دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

مطالعه تنوع ژنتیکی سویا (*Glycine max*) با استفاده از نشانگرهای ISSR

زهرا ملک محمدی[۱]، حسین صبوری[۲]، عباس بیابانی[۳] و ابراهیم هزارجریبی[۴]

۱ و ۳- دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیار، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گنبد کاووس
۲- دانشیار، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گنبدکاووس (نویسنده مسوول: saboriho@yahoo.com)
۴- عضو هیات علمی، مرکز تحقیقات کشاورزی استان گلستان
تاریخ دریافت: ۹۳/۸/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۱

چکیده

شناخت تنوع ژنتیکی و طبقه‌بندی ذخایر توارثی یکی از فعالیت‌های مهم در زمینه‌ی به‌نژادی و حفظ ذخایر ژنتیکی در گیاهان است. به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی در ٤٨ ژنوتیپ سویا، تکثیر مکان‌های ژنی با استفاده از ۱۰ آغازگر ISSR در آزمایشگاه ژنتیک و اصلاح نباتات دانشکده‌ی کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گنبدکاووسانجام شد. از تعداد ٦٨ قطعه‌ای که در کل ارقام تولید شد ٣٤ قطعه چند شکل بودند. تعداد باندهای چند شکل از ۲ تا ۵ به ازای هر آغازگر متفاوت بود. بیشترین باندهای چند شکل مربوط به آغازگر PRI-4 بود. مقادیر PIC بین ۰/۱٤٧ تا ۰/۰۵۸ و شاخص نشانگری بین ۸/۳۹ تا ۱/٦٥ در آغازگرها متغیر بود. بیشترین و کمترین میزان چندشکلی به‌ترتیب به آغازگر PRI–2 با ٦٦/٦٦ درصد و آغازگر PRI-5 با ۲۸/۵۷ درصد تعلق داشت. آغازگر PRI-5 بیشترین میزان شاخص شانون را با مقدار ۰/٦٧٨ و آغازگر PRI-1 کمترین میزان شاخص شانون را با مقدار ۰/٤٦٧ نشان دادند. بیشترین میزان تنوع ژنتیکی در آغازگر PRI-5 با مقدار ۰/٤٨٥ و کمترین میزان تنوع ژنتیکی در آغازگر PRI-1 با مقدار ۰/۳۰۰ مشاهده شد. بیشترین تعداد آلل مؤثر برای آغازگر PRI-5 با مقدار ۱/۹٤۳ و کمترین تعداد آلل مؤثر برای آغازگرPRI-1 با مقدار ۱/٤٧۹ به‌دست آمد. بیشترین میزان شاخص نشانگری مربوط به آغازگر PRI-6 با مقدار ۸/۳۹ به دست آمد که نشان‌دهنده قدرت تفکیک بالاتر این آغازگر نسبت به سایر آغازگرها است و کمترین شاخص نشانگری در آغازگر PRI-5 با مقدار ۱/٦٥ مشاهده شد. ٤٨ ژنوتیپ مورد مطالعه با استفاده از تجزیه‌ی خوشه‌ای به روش UPGAM و ضریب تشابه ژاکارد در چهار گروه مجزا گروه‌بندی شدند. نتایج حاصل نشان داد نشانگر ISSR سیستم نشانگری قابل‌اطمینان برای آشکارسازی سطح بالایی از چندشکلی است و می‌توان از آن در بررسی تنوع ژنتیکی و انجام برنامه‌های اصلاحی در سویا استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، چندشکلی، سویا، نشانگر ISSR

مقدمه

سویا گیاهی است بانام علمی (*Glycine max*) که دارای ۴۰ کروموزوم است. این گیاه روز کوتاه بوده و در فارسی بانام‌های سوژا، لوبیا روغنی و نخودفرنگی چینی نامیده می‌شود.هدف کلیه‌ی محققان کشاورزی که در ارتباط با گیاهان کار می‌کنند، افزایش تولید محصولات زراعی می‌باشد. به‌طوری‌که بتواند جوابگوی نیاز غذایی بشر باشد. با افزایش سطح زیرکشت محصولات زراعی و راهکارهای به‌نژادی و به‌زراعی محققان کشاورزی توانسته‌اند تا حد زیادی نیاز غذایی انسان را فراهم کنند. حدود ۳۰ درصد افزایش در میزان محصولات زراعی مدیون اصلاح نباتات و استفاده از واریته‌های پر محصول بوده است.ازآنجاکه تنوع مهم‌ترین عامل بقای موجود زنده ازجمله گیاهان زراعی در برابر تغییر شرایط وآفات می‌باشد، تنوع زیستی در کشاورزی مهم‌ترین امر حیاتی برای امنیت غذایی نسل آینده است (۱۳).

نشانگر ISSR ازجمله نشانگرهای نیمه تصادفی می‌باشد که دارای آغازگرهای واجد نوکلئوتیدهای تکراری مانند GT، AC و AG است به همین دلیل MPPCR نیز نامیده می‌شود. استفاده از تکنیک ISSR نیاز به دارا بودن آگاهی قبلی در مورد توالی ژنوم ندارد و الگوهای چندشکلی زیاد وچند مکانی ایجاد می‌کند. هر نوار تولید شده مربوط به قسمتی از توالی DNA می‌باشد که با دو ریز ماهواره‌ی معکوس شده پوشیده شده است. از نشانگر ISSR در انگشت‌نگاری ژنومی، گوناگونی ژنتیکی، آنالیز فیلوژنتیکی، نقشه‌یابی ژنوم، مشخص نمودن فراوانی توالی‌های ریز ماهواره‌ها، بررسی در جمعیت‌های طبیعی و جداسازی گونه‌ها استفاده می‌گردد (۱۶). قبادی و همکاران (۴) روابط فیلوژنتیکی بیست و چهار نژادگان انار ایران را با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR مورد بررسی قرار دادند. در مجموع ۱۷۳ قطعه تکثیر شد که ۶۷ قطعه از آن‌ها دربین نژادگان چند شکل بودند. در دندروگرام به‌دست‌آمده، در ضریب تشابه ۶۵ درصد ارقام در پنج گروه قرار گرفتند که ۱۹ تای آن‌ها یک گروه مستقل را تشکیل دادند. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده به نظر می‌رسد که نشانگر مولکولی ISSR به دلیل تولید تعداد نوار چندشکلی بیشتر و تکرار الگوی باندی ازکارایی بالایی برخوردار است. لوکاس و ایدر (۷) به‌منظور دستیابی تنوع ژنتیکی در میان میوه‌های گرمسیری شیرین با رنگ ارغوانی و زرد از نشانگرهای ISSR استفاده کردندکه تعداد ۴ تا ۲۲ عدد باند چندشکل مختلف در هر آغازگر ایجاد شد. دلیل تفکیک تنوع ژنتیکی در ژرم پلاسم میوه‌های گرمسیری منطقه‌ی جغرافیایی آن‌ها نبوده بلکه استفاده از نشانگر ISSR می‌باشد. آن‌ها گزارش کردند که نشانگر ISSR می‌تواند برای مطالعات تنوع ژنتیکی به‌منظور تهیه‌ی اطلاعات کاربردی برای گزینش پدر و مادری و اصلاح کردن و محافظت‌های استراتژیک مفید باشد. گرادزیلاسکا (۵) شباهت ژنتیکی بین ذخایر هیبریدهای تریتیکاله با استفاده از ۱۴ نشانگر ISSR بررسی کرد و

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-05-17]

گزارش کرد که نشانگر ISSR یک روش قابل‌اعتماد برای شناسایی کروماتین *A. juvenalis* در تریتیکاله و همچنین تخمین شباهت ژنتیکی بین هیبریدها و فرم‌های والدی است. پرابهو و همکاران (۱۴) روابط ژنتیکی ۱۰ ژنوتیپ سویا را با فنون DAF و RFLP مطالعه نمودند و گزارش کردند که هر سه روش مذکور در خصوص برآورد تنوع ژنتیکی از کارایی لازم برخوردارند. لئو و سانگ (۶) تنوع ژنتیکی ۳۷ توده ژرم پلاسم خربزه–طالبی را با استفاده از دو نشانگر ISSR و RAPD بررسی نمودند و گزارش کردند که دو نشانگر یادشده می‌تواند برای بررسی تنوع ژنتیکی این گیاه استفاده شود و از طرف دیگر تحلیل مبتنی بر نتایج به‌دست‌آمده از هر دو نشانگر همبستگی مثبت و معنی‌داری را نشان داد. پاریس و همکاران (۱۲) نشانگر مولکولی AFLP را برای بررسی ارتباط ژنتیکی دامنه وسیعی از خزانه ژنتیکی *Cucurbita pepo* L. استفاده نمودند. نتایج به‌دست‌آمده از آن نشانگرها با همدیگر همبستگی بسیار بالایی نشان داد. ریدی و همکاران (۱۵) گزارش کردند که سنجش معتبر و قابل تکراری برای بررسی تنوع ژنتیکی در بسیاری از گیاهان توسط تکنیک ISSR انجام شد. فایبریکی و همکاران (۳) گزارش کردندکه نشانگر ISSR به‌طور موثری می‌تواند برای مطالعه‌ی تنوع ژنتیکی توده‌های خربزه و طالبی استفاده شود و از میان آغازگرهای استفاده‌شده AC(8G) مناسب‌ترین آغازگر برای مطالعات بعدی تشخیص داده شد. کوتی یارنینگ و همکاران (۱) با مطالعه ۱۶۰ واریته محلی و نوترکیب سویا گزارش کردند که میانگین شاخص تنوع ژنتیکی ۰/۸۳۱ بود و همبستگی مثبتی را با تعداد آلل مؤثر نشان داد. ایدوسا و همکاران (۲) در بررسی نژادهای عدس ایتیوپی گزارش کردند که بیشترین درصد پلی مرفیسم برای آغازگر P 835 با مقدار ۷۵ درصد به دست آمد. تقی‌زاده و همکاران (۱۹) تنوع ژنتیکی ۱۹ توده پسته ایرانی را با ۲۰ آغازگر ISSR بررسی نمودند و مشاهده کردند که تجزیه خوشه‌ای ارقام را در سه گروه اصلی ۲، ۴ و ۱۳ رقمی گروه‌بندی کرد. شاه نجات بوشهری (۱۸) به بررسی تنوع ژنتیکی ۲۱ رقم زراعی سویا با آغازگرهای RAPD و DAF پرداخت و تجزیه‌ی خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها را در ۲ دندروگرام در سه گروه مشخص تقسیم کرد و نشان داد که تشابه بین ارقام بالا بوده و تنوع قابل‌ملاحظه‌ای بین آن‌ها وجود نداشت.

هدف از این تحقیق بررسی تنوع ژنتیکی، ارزیابی چندشکلی و گروه‌بندی ارقام مختلف سویا با استفاده از نشانگر ISSR و معرفی ارقام مناسب جهت والدین تلاقی در برنامه‌های دورگ‌گیری و اصلاحی می‌باشد

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی در ژنوتیپ‌های سویا، ۴۸ ژنوتیپ سویا از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان تهیه شد (جدول ۱).

استخراج و واکنش زنجیره پلی‌مراز (PCR)

۴۸ ژنوتیپ مورد بررسی به‌منظور استخراج DNA در گلدان‌های مناسب کشت شدند. نمونه‌های برگی پس از انتقال به آزمایشگاه ابتدا شسته شده و سپس در معرض نیتروژن مایع به‌سرعت آسیاب شد. جهت بررسی تنوع ژنتیکی در سطح مولکولی، DNA ژنوتیپ‌ها با استفاده از روش CTAB استخراج شد (۱۱). سپس کیفیت DNAی استخراج شده روی ژل آگارز ۱٪ بررسی گردید. از ۱۰ نشانگر ISSR که با علامت اختصاری PRl-1، PRl-2، PRl-3، PRl-4، PRl-5، PRl-6، PRl-7، PRl-8، PRl-9 و PRl-10 نشان داده شدند برای برآورد تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گیاهی استفاده شد. واکنش PCR شامل یک چرخه به مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ چرخه هریک شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و در پایان یک چرخه در دمای ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه با استفاده از دستگاه ترموسایکلر انجام شد. فرآورده‌های PCR روی ژل آگارز ۲ درصد منتقل شده و با استفاده از اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شدند و با دستگاه ژل داک عکس‌برداری از ژل‌ها انجام شد. براساس الگوهای نواری واضح و روشن حاصل از الکتروفورز، نمره دهی به‌صورت حضور باند (۱) و عدم حضور باند (صفر) صورت گرفت. محتوای اطلاعات چندشکلی ۱ که نشان‌دهنده ارزش هر نشانگر برای بیان چندشکلی است توسط رابطه ۱ محاسبه شد (۱۰).

رابطه (۲) $PIC=-\sum fi2$ [1]

در این رابطه fi برابر فراوانی آلل iام است.

گروه‌بندی لاین‌ها با استفاده از روش‌های تجزیه‌یبه مؤلفه‌های اصلی با استفاده از نرم‌افزار past و تجزیه‌ی خوشه‌ای با استفاده روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد انجام گرفت.

1-Polymorphism Information Content

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-05-17]

جدول ۱- اسامی ارقام مورد استفاده در این تحقیق

Table 1. Names of cultivars used in this study

اسامی قابل استفاده	نام شجره					شماره تیمار
	توضیحات نام لاین نام تجاری والد پدری والد مادری					
Williams	رقم تجاری استان‌های گلستان، لرستان و منطقه مغان		Williams			۱
سحر	رقم تجارتی استان گلستان حاصل لاین وارداتی با نام Pershing		سحر			۲
گرگان ۳	رقم تجارتی استان گلستان حاصل انتخاب بوته در لاین وارداتی		گرگان ۳			۳
کتول	رقم تجارتی استان گلستان حاصل لاین وارداتی با نام DP3589		کتول			۴
DW	لاین خالص برنامه به نژادی گرگان (ابراهیم هزارجریبی)			Williams	Davis	۵
HT	لاین خالص برنامه به نژادی گرگان (ابراهیم هزارجریبی)			TN4.54	Hobbit	۶
PE	لاین خالص برنامه به نژادی گرگان (ابراهیم هزارجریبی)			Epps	Pershing	۷
سامان	رقم تجاری استان گلستان حاصل برنامه به نژادی گرگان (ابراهیم هزارجریبی)		سامان	Essex	Williams	۸
تلار	رقم تجاری استان مازندران حاصل انتخاب بوته در رقم سحر (غلامحسین عرب)		تلار			۹
ساری	رقم تجاری استان مازندران حاصل انتخاب بوته در رقم KW505 (غلامحسین عرب)		ساری			۱۰
نکادر	رقم تجاری استان مازندران حاصل برنامه به نژادی ساری (غلامحسین عرب)		نکادر	گرگان ۳	تلار	۱۱
کاسپین	رقم تجاری استان مازندران حاصل برنامه به نژادی ساری (غلامحسین عرب)		کاسپین	هیل	تلار	۱۲
سالند	رقم معرفی‌شده حاصل برنامه به نژادی دزفول (غلامرضا قدرتی)	L 14	سالند	Duglas	صفی آبادی	۱۳
M 7	رقم تجاری استان لرستان (لاین موتانت از رقم کلارک)	M 7				۱۴
M 9	رقم تجاری استان لرستان (لاین موتانت از رقم کلارک)	M 9				۱۵
L 17	رقم تجاری منطقه مغان	L 17				۱۶
D42.I9	لاین خالص برنامه به نژادی گرگان (هزارجریبی)	D42.I9		Iropouis	Delsoy4210	۱۷
D42.Will82	لاین خالص برنامه به نژادی گرگان (هزارجریبی)	D42.Will82-3		Williams82	Delsoy4210	۱۸
HMS31	لاین موتانت از رقم سپیده برنامه به نژادی گرگان (هزارجریبی)	HMS31				۱۹
Linford	کلکسیون		Linford			۲۰
Clean	کلکسیون		Clean			۲۱
FE	لاین خالص برنامه به نژادی گرگان (ابراهیم هزارجریبی)			Epps	For a	۲۲
PC4	لاین خالص برنامه به نژادی گرگان (ابراهیم هزارجریبی)	PC4		Collombus	Pershing	۲۳
Black WE	لاین خالص برنامه به نژادی گرگان (ابراهیم هزارجریبی)			Epps	ویلیامز دانه سیاه	۲۴
KF	لاین خالص برنامه به نژادی گرگان (ابراهیم هزارجریبی)			For a	کتول	۲۵
KK10	لاین خالص برنامه به نژادی گرگان (ابراهیم هزارجریبی)	KK10		Krasnodar778	کتول	۲۶
KS5	لاین خالص برنامه به نژادی گرگان (ابراهیم هزارجریبی)	KS5		سپیده	کتول	۲۷

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-05-17]

ادامه‌ی جدول ۱

Continue Table 1

شماره تیمار	نام شجره				
	نام لاین نام تجاری والد پدری والد مادری			توضیحات	اسامی قابل استفاده
۲۸	Pershing	کتول	H3051	لاین خالص برنامه به نژادی گرگان (ابراهیم هزارجریبی)	H3051
۲۹	Pershing	کتول	H3058	لاین خالص برنامه به نژادی گرگان (ابراهیم هزارجریبی)	H3058
۳۰	Williams	کتول	H3123	لاین خالص برنامه به نژادی گرگان (ابراهیم هزارجریبی)	H3123
۳۱	Hamilton	کتول	H3137	لاین خالص برنامه به نژادی گرگان (ابراهیم هزارجریبی)	H3137
۳۲	Hamilton	کتول	H3145	لاین خالص برنامه به نژادی گرگان (ابراهیم هزارجریبی)	H3145
۳۳	Krasnodar778	کتول	H3155	لاین خالص برنامه به نژادی گرگان (ابراهیم هزارجریبی)	H3155
۳۴	کتول	Rend	KR3	لاین خالص برنامه به نژادی گرگان (ابراهیم هزارجریبی)	KR3
۳۵	کتول	Yougetsu	Ky3	لاین خالص برنامه به نژادی گرگان (ابراهیم هزارجریبی)	Ky3
۳۶	کتول	Kottman	KK1	لاین خالص برنامه به نژادی گرگان (ابراهیم هزارجریبی)	KK1
۳۷	کتول	Nemaha	KN3	لاین خالص برنامه به نژادی گرگان (ابراهیم هزارجریبی)	KN3
۳۸	کتول	Darby	KD1	لاین خالص برنامه به نژادی گرگان (ابراهیم هزارجریبی)	KD1
۳۹	کتول	Darby	KD2	لاین خالص برنامه به نژادی گرگان (ابراهیم هزارجریبی)	KD2
۴۰	Williams	کتول	WK3	لاین خالص برنامه به نژادی گرگان (ابراهیم هزارجریبی)	WK3
۴۱	Williams	کتول	WK9	لاین خالص برنامه به نژادی گرگان (ابراهیم هزارجریبی)	WK9
۴۲	کتول	Hamilton	KH3	لاین خالص برنامه به نژادی گرگان (ابراهیم هزارجریبی)	KH3
۴۳	Hamilton	کتول	HK1	لاین خالص برنامه به نژادی گرگان (ابراهیم هزارجریبی)	HK1
۴۴	Omaha	Pershing	OP3	لاین خالص برنامه به نژادی گرگان (ابراهیم هزارجریبی)	OP3
۴۵	Accomac	Yougetsu	AY3	لاین خالص برنامه به نژادی گرگان (ابراهیم هزارجریبی)	AY3
۴۶	Accomac	Nemaha	AN3	لاین خالص برنامه به نژادی گرگان (ابراهیم هزارجریبی)	AN3
۴۷	Hamilton	Nemaha	HN6	لاین خالص برنامه به نژادی گرگان (ابراهیم هزارجریبی)	HN6
۴۸	لاین نیجریه	سپیده	NS3	لاین خالص برنامه به نژادی گرگان (ابراهیم هزارجریبی)	NS3

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-05-17]

نتایج و بحث

تنوع ژنتیکی ارقام موردمطالعه سویا با استفاده از ۱۰ آغازگر ISSR نشان داد که از میان همه آغازگرهای مورد بررسی ۷ آغازگر چند شکلی مناسبی را داشتند. آغازگرهای استفاده شده برای آنالیز تنوع ژنتیکی ارقام مختلف سویا در مجموع توانستند ۶۸ مکان را شناسایی کنند که ۳۴ مکان از آن‌ها چندشکلی را نشان دادند. بیشترین تعداد مکان مربوط به آغازگر PRI-4 با ۵ مکان و کمترین تعداد مکان مربوط به آغازگر PRI-5 با ۲ مکان به دست آمد. بیشترین و کمترین درصد چندشکلی به ترتیب به آغازگر PRI-2 با ۶۶/۶۶ درصد و آغازگر PRI-5 با ۲۸/۵۷ درصد تعلق داشت (جدول ۲). مقدار متوسط درصد چندشکلی به‌دست آمده برای نشانگرهای مورد استفاده ۵۰/۵۲ درصد محاسبه گردید (جدول ۲). متوسط تعداد باندهای چند شکل تولیدشده توسط هر آغازگر و متوسط تعداد کل باندها در ۴۸ ژنوتیپ سویا ۴/۸۵ و ۹/۷۱ به دست آمد (جدول ۲).

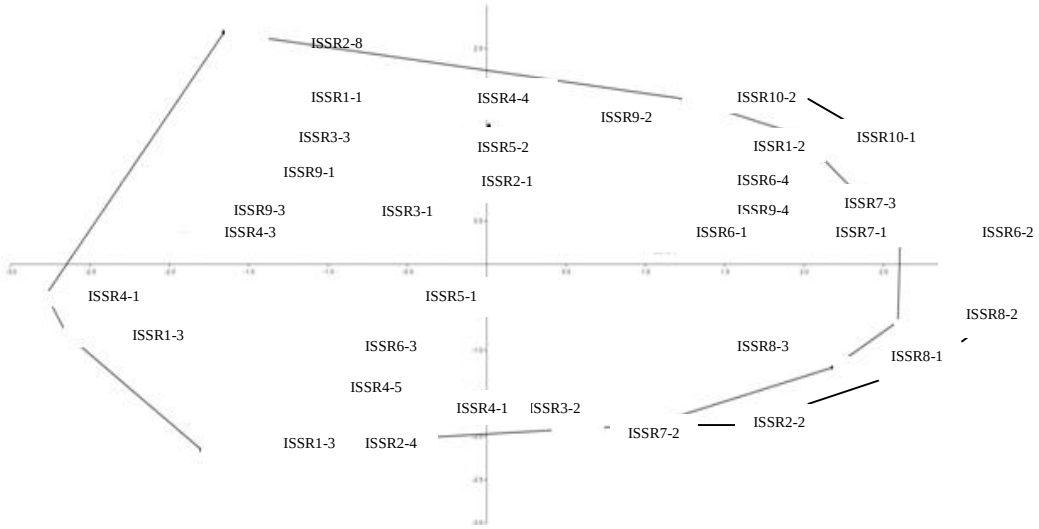
جدول ۲- نتایج حاصل از بررسی ۴۸ ژنوتیپ سویا با استفاده از نشانگر ISSR

Table 2. The results of 48 soybean genotypes using ISSR marker

نام آغازگر	توالی آغازگر	دمای اتصال آغازگر	تعداد کل باندها	تعداد باندهای چندشکلی	درصد چندشکلی	شاخص نشانگری (MI)	محتوای اطلاعات ژنتیکی (Pic)	شاخص شانون (I)	تنوع ژنتیکی (H)	تعداد آلل مؤثر (ne)
PRI-1	$(CAG)_5$	۵۴	۶	۳	۵۰	۳/۸	۰/۰۷۶	۰/۴۶۷	۰/۳۰۰	۱/۴۷۹
PRI-2	$(GAAT)_4$	۴۲	۶	۴	۶۶/۶۶	۶/۳۳	۰/۰۹۵	۰/۶۵۸	۰/۴۶۶	۱/۸۷۹
PRI-3	$(CCTA)_4$	۴۷	۶	۳	۵۰	۳/۸	۰/۰۷۶	۰/۶۶۶	۰/۴۷۳	۱/۹۰۴
PRI-4	$(CT)_8T$	۴۲	۱۰	۵	۵۰	۴/۷۵	۰/۰۹۵	۰/۶۲۹	۰/۴۳۸	۱/۷۹۶
PRI-5	$(CCA)_5$	۵۴	۷	۲	۲۸/۵۷	۱/۶۵	۰/۰۵۸	۰/۶۷۸	۰/۴۸۵	۱/۹۴۳
PRI-6	$(ATG)_5$	۴۲	۷	۴	۵۷/۱۴	۸/۳۹	۰/۱۴۷	۰/۶۰۰	۰/۴۱۴	۱/۷۵۰
PRI-7	$(CAA)_5$	۴۷	۵	۳	۶۰	۶/۷۲	۰/۱۱۲	۰/۵۳۴	۰/۳۵۳	۱/۵۷۹
PRI-8	$(CT)_8A$	۴۲	۷	۳	۴۲/۸۵	۲/۹۹	۰/۰۷	۰/۵۸۵	۰/۳۹۷	۱/۶۷۵
PRI-9	$(ACTG)_4$	۴۶	۸	۴	۵۰	۴/۷۵	۰/۰۹۵	۰/۶۲۸	۰/۴۳۸	۱/۸۰۳
PRI-1	$(GT)_6CC$	۴۲	۶	۳	۵۰	۴/۷۵	۰/۰۹۵	۰/۶۵۰	۰/۴۵۸	۱/۸۴۸
میانگین			۹/۷۱	۴/۸۵	۵۰/۵۲					

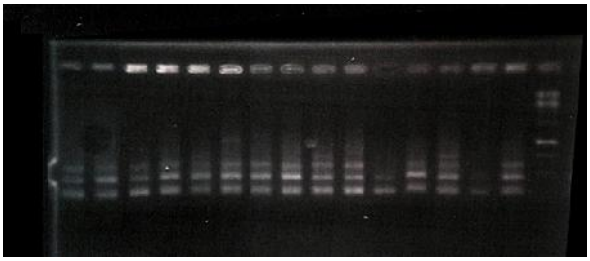
بیشترین محتوای اطلاعات ژنتیکی مربوط به آغازگر PRI-6 با مقدار ۰/۱۴۷ و کمترین محتوای اطلاعات ژنتیکی مربوط به آغازگر PRI-5 با مقدار ۰/۰۵۸ بود. آغازگر PRI-5 بیشترین میزان شاخص شانون را با مقدار ۰/۶۷۸ و آغازگر PRI-1 کمترین میزان شاخص شانون را با مقدار ۰/۴۶۷ نشان دادند. بیشترین میزان تنوع ژنتیکی در آغازگر PRI-5 با مقدار ۰/۴۸۵ و کمترین میزان تنوع ژنتیکی در آغازگر PRI-1 با مقدار ۰/۳۰۰ مشاهده شد. بیشترین تعداد آلل مؤثر برای آغازگر PRI-5 با مقدار ۱/۹۴۳ و کمترین تعداد آلل مؤثر برای آغازگر PRI-1 با مقدار ۱/۴۷۹ به دست آمد. بیشترین میزان شاخص نشانگری در آغازگر PRI-6 با مقدار ۸/۳۹ مشاهده شد که نشان‌دهنده قدرت تفکیک بالاتر این آغازگر نسبت به سایر آغازگرها است و کمترین شاخص نشانگری مربوط به آغازگر PRI-5با مقدار ۱/۶۵ بود (جدول ۲). کوتی یارنونگ و همکاران (۱) با مطالعه ۱۶۰ واریته محلی و نوترکیب سویا گزارش کردند که میانگین شاخص تنوع ژنتیکی ۰/۸۳۱ بود و همبستگی مثبتی را با تعداد آلل مؤثر نشان داد و این نتیجه با نتیجه‌گیری ما مطابقت داشت. ادوسا و همکاران (۲) در بررسی نژادهای عدس ایتیوپی گزارش کردند که بیشترین درصد پلی‌مرفیسم برای آغازگر P 835 به مقدار ۷۵ درصد به دست آمد. محجوب و همکاران (۸) با مطالعه ۳۶ ژنوتیپ کلزا گزارش کردند که بیشترین مقدار PIC ۰/۴ و مربوط به آغازگر ISSR16 و میانگین PIC در این تحقیق ۰/۳۴ به دست آمد. پاریس و همکاران (۱۲) میزان چندشکلی بالایی را (۷۴ درصد) با نشانگر ISSR بین ژنوتیپ‌های مختلف کدو مشاهده کردند. مهدیخانی و همکاران (۹) در بررسی توده‌های بابونه گزارش کردندکه در مجموع درصد چند شکلی ۵۸/۰۹ درصد براورده شد که برای آغازگرهای تصادفی ۸۱/۰۳ و برای اغازگرهای نیمه تصادفی ۸۸/۷۲ بود. همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده شد نشانگرهای PRI-10، PRI-6، PRI-8، PRI-2، PRI-7، PRI-1 و PRI-4 جزء نشانگرهای بحرانی و تأثیرگذار هستند و نقش بسزایی در گروه‌بندی نشانگرها داشتند. گروه‌بندی نشانگرها با تجزیه کلاستر بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد و برش دندروگرام در فاصله ۱۰ نشانگرها را در ۴ گروه قرار داد و بیشترین تعداد نشانگرها در گروه چهارم قرار گرفتند.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-05-17]



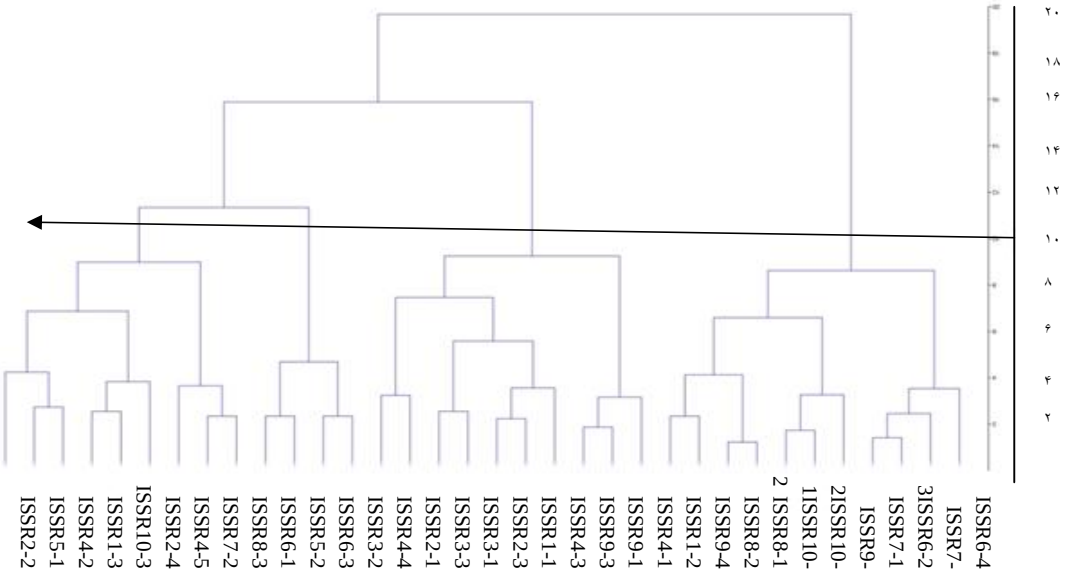
شکل ۱- تعیین آلل‌های تکثیر یافته تأثیرگذار و بحرانی با استفاده از تجزیه به مؤلفه‌های اصلی با نشانگرهای ISSR

Figure 1. Determine the impact and critical amplified alleles using principal components analysis with markers ISSR



شکل ۲- نمونه ژل ISSR با آغازگر PRl-5

Figure 2. Sample ISSR primer gel PRl-5



شکل ۳- گروه‌بندی آلل‌های تکثیر یافته در نشانگرهای ISSR با استفاده از نرم‌افزار past

Figure 3.grouping alleles amplified ISSR markers, using past

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-05-17]

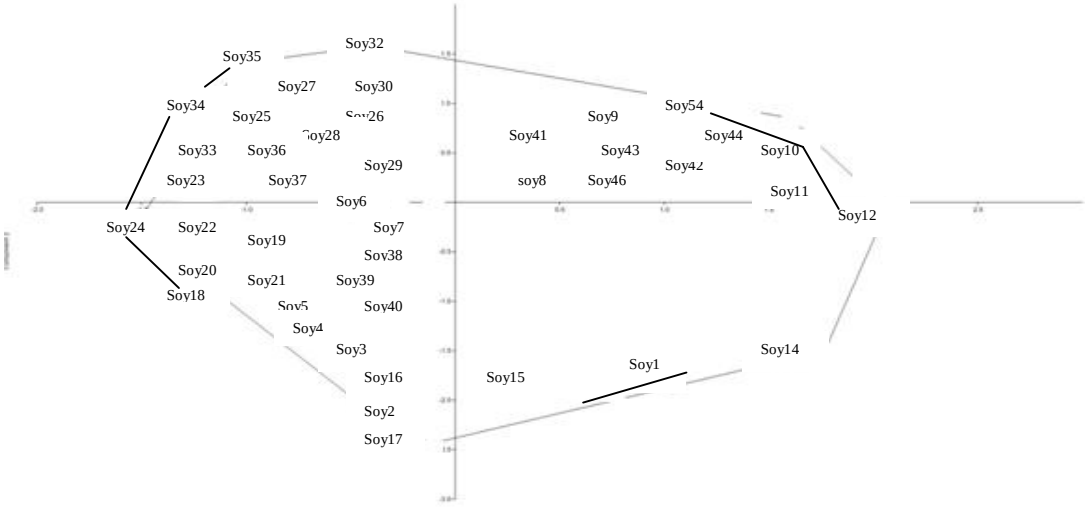
نتایج حاصل از تجزیه به مختصات اصلی PCOA در جدول ۳ آورده شد و نشان داد که ۵ مؤلفه‌ی اول توانستند ۶۶/۳۹ درصد از تغییرات را توجیه نمایند. مؤلفه‌ی اول ۲۳/۱۴ درصد و مؤلفه‌ی دوم ۱۴/۳ درصد از تغییرات را توجیه نمودند.

جدول ۳- مقادیر ویژه، نسبت واریانس تجمعی عامل‌های استخراج شده

Table 3. Significant amounts of operating the cumulative variance extracted

PC	مقدار ویژه	درصد واریانس
۱	۲/۷۱	۲۳/۱۴
۲	۱/۶۷	۱۴/۳۰
۳	۱/۱۹	۱۰/۱۸
۴	۱/۱۸	۱۰/۰۹
۵	۱/۰۱	۸/۶۸

تجزیه‌ی بای پلات با استفاده از نتایج PCOA نشان داد که ژنوتیپ‌های سالند، D42.19، D42.Will82، Blak WE، H3145، KR3، Ky3، AY3 و M7 جزء ژنوتیپ‌های بحرانی بودند و در گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها نقش مهمی را ایفا کردند (شکل ۴).



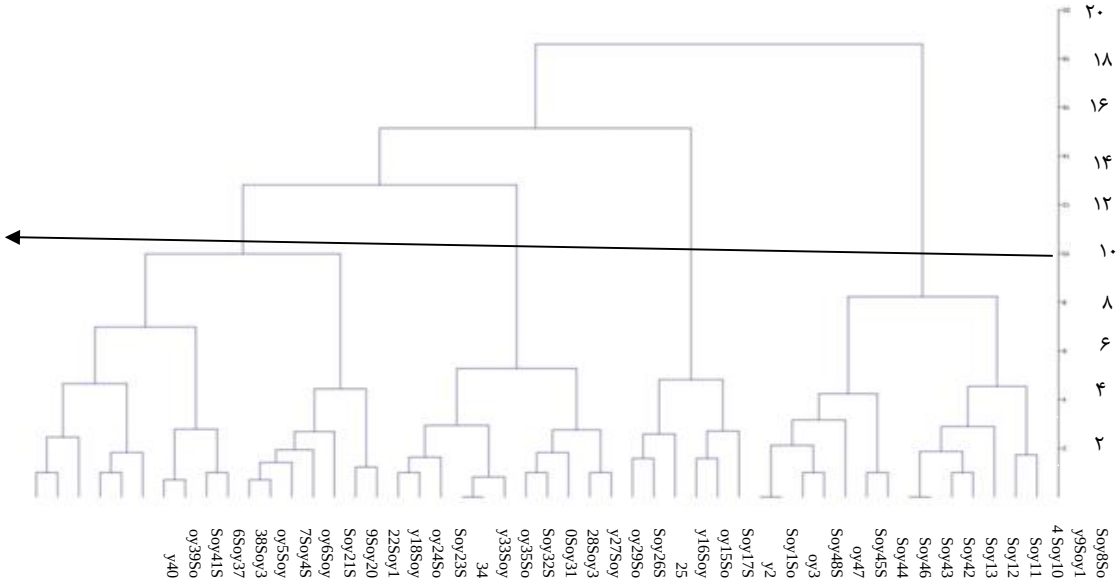
شکل ۴- تعیین ژنوتیپ‌های بحرانی با استفاده از تجزیه به مولفه‌های اصلی

Figure 4. Critical genotyped using principal components analysis

گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با تجزیه کلاستر بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد و برش دندروگرام در فاصله ۱۰ ژنوتیپ‌ها را به چهار گروه تقسیم کرد (شکل ۵). در گروه یک ژنوتیپ‌های CleanT، Linford، HMS31، FE، D42.Will82، PC4، Blak WE، DW، HT، PE، کتول، kkl، KN3، kDl، KD2، WK3 و WK9 قرار گرفتند. ژنوتیپ‌های موجود در گروه یک اغلب حاصل برنامه‌ی به‌نژادی گرگان هستند و والد مشترک در ژنوتیپ‌های این گروه کتول و williams و Darby بود. در گروه دوم Kf، kk10، KSS، H3051، H3058، H3123، H3137، H3145، H3155، KR3 و Ky3 قرار گرفتند که در این گروه والد مشترک در اکثر ژنوتیپ‌ها کتول و pershing می‌باشد. در گروه سوم ژنوتیپ‌های سحر، گرگان ۳، Williams، M9، L17 و D42.19 بوده و ژنوتیپ‌های گروه سوم بیشتر حاصل برنامه‌ی به‌نژادی گلستان و لرستان می‌باشند و در گروه چهارم ژنوتیپ‌های سامان، تلار، ساری، نکادر، کاسپین، سالند، Kh3، HKl، OP3، AY3، AN3، HN6، M7 و NS3 قرار گرفتند و والد مشترک تلار و Accoma در اکثر ژنوتیپ‌ها وجود داشت و اغلب حاصل برنامه‌ی به‌نژادی ساری و گرگان بودند. در گروه اول ژنوتیپ‌های CleanT، Linford، HMS31، FE و D42.Will82در یک گروه قرار گرفتند و ارقام PC4 و Blak WE در یک گروه مجزا واقع شدند. اما این ژنوتیپ‌ها در گروه‌بندی بر اساس صفات مرفولوژیک در سه گروه مجزا قرار داشتند. در گروه سوم هیچ‌کدام از ژنوتیپ‌ها والد مشترک نداشتند و از نظر مرفولوژیکی شبیه نبودند اما در یک گروه قرار گرفتند. از آن‌جایی‌که نشانگرهای ISSR جزء نشانگرهای نیمه تصادفی هستند بنابراین قرارگیری ژنوتیپ‌های متفاوت از

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-05-17]

نظر ظاهری شاید به دلیل تکثیر مناطق غیر رمزکننده توسط آغازگرهای مورد استفاده در این بررسی باشد. البته تأثیر عوامل محیطی در بروز صفات ریخت‌شناسی را نباید فراموش کرد (۱۷). بیشترین تعداد ژنو تیپ‌ها در گروه یک جای گرفتند. در گروه دوم ژنوتیپ‌های H3137 و H3145 بیشترین شباهت ژنتیکی را داشتند این دو ژنو تیپ دارای والدین مشترکی بودند و جزء لاین‌های به‌نژادی گرگان هستند. در گروه چهارم ژنوتیپ‌های HN6 وNS3 و ژنوتیپ‌های کاسپین و سالند بیشترین شباهت ژنتیکی را داشتند. کمترین شباهت ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های گروه یک و چهار مشاهده شد و این موضوع نشان‌دهنده اختلاف ژنتیکی زیاد بین دو گروه‌هاست لذا می‌توان از آن‌ها در صورت داشتن صفات مطلوب به‌عنوان والد در برنامه‌های اصلاحی و دورگ‌گیری برای به‌دست آوردن حداکثر هتروزیس استفاده نمود. در گروه دوم در تمام ژنوتیپ‌ها والد مشترک کتول وجود داشت. در گروه چهارم ژنوتیپ‌هایی قرار گرفتند که والد مشترک در بین آن‌هامشاهده شد. تقی‌زاده و همکاران (۱۹) تنوع ژنتیکی ۱۹ توده پسته ایرانی را با ۲۰ آغازگر ISSR بررسی نمودند و مشاهده کردند که تجزیه خوشه‌ای ارقام را در سه گروه اصلی ۲، ۴ و ۱۳ رقمی گروه‌بندی کرد. شاه نجات بوشهری (۱۸) به بررسی تنوع ژنتیکی ۲۱ رقم زراعی سویا با آغازگرهای RAPD و DAF پرداخت و تجزیه‌ی خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها را در ۲ دندروگرام در سه گروه مشخص تقسیم کرد و نشان داد که تشابه بین ارقام بالا بوده و تنوع قابل‌ملاحظه‌ای بین آن‌ها وجود نداشت.



شکل ۵- گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد بررسی بر اساس نشانگرهای ISSR بر اساس UPGMA و ضریب تشابه جاکارد
Fig 5. The classification of genotypes based on ISSR markers by UPGMA and Jaccard coefficient

نتایج این تحقیق نشان داد که بالا بودن میزان چند شکلی به‌دست‌آمده نشان‌دهنده کارایی مناسب نشانگر ISSR در مطالعه تنوع ژنتیکی ارقام مختلف سویا می‌باشد و می‌توان از آن به‌عنوان ابزار مفیدی در بررسی تنوع ژنتیکی و انجام برنامه‌های اصلاحی در گیاهان استفاده نمود از طرفی تطابق داده‌های ریخت‌شناسی و مولکولی نشان داد تشابه چندانی بین این دو گروه‌بندی وجود ندارد. در توجیه این مطلب می‌توان به ارتباط میان نشانگر ISSR با نواحی رمزکننده و غیررمزکننده ژنوم اشاره کرد درصورتی‌که صفات مرفولوژیکی فقط به نواحی رمزکننده مرتبط می‌باشند و نیز تحت تأثیر محیط هستند.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از مرکز تحقیقات سویای استان گلستان به دلیل همکاری‌های لازم جهت انجام این پروژه و همچنین از همکاری صمیمانه خانم‌ها مهندس مهناز کاتوزی و کعبه ممی زاده، سپاس‌گزاری می‌گردد.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-05-17]

منابع

1. Chotiyarnwong, O., P. Chotiyarnwong, S. Chanprame and P. Srinives. 2007. Evaluation of genetic diversity in thai indigenous and recommended soybean varieties by SSR marker. Thai Journal of Agricultural Science, 40: 119-126.
2. Edossa, F., T. kassahun and B. Shaw. 2007. Gnetic diversity and population structure of Ethiopian lentil (Lens Culinaris medikus) landraces as revealed by ISSR marker. African Journal of Biotechnology, 6: 1460-1468.
3. Fabriki Ourang, S., M. Shams Bakhsh, M. Jalali Javara and J. Ahmadi. 2009. Analysis of genetic diversity of Iranian Melons (Cucumis melo L.) using ISSR markers. Iranian Journal of Biology, 22: 57-68.
4. Ghobade, S., M. Khoshkhoe and S.B.A. Tabatabaie. 2005. Phylogenetic relationships among some Iranian pomegranate accessions revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) marker. Journal of Horticultural Science and Technology Iranian, 6: 111-120.
5. Gradzielewska, A. 2012. Identification of hybrids between triticale and aegilops juvenalis (Thell) eig and determination of Jeuetic similwity with ISSR. Genetic Mol Res, 11: 2147-2155.
6. Liu, B. and M. Song. 2002. Assessment of genetic diversity in melon germplasm based on RAPD and ISSR. Journal of Biotechnology Agricultural, 10: 231-236.
7. Lucas, F.D. and S.D. Eder. 2011. ISSR markers as tool for the assessment of genetic diversity in passiflora Biochemical Genetic, 49: 540-554.
8. Mahjoob, B., H. Najafi-Zarini and S.H.R. Hashemi. 2014. Assessment of genetic relationship among 36 Brassica genotypes using ISSR molecular markers. Journal of Crop Breeding, 6: 96-106.
9. Mehdikhani, H., M. Solouki and H. Zeinali. 2013. Studi of genetic diversity in chamomile landraces (Matricaria aurea(coefl.) Sch. Bip) using random and semi- random primers Journal of Crop Breeding, 5: 69-82.
10. Mohammadi, A. 2006. Molecular analysis from viewpoint investigates of genetic variation, The 9th Iranian crop sciences congress.
11. Murray, M.G. and W. F. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucl. Acid Res, 8: 4321-4335.
12. Paris, H.S., N. Yonash, V. Portony, N. Mozes-Daube, G. Tzuri and N. Katzir. 2003. Assesment of genetic Relationship in Cucurbita pepo using DNA markers. Theor. Apple Genet, 106: 971-978.
13. Pharsi, A. and A. Bagheri. 2009. Principles of Plant Breeding. Mashhad Jahad Daneshgahi press, 368 pp.
14. Prabhu, R.R., D. Webb, H. Jessen, S.L. Smith and P.M. Gresshoff. 1997. Genetic relatedness of soybean genotypes using DNA amplification fingerprinting (DAF), RFLP, and pedigree. Crop Science, 37: 1590-1595.
15. Reddy, M.P., N. Sarla and E.A. Siddiq. 2000. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its Application in plant breeding. Euphytica, 128: 9-17.
16. Reddy, M.P., N. Sarla and E.A. Siddiq. 2002. Inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding Euphytica, 128: 9-12.
17. Roldan-Ruiz, F.A., T.J. Gilliland, P. Dubreuil, C. Dillmann and J. Lallemand. 2001. A comparative study of molecular and morphological methods of describing relationships between perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) varieties. Theor. Appl. Genet, 103:1138-1150.
18. Shahnejat boshehre, A.A. 2003. Genetic diversity in Soybean as determined by RAPD and DAF markers Iranian Journaof Agricultural Sciencesl, 34: 625-633.
19. Taghezadeh, A., G. Ahmadi, R. Hadad and M. Zarabi. 2012. Studyof genetic diversity among Iranian pistachios using a micro- satellitemarkersISSR. Journal of Horticultural Science (Agricultural Sciences and Technology), 25: 453-460.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-05-17]

Study of Genetic Diversity of Soybean (Glycine max) using ISSR Markers

Zahra Malekmohamadi[1], Hosein Sabori[2], Abbas Biabani[3] and Ebrahim Hezarjaribi[4]

1 and 3- M.Sc. Student Associate Professor, Gonbad Kavous Agriculture Sciences and Natural Resource University
2- Associate Professor, University of Gonbad Kavous Agriculture Sciences and Natural Resource University
(Corresponding author: saboriho@yahoo.com)
4- Academic Member, Golestan Agriculture Research Center
Received: November 7, 2014 Accepted: April 21, 2015

Abstract

Recogniting the genetic diversity and classification of inheritancepools is one of important activities in the field of breeding and maintaining genetic resources in plants. In order to assess the genetic diversity in 48 genotypes of soybean amplification of gene loci was performed by using 10 ISSR primers In Genetics and Plant Breeding laboratory, College of Agriculture andNatural Resources, University of gonbad Kavos.Among 68 amplifed fragment of caltivars were generated, 34 fragments were ploymorphic.The number of polymorphic bands per primer varied from 2 to 5 and the most of polymorphic bands was related to PRI-4. Pic values varied between 0.147 to 0.058 and the marker indexwasbetween 8.39 to 1.56, for primers. The highest and lowest percentage of polymorphic belonged to primer PRI-2 (66.66) and primer PRI-5 (28.57). Primer PRI-5 showed the maximum value of Shanon index (0.678) and primer PRI-1 had the lowest Shanon index with a value of 0.467. The greatest amount of genetic variation was observed in primer PRI-5 with value of 0.485 and the lowest genetic diversity in primer PRI-1 with value 0.3. The highest number of effective alleles obtained for primer PRI-5 with a value of 1.943 and a minimal number of effective allels for primer PRI-1 with a value of 1.479. Maximum level ofmarker index obtained forprimer PRI-6 with value of 8.39 which indicating a higher resolution of this primer than the otherand the lowest was observed in primer PRI-5 with a value of 1.65. Culaster analysis method UPGAM and jacards similarity coefficient grouped 48 genotypes in four separate groups.The result showed ISSR marker is amarker system for detecion of high levels of polymorphism and can be usedto investigation genetic diversity and breeding program in soybean.

Keywords: Genetic diversity, ISSR marker, Polymorphism, Soybean

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2025-05-17]