sat_252 با صفات تعداد دانه در بوته، وزن دانه و وزن صد دانه و نشانگر Sct_028 با صفات وزن دانه و عملکرد دانه بودند. وجود یک ژن یا ناحیه ژنومی برای کنترل همزمان چند صفت احتمالاً می‌تواند ناشی از آثار پلی‌تروپی و یا پیوستگی نواحی ژنومی دخیل در کنترل این صفات باشد (۱۳). شناسایی نشانگرهای مشترک اهمیت زیادی در به‌نژادی گیاهان دارد، زیرا گزینش همزمان چند صفت را امکان‌پذیر می‌سازند (۲۳).

بر اساس نتایج ارائه‌شده در جدول ۵ می‌توان اظهار داشت که ارتباط چند نشانگر با یک صفت خاص مانند ارتباط نشانگرهای Satt460، Sat_357 و Satt644 با صفت ارتفاع

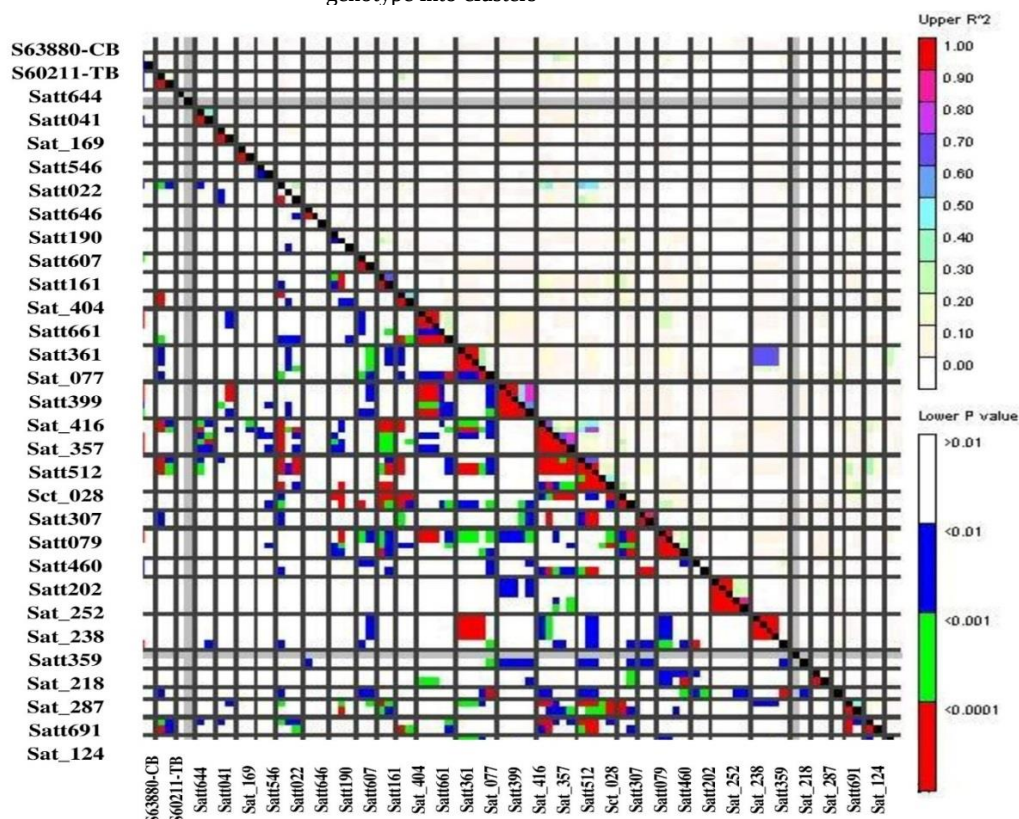
تشکر و قدردانی

از دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان و بخش دانه‌های روغنی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج به خاطر فراهم نمودن امکانات لازم برای اجرای این تحقیق کمال تشکر و قدردانی را داریم.

روش نقشه‌یابی پیوستگی از قبیل در دسترس نبودن جمعیت‌های در حال تفرق و زمان طولانی لازم جهت ایجاد آن‌ها، روش تجزیه ارتباطی با از بین بردن این محدودیت‌ها اطلاعات نشانگری مناسبی را در اختیار محققان قرار می‌دهد.



شکل ۲- تجزیه ساختار مبتنی بر مدل Bayesian برای ۱۳۰ ژنوتیپ سویای مورد مطالعه بر اساس ۳۱ نشانگر ریز ماهواره. هر رنگ یک زیر جمعیت یا کلاستر را نشان می‌دهد ($K=3$). محور عمودی ضریب تعلق هر ژنوتیپ به هر کلاستر را نشان می‌دهد.
Figure 2. Bayesian model based cluster analysis for 130 different soybean genotypes using 31 microsatellite loci ($K=3$). Each color indicate one sub-population or cluster. Vertical axis show the membership coefficient of each genotype into clusters



شکل ۳- پلات نامتعادلی پیوستگی نشانگرهای ریز ماهواره مورد استفاده در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه سویا. بالای قطر میزان نامتعادلی پیوستگی و پایین قطر p-value را برای جفت نشانگرها نشان می‌دهد.

Figure 3. Linkage disequilibrium plot (LD plot). Diameter upper and lower are indicating linkage disequilibrium and p-value for each pair of marker, respectively

جدول ۵- نشانگرهای پیوسته با صفات ارزیابی شده در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه بر اساس مدل‌های GLM و MLM
 Table 5. Microsatellite markers linked to evaluated traits in the studied soybean population using the association analysis based on GLM and MLM models

مدل MLM		مدل GLM		نشانگر	صفات
F-value	p-value	R ²	p-value		
۴/۵۹	۰/۰۳	۰/۱۱	۰/۰۱	Satt460	ارتفاع بوته
۴/۳۷	۰/۰۴	۰/۱۲	۰/۰۰۵	Sat_357	
۵/۱۲	۰/۲۵	۰/۱۳	۰/۰۰۳	Satt644	
۴/۹۳	۰/۰۲۸	۰/۱۱	۰/۰۲۶	Satt546	تعداد غلاف در بوته
۳/۹۶	۰/۰۵	۰/۱	۰/۰۳	Satt661	
۷/۵۷	۰/۰۰۶	۰/۱۲	۰/۰۵	Satt079	
۴/۸۲	۰/۰۳	۰/۱	۰/۰۲۶	Satt202	
۷/۳۲	۰/۰۰۸	۰/۱۲	۰/۰۰۷	Sat_287	طول غلاف
۵/۶۷	۰/۰۲	۰/۱۲	۰/۰۲	Satt361	
۵/۶۱	۰/۰۱۹	۰/۱۱	۰/۰۱	Satt079	
۷/۱۶	۰/۰۸	۰/۱۴	۰/۰۰۹	S63880-CB	
۴/۳۱	۰/۰۳	۰/۱۵	۰/۰۲	Satt460	
۵/۵۶	۰/۰۲	۰/۱۳	۰/۰۰۱	Sat_124	تعداد دانه در غلاف
۴/۷۴	۰/۰۳	۰/۱۱	۰/۰۳	S63880-CB	
۷/۵	۰/۰۰۷	۰/۱۲	۰/۰۰۷	Satt646	
۴/۲	۰/۰۴	۰/۰۹	۰/۰۲	Satt460	
۵/۶۶	۰/۰۱۸	۰/۰۶	۰/۰۳	Sat_238	تعداد دانه در بوته
۴/۰۲	۰/۰۵	۰/۰۹	۰/۰۴	Satt661	
۴/۶	۰/۰۳۴	۰/۰۹	۰/۰۳	Satt607	
۷/۳۷	۰/۰۰۷	۰/۱۴	۰/۰۰۷	Sat_252	
۵/۱۳	۰/۰۲	۰/۱۲	۰/۰۲	Sat_124	وزن غلاف
۶/۷۵	۰/۰۱	۰/۱۱	۰/۰۱	Sct_028	وزن دانه
۷/۶۴	۰/۰۰۶	۰/۱۲	۰/۰۰۵	S63880-CB	
۱۰/۰۹	۰/۰۰۲	۰/۱۳	۰/۰۲	Satt644	
۵/۴۸	۰/۰۲	۰/۱۱	۰/۰۱	Sat_252	
۴/۰۷	۰/۰۴	۰/۰۹	۰/۰۴	Satt460	وزن صد دانه
۴/۵۲	۰/۰۳	۰/۰۹	۰/۰۳	Sat_252	
۸/۲۲	۰/۰۵	۰/۱۳	۰/۰۵	S63880-CB	
۷/۷۷	۰/۰۶	۰/۱۲	۰/۰۶	Satt644	
۱۰/۰۶	۰/۰۲	۰/۱۵	۰/۰۰۱۶	Satt359	عملکرد دانه
۶/۵۸	۰/۰۱۱	۰/۱۲	۰/۰۰۹	Satt361	
۵/۱۴	۰/۰۲	۰/۱	۰/۰۲	Sct_028	
۸/۵۲	۰/۰۰۴	۰/۱۲	۰/۰۰۴	Sat_124	

GLM, General linear model; MLM, Mixed linear model

منابع

1. Abdollahi Mandoulakani, B., A. Alami and M. Esfahani. 2010. Association analysis for morphological traits in peanut (*Arachis hypogea* L.) using microsatellite markers. Iranian Journal of Crop Sciences, 12(4): 510-519 (In Persian).
2. Andersen, J.R. and T. Lübberstedt. 2003. Functional markers in plants. Trends in Plant Science, 8(11): 554-560.
3. Bilyeu, K.D., N.B. Ratnaparkhe and Ch. Kole. 2010. Genetics, genomics and breeding of soybean. Published by Science Publishers, P.O. Box 699, Enfield, NH 03748, USA.
4. Buckler E., J.M. Thornsberry and S. Kresovich. 2001. Molecular diversity, structure and domestication of grasses. Genetics Research, 77: 213-218.
5. Bus, A., N. Korber, R.J. Snowdon and B. Stich. 2011. Patterns of molecular variation in a species wide germplasm set of *Brassica napus*. Theoretical and Applied Genetics, 123: 1413-1423.
6. Chen, C., S. Li, S. Wang, H. Liu, Q. Deng, A. Zheng, J. Zhu, L. Wang and P. Li. 2011. Assessment of the Genetic Diversity and Genetic Structure of Rice Core Parent Guichao 2, its Parents and Derivatives Journal of Plant Science, 6: 66-76.
7. Dadras, A.R., H. Samizadeh and H. Sabouri. 2015. Validation of Candidate Markers Drought Tolerance in Soybean Genotypes under Normal and Drought Stress Condition. Journal of Crop Breeding, 9(22): 1-13 (In Persian).
8. 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.
9. 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.

10. 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.
11. Gwinner, R., T.A. Setotaw, M. Pasqual, J. Bosco dos Santos, A.M. Zuffo, E. Zambiazzi and A.T. Bruzi. 2017. Genetic diversity in Brazilian soybean germplasm. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 17(4): 73-84.
12. Hartl, D.L. and A.G. Clark. 1997. "Principles of population genetics", Sinauer Associates, Inc. Sunderland, 542-549 pp.
13. Jun, T.H., K. Van, M.Y. Kim, S.H. Lee and D.R. Walker. 2008. Association analysis using SSR markers to find QTL for seed protein content in soybean. *Euphytica*, 62: 179-191.
14. Lee, J.D., 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.
15. Mahjoob, M., H. Najafi-Zarini and S.H.R. Hashemi. 2014. Assessment of genetic relationships among 36 brassica genotypes using ISSR molecular markers. *Journal of Crop Breeding*, 6(14): 96-106 (In Persian).
16. Mohini, J. and J.D. Deshpande. 2010. Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research*, 1(5): 81-97.
17. Moose, S.P. and R.H. Mumm. 2008. Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. *Plant Physiol*, 147: 969-977.
18. Musial J.M., J.M. Mackie, J.D. Armour, T.T.H. Phan and E.S. Ellwood. 2008. Identify of QTL for resistance and susceptibility to *Stagonospora meliloti* in autotetraploid Lucern. *Applied Genetic*, 1148: 1427-1435.
19. Nei, M. 1997. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 70: 3321-3321.
20. Pritchard, J.K., M. Stephens and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2): 945-959.
21. Saghai-Marooof, M.A., K.M. Soliman, R.A. Jorgensen and R.W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacerlength polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 81: 8014-8018.
22. Spataro, G., B. Tiranti, P. Arcaleni, E. Bellucci, G. Attene, R. Papa, P. Spagnoletti Zeuli and V. Negri. 2011. Genetic diversity and structure of a worldwide collection of *Phaseolus coccineus* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 122: 1281-1291.
23. Tuberosa, R., S. Salvi, M. C. Sanguineti, P. Landi, M. Maccaferri and S. Conti. 2002. Mapping QTLs regulating morpho-physiological traits and yield in drought-stressed maize: case studies, shortcomings and perspectives. *Annals Botany*, 89: 941-963.
24. Wang, J., P.E. Mc Clean, K. Lee, R.J. Goos and T. Helms. 2008. Association mapping of iron deficiency chlorosis loci in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] advanced breeding lines. *Theoretical and applied genetic*, 116(6): 777-787.
25. Yeh, F.C. and T.J.B. Boyle. 1997. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany*, 129: 157-163.
26. Zeinalzadeh-Tabrizi, H., K. Haliloglu, M. Ghaffari and A. Hosseinpour. 2008. Assessment of genetic diversity among sunflower genotypes using microsatellite markers. *Molecular Biology Research Communications*, 7(3): 143-152.
27. Zhu, C., M. Gore, E.S. Buckler and J. Yu. 2008. Status and prospects of association mapping in plants. *The Plant Genome*, 1(1): 5-20.
28. Zietkiewich, E., A. Rafalski and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymorphism chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176-183.
29. Zi-Xiang, W., Z. Tuan-Jie, Z. Yong-Zhan, L. Shun-Hu, E.W. Chun, W. Fang and I.C. UN. 2008. Association analysis of agronomic and quality traits with SSR markers in *Glycine max* and *Glycine soja* in China: Population Structure and Associated Markers. *Journal of Acta Agronomica Sinica*, 34: 1169-1178.

Association Analysis for Important Quantitative and Morphological Traits in Cultivars and Advanced Lines of Soybean (*Glycine max* (L.)) using Microsatellite Markers

Ali Ghorbanipour¹ and Babak Rabiei²

1- Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agricultural Science, University of Guilan, Rasht, (Corresponding author: Ghorbanipour.ali@gmail.com)

2- Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agricultural Science, University of Guilan, Rasht

Received: 12 September 2021 Accepted: 1 February 2022

Extended Abstract

Introduction and Objective: The economic value of a genotype depends on its various traits and therefore the accurate knowledge of genetic behavior and identification of genomic locus involved in controlling these traits can help the breeder to improve genotypes.

Material and Methods: In this study, the relationship between microsatellite markers with some important agronomic and morphological traits in 130 different soybean genotypes through communication models, including the general linear model (GLM) and the mixed linear model (MLM) in 2015 was evaluated. The studied traits were including plant height, pod length, number of pod per plant, number of grain per pod, number of grain per plant, pod weight, grain weight, 100-grain weight and grain yield.

Results: According to the molecular diversity among the 130 studied genotypes on the basis of microsatellite markers, 87 alleles were amplified by markers, of which 85 alleles (97.7%) were polymorph. Results of allelic diversity revealed average number of effective alleles, shannons's index, polymorphic information content and gene diversity Nei equal to 1.7, 0.52, 0.62 and 0.48 respectively. The results of structural analysis showed that there were three sub-populations ($k=3$) in the studied germplasm, so that from the 130 soybean genotypes, 34 (26.15%) belonged to first structure, 43 (33.07%) to second structure, 44 (33.84%) to third structure and nine genotypes (6.92%) to mixed structure, which were confirmed by the results of the bar plot. The association analysis of microsatellite markers with traits under a mixed linear model (MLM) indicated that 33 and 35 markers had significant relationships with the evaluated characteristics. Some microsatellite markers had significant relationships with the several traits (e.g. the relationships between Satt460 marker with plant height, pod length, number of grain per pod, and 100-grain weight), which can be due to either the pleiotropic effects or the tight linkage of genomic regions controlling these traits. The relationship between several markers with a specific trait (for example relationship between Sct_028, Sat_124, Satt359 and Satt361 markers with trait of grain yield) indicating the quantitative and polygenic inheritance of the evaluated traits.

Conclusion: The results of this research showed that in addition to using markers as useful markers in assessing genetic diversity in soybeans, markers that were more closely related to the genomic regions controlling these traits, to modify the population by marker assisted selection.

Keywords: Genetic structure, Genotype, Linkage disequilibrium, Yield and components yield