



## "مقاله پژوهشی"

### بررسی تنوع آلتی در لاین‌های اصلاحی سویا (*Glycin max*, L) با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره (SSR)

#### حمیدرضا بابائی

استادیار پژوهش بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی ساری، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، برای بهترین دکتران همراه با مشکلاتی خواهد بود. بدین سبب استفاده از نشانگرهای مولکول به عنوان روش مکمل در کنار خصوصیات زراعی جهت تشخیص و گزینش لاین‌های برتر اصلاحی سودمند خواهد بود. این تحقیق با هدف بررسی تفاوت‌های ژنتیکی لاین‌های پیشرفت اصلاحی سویا جهت گزینش لاین‌های مطلوب و حذف لاین‌های تکراری انجام گردید.

#### چکیده مبسوط

**مقدمه و هدف:** به دلیل محدودیت صفات مورفو‌لوزیکی متمایز‌کننده غیر وابسته به محیط و اشکال تظاهر آنها، تشخیص و گزینش در بین لاین‌های مشابه برای بهترین دکتران همراه با مشکلاتی خواهد بود. بدین سبب استفاده از نشانگرهای مولکول به عنوان روش مکمل در کنار خصوصیات زراعی جهت تشخیص و گزینش لاین‌های برتر اصلاحی سودمند خواهد بود. این تحقیق با هدف بررسی تفاوت‌های ژنتیکی لاین‌های پیشرفت اصلاحی سویا جهت گزینش لاین‌های مطلوب و حذف لاین‌های تکراری انجام گردید.

**مواد و روش‌ها:** در سال ۱۳۹۲ در کرج ۶۴ لاین نسل F7 سویا در گلخانه کشت و در زمان مناسب نمونه‌های برگی از گیاه‌جه لاین‌ها برداشت و DNA نمونه‌ها استخراج شد. محاول DNA حاصل پس از تعیین کمیت و کیفیت و نهیه غلاظت نسبت برای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) توسط ۲۰ نشانگر ریزماهواره مورد استفاده گرفت. پس از تعیین ژنوتیپ لاین‌ها بوسیله نشانگرهای چند شکل، امتیازدهی باندهای ژنتیکی، تجزیه آماری با استفاده از داده‌های ژنتیکی برای برآورد شاخص‌های تنوع ژنتیکی شامل تعداد آلل مشاهده شده و موثر، درصد هتروزیگوستی و هموزیگوستی، محتوی اطلاعات چندشکل و شاخص شانون انجام گرفت. همچنین برای گروه‌بندی لاین‌های مورد بررسی از تجزیه خوش‌های به روش انتقال همسایگی و ضربی تشابه تطبیق ساده و از تجزیه به مختصات اصلی برای بررسی صحت نتایج تجزیه خوش‌های مورد استفاده قرار گرفت.

**یافته‌ها:** بر اساس نتایج حاصل از ۲۰ نشانگر ریزماهواره مورد استفاده جهت تعیین تنوع ژنتیکی، ۱۴ نشانگر چند شکل نشان دادند. در مجموع ۴۱ آلل برای مکان‌های ژئی شناسایی شد که میانگین تعداد آلل‌های مشاهده شده برای هر جایگاه ۲/۹۳ و میانگین تعداد آلل‌های موثر ۲/۳۶ بود. دامنه شاخص شانون (I) از ۰/۲۹ تا ۰/۵۶ و دامنه حوتی اطلاعات چندشکل (PIC) از ۰/۷۸ تا ۰/۱۶. تغییر بودند. بر اساس شاخص‌های تنوع ژنتیکی اندازه‌گیری شده، نشانگرهای Sat\_218 و Sat\_117 قدرت تمايز بالاتری داشتند. تجزیه خوش‌های لاین‌های اصلاحی را در چهار گروه و هشت زیر گروه قرار داد. سه مولفه نخستین تجزیه به مختصات اصلی در مجموع ۳۶٪ درصد از واریانس کل تغییرات را توجیه نمودند. نمودار سه بعدی لاین‌های اصلاحی را در چهار گروه قرار داد که تطابق نسبتاً خوبی با گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوش‌های داشت.

**نتیجه‌گیری:** به طور کلی نتایج تحقیق حاضر نشان داد که نشانگرهای مورد استفاده دارای چندشکل قابل قبولی بودند و نشانگرهای Sat\_218 و Sat\_117 از قدرت تمايز بالاتری بین ژنوتیپ‌ها و تعیین تنوع آللی برخوردار بودند. بنابرین نشانگرهای مولکولی از کارائی لازم برای ارزیابی و گزینش لاین‌های اصلاحی برتر در نسل‌های پیشرفتی برخوردار بودند.

**واژه‌های کلیدی:** تجزیه خوش‌های و تجزیه به مختصات اصلی، تعداد آلل موثر، شاخص شانون (I)، شاخص محتوی اطلاعات چندشکل (PIC)

**مقدمه**  
برخورداری از تنوع آلتی و چندشکلی بالا و نیز مشخص بودن محل کروموزومی آنها به لحاظ کاربردی بسیار سودمند خواهد بود (۲۲). نشانگرهای ریزماهواره (SSR) در زمینه تجزیه ژنومیک و ژنتیکی، تنوع ژنتیکی، ثبت ارقام، برآورد خلوص بذر، حفاظت ژرم‌پلاسم، بررسی ارتباطات خویشاوندی در جمعیت‌های گیاهی، نقشه‌یابی صفات کمی، اصلاح نباتات مولکولی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۲۱). یک بررسی بر روی برنج نشان داد که نشانگرهای ریزماهواره بوسیله مناسبی برای پیش‌بینی عملکرد هیریدها هستند (۱۵). در ذرت از نشانگرهای SSR برای گروه‌بندی ژرم‌پلاسم و بدست آوردن والدین دور از هم در اصلاح هتروزیس و تشخیص گروه‌های هتروتیک استفاده شده است. در این خصوص همبستگی بالائی میان فاصله ژنتیکی برآورد شده توسط نشانگرهای SSR و هتروزیس عملکرد در ذرت گزارش شده است (۲۴، ۱۸). لی و همکاران (۱۶) در بررسی تنوع ژنتیکی یک جمعیت گیاهی با ۱۵۹ ژنوتیپ سویا توسط ۵۵ نشانگر ریزماهواره از نواحی مختلف ژنوم و مطالعه ارتباط نشانگرهای با خصوصیات مورفو‌لوزیکی گزارش نمودند که متوسط محتوی اطلاعات چندشکلی (PIC)<sup>۱</sup> نشانگرها ۰/۸، تعداد کل آلل ۷۸۱ با متوسط ۹/۴ آلل برای هر نشانگر بود که نشان دهنده

**مقدمه**  
سویا (*Glycine max* (L.) Merr.) به دلیل برخورداری از روغن و پروتئین خوراکی مطلوب و فراورده‌های متعدد تقدیمی و صنعتی یکی از گیاهان روغنی مهم در جهان است (۲۳). در اغلب مزارع سویا ایران از ارقام تجاری برنامه‌های بهترین دکتران همراه با مشکلاتی خواهد بود. بدین جهت استفاده از نشانگرهای کشاورزی داخل کشور استفاده می‌شود. در این برنامه‌ها معمولاً پس از تلاقی بین ژنوتیپ‌های مختلف در طی نسل‌های در حال تفرق لاین‌های برتر گزینش و خالص‌سازی می‌شوند (۱). تنوع ژنتیکی لاین‌های اصلاحی شانس دستیابی به رقم مطلوب را افزایش می‌دهد. به دلیل محدودیت صفات مورفو‌لوزیکی متمایز‌کننده غیر وابسته به محیط و اشکال تظاهر آنها، تشخیص و گزینش در بین لاین‌های مشابه برای بهترین دکتران همراه با مشکلاتی خواهد بود. بدین جهت استفاده از نشانگرهای مولکولی جهت تکمیک و حذف لاین‌های تکراری و کاهش موارد ژنتیکی در نسل‌های پیشرفت اصلاحی به عنوان یک روش تکمیلی حائز اهمیت است (۳۰). از مهم‌ترین مزایای نشانگرهای می‌توان به فراوانی و چندشکلی بالا، عدم تاثیر پذیری از عوامل محیطی، غیر وابسته بودن به مرحله رشدی گیاه و قابل ارزیابی بودن در آزمایشگاه اشاره نمود. نشانگرهای ریزماهواره (SSR) به دلیل

بررسی قرار می‌گیرد و با استفاده روش‌های آماری چند متغیره لاین‌های اصلاحی گروه بندی می‌شوند تا امکان تصمیم‌گیری برای حذف ژنتیک‌های تکراری و گرینش لاین‌های برتر در برنامه اصلاحی فراهم شود.

### مواد و روش‌ها

#### DNA استخراج

شست و چهار گلدان به قطر ۳۰ سانتی‌متر از خاک مزرعه‌ای با بافت رسی سیلتی پر شد و سپس بذور شست و چهار لاین اصلاحی امیدبخش سویا داخل گلدان در گلخانه بخش دانه‌های روغنی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج در سال ۱۳۹۲ کشت شد (جدول ۱). پس از جوانهزنی و رشد گیاهچه‌ها، در مرحله پنج برگی ۳-۴ برگ به ابعاد  $3 \times 2 \text{ cm}$  از هر گیاه (لاین) برداشت و پس از قرار دادن داخل یک ورقه آلومنیوم بلافلصله داخل نیتروژن مایع غوطه‌ور شد و پس از انتقال به آزمایشگاه در فریزر  $-80^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. نمونه‌های برداشته توسط نیتروژن مایع در هاون چینی کوبیده شد تا بافت برگ به‌شكل پودر سفید رنگ درآید. مقدار  $50\text{ mg}$  از بافت حاصل را در تیوب‌های  $2\text{ ml}$  ریخته و برای استخراج دی ان ای در فریزر نگهداری شد. در زمان مناسب نمونه‌ها از فریزر خارج و به روش CTAB مطابق دستورالعمل سقائی معروف و همکاران (۲۰) دی ان ای نمونه‌ها استخراج گردید. به‌منظور تعیین کیفیت دی ان ای استخراجی مقدار پنج میکرو لیتر از هر نمونه به‌همراه  $3\text{ }\mu\text{l}$  میکرولیتر دای<sup>۱</sup> روی ژل آکارز یک درصد بارگذاری و با ولتاژ  $7\text{ V}$  به مدت  $45\text{ دقیقه}$  بر روی ژل به جریان درآمد.

پس از گذشت زمان لازم توسط دستگاه ژل داک<sup>۱۱</sup> از ژل عکس گرفته و در صورت احرارز کیفیت مطلوب برای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مورد استفاده قرار گرفت. برای تعیین کمیت دی ان ای نیز بر اساس نمونه‌های معیار که قبلاً از اسپکتوفوتومتری بدست آمد، کمیت نمونه‌ها تعیین و سپس غلظت نمونه‌ها به میزان  $1\text{ }\mu\text{l}$   $20\text{--}30\text{ ng}$  دی ان ای رقیق شد.

#### واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

محلول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از نشانگرهای مورد بررسی برای حجم  $15\text{ }\mu\text{l}$  میکرو لیتر با اجزا ذکر شده در جدول ۱ تهیه گردید. برنامه دستگاه ترموماسایکلر مدل Biorad برای انجام واکنش نیز بر اساس مراحل مورد اشاره در جدول ۲ تنظیم گردید. برای تفکیک محصول PCR از الکتروفوروز ژل آکارز  $2\%$  و رنگ‌آمیزی توسط اتیدیوم بروماید استفاده شد و عکس برداری از ژل توسط "سامانه استاندی ژل"<sup>۱۲</sup> انجام شد. ابتدا چند شکلی بودن  $20\text{ }\mu\text{l}$  نشانگر ریزماهواره امتحان شد و سپس نشانگرهای چند شکل برای تعیین ژنتیپ لاین‌ها بکار رفت (جدول ۴). محصول واکنش پس از رنگ‌آمیزی و عکس برداری، بر مبنای نمادهای "۱" و "صفر" به ترتیب برای وجود و عدم باند امتیازدهی و ثبت گردید.

اطلاعات و تنوع ژنتیکی بالا در جمعیت بود. در این بررسی تجزیه ساختار ژنتیپ‌ها را به چهار گروه تقسیم کرد و تجزیه ارتباطی منتاج به شناسایی ۲۱ نشانگر ریزماهواره مرتبط با صفات مختلف گردید. دادرس و همکاران<sup>(۴)</sup> با هدف بررسی نشانگرهای SSR مرتبط با تحمل به تنش خشکی، ۱۲۱ ژنتیپ سویا را توسط ۲۱ نشانگر ریزماهواره مورد ارزیابی قرار دادند. بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت نشان داد متوسط تعداد آلل به ازای هر نشانگر  $5/5$  و متوسط شاخص‌های محتوى اطلاعات چندشکلی (PIC)، ضریب تنوع نی<sup>۱</sup> (H)، تنوع ژنتیکی شانون<sup>۲</sup> (I) به ترتیب  $0.77$ ،  $0.57$  و  $0.57$  بودند. دو نشانگر Sat\_292 و Satt454 بیش از  $18$  درصد تغییرات مربوط به عملکرد تک بوته در شرایط نرمال و تنش خشکی را توجیه نمودند. با استفاده از تجزیه ساختار و خوشه‌ای به‌روش اتصال همسایگی<sup>۳</sup> و ضرایب جاکارد<sup>۴</sup>، ضریب تطابق ساده و نی ژنتیپ‌ها در سه زیر جمعیت و سه گروه قرار گرفتند. جمالی و همکاران<sup>(11)</sup> به‌منظور شناسایی و تمایز بین  $15$  رقم تجاری سویا از  $11$  خصوصیت مرفوولوژیکی و  $16$  نشانگر ریزماهواره برای انگشت‌نگاری ارقام استفاده نمودند. در این برونسی در مجموع  $61$  آلل با میانگین  $3/8$  آلل برای هر جایگاه شناسایی شد. نشانگر Satt005 با هفت آلل دارای بیشترین تنوع آللی در مکان ژنی و نشانگر Satt231 دارای بیشترین شاخص قدرت تمایز و محتوى اطلاعات چندشکلی (PIC) به‌ترتیب به میزان  $0.84$  و  $0.75$  بود. تجزیه خوشه‌ای به‌روش UPGMA<sup>۵</sup> و ضریب تشابه دایس<sup>۶</sup> ارقام سویا را در سه گروه مجزا قرار داد. نتایج این تحقیق نشان داد که نشانگرهای SSR به‌دلیل مستقل بودن از محیط می‌توانند به عنوان مکمل صفات مرفوولوژیکی در شناسایی ارقام تجاری سویا مورد استفاده قرار گیرند. محبوب و همکاران<sup>(17)</sup> روابط ژنتیکی  $36$  ژنتیپ گلزا از گونه‌های مختلف جنس براسیکای گلزا را با استفاده از  $13$  نشانگر بین توالی‌های تکراری ساده<sup>۷</sup> مورد ارزیابی قرار دادند. در این بررسی  $267$  قطعه تکثیری امتیازدهی شدند که از این تعداد  $257$  مکان چند شکلی  $96/4$ % نشان دادند. میانگین محتوى اطلاعات چندشکلی (PIC) و شاخص نشانگری<sup>۸</sup> (MI) به ترتیب  $0.34$  و  $0.5/6$  بود. در این بررسی شاخص تنوع ژنتیکی نی، ضریب شانون و تعداد آلل موثر<sup>۹</sup> به‌ترتیب  $0.34$ ،  $0.51$  و  $0.58$  بودند. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA ژنتیپ‌ها را به سه گروه و سه زیر گروه تفکیک نمود که با سطوح پلوبیدی ژنتیپ‌ها تطابق داشت.

تعداد زیاد لاین‌های اصلاحی از تلاقی‌های مختلف در نسل‌های پیشرفته (F7) سویا چالش بزرگی برای انتخاب لاین‌های مطلوب توسط به تزادگران است. ارزیابی لاین‌های حاصل از یک تلاقی با استفاده از نشانگرهای مولکولی و حذف لاین‌های مشابه کمک زیادی به اداره نسل‌ها و کاهش هزینه‌های برنامه اصلاحی می‌کند. در این تحقیق تنوع آللی و تفاوت‌های ژنتیکی  $64$  لاین پیشرفته اصلاحی نسل F7 (جدول ۳) با استفاده از  $20$  نشانگر ریزماهواره (SSR) مورد

1- Nei  
5- Unweighted Paired Groups Method Using Arithmetic Average  
7- Inter-simple sequence repeat amplification (ISSR)  
10- Dye

2-Shanon index  
6-Dice  
8- Marker index  
11- Gel doc  
3-Neighbor Joining  
4- Jaccard  
9-Effective allel number  
12- Gel documentation system

جدول ۱- حجم مواد شیمیائی مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

Table 1. The volume of chemicals used in the polymerase chain reaction

حجم	اجزا واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز
۲ میکرو لیتر	دی‌ان‌ای ژنوتیپ (10X)
۱/۵ میکرو لیتر	بافر PCR
۰/۵ میکرو لیتر	۱ میکرو لیتر یک میلی مolar dNTPs
۱ میکرو لیتر از هر آغازگر	آغازگرهای پیش رو و پس رو
۱/۲ میکرو لیتر	کلرید منیزیم ۱۵ میلی مولار
۰/۱ میکرو لیتر	آنژیم تگ پلی‌مراز
۷/۷ میکرو لیتر	آب مقطر استریل
۵ میکرو لیتر (حجم نهایی)	

جدول ۲- برنامه اجرای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز توسط دستگاه ترموسایکلر

Table 2. Execution program of polymerase chain reaction by thermocycler

زمان	دما (سانتی‌گراد)	عملیات	مرحله
۳ دققه	۹۴	واسرشت‌سازی اولیه	یک چرخه
۳۰ ثانیه	۹۴	۱. واسرشت‌سازی	۳۰ چرخه حرارتی اصلی :
۳۰ ثانیه	۴۵-۶۰	۲. اتصال به آغازگر	
۴۵ ثانیه	۷۲	۳. بسط رشته	
۵ دققيقة	۷۲	بسط نهایی	یک چرخه

آل با متوسط ۵/۵ آل به ازای هر مکان ژنی و جمالی و همکاران (۱۱) در بررسی ۱۵ رقم سویا توسط ۱۶ نشانگر ریزماهواره در مجموع ۶۱ آل با میانگین ۳/۸ آل برای هر جایگاه ژنی گزارش کردند. مقایسه نتایج این بررسی‌ها با نتایج تحقیق حاضر نشان داد که نشانگرهای ریزماهواره به خوبی تنوع آللی موجود در مکان‌های ژنی لاین‌های اصلاحی را معنکس نموده و از ظرفیت کافی برای ایجاد تمایز بین ژنوتیپ‌ها برخوردار بودند. نشانگرهای Satt\_218 و Satt\_191 با پنج آل دارای بیشترین آل، نشانگر Satt 661 دارای ۴ آل و نشانگرهای Satt307 و Satt277661 دارای ۳ آل بودند. سایر نشانگرهای نیز دارای دو آل بودند. تعداد آل‌های موثر جایگاه‌های ژنی (نشانگرهای) از حداقل ۱/۱۹ تا حداقل ۴/۵۶ متغیر بود. میانگین تعداد ال‌های موثر در کل نشانگرهای چندشکل ۲/۳۶ با انحراف معیار ۱/۰۱ بود. نشانگرهای Sat\_218 و Sat\_117 بهترین ۴/۵۶ و ۴/۲۷ دارای بیشترین و نشانگرهای Satt384 و Satt411 بهترین ۱/۱۹ و ۱/۲۱ دارای کمترین تعداد آل موثر بودند (جدول ۳). مقایسه تعداد آل موثر با تعداد آل‌های مشاهده شده نشان داد که با افزایش تعداد آل مشاهده شده تعداد آل موثر نیز افزایش یافته است. دامنه شاخص تنوع ژنتیکی شانون برای نشانگرها از ۰/۲۹ تا ۱/۵۶ متغیر بود و میانگین این شاخص ۰/۸۵ با انحراف معیار ۰/۴۰ بود. بر اساس این شاخص نشانگرهای Sat\_218 و Sat\_117 بهترین ۱/۵۶، ۱/۵۱ و ۱/۳۵ دارای بیشترین و نشانگرهای Satt384 و Satt411 بهترین ۰/۳۱ و ۰/۰۷۹ دارای کمترین مقادیر شاخص شانون بودند (جدول ۳). دامنه مقادیر اطلاعات چند شکلی (PIC) نشانگرها از ۰/۷۸ تا ۰/۱۶ متغیر بود و میانگین ۰/۰۷۸ برابر PIC با انحراف معیار ۰/۱۸ بود. نشانگرهای Sat\_218 و Sat\_117 بهترین ۰/۰۷۸ و ۰/۰۷۷ دارای Satt191 بهترین PIC بودند که بیانگر ظرفیت بالای آنها در ایجاد تمایز بین ژنوتیپ‌ها و نشانگرهای Satt384 و Satt411 بهترین ۰/۰۱۶ و ۰/۰۱۸ دارای کمترین مقادیر PIC بودند که نشانده‌نده کارآمدی کمتر آنها از این حیث بود (جدول ۳). در بررسی‌هایی که توسط

تجزیه آماری برای محاسبه شاخص محتوى اطلاعات چند شکلي (PIC) از رابطه  $PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$  (۶) که در آن  $P_i$  فراوانی آللی و  $n$  تعداد آل در جایگاه ژنی است، برای محاسبه شاخص شانون (H) از رابطه  $H = \sum_{i=1}^n P_i \ln P_i$  (۲۶) که در آن  $P_i$  فراوانی گروه ژنوتیپی،  $S$  تعداد گروههای ژنوتیپی و  $\ln$  لگاریتم طبیعی است و برای محاسبه تعداد آل موثر از رابطه  $A_e = \frac{1}{\sum_{i=1}^n P_i^2}$  (۱۴) که در آن  $P_i$  فراوانی آللی و  $n$  تعداد آل در جایگاه ژنی می‌باشد استفاده گردید. برای محاسبه شاخصهای مذکور نرم‌افزار پاپ ژن<sup>۱</sup> نسخه ۱/۳۱ (۵) بکار رفت. برای گروه‌بندی لاین‌های موثر بررسی از تجزیه خوشهای به روش اتصال همسایگی و ضربی تشابه تطابق ساده و برای بررسی نحوه پراکنش لاین‌های اصلاحی بر مبنای تنوع آللی نشانگرهای ریزماهواره و مقایسه نتایج حاصل با نتایج تجزیه خوشهای از نرم‌افزار انت‌سیس<sup>۲</sup> نسخه ۲/۰۲ استفاده گردید.

### نتایج و بحث

شاخصهای تنوع ژنتیکی از ۲۰ نشانگر ریزماهواره که برای بررسی تمایز ژنتیکی لاین‌های امیدبخش بکار رفت ۱۴ نشانگر چندشکلی نشان دادند که معادل ۷۰ درصد نشانگرهای استفاده شده بود. (جدول ۴). الگوی نواربندی نشانگر Sat\_117 به عنوان Sat\_117<sup>۳</sup> نومنه‌ای از نشانگرهای چندشکل در شکل ۱ نشان داده شده است. بر اساس نتایج حاصل در مجموع ۴۱ آل برای جایگاه‌های مختلف ژنی مشاهده شد که تعداد آل‌ها از دو تا پنج آل متغیر بود و میانگین تعداد آل‌ها ۲/۹۳ با انحراف معیار ۱/۳ بود (شکل ۲ و جدول ۵). هوانگ و همکاران (۱۰) در بررسی ۱۷۲ ژنوتیپ سویا توسط ۲۰ نشانگر ریزماهواره در مجموع ۳۴۴ آل با میانگین ۱۷/۲ آل به ازای هر مکان ژنی، لی و همکاران (۱۶) در بررسی ۱۵۹ رقم و لاین سویا توسط ۵۵ نشانگر ریزماهواره در کل ۷۸۱ آل با متوسط ۹/۴ آل برای هر نشانگر، دادرس و همکاران (۴) در ارزیابی ۱۲۱ ژنوتیپ سویا توسط ۲۱ نشانگر ریزماهواره در مجموع ۱۱۶

دو لاین L.49 و L.50 از تلاقی Accomac x Yougetsu منتج شدند. از ۱۶ لاین اصلاحی گروه سوم، چهار لاین DPX x Nemaha L.26 و L.27 از تلاقی L.29 و L.28 و L.32 از تلاقی L.30 و L.34 از تلاقی Darby و DPX x Williams L.35 و L.36 از تلاقی Williams x DPX بدست آمده‌اند و از نه لاین اصلاحی گروه چهار، دو لاین L.39 و L.41 از تلاقی Yougetsu x Accomac و چهار L.52 و L.53 از تلاقی Yougetsu x Accomac L.42 و L.43 از تلاقی Williams x L.44 و L.45 از تلاقی DPX بدست آمده‌اند (شکل ۳ و جدول ۳). این نتایج نشان داد که اغلب لاین‌های درون یک گروه دارای شجره مشابه بوده به‌گونه‌ای که دو والد یا حداقل یک والد مشترک داشتند و لاین‌های گروه‌های متفاوت کمتر دارای والدین مشترک بودند. در دو تحقیق جداگانه که با هدف بررسی روابط خویشاوندی ارقام سویا توسط نشانگرهای ریزماهواره انجام شده بود، تجزیه خوشهای نشان داد که ارقام داخل گروه‌های مشابه دارای والدین مشترک بودند (۱۹، ۲۷). در بررسی تنوع ژنتیکی ۱۲۹ ژنوتیپ از کلکسیون ملی چین با ۶۰ نشانگر SSR، تجزیه خوشهای ژنوتیپ‌ها را به پنج گروه بزرگ تقسیم نمود که تطابق بالائی با منشاء جغرافیائی ژنوتیپ‌ها (اکوتیپ‌ها) داشت (۳۱). ارزیابی ۱۶۰ ژنوتیپ از ارقام زراعی و محلی سویای تایلند با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره نشان داد که تفاوت‌های ژنتیکی بین ارقام زراعی و بومی ناچیز بود. به عبارت دیگر پایه ژنتیکی ارقام زراعی و بومی تا حد زیادی یکسان است (۳). زویچ میهالوبیج و همکاران (۳۳) ۹۷ ژنوتیپ سویا متشکل از ارقام تجاری و لاین‌های الیت موسسات بمنزدی اروپا و امریکای شمالی را توسط ۲۷ نشانگر چند شکل ریزماهواره مورد ارزیابی قرار دادند. تجزیه خوشهای ژنوتیپ‌ها را به نحوی تفکیک نمود که گروه‌های بدست آمده تطابق بالائی با برنامه اصلاحی ارقام و گروه رسیدن آنها داشت. مولاتو و همکاران (۲۰) به کمک ۲۰ نشانگر ریزماهواره و ۱۰ نشانگر EST روابط خویشاوندی ۷۹ ژنوتیپ سویای بزرگی را بررسی نمود. در این تحقیق در مجموع ۲۵۹ آلل و از ۲ تا ۲۱ آلل با متوسط ۸/۶ آلل برای هر مکان ژنی مشاهده شد. نتایج حاصل بیانگر تنوع ژنتیکی بالا بین ژنوتیپ‌ها بود و ژنوتیپ‌ها توسط تجزیه خوشهای به پنج زیر جمعیت با تعداد زیادی زیرگروه تقسیم شدند. همچنین ارتباط نسبی قابل قبولی بین تنوع ژنتیکی و منشاء جغرافیائی ژنوتیپ‌ها بدست آمد.

#### تجزیه به مولفه‌های اصلی

سه مولفه اصلی اول (PC1) و دوم (PC2) و سوم (PC3) به ترتیب ۱۸/۶، ۷/۹۹، ۹/۹۹ و در مجموع ۳۶/۶ درصد از واریانس کل نشانگرهای را به خود اختصاص دادند. در بررسی‌های مختلف بسته به تعداد نشانگر و اندازه جمعیت دامنه تغییرات مولفه اول (PC1) از ۸/۵ تا ۳۹/۴ درصد و مولفه دوم از ۴/۵ تا ۱۷/۷ درصد گزارش شده است (۲۹) و (۹). نمودار سه بعدی سه مولفه اصلی اولیه، لاین‌های مورد بررسی را در چهار گروه قرار داد (شکل ۴). این چهار گروه توسط دوایر قرمز رنگ در شکل ۴ مشخص شده است. در گروه یک لاین‌های شماره ۱، ۴، ۶، ۹، ۸، ۷، ۱۱، ۱۰، ۹، ۲۰ و

نشانگرهای SSR روی سویا صورت گرفته است دامنه مقادیر شاخص PIC از ۰/۰۳ تا ۰/۸۷ و شاخص شانون از ۰/۰۷ تا ۰/۱۲ گزارش شده است (۳۲، ۱۹، ۱۳، ۲، ۲۸). مقایسه نتایج شاخص شانون و محتوى اطلاعات چند شکلی با تعداد آلل‌های موثر و مشاهده شده بیانگر این نکته است که هرچه تعداد آلل موثر در یک نشانگر بیشتر باشد سهم بیشتری در تشخیص تفاوت‌های ژنتیکی ژنوتیپ‌ها و آشکار نمودن تنوع ژنتیکی خواهد داشت. بررسی‌های صورت گرفته این موضوع را تأیید می‌کنند (۱۹، ۲۸، ۱۲). میانگین درصد هموزیگوستی در جایگاه‌های ژنی از ۱۰/۰ با میانگین ۷۵/۰ و انحراف معیار ۰/۳۱ بود. بالاترین درصد هموزیگوستی به میزان ۱۰۰ درصد (۱) مربوط به نشانگرهای دولالی Satt404، Satt411، Satt607 و Satt718 کمترین میزان هموزیگوستی به میزان ۱۰ درصد مربوط به نشانگر پنج آللی Sat\_218 و نشانگر ۴ آللی Satt661 بود (جدول ۳). این نتایج نشان داد که در لاین‌های اصلاحی نسل هفتم (F7) جایگاه‌های ژنی (نشانگرهای) با تعداد آلل کمتر زودتر به مرحله تثبیت یا خلوص می‌رسند و جایگاه‌های ژنی با آلل‌های بیشتر تعداد نسل‌های بیشتری لازم دارند تا به خلوص برسند (جدول ۳). دامنه هتروزیگوستی مشاهده شده در بسیاری از جمعیت‌های سویایی که توسط نشانگرهای ریزماهواره مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند از ۰/۰۰ تا ۰/۹۸ گزارش شده است (۲۰، ۱۹، ۷). بطورکلی در این تحقیق با توجه به مقادیر شاخص‌های تنوع ژنتیکی اندازه‌گیری شده، نشانگرهای Sat\_218 و Sat\_117 قدرت بالائی جهت تمایز بین ژنوتیپ‌ها و تبیین تنوع آلل داشتند.

#### تجزیه خوشهای

بیشترین شباهت بر اساس ضریب تشابه تطابق ساده (SM) به میزان ۰/۹۸ بین لاین‌های L.55 با L.62 و کمترین شباهت به میزان ۰/۳۰ بین لاین‌های L.12 و L.22 بدست آمد. برش نمودار دندروگرام خوشهای در نقطه واحد محور ضریب فاصله ژنتیکی، لاین‌های مورد بررسی را در چهار گروه و هشت زیر گروه قرار داد که از ۶۴ لاین اصلاحی ۲۸ لاین در گروه یک، ۱۱ لاین در گروه دو، ۱۶ لاین در گروه سه و ۹ لاین در گروه چهار گرفتند (شکل ۳). بررسی شجره لاین‌های اصلاحی نشان داد که در گروه یک لاین‌های اصلاحی L.3 L.6 L.5 L.4 L.7 L.8 و L.23 L.22 G.3 x Hamilton همگی از تلاقی DPX x Kotaman و پنج لاین L.24 از تلاقی DPX x Sepideh L.62 L.59 L.58 L.61 L.55 از تلاقی Nigeria x Sepideh بدست آمده‌اند (شکل ۳ و جدول ۳). در همین گروه دو لاین ۹ L.10 از تلاقی Sahar x Nemaha، دو لاین L.31 از تلاقی DPX x Darby و دو لاین L.45 از تلاقی Hamilton x DPX بدست آمده‌اند. علاوه بر این اغلب لاین‌های این گروه حداقل دارای یک والد مشترک نظیر بودند که بیانگر قرابت ژنتیکی لاین‌های این گروه بود (شکل ۳ و جدول ۳). در گروه دو لاین‌های DPX x Yougetsu L.17 L.18 و L.19 از تلاقی DPX x Rend و L.16 از تلاقی DPX x L.13 L.15

ژاپنی در گروه یک و ارقام خارجی و ژنتیپ‌های خوشی به ترتیب در گروه‌های دو و سه قرار گرفتند. این گروه‌بندی با مبدأ جغرافیائی ارقام نیز مطابقت داشت. الگوی پراکنش ژنتیپ‌ها در نمودار دو بعدی تجزیه به مولفه‌های اصلی تطابق قابل قبولی با دندروگرام حاصل از تجزیه خوشی‌ای داشت (۹). در تحقیقی که با هدف بررسی تفاوت‌های مولکولی ۷۵ رقم تجاری و بومی سویای هندی با مصارف تقدیمهای و داروئی توسط ۲۱ نشانگر ریزماهواره انجام شد، تجزیه خوشی‌ای ژنتیپ‌های مورد بررسی را در سه گروه بزرگ قرار داد به‌گونه‌ای که ارقام تجاری دارای پوسته زردنگ در یک گروه و ارقام تجاری پوسته قهوه‌ای به همراه ارقام بومی پوسته سیاه در دو گروه دیگر قرار گرفتند. تجزیه به مختصات اصلی گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشی‌ای را تائید نمود و سه مولفه اولیه در مجموع  $33/15$  درصد از تغییرات واریانس داده‌های مولکولی را توجیه نمودند. این بررسی نشان داد که پایه ژنتیکی ارقام بومی با ارقام تجاری پوسته قهوه‌ای تا حد زیادی مشابه بود (۷).

بطور کلی بر اساس نتایج تحقیق حاضر می‌توان گفت که نشانگرهای مورد استفاده دارای چندشکلی قابل قبولی بودند و نشانگرهای Sat\_218 و Sat\_117 از قدرت تمایز بالاتری بین ژنتیپ‌ها و تبیین تنوع آلی برخوردار بودند. تجزیه خوشی‌ای بر اساس داده‌های ژنتیکی لاین‌های اصلاحی را در چهار گروه و هشت زیر گروه قرار داد که بیانگر تنوع ژنتیکی قابل توجه‌ای بین ژنتیپ‌ها بود تجزیه به مختصات اصلی نیز صحت گروه‌بندی تجزیه خوشی‌ای را تائید نمود. با توجه به نتایج حاصل می‌توان گفت استفاده از نشانگرهای مولکولی برای ارزیابی و گزینش لاین‌های اصلاحی در نسل‌های پیشرفته امکان‌پذیر بوده و از کارائی لازم برخوردار بود.

لاین‌های شماره ۲، ۲۵، ۲۶، ۳۴، ۳۸، ۳۷، ۳۶، ۳۳ و ۶۲، ۵۰، ۴۷، ۴۰، ۳۸، ۳۷، ۳۶، ۳۳ و ۶۲، در گروه دو شماره ۳۲، ۳۶، ۳۹ و ۴۳، در گروه سه لاین‌های شماره ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۴۱، ۴۲، ۴۴، ۵۲، ۵۳، ۵۵ و ۵۷ و در گروه چهار لاین‌های شماره ۳۴، ۴۳، ۴۱، ۴۲، ۴۴، ۵۲، ۵۳، ۵۵ و ۵۷ قرار گرفتند (شکل ۳). این گروه‌ها در برخی نواحی با یکدیگر همپوشانی داشتند. مقایسه گروه‌بندی حاصل از تجزیه به مولفه‌های اصلی با گروه‌بندی تجزیه خوشی‌ای نشان داد که این دو نوع گروه‌بندی تطابق خوبی با یکدیگر دارند. بطور مثال لاین‌های شماره ۱، ۹، ۷، ۱۱، ۱۰، ۳۷، ۳۳، ۳۱ و ۶۱ در هر دو روش در گروه یک قرار گرفتند. لاین‌های شماره ۲، ۲۵، ۲۱، ۲۶، ۲۷، ۲۸، ۳۲، ۳۹، ۳۴، ۳۶ و ۳۹ در هر دو روش در گروه ۱۹، ۱۸، ۱۶، ۱۷، ۱۵، ۱۳، ۱۲ و ۵۱ در هر دو روش در گروه سه قرار گرفتند و در گروه چهار لاین‌های شماره ۳۴، ۴۳، ۴۲، ۴۱، ۴۴، ۵۲، ۵۳، ۵۵ و ۵۷ در هر دو روش مشترک بودند (شکل ۳ و ۴). در یک پژوهش موكوزه و همکاران (۱۹) تنوع ژنتیکی  $34$  رقم تجاری و لاین‌الیت سویا را توسط ۲۱ نشانگر ریزماهواره بررسی و گزارش نمودند که تجزیه خوشی‌ای به روش سلسه مراتبی ژنتیپ‌ها را در سه گروه مجزا قرار داد. به گونه‌ای که اغلب ارقام تجاری در یک گروه و لاین‌های الیت در دو گروه دیگر قرار گرفتند. مولفه اصلی اول (PCA1) و دوم (PCA2) تجزیه به مولفه‌های اصلی به ترتیب  $17/2$  درصد و  $11/7$  درصد از واریانس داده‌های مولکولی را توجیه نمودند و نحوه پراکنش ژنتیپ‌ها بر اساس دو مولفه اول و دوم صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشی‌ای تائید نمود. در بررسی دیگری که با هدف بررسی روابط ژنتیکی  $87$  رقم و ژنتیپ وحشی سویا ژاپنی انجام گردید. تجزیه خوشی‌ای توسط  $33/7$  نشانگر ریزماهواره، ژنتیپ‌ها را در سه گروه مجزا قرار داد که اغلب ارقام

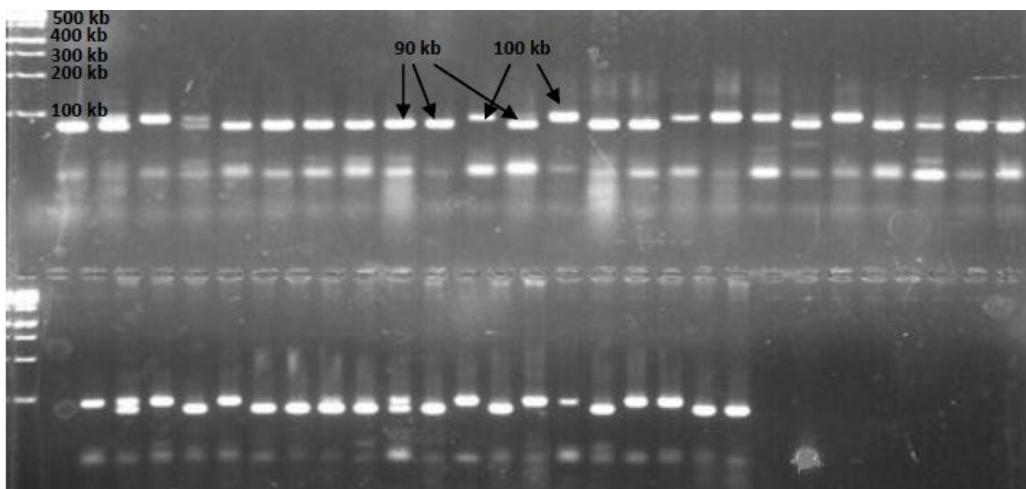
جدول ۳ - شماره و شجره لاین‌های اصلاحی سویا  
Table 3. Number and pedigree of soybean breeding lines

شماره لاین	شجره	شماره لاین	شجره
L.1	BL.5 (G.3 × Nemaha)	L.33	L.4 (DPX × Darby)
L.2	L.2 (G.3 × Hamilton)	L.34	L.5 (DPX × Darby)
L.3	L.3 (G.3 × Hamilton)	L.35	L.1 (Williams × DPX)
L.4	L.4 (G.3 × Hamilton)	L.36	L.2 (Williams × DPX)
L.5	L.5 (G.3 × Hamilton)	L.37	L.3 (Williams × DPX)
L.6	L.8 (G.3 × Hamilton)	L.38	L.4 (Williams × DPX)
L.7	L.9 (G.3 × Hamilton)	L.39	L.5 (Williams × DPX)
L.8	L.10 (G.3 × Hamilton)	L.40	L.6 (Williams × DPX)
L.9	L.2 (Sahar × Nemaha)	L.41	L.7 (Williams × DPX)
L.10	L.3 (Sahar × Nemaha)	L.42	L.8 (Williams × DPX)
L.11	L.2 (Williams × Sahar)	L.43	L.9 (Williams × DPX)
L.12	L.3 (Williams × Sahar)	L.44	L.10 (Williams × DPX)
L.13	L.1 (DPX × Rend)	L.45	L.3 (Hamilton × DPX)
L.14	L.3 (DPX × Rend)	L.46	L.1 (Hamilton × DPX)
L.15	L.4 (DPX × Rend)	L.47	L.3 (Hamilton × Sahar)
L.16	L.5 (DPX × Rend)	L.48	L.3 (Omaha × Sahar )
L.17	L.1 (DPX × Yougetsu)	L.49	L.3 (Accomac × Yougetsu)
L.18	L.2 (DPX × Yougetsu)	L.50	L.5 (Accomac × Yougetsu)
L.19	L.3 (DPX × Yougetsu)	L.51	L.1 (Accomac × Nemaha)
L.20	L.4 (DPX × Yougetsu)	L.52	L.2 (Accomac × Nemaha)
L.21	L.5 (DPX × Yougetsu)	L.53	L.3 (Accomac × Nemaha)
L.22	L.1 (DPX × Kotaman)	L.54	L.10 (Hamilton × Williams)
L.23	L.2 (DPX × Kotaman)	L.55	L.6 (Hamilton × Nemaha)
L.24	L.4 (DPX × Kotaman)	L.56	L.3 (Nigeria × Sepideh)
L.25	L.5 (DPX × Kotaman)	L.57	L.4 (Nigeria × Sepideh)
L.26	L.2 (DPX × Nemaha)	L.58	L.5 (Nigeria × Sepideh)
L.27	L.3 (DPX × Nemaha)	L.59	L.6 (Nigeria × Sepideh)
L.28	L.4 (DPX × Nemaha)	L.60	L.7 (Nigeria × Sepideh)
L.29	L.5 (DPX × Nemaha)	L.61	L.8 (Nigeria × Sepideh)
L.30	L.1 (DPX × Darby)	L.62	L.9 (Nigeria × Sepideh)
L.31	L.2 (DPX × Darby)	L.63	Katool
L.32	L.3 (DPX × Darby)	L.64	Sari

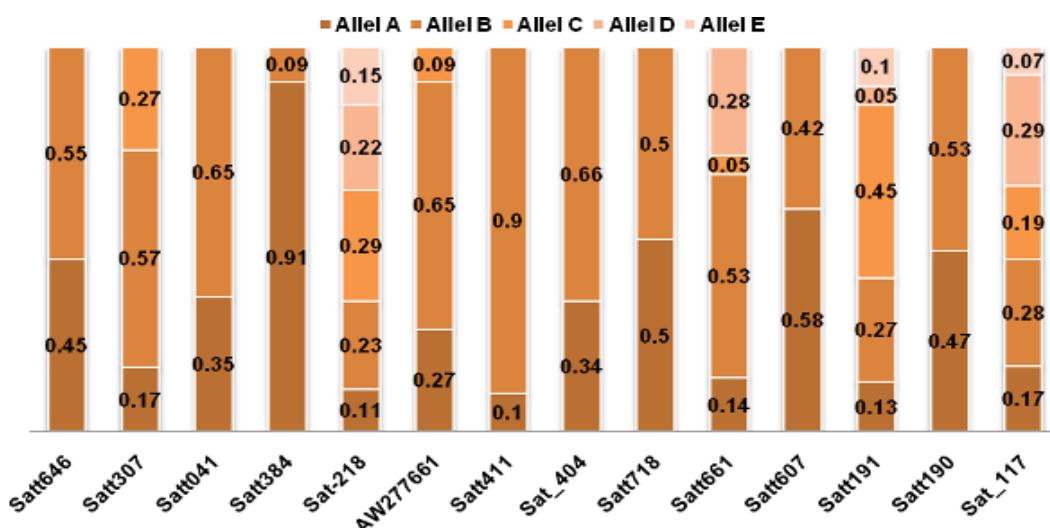
جدول ۴ - مشخصات نشانگرهای ریزماهواره و توالی آغازگرهای پیش رو و پس رو

Table 4. Description of SSR markers and sequence of forward and backward primers

شماره	نام نشانگر	کروموزوم	پرایمر پیش رو	پرایمر پس رو	الگوی نووارندی
۱	Sat_117	G	TTGGCAGTTCTTGTAG	GCTGGATCGCAGTTA	چند شکل
۲	Sat_124	E	GGGTCCATTCCACTTTTGACAAATAT	GGGAGTTCAACATCCATTAGTGGTATA	تک شکل
۳	Satt041	D1b	TGTTGTGGCTTTATTATT	TTAACGGTGGATATGGTC	چند شکل
۴	Satt307	C2	GCGCTGGCCTTAGAAC	GCGTTGTAGGAATTGAGTAGTAAG	چند شکل
۵	Sct_028	C2	TCGCCGGTACAAGAAG	CGAATGAACAAACAAACA	تک شکل
۶	Satt646	C1	GCGGGGTATGAATTAAATTATGTAGAAT	GCGCCTTCAAAAACAAATGACATATCAT	چند شکل
۷	AW277661	C1	GCGCATGGAGCATCATCTCATA	GCGAGAAAACCCAATCTTATATCAATA	چند شکل
۸	Sat_125	N	GGGACGAAACAAAGTCACAT	GGGATGCTGTTATCAAATCA	تک شکل
۹	Sat_218	H	GCGCACGTTAAATGAACGTGTTATGATA	GCGGGCCAAGAGGAAGATTGTAAT	چند شکل
۱۰	Satt384	E	TGGGGGTCAATTAAATTGTGC	ATTTCCCTTCACCCACCTCTGTTT	چند شکل
۱۱	Satt691	E	GCGAAAGATAAAAAGTAGATTGAAA	GCGCTCTAAATCCAATGAATC	تک شکل
۱۲	Satt190	C1	GGGAGTGTGAACTACATTGTCT	GGGCCTGTAATTGTCGCTAT	چند شکل
۱۳	Satt161	C1	GGGTATATCAACATATCTCACCTTTT	GGGCTGCTGTTAATGTTTGTAGA	تک شکل
۱۴	Satt 718	C1	GCGTGCAACACCTCAAGTTCAAATAC	GCGTAGCTTTCCAAGTTTTCATC	چند شکل
۱۵	SAtt022	N	GGGGGATCTGATTGTTTTACCT	CGGGTTCAAAAAACCATCCTTAC	تک شکل
۱۶	Satt411	E	TGGCCATGTCAAACCATACAACA	GCGTTGAAGCCGCTACAAATATAAT	چند شکل
۱۷	Satt607	C1	GCGGTTCATCTGCAAGTGTATTATT	GCGCCACTTAATTATTCAGATTAATT	چند شکل
۱۸	Sat_404	C1	GCGGATGCGCTTAGCCAGAAGATGAGT	GCGTTCTCCCCAATGTACATACCTACCA	چند شکل
۱۹	Satt661	C1	TGATATGAGCAATGTAGTCCCTCT	TCCATGAAAAGAAGTTAGAATAGC	چند شکل
۲۰	Satt191	G	CGCGATCATGTCCTG	GGGAGTTGGTGTCTGTG	چند شکل



شکل ۱- الگوی نواریندی نشانگر Sat\_117 در برخی از لاین‌های اصلاحی  
Figure 1. Banding pattern of Sat\_117 marker in the some breeding lines

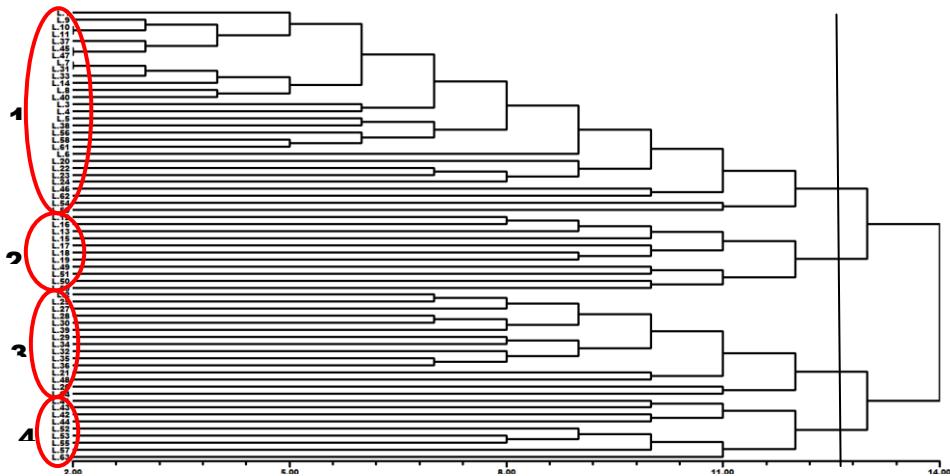


شکل ۲- تعداد و فراوانی آلل‌های نشانگرهای ریزماهواره مورد بررسی  
Figure 2. Alleles number and frequency of the studied microsatellite marker

جدول ۵- تخمین پارامترهای ژنتیکی نشانگرهای ریزماهواره مورد بررسی

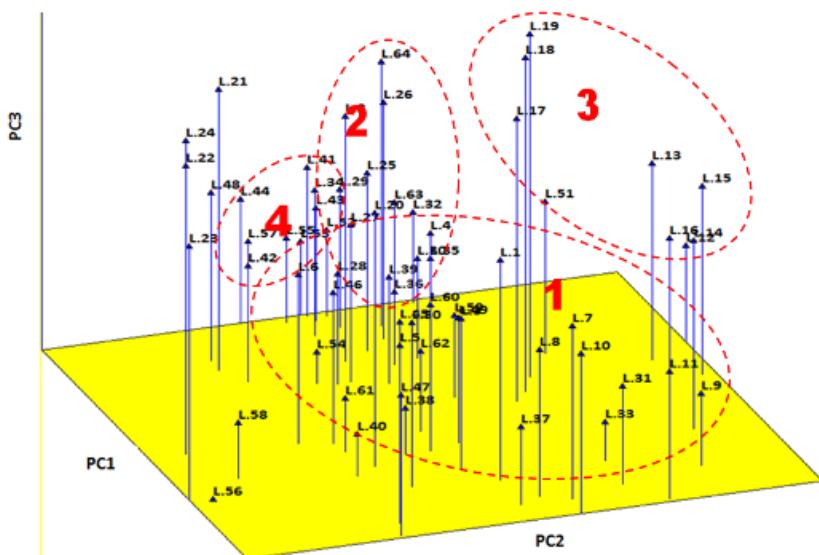
Table 5. Estimation of genetic diversity parameters of the studied microsatellite markers

نشانگر	تعداد آلل مشاهده شده	تعداد آلل موقر	شاخص شانون	درصد هموژنگیستی	درصد هتروژنگیستی	محظوظ اطلاعات چند شکلی (PIC)
Satt646	۲	۱/۹۸	۰/۶۹	۰/۸۶	۰/۱۴	۰/۵۰
Satt307	۳	۲/۳۸	۰/۹۷	۰/۵۳	۰/۴۷	۰/۵۷
Satt041	۲	۱/۸۴	۰/۶۵	۰/۷۷	۰/۲۳	۰/۴۶
Satt384	۲	۱/۱۹	۰/۲۹	۰/۸۹	۰/۱۱	۰/۱۶
Sat-218	۵	۴/۵۶	۱/۵۶	۰/۱۰	۰/۹۰	۰/۷۸
AW277661	۳	۲/۰۱	۰/۸۴	۰/۴۵	۰/۵۵	۰/۵۰
Satt411	۲	۱/۲۱	۰/۲۱	۱	۰	۰/۱۸
Sat_404	۲	۱/۸۱	۰/۸۴	۱	۰	۰/۴۵
Satt718	۲	۲	۰/۶۹	۱	۰	۰/۵۰
Satt661	۴	۲/۶	۱/۱	۰/۲۷	۰/۷۳	۰/۶۲
Satt607	۲	۱/۹۵	۰/۶۸	۱	۰	۰/۴۹
Satt191	۵	۳/۲۴	۱/۲۵	۰/۹۴	۰/۰۶	۰/۷۰
Satt190	۲	۱/۹۹	۰/۶۹	۰/۸۸	۰/۱۲	۰/۵۰
Sat_117	۵	۴/۲۷	۱/۵۱	۰/۵۰	۰/۵۰	۰/۷۷
Mean	۲/۹۳	۲/۲۶	۰/۸۵	۰/۷۲	۰/۲۷	۰/۵۱
Stan D	۱/۳	۱/۰۱	۰/۴۰	۰/۳۰	۰/۳۰	۰/۱۸



شکل ۳ - دندروگرام حاصل از تجزیه خوشای به روش اتصال همسایگی و ضریب تشابه تطابق ساده ۶۴ لاین اصلاحی سویا بر اساس امتیاز نشانگر ریزماهواره ۱۴

Figure 3. Dendrogram of clustering analysis Neighbor Joining and simple matching coefficient for 64 soybean breeding lines based on scoring 14 microsatellite markers



شکل ۴ - نمودار سه بعدی پراکنش ۶۴ لاین اصلاحی سویا بر اساس سه مولفه اولیه ( $PC_3 = \% 8$  و  $PC_2 = \% 10$  و  $PC_1 = \% 19$ )

Figure 4. Three-Dimensional distribution graph of 64 soybean breeding lines based on 3 first principle components ( $PC_1 = \% 18.6$ ,  $PC_2 = \% 10$ ,  $PC_3 = \% 8$ )

#### منابع

- Babaei, H.R. 2016. Study of adaptability of new soybean purlines. Registered number: 55194-97/12/15. Final report of research project. Seed and Plant Improvement Institute, [available] In Site: < <https://www.acist.areeo.ac.ir/fa-IR/acist.areeo.ac/15589>>.
- Bisen, A., D. Khare, P. Nair and N. Tripathi. 2015. SSR analysis of 38 genotypes of soybean (*Glycine Max* (L.) Merr.) Genetic diversity in India. Physiology Molecular Biology Plants. 21: 109-115.
- Chotiyarnwong. O., P. Chatwachirawong, S. Chanprame and P. Srinives. 2007. Evaluation of genetic diversity in Thailand indigenous and recommended soybean varieties by SSR markers. Thailand Journal of Agricultural Science, 40(3): 119-126.
- 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).

5. Francis, C.Y. and R. Cai Yang. 1999. Popgene version 1.31. A joint project development by University of Alberta and Tim Boyle, Centre for International. Available at < <http://ftp.microsoft.com/Softlib/Mslfiles>>.
6. He, C., V. Poysa and K. Yu. 2003. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in determining relationships among *Lycopersicon esculentum* cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 106: 363-373.
7. Hippuragi, Y., R. Singh, D.R. Choudhury and V. Gupta. 2017. Genetic diversity and population structure analysis of Kala bhat (*Glycine max* (L.) Merrill) genotypes using SSR markers. *Hereditas*. 154(9): 1-11.
8. Hisano, H., S. Sato and S. Isobe. 2007. Characterisation of soybean genome using EST-derived microsatellite markers. *DNA Research*, 14: 271-281.
9. Hwang, T.Y., B.S. Gwak, J. Sung and H.S. Kim. 2020. Genetic diversity patterns and discrimination of 172 Korean soybeans (*Glycine max* (L.) Merrill) varieties based on SSR analysis. *Agriculture*. Open access. [available] In Site: <https://www.mdpi.com/2077-0472/10/3/77/pdf>.
10. Hwang, T.Y., Y. Nakamoto, I. Kono, H. Enoki, H. Funatsuki, K. Kitamura and M. Ishimoto. 2008. Genetic diversity of cultivated and wild soybeans including Japanese elite cultivars as revealed by length polymorphism of SSR markers. *Breeding Science*. (58): 315-323.
11. Jamali, S.H., L. Sadghi and S.Y. Sadeghian-Motahhar. 2011. Identification and distinction of soybean commercial cultivars using morphological and microsatellite markers. *Iranian Journal of Crop Sciences*, 13(1): 131-145 (In Persian).
12. Khatun, M.K., M.A. Haque, M.A. Malek, M.H. Rashid, S. Islam and M.M. Haque. 2021. Genetic diversity analysis of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill.] germplasms in Bangladesh using SSR markers. *Journal of Agricultural Science*, 13(2): 1-10.
13. Kim, K.S., A. Chirumamilla, C.B. Hill, G.L. Hartman and B.W. Diers. 2014. Identification and molecular mapping of two soybean aphid resistance genes in soybean PI 587732. *Theoretical and Applied Genetics*. 127: 1251-1259.
14. Kimura, M. and J.F. Crow. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*. 49: 25-38.
15. Kwon, S.J. 2002. Relationship between genetic divergence and hybrid performance in japonica rice grown in a cold water-irrigated field. *Euphytica*, 28: 389-396.
16. Li, Y. H., 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
17. Mahjoob, B., H. NajafiZarini 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).
18. Marsan, P.A., P. Castiglioni, F. Fusari, M. Kuiper and M. Motto. 2004. Genetic diversity and its relationship to hybrid performance in maize as revealed by RFLP and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 96(2): 219-227.
19. Mukuze, C., P. Tukamuhabwa, M. Maphosa, S. Dari, I.O. Dramadri, T. Obua, H.M. Kongai and P. Rubaihayo. 2020. Genetic diversity analysis among soybean genotypes using SSR markers in Uganda. *African Journal of Biotechnology*, 19(7): 439-448.
20. Mulato, B.M., M. Moller, M.I. Zucchi, V. Quecini and J.B. Pinheiro. 2010. Genetic diversity in soybean germplasm identified by SSR and EST-SSR markers. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 45: 276-283.
21. Munir, A., S. Armghan, M. Iqbal, M. Asif and A.H. Hirani. 2013. Morphological and molecular genetic variation in wheat for salinity tolerance at germination and early seedling stage. *Australian Journal of Crop Science*, 7(1): 66-74.
22. Naghavi, M.R., B. Ghareyazi and G. Hosseni Salekdeh. 2005. Molecular Marker. 320 pp. University of Tehran Press, Iran (In Persian).
23. Qiu, L.J. and R.Z. Chang. 2009. The Origin and History of Soybean. In: Sing, G. (ed) *The Soybean: Botany, Production and Uses*. 1-23 pp. CAB International. London, UK.
24. Reif, J. 2004. Assessing the genetic diversity in crops with molecular markers: theory and experimental results with CIMMYT wheat and maize elite germplasm and genetic resources. PhD. thesis. The University of Hohenheim, Stuttgart, Germany, 81 pp.
25. Saghai-Marof, M.A., K.M. Soliman, R.A. Jorgensen and R.W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81: 8014-8018.
26. Shannon, C. E., and W. Weaver. 1949. The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana, IL, USA.
27. Ssendege, G., T. Obua, R. Kawuki, M. Maphosa and T.P. Tukamuhabwa. 2015. Soybean genetic diversity and resistance to soybean rust disease in Uganda. *Agricultural Journal*, 10(3-6): 17-23.

28. Sun, B., C. Fu, C. Yang, Q. Ma, D. Pan and H. Nian. 2013. Genetic diversity of wild soybeans from some regions of southern China based on SSR and SRAP markers. American Journal of Plant Sciences, 4: 257-268.
29. Tantasawat, P., J. Trongchuen, T. Prajongjai, S. Jenweerawat and W. Chaowiset. 2011. SSR analysis of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). Genetic relationship and variety identification in Thailand. Australian Journal of Crop Science, 5(3): 283-290.
30. Tommasini, L., J. Batley, G.M. Arnold, R.J. Cooke, P. Donini, D. Lee, J.R. Law, C. Lowe, C. Moule, M. Trick and K.J. Edwards. 2003. The development of multiplex simple sequence repeats (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus* L.) varieties. Theoretical and Applied Genetics, 106: 1091-1101.
31. Wang, M., R.Z. Li, W.M. Yang and W.J. Du. 2010. Assessing the genetic diversity of cultivars and wild soybeans using SSR markers. African Journal of Biotechnology, 9: 4857-4866.
32. Zhang, G. W., S. C. Xu, W. H. Mao, Q. Z. Hu, and Y. M. Gong. 2013. Determination of the genetic diversity of vegetable soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] using EST-SSR markers. Journal of Zhejiang University Science, 4: 279-288.
33. Zulj Mihaljevic, M., H. Sarcevic, A. Lovric, Z. Andrijanic, A. Sudaric, G. Jukic and I. Pejic. 2020. Genetic diversity of European commercial soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] germplasm revealed by SSR markers. Genetic Resources and Crop Evolution, 67: 1587-1600.

## Evaluation of Allelic Diversity in Soybean Breeding lines (*Glycine max*, L) using Microsatellite markers (SSR)

Hamid Reza Babaei

Research Assistant of Professor of Horticulture Crops Research Department, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran,  
(Corresponding Author: 30241hrbabaei@gmail.com)  
Received: 13 February, 2021 Accepted: 22 November, 2021

### Extended Abstract

**Introduction and Objective:** Due to the limitation of morphologically distinguishing features that are not dependent on the environment and their Appearance forms, recognition and selection among similar lines for breeders will be associated with problems. Therefore, the use of molecular markers as a complementary method for assessing agronomic properties will be useful in identifying and selecting superior breeding lines. The aim of this study was to investigate the genetic differences of advanced soybean breeding lines to select the desired lines and eliminate duplicate lines.

**Materials and Methods:** in Karaj in 2013, 64 F7 generation soybean lines were planted in the greenhouse and at the appropriate time, leaf samples were taken from the seedlings of the lines and DNA samples were extracted. The resulting DNA solution was used for quantification and quality and preparation of appropriate concentration for polymerase chain reaction (PCR) by 20 microsatellite markers. After determining the genotype of the lines by polymorphic markers, Scoring genetic bands, Statistical analysis was performed using genetic data to estimate the genetic diversity indices including the number of observed and effective alleles, heterozygosity and homozygosity percentage, polymorphic information content and Shannon index. Also, for grouping the studied lines, cluster analysis by neighborhood connection method and simple similarity coefficient were used, and analysis by principal coordinates was used to check the accuracy of cluster analysis results.

**Results:** Based on the results of 20 microsatellite markers used to determine genetic diversity, 14 polymorphic markers showed. A total of 41 alleles were identified for gene loci, with the average number of alleles observed for each gene locus being 2.93 and the average number of effective alleles being 2.36. The range of Shannon (I) index ranged from 0.29 to 1.56 and the range of polymorphic information content (PIC) ranged from 0.78 to 0.16. Based on the measured genetic diversity indices, Sat\_218 and Sat\_117 markers had higher differentiation power. The cluster analysis divided the breeding lines into four groups and eight subgroups. The first three components of the principal coordinate analysis accounted for 36.6% of the total variance of the changes. The three-dimensional diagram divided the breeding lines into four groups, which was compatible relatively well with the clustering resulting from the cluster analysis.

**Conclusion:** In general, the results of the present study showed that the markers used had acceptable polymorphism and Sat\_218 and Sat\_117 markers had a higher ability to differentiate between genotypes and reveal allelic diversity. Therefore, molecular markers had the necessary efficiency to evaluate and select superior breeding lines in advanced generations.

**Key word:** Cluster analysis, number of effective alleles ( $A_e$ ), Principal components analysis and Shannon index (I), Polymorphic information content (PIC)