علوم و تحقیقات بذر ایران
سال نهم/ شماره دوم/ ۱۴۰۱ (۲۹ - ۱۳)
مقاله پژوهشی
DOI: 10.22124/jms.2022.6149

گروه‌بندی برخی ژنوتیپ‌های سویا با تیمارهای مختلف تنش شوری در مرحله جوانه‌زنی بذر و استفاده از نشانگر مولکولی برای بررسی تنوع ژنتیکی

مهدی پرکار[۱]، محمد محسن‌زاده گلفزانی[۲*]، سید حسن حسنی کومله[۳]، حبیب الله سمیع‌زاده لاهیجی[۴]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۵/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۷/۲۶

چکیده

در این تحقیق کارآیی ۱۱ نشانگر ISSR، دو نشانگر رتروترانسپوزون و ۱۵ نشانگر ترکیبی ISSR + رتروترانسپوزون (REMAP) در ۲۷ ژنوتیپ سویا، مورد ارزیابی قرار گرفتند. از ۲۸ آغازگر تعداد ۱۳۰ نوار چندشکل به‌دست آمد. بیش‌ترین درصد چندشکلی به‌دست آمده ۷۷ درصد برای UBC808 در نشان‌گرهای ISSR، ۵۴ درصد برای TOS-2 در نشانگرهای رتروترانسپوزون و درصد چندشکلی در آغازگرهای ترکیبی در آغازگر UBC808+TOS-1، ۷۰ درصد به‌دست آمد. بالا بودن معیارهای تنوع ژنی نی، شاخص شانون و میزان PIC برای آغازگرهای UBC825، UBC811، TOS-2، HB-12، UBC834+TOS-1، UBC807+TOS-1، UBC807+TOS-2 و UBC808 نشان‌دهنده کارآیی بالای این آغازگرها در ارزیابی تنوع ژنتیکی در این تحقیق می‌باشد. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای داده‌های مولکولی به‌روش دورترین همسایه با استفاده از ترکیب داده‌های نشانگرها ۲۷ ژنوتیپ را در چهار گروه قرار داد، گروه‌ها به‌ترتیب شامل چهار، نه، نه و پنج ژنوتیپ بود. تجزیه تابع تشخیص به‌روش خطی فیشر نشان داد که روش دورترین همسایه ژنوتیپ‌ها را با دقت ۹۶/۳ درصد جداسازی کرد. خصوصیات جوانه‌زنی بذر ژنوتیپ‌های سویا در سطوح مختلف تنش شاهد، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی‌مولار NaCl در آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی ارزیابی شد. نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین ارقام، سطوح تنش از نظر تمامی صفات جوانه‌زنی اندازه‌گیری شده و برای اثر متقابل رقم×تنش برای تمامی صفات به‌غیر از صفات وزن تر ساقه‌چه، وزن خشک ساقه‌چه، وزن خشک ریشه‌چه و تفاوت وزن تر و خشک ساقه‌چه وجود داشت. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای داده‌های جوانه‌زنی به‌روش دورترین همسایه با معیار فاصله اقلیدوسی، ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را نیز در چهار گروه مجزا قرار داد. نتایج حاصل از تجزیه تابع تشخیص نشان داد که صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای ۹۲/۶ درصد می‌باشد. همبستگی بین دو ماتریس تشابه داده‌های جوانه‌زنی و مولکولی توسط آزمون مانتل معنی‌دار نبود. تجزیه و تحلیل ارتباط نشانگر با صفات جوانه‌زنی نشان داد باندهایی که موجب افزایش میانگین صفات مرتبط با تحمل به تنش شوری می‌شوند، می‌توانند برای شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل سویا استفاده شوند.

واژه‌های کلیدی: تجزیه خوشه‌ای، چندشکلی، رتروترانسپوزون، ISSR، PIC

۱- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان. رشت، ایران. taktirandaz.0131@gmail.com
۲- استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. mohsenzadeh.mohamad@guilan.ac.ir
۳- دانشیار، بیوشیمی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. kumleh@yahoo.com
۴- استاد، بیوتکنولوژی گیاهی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. hsamizadeh@guilan.ac.ir
*نویسنده مسئول: mohsenzadeh.mohamad@guilan.ac.ir

مقدمه

سویا با نام علمی (*Glycine max* L.) گیاهی یک‌ساله، دولپه و علفی و از گیاهان مهم زراعی و با ارزش تغذیه‌ای بالا می‌باشد، از این جهت شناسایی منابع ژنتیکی اولیه و تلاش در ایجاد ذخایر ژنتیکی با ارزش جدید می‌تواند ارزش اصلاحی بالایی داشته باشد. تنوع ژنتیکی به‌منزله ماده اولیه فعالیت‌های اصلاح نباتات است و نتایج حاصل از بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای مولکولی نشان می‌دهد که تنوع ژنتیکی در گیاه سویا نسبت به سایر گیاهان کم‌تر است (Younessi *et al.,* 2012). تنش‌های غیرزیستی شامل محدوده‌ای از عوامل محیطی از جمله خشکی، شوری، سرما، گرما و غیره می‌باشند که از طریق سازوکارهای مختلفی باعث کاهش عملکرد می‌شوند. تنش آبی، خشکی و شوری مهم‌ترین عوامل محدودکننده عملکرد در شرایط محیطی نواحی نیمه‌خشک می‌باشند. شوری خاک به‌تنهایی حدود ۳۴۰ میلیون هکتار از اراضی زراعی را تحت تأثیر قرار داده است. سمیت ناشی از سدیم در زمان نمو بافت گیاهچه حادث می‌شود. در یک بررسی آستانه تحمل به شوری درصد تندش در حدود ۰/۴۳ مولار برآورد شد. (Farokhi and Ghaleshi, 2005). تنش شوری روی گیاهان باعث کاهش میزان شاخص سطح برگ (LAI) می‌شود، به‌دنبال کاهش سطح برگ و پدیده زردشدن و ریزش برگ‌ها در اثر شوری، شاخص سطح برگ نیز کاهش می‌یابد (Drazkiewicz, 1994). با بررسی تأثیر تنش شوری بر رشد ارقام سویا گزارش شد که با افزایش شوری سطح برگ، وزن خشک قسمت هوایی و ریشه کاهش می‌یابد. خان و همکاران (Khan *et al*., 2009) با بررسی تغییرات مورفولوژیک دو ژنوتیپ سویا تحت تنش شوری بیان کردند که فاکتورهای رشد شامل طول، وزن تر و خشک گیاهان تحت تأثیر قرار گرفته و کاهش می‌یابد. بورگلز و همکاران (Bourgeais-Chaillou *et al*., 1992) نتیجه گرفتند که وزن ریشه و ساقه گیاه سویا با افزایش غلظت شوری کاهش می‌یابد.

سیتوا و همکاران (Seitova *et al*., 2004)، ۲۰۰ ژنوتیپ سویای زراعی و وحشی را توسط شش نشانگر RAPD مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که درصد پلی‌مورفیسم در سویای وحشی به‌طور قابل ملاحظه‌ای بالاتر از سویای زراعی بود. به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی ۴۵ ژنوتیپ سویای مورد کشت در ایران، از دو نوع نشانگر مولکولی RAPD و ISJ استفاده شد (Panjoo *et al*., 2014). در این مطالعه از ده آغازگر RAPD در مجموع ۱۰۳ باند قابل امتیازدهی را تکثیر نمودند که ۶۰ درصد آن‌ها چندشکل بودند. از طرف دیگر ۱۵ آغازگر ISJ در مجموع ۱۲۹ باند مشخص تولید کردند که ۸۷ درصد آن‌ها چندشکل بودند. تجزیه کلاستر به روش UPGMA و ضریب تطابق ساده ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را در هفت گروه قرار داد. در پژوهش دیگر به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی در ۴۸ ژنوتیپ سویا، تکثیر مکان‌های ژنی با استفاده از ۱۰ آغازگر ISSR انجام شد (Malekmohamadi *et al*., 2017). از تعداد ۶۸ قطعه‌ای که در کل ارقام تولید شد، ۳۴ قطعه چندشکل بودند. تعداد باندهای چندشکل از دو تا پنج به ازای هر آغازگر متفاوت بود. آن‌ها اعلام کردند ۴۸ ژنوتیپ مورد مطالعه با استفاده از تجزیه‌ی خوشه‌ای به‌روش UPGAM و ضریب تشابه جاکارد در چهار گروه مجزا گروه‌بندی شدند و اظهار داشتند نشانگر ISSR سیستم نشانگری قابل اطمینان برای آشکارسازی سطح بالایی از چندشکلی است و می‌توان از آن در بررسی تنوع ژنتیکی و انجام برنامه‌های اصلاحی در سویا استفاده نمود. در بررسی که شاه‌نجات بوشهری (Shahnejat Bushehry, 2003) روی تنوع ژنتیکی ۲۱ رقم زراعی سویا با آغازگرهای RAPD و DAF انجام دادند، تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها را در دو دندروگرام در سه گروه مشخص تقسیم کرد و نشان داد که تشابه بین ارقام بالا بوده و تنوع قابل ملاحظه‌ای بین آن‌ها وجود نداشت.

با توجه به اهمیت موضوع تحمل گیاهان به تنش‌های غیرزیستی به‌خصوص تنش شوری، این تحقیق به‌دنبال تعیین تنوع و جداسازی ۲۷ ژنوتیپ سویا با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR و رتروترانسپوزون و صفات جوانه‌زنی بذر و هم‌چنین ارزیابی واکنش ژنوتیپ‌های سویا به تنش شوری در مرحله جوانه‌زنی و شناسایی ارقام متحمل با بهره‌گیری از روش‌های پیشرفته آماری انجام شد. آگاهی از وجود تنوع در ژرم‌پلاسم و ارتباط ژنتیکی در میان ژنوتیپ‌ها کمک بزرگی در استراتژی‌های توسعه محصولات به‌شمار می‌رود، علاوه بر این تعیین و تشخیص ژنوتیپ‌هایی که هیبرید آن‌ها هتروزیس بالایی دارد برای اصلاح‌گر از اهمیت به‌سزایی برخوردار خواهد بود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، ۲۷ ژنوتیپ سویا از بانک ژن مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج (جدول ۱) برای بررسی مورد استفاده قرار گرفت.

ارزیابی صفات مورفولوژی مربوط به جوانه‌زنی

به‌منظور تعیین اثر تنش شوری بر صفات جوانه‌زنی ژنوتیپ‌های سویا، آزمایشی در قالب یک آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد و در آن ۲۷ ژنوتیپ سویا در چهار سطح تیمار شوری شامل صفر (شاهد و با آب مقطر)، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی‌مولار NaCl مورد مطالعه قرار گرفتند. برای این کار ابتدا بذرها در هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد و سپس بذرها چند بار با آب مقطر شستشو داده شدند. سپس بذور در داخل پتری‌دیش با ابعاد ۱۰ سانتی‌متر بر روی کاغذ صافی قرار داده شد.

جدول ۱- اسامی ژنوتیپ‌های سویا مورد مطالعه در این تحقیق

Table 1. Name of soybean genotypes studied in this experiment

ردیف No.	اسم ژنوتیپ Genotype	ردیف No.	اسم ژنوتیپ Genotype
1	Williams	15	Sahar
2	Zon	16	Tena
3	2001	17	Davis and Willliams
4	M.7	18	Tisa
5	033	19	DI.74
6	2002	20	LH.2500
7	Sari	21	032
8	M9	22	Linford
9	L17	23	Saland
10	Katool	24	DI.41
11	Clean	25	Boutng
12	BP	26	Zara
13	Mercury	27	Hamilton and Essex
14	MS12		

پتری‌دیش‌ها به انکوباتور با دمای ۲۱ درجه سلسیوس و دوره روشنایی ۱۴/۱۰ ساعت (روز/شب) به‌منظور فعال شدن بذر و آغاز جوانه‌زنی منتقل شد. ارزیابی جوانه‌زنی بعد از ۲۴ ساعت صورت گرفت و این عمل تا زمانی که تمامی بذور جوانه زده و یا قادر به جوانه‌زنی نبودند ادامه یافت. زمانی که طول ریشه‌چه در حدود دو میلی‌متر و یا کمی بیش‌تر بود به هر پتری‌دیش ۱۰ میلی‌لیتر محلول تهیه شده با NaCl به روش نیاکان و همکاران (Niakan *et al.*, 2008) بسته به غلظت هر تیمار اضافه شد. برای به‌دست آوردن غلظت‌های ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی‌مولار NaCl توسط (رابطه ۱) مقدار مورد نیاز محاسبه شد.

$$N_1V_1=N_2V_2 \quad \text{(رابطه ۱)}$$

که در آن N_1 غلظت محلول اولیه NaCl (یک مولار)، V_1 حجم لازم از محلول NaCl یک مولار، N_2 غلظت‌های مورد نیاز از محلول NaCl برای سطوح مختلف تنش شوری (۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی‌مولار) و V_2 حجم نهایی محلول NaCl موردنیاز برای استفاده در اعمال تنش شوری می‌باشد.

پس از گذشت سه روز از اعمال اولین مرحله تنش شوری، طول ریشه‌چه و ساقه‌چه نمونه‌ها با استفاده از کاغذ مدرج و عکس‌گرفتن توسط دوربین دیجیتال و آنالیز عکس‌ها توسط نرم‌افزار مهندسی Image-J طی سه مرحله به فواصل زمانی شش، نه و ۱۲ روز پس از اولین کشت اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری سرعت رشد ساقه‌چه و ریشه‌چه پس از آخرین مرحله اندازه‌گیری طول ساقه‌چه و ریشه‌چه توسط (رابطه ۲) محاسبه شد.

$$GR=\Sigma\frac{Li}{Di} \quad \text{(رابطه ۲)}$$

که در آن GR سرعت رشد، Li طول ساقه‌چه یا ریشه‌چه در روز اندازه‌گیری و Di تعداد روز از ابتدای کشت می‌باشد.

اندازه‌گیری وزن تر و وزن خشک گیاهچه: در پایان وزن تر نمونه‌ها با استفاده از ترازو دقیق اندازه‌گیری شد، سپس آن‌ها را در داخل فویل آلومینیومی پیچانده و به‌مدت ۷۲ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سلسیوس قرار داده تا خشک شوند. سپس وزن خشک آن‌ها اندازه‌گیری شد. ضریب آلومتری از نسبت طول ریشه‌چه به طول ساقه‌چه محاسبه شد (Scott *et al*., 1984).

به‌منظور تعیین وجود اختلاف معنی‌دار بین ژنوتیپ‌های سویا و هم‌چنین اثر متقابل ژنوتیپ و تنش شوری بر صفات اندازه‌گیری شده، تجزیه واریانس داده‌ها به‌صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. برای این منظور از نرم‌افزار SAS 9.00 استفاده شد. برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌های سویا، بر اساس صفات جوانه‌زنی اندازه‌گیری‌شده از تجزیه خوشه‌ای استفاده شد. به این ترتیب که هرکدام از ژنوتیپ‌ها در چهار سطح تنش شوری (شاهد، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی‌مولار NaCl) به‌ترتیب با ۱، ۲، ۳ و ۴ نام‌گذاری شد و ژنوتیپ‌های مختلف سویا در سطوح مختلف تنش شوری به‌عنوان یک تیمار در نظر گرفته شد و گروه‌بندی تیمارها در سطوح مختلف انجام شد. برای انجام تجزیه خوشه‌ای فاصله بین ژنوتیپ‌ها از روش فاصله اقلیدوسی استفاده شد. روش‌های مختلف تجزیه خوشه‌ای شامل ادغام بر مبنای متوسط فاصله بین گروه‌ها (UPGMA)، ادغام بر اساس نزدیک‌ترین همسایه‌ها (SL)، دورترین همسایه (CL) و حداقل واریانس وارد (Ward) با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام شد. برای آزمون صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای و برآورد میزان انتساب اشتباه ارقام به گروه‌ها از تجزیه تابع تشخیص استفاده شد. به این ترتیب که گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای و ژنوتیپ‌های موجود در هر گروه به‌عنوان گروه‌بندی اولیه در نظر گرفته شد و با استفاده از تجزیه تابع تشخیص به‌روش خطی فیشر، صحت گروه‌بندی اولیه مورد آزمون قرار گرفت. تجزیه تابع تشخیص با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام شد.

ارزیابی مولکولی

در این تحقیق از ۳۰ آغازگر شامل ۱۲ آغازگر ISSR و سه آغازگر رتروترانسپوزون و ۱۵ نشانگر ترکیبی REMAP استفاده شد (جدول ۲). به‌منظور تهیه نمونه های برگی و استخراج DNA بذرهای هر یک از ژنوتیپ‌ها مجددا در گلدان‌های پلاستیکی به ابعاد ۵×۱۰×۷ سانتی‌متر با خاک مناسب در گلخانه دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان کشت شد. پس از شش تا هشت برگی‌شدن گیاه (حدوداً چهار هفته)، نمونه‌برداری از برگ‌های جوان صورت گرفت نمونه‌های برگی تا زمان استخراج DNA به فریزر ۷۰- منتقل شدند. به‌منظور استخراج DNA برگ‌های جوان (حدود ۰/۴ تا ۰/۷ گرم) را در هاون چینی گذاشته و با افزودن نیتروژن مایع به‌خوبی پودر گردید. جهت استخراج DNA از روش CTAB با اندکی تغییرات استفاده شد (Saghai-Maroof *et al*., 1984). به‌منظور تعیین کمیت و کیفیت DNA در نمونه‌های استخراج‌شده، از ژل آگارز یک درصد و اسپکتروفوتومتری استفاده شد.

واکنش PCR در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل ۳۰ تا۴۰ نانوگرم DNA الگو، ۰/۱ میلی‌مول dNTP، ۰/۳ میلی‌مول آغازگر، ۱/۵ میلی‌مول $MgCl_2$، بافر 1X PCR و ۱ واحد آنزیم Taqپلیمراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر Biometra انجام شد (Mohsenzadeh Golfazani *et al*., 2016, Mohsenzadeh Golfazani *et al*., 2012).

چرخه حرارتی شامل چهار دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس، سپس ۳۵ سیکل به‌صورت ۴۰ ثانیه واسرشته‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس، ۴۰ ثانیه مرحله اتصال آغازگر در دمای Tm، دو دقیقه مرحله بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و پنج دقیقه بسط انتهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس، سپس نگه‌داری در دمای چهار درجه سلسیوس بود. دمای بهینه برای اتصال هر آغازگر در طی واکنش PCR، با تعریف کرد محدوده دمایی چهار درجه سلسیوس پایین‌تر از دمای Tm و سه درجه سلسیوس بالاتر از دمای Tm برای دستگاه ترموسایکلر دارای بلوک‌های شیب دمایی، بر اساس دمای Tm ارائه‌شده توسط شرکت Generay Biotech برای آغازگرهای ISSR و شرکت سینا ژن برای آغازگرهای رتروترانسپوزون تعریف شد (جدول ۲). به‌منظور الکتروفورز محصول PCR و آشکارسازی DNA تکثیرشده برای نشانگرها از ژل آگارز ۱/۵ درصد و با ولتاژ ثابت ۸۰ وات به‌مدت ۹۰ دقیقه انجام شد.

الگوی باندی بر اساس وجود یا عدم وجود باندها به‌ترتیب با یک و صفر نمره‌دهی شدند. داده‌های حاصل به‌صورت یک ماتریس ۲۷×۱۱۳۰ وارد نرم‌افزار Excel شد که در آن ۲۷ تعداد ژنوتیپ سویا و ۱۳۰ تعداد باند مشاهده شده بود.

جدول ۲- لیست آغازگرها، توالی و دمای اتصال آغازگرهای ISSR و رتروترانسپوزن مورد استفاده

Table 2. List of primers, primer sequence, annealing temperature of ISSR and Retrotransposons

	ردیف No.	آغازگر Primer	توالی Sequence	دمای اتصال Annealing temperature (°C)
ISSR	1	UBC8736	$(AC)_8A$	43
	2	UBC827	$(AC)_8G$	50
	3	UBC834	$(AC)_8C$	48/5
	4	UBC807	$(AG)_8T$	43
	5	UBC808	$(AG)_8C$	45
	6	UBC825	$(AC)_8T$	48
	7	UBC811	$(GA)_8C$	42
	8	UBC809	$(AG)_8G$	44
	9	UBC810	$(GA)_8T$	47/5
	10	UBC821	$(GT)_8T$	47/5
	11	UBC822	$(TC)_8A$	43
	12	HB12	$(CAC)_3GC$	43
Retrotransposons	13	TOS-1	TGTTGGGAATAGTCCCACA	61
	14	TOS-2	TGTTGAATAGTTCCACATT	52
	15	TOS-3	TGTTAGAAGTATAATATGT	43
REMAP	16	HB-12+TOS-1		43
	17	UBC809+TOS-1		44
	18	UBC810+TOS-1		48
	19	UBC807+TOS-1		43
	20	UBC822+TOS-1		42
	21	UBC808+TOS-1		45
	22	HB-12+TOS-2		43
	23	UBC834+TOS-1		49
	24	UBC825+TOS-1		48
	25	UBC808+TOS-2		45
	26	UBC807+TOS-2		43
	27	UBC822+TOS-2		43
	28	UBC809+TOS-2		44
	29	UBC810+TOS-2		48
	30	UBC811+TOS-2		43

درصد جایگاه‌های چندشکل در هر آغازگر به‌عنوان شاخصی از توانایی آغازگر در ایجاد چندشکلی و تمایز بین جدایه‌ها برای هر آغازگر محاسبه شد. درصد چندشکلی در هر آغازگر برای ژنوتیپ‌های مورد مطالعه از طریق تقسیم تعداد باندهای چندشکل بر تعداد کل باندهای تکثیر شده برای هر آغازگر به‌دست آمد.

محتوای اطلاعات چندشکل یک نشانگر[1] (PIC)، از رابطه ۳ و با استفاده از نرم‌افزار Excel محاسبه شد که در

[1] - Polymorphism Information Content

این رابطه Pi فراوانی آلل iام و n تعداد آلل‌هاست (Mohsenzadeh Golfazani *et al*., 2012).

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^{n} p_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^{n} 2p_i^2 p_j^2$$ (رابطه ۳)

تعداد آلل‌های مؤثر، شاخص شانون، تعیین تنوع ژنی نی با استفاده از نرم‌افزار POPGEN نسخه ۱/۳۱ تعیین گردید. تجزیه به مختصات اصلی با استفاده از نرم‌افزار GenStat نسخه ۱۲ انجام شد. جهت گروه‌بندی ارقام ابتدا تفاوت‌های و مشابهت ارقام بر اساس داده‌های مولکولی با روش تطابق ساده تهیه و گروه‌بندی ارقام با استفاده از روش‌های مختلف حداقل واریانس وارد، دورترین همسایه‌ها، UPGMA، متوسط فاصله بین و درون کلاسترها، مرکزی، میانه‌ای و نزدیک‌ترین همسایه‌ها رسم شد. از بین این روش‌ها دورترین همسایه‌ها بهترین روش و بیش‌ترین ضریب همبستگی کوفنتیک را داشت. دندروگرام با استفاده از نرم‌افزار NTSYS 2.02 رسم شد. جهت مطرح نمودن این‌که دندروگرام حاصل از ماتریس داده‌ها تا چه حد توانسته ماتریس داده‌ها و ساختار جمعیت را توجیه کند از ضریب همبستگی کوفنتیک استفاده شد. برای محاسبه ضریب همبستگی کوفنتیک، دندروگرام به معادل آن تبدیل می‌شود. این معادل را ماتریس کوفنتیک گویند. بعد از به‌دست آوردن ماتریس کوفنتیک ماتریس فاصله یا شباهت اولیه با ماتریس همبستگی حاصل از برگردان دندروگرام مقایسه می‌شد. بالابودن ضریب همبستگی کوفنتیک به مفهوم وجود همبستگی بین دندروگرام و ماتریس فاصله یا شباهت همبستگی وجود دارد. تعیین ضریب همبستگی کوفنتیک با نرم‌افزار NTSYS 2.02 انجام شد. تجزیه تابع تشخیص به بررسی میزان تمایز گروه‌های موجود و یا از قبل تشکیل شده از لحاظ اندازه‌گیری‌های انجام‌شده می‌پردازد و میزان صحت و یا اشتباه گروه‌بندی موجود را ارزیابی می‌کند. جهت بررسی صحت گروه‌بندی انجام‌شده توسط تجزیه خوشه‌ای، با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ انجام شد.

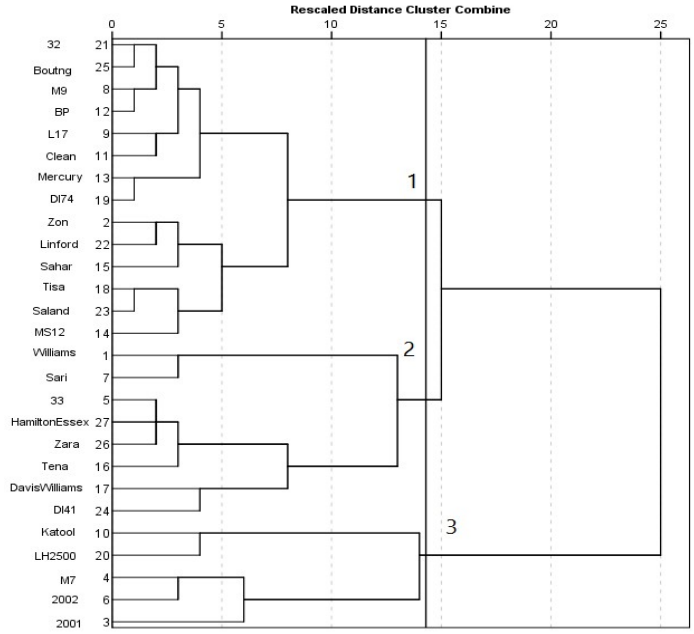
ارتباط نشانگرهای مولکولی و صفات جوانه‌زنی

به‌منظور بررسی توانایی نشانگرها در جداسازی ژنوتیپ‌ها، از نظر صفات جوانه‌زنی مورد بررسی در شرایط تنش با استفاده از ۲۸ نشانگر ISSR، رتروترانسپوزون و ترکیب رتروترانسپوزون و ISSR بر روی ۲۷ ژنوتیپ سویا، ۱۳۰ باند تولید شد که نقش وجود یا عدم وجود باند در کاهش یا افزایش میانگین صفات اندازه‌گیری‌شده در ژنوتیپ‌ها با استفاده از برنامه‌ی Proc Anova در برنامه SAS بررسی شد. در این بررسی تنش ۹۰ میلی‌مولار NaCl به‌عنوان شاخص شوری برای تنش‌های بالا در نظر گرفته شد. هم‌چنین به‌منظور به‌دست آوردن همبستگی بین دو ماتریس تشابه داده‌های جوانه‌زنی و مولکولی توسط آزمون مانتل با نرم‌افزار GenStat نسخه ۱۲ انجام شد که نتایج نشان داد این ارتباط معنی‌دار نبود.

نتایج و بحث

ارزیابی صفات مورفولوژی مربوط به جوانه‌زنی

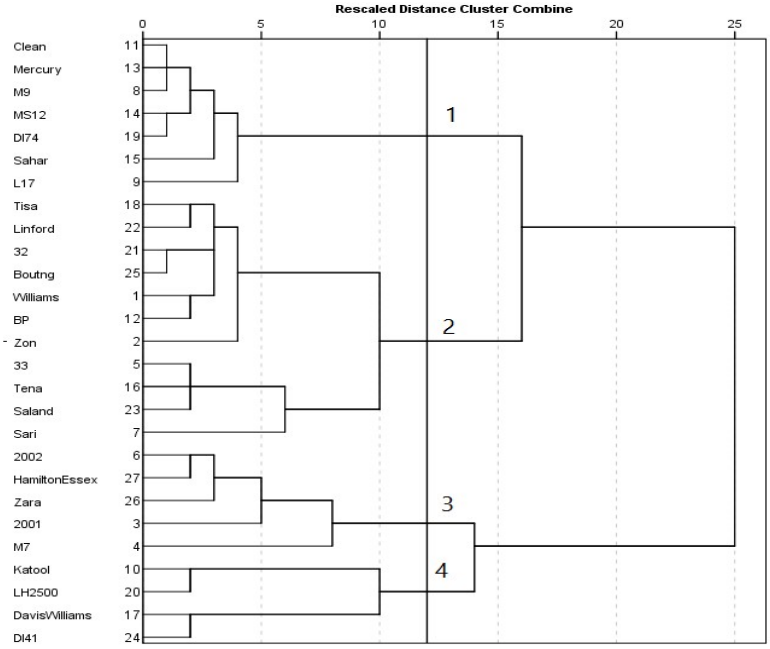
نتایج حاصل از تجزیه واریانس بر اساس آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین ژنوتیپ‌ها و سطوح تنش برای کلیه صفات مطالعه‌شده در سطح احتمال یک درصد وجود دارد (نتایج نشان داده نشد). هم‌چنین برای اثر متقابل ژنوتیپ × تنش شوری نیز برای کلیه صفات به‌غیر از صفات وزن تر ساقه‌چه، وزن خشک ساقه‌چه، وزن خشک ریشه‌چه و تفاوت وزن تر و خشک ساقه‌چه نیز تفاوت معنی‌داری مشاهده شد. معنی‌دار شدن اثر متقابل ژنوتیپ در تنش نشان می‌دهد که واکنش ژنوتیپ‌ها در سطوح تنش شوری مورد مطالعه یکسان نبوده و ژنوتیپ‌ها واکنش‌های متفاوتی در سطوح مختلف تنش‌های شوری دا شتند. در تنش ۶۰ میلی‌مولار نیز ژنوتیپ‌ها در سه گروه قرار گرفتند (شکل ۱)، در گروه اول ژنوتیپ های 32، M9، Boutng، L17، Linford، Zon، DI74، Mercury، Clean،Bp، Sahar، Tisa، Saland، Ms12 در گروه دوم ژنوتیپ‌های Williams، Sari، 33، Hamilton&Essex، Zara، Tena، Davis&Williams و DI41 و در گروه سوم ژنوتیپ های Katool، LH2500، M7، 2001 و 2002 قرار گرفتند. در تنش ۹۰ میلی‌مولار ژنوتیپ ها در چهار گروه قرار گرفتند (شکل ۲). در گروه اول ژنوتیپ های 2001، Clean، Mercury، Ms12، M9، DI74، L17 و Sahar، قرار گرفتند.



شکل ۱- گروه‌بندی ژنوتیپ‌های سویا بر اساس صفات جوانه‌زنی مورد ارزیابی و معیار فاصله اقلیدوسی و روش دورترین فاصله بر مبنای تنش ۶۰ میلی‌مولار NaCl

Figure 1. Cluster analysis of soybean genotypes based on Euclidean distance with on complete linkage method in 60 mM NaCl

در گروه دوم ژنوتیپ‌های Tisa، Zon، 32، Linford، Boutng، Williams، Bp، 33، Tena، Sari و Saland، گروه سوم شامل ژنوتیپ‌های 2002، Hamilton and Essex، Zara، 2001 و M7 و در گروه چهارم ژنوتیپ‌های Katool، LH2500، Davis and Williams و DI41 قرار گرفتند.



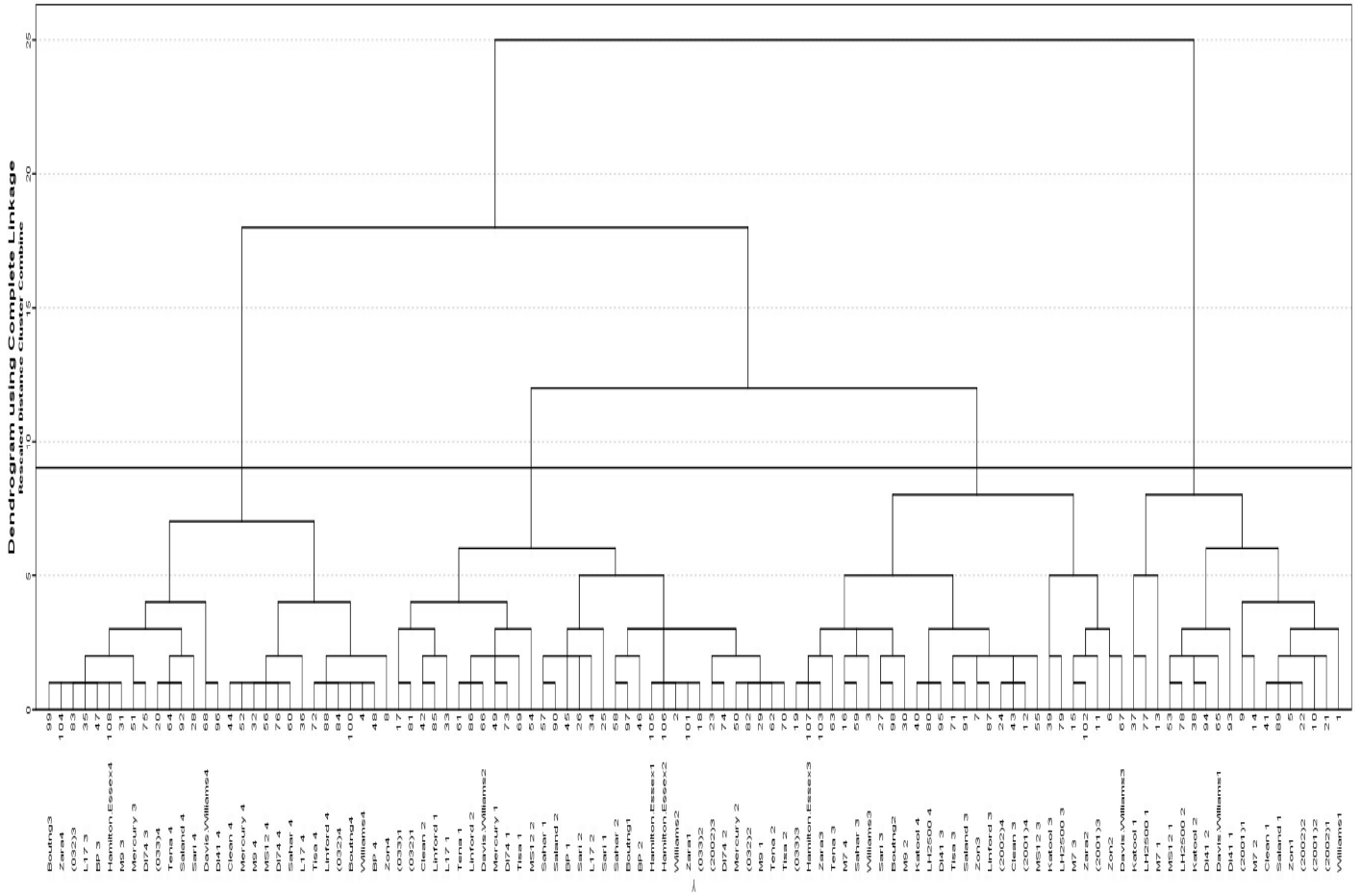
شکل ۲- گروه‌بندی ژنوتیپ‌های سویا بر اساس صفات جوانه‌زنی مورد ارزیابی و معیار فاصله اقلیدوسی و روش دورترین فاصله بر مبنای تنش ۹۰ میلی‌مولار NaCl

Figure 2. Cluster analysis of soybean genotypes based on Euclidean distance with on complete linkage method in 90 mM NaCl

مطالعه نتایج حاصل از تجزیه‌های مختلف کلاستر در سطوح تنش شوری نشان داد که ژنوتیپ‌های مانند DI41، M7، 2001، 2002، Katool و LH2500 در سطوح مختلف تنش در یک گروه قرار گرفته و این موضوع می‌تواند بیانگر این باشد که این ژنوتیپ‌ها در تیمارهای مختلف از نظر رشدی تغییرات چندانی نخواهد داشت. به‌عبارتی ژنوتیپ‌ها هم‌چون Katool، 2001، DI41، M7، 2002، LH2500 در کلیه سطوح تنش به‌خصوص سطوح ۶۰ و ۹۰ میلی‌مولار برای اکثر صفات به‌ویژه صفات مربوط به طول ریشه‌چه و ساقه‌چه بیش‌ترین میانگین صفات را داشته و به‌عنوان ژنوتیپ‌های متحمل سویا معرفی شدند و هم‌چنین رقم‌هایی مانند زان، Boutng، M9، L17، BP و Mercury در سطوح مختلف تنش به‌خصوص سطوح ۶۰ و ۹۰ میلی‌مولار دارای میانگین صفات کم‌تری بودند و به‌عنوان ژنوتیپ‌های حساس سویا معرفی شدند. برای این‌که ایده‌ای از میزان شباهت‌ها و تفاوت‌های بین ۲۷ ژنوتیپ مورد مطالعه از نظر صفات اندازه‌گیری‌شده در مجموع چهار سطح تنش شوری به‌دست آید، تجزیه خوشه‌ای به‌روش دورترین همسایه و با معیار فاصله اقلیدوسی انجام شد و ژنوتیپ‌ها در چهار گروه، گروه‌بندی شدند (شکل ۳). بر اساس دندروگرام ژنوتیپ‌های Williams، Zon، 2001، M.7، 2002، Katool، Clean، MS12، Davis and Willliams، LH.2500، Saland، DI41 برای تیمار شاهد در گروه اول قرار گرفتند هم‌چنین ژنوتیپ‌های 2001، M.7، 2002، Katool، Clean، LH.2500 و DI41 در تیمار ۳۰ میلی‌مولار NaCl نیز در کنار این ژنوتیپ‌ها در این خوشه قرار گرفتند که بیانگر این است که این ارقام در شرایط تیماری ذکر شده عملکرد و خصوصیات نزدیک به‌هم داشتند. در گروه دوم ژنوتیپ‌های Williams، Zon، 2001، M.7، 033، Sari، Katool، Clean، MS12، Sahar، Tena، Davis and Willliams، Tisa، LH.2500، Linford، Saland، DI41، Zara و Hamilton and Essex از تیمار ۶۰ میلی‌مولار، ژنوتیپ‌های M9، Boutng و Zara از در تیمار ۳۰ میلی‌مولار و ژنوتیپ‌های 2001، M.7، 2002، Katool و LH.2500 از تیمار ۹۰ میلی‌مولار NaCl قرار داشتند. گروه سوم شامل ژنوتیپ‌های Williams، 033، Sari، Boutng، M9، L17، BP، Mercury، Sahar، Tena، Tisa، DI74، 032، Linford، Zara، Hamilton and Essex از تیمار شاهد، ژنوتیپ‌های Williams، Sari، L17، Clean، Mercury، MS12، Sahar، Tena، Davis and Willliams، Tisa، DI74، 032، Linford، Saland، Hamilton and Essex از تیمار ۶۰ میلی‌مولار و ژنوتیپ‌های 2002، BP و 032 نیز از تیمار ۹۰ میلی‌مولار NaCl در کنار یکدیگر قرار گرفتند. در گروه چهارم نیز ژنوتیپ‌های BP و 032 از تیمار ۶۰ میلی‌مولار، ژنوتیپ‌های M9، L17، Boutng، Mercury از تیمار ۶۰ میلی‌مولار و ژنوتیپ‌های Williams، Zon، 033، Sari، M9، L17، BP، Mercury، Clean، MS12، Sahar، Tena، Davis and Willliams، Tisa، DI74، 032، Linford، Saland، DI41، Boutng، Zara و Hamilton and Essex در کنار یکدیگر در یک خوشه گروه‌بندی قرار گرفتند. قرار گرفتن این ژنوتیپ‌ها در این گروه‌ها نشان دهنده عکس‌العمل تقریبا مشابه آن‌ها تحت شرایط تیمار شوری می‌باشد، به‌عبارت دیگر از لحاظ صفات جوانه‌زنی به یک میزان تحت تنش قرار گرفتند. به‌منظور شناسایی ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس بر اساس صفات جوانه‌زنی اندازه‌گیری‌شده در چهار سطح تنش، ژنوتیپ‌ها در چهار سطح شاهد، ۳۰، ۶۰ و ۹۰ میلی‌مولار NaCl به‌ترتیب با یک، دو، سه و چهار نام‌گذاری، و بر اساس تنش در چهار گروه گروه‌بندی شدند. صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای توسط تابع تشخیص کانونی به‌روش خطی فیشر ۹۲/۶ درصد بوده است. نسبت موفقیت گروه‌بندی ژنوتیپ‌های سویا درون گروه‌های یک تا چهار با تابع تشخیص به‌ترتیب ۶۳، ۶۶/۷، ۷۱/۸ و ۷۷/۸ بود.

ارزیابی مولکولی

از بین ۱۲ نشانگر ISSR و سه نشانگر رتروترانسپوزون استفاده شده در این پژوهش تعداد ۱۱ نشانگر ISSR و دو نشانگر رتروترانسپوزون در بین ژنوتیپ‌ها چندشکلی نشان دادند و یک نشانگر ISSR (UBC821) و یک نشانگر رتروترانسپوزون (TOS-3) قابلیت امتیازدهی باندها را نداشتند. از مجموع ۱۳ نشانگر چندشکل استفاده‌شده در بین ۲۷ ژنوتیپ ۱۲۹ باند تشکیل شد که ۶۱ عدد از آن‌ها (۴۷/۷۸ درصد) چندشکل بودند.



شکل ۳- گروه‌بندی ژنوتیپ‌های سویا بر اساس صفات جوانه‌زنی مورد ارزیابی و معیار فاصله اقلیدوسی و روش دورترین فاصله

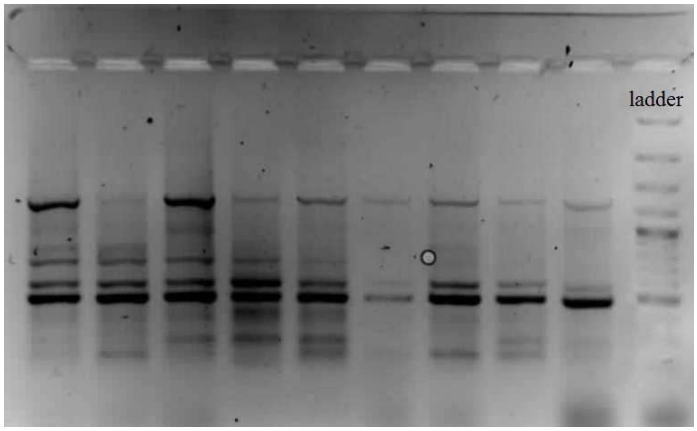
Figure 3. Cluster analysis of soybean genotypes based on Euclidean distance with on complete linkage method

میانگین تعداد باندهای چندشکل به‌ازای هر نشانگر معادل ۳/۶۷ باند بود (جدول ۳). از بین نشانگرهای مورد استفاده، نشانگر UBC8736 با تعداد ۱۴ باند و بعد از آن، نشانگرهایUBC827 و UBC825 با تعداد ۱۲ باند، بیش‌ترین تعداد باند و نشانگرهای UBC810 و UBC822 با تعداد هفت باند، کم‌ترین تعداد را داشتند. تمام نشانگرها چندشکل بودند. بنابراین، توانستند به‌خوبی تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها را نشان دهند و قادر به تفکیک ژنوتیپ‌ها از هم بودند. نشانگرهای UBC873، UBC827 و UBC825 با تعداد باند بیش‌تر، می‌توانند تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های سویا را بهتر نشان دهند. از بین ۱۵ نشانگر ترکیبی استفاده‌شده در این پژوهش تمامی نشانگرها چندشکلی نشان دادند. از مجموع ۱۵ نشانگر چندشکل استفاده‌شده در بین ۲۷ ژنوتیپ ۱۳۹ باند تشکیل شد که ۶۹ عدد از آن‌ها (۴۹/۷۴ درصد) چندشکل بودند. میانگین تعداد باندهای چندشکل به‌ازای هر نشانگر معادل ۳/۳۱ باند بود (جدول ۳).

جدول ۳- تعداد باند، تعداد باندهای چندشکل و درصد چندشکلی، تعداد آلل مؤثر، تنوع ژنی نی، شاخص شانون و محتوای اطلاعات چند شکل مربوط به نشانگرهای ISSR، رتروترانسپوزون و REMAP مورد مطالعه

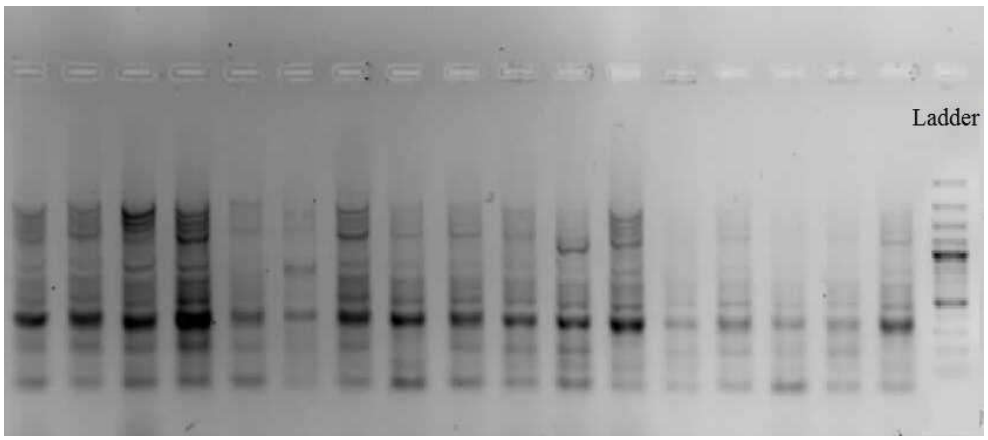
Table 3. Number of bands, Polymorphic percentage, Number of polymorphic bands, PIC, number of effective alleles, Nei gene diversity and Shannon index at ISSR and retrotransposon studied

نام آغازگر	تعداد باند Number of bands	تعداد باند چند شکل Number of polymorphic bands	درصد چند شکلی Polymorphic percentage	PIC	شاخص شانون Shannon index	تنوع ژنی نئ Nei gene diversity	تعداد آلل مؤثر Number of effective alleles
UBC8736	14	6	42/86	0/39	0/64	0/44	1/82
UBC827	12	5	41/67	0/3	0/6	0/42	1/76
UBC834	8	4	50	0/37	0/55	0/37	1/65
UBC807	11	4	36/36	0/41	0/56	0/38	1/65
UBC808	9	7	77/77	0/47	0/62	0/43	1/77
UBC825	12	4	33/33	0/39	0/68	0/49	1/96
UBC811	10	3	30	0/42	0/67	0/48	1/93
TOS-1	10	5	50	0/21	0/59	0/4	1/69
TOS-2	11	6	54/54	0/35	0/65	0/46	1/85
UBC809	8	6	75	0/24	0/59	0/4	1/71
UBC810	7	3	42/85	0/31	0/61	0/42	1/74
UBC822	7	3	42/85	0/27	0/53	0/35	1/62
HB-12	10	5	50	0/47	0/65	0/46	1/86
HB-12+TOS-1	6	3	50	0/41	0/61	0/42	1/76
UBC809+TOS-1	12	4	33/33	0/42	0/48	0/31	1/48
UBC810+TOS-1	13	9	69/23	0/39	0/58	0/4	1/7
UBC807+TOS-1	11	4	36/36	0/48	0/59	0/4	1/7
UBC822+TOS-1	11	6	54/54	0/37	0/63	0/44	1/66
UBC808+TOS-1	10	7	70	0/4	0/52	0/34	1/57
HB-12+TOS-2	8	3	37/5	0/34	0/57	0/39	1/74
UBC834+TOS-1	10	3	30	0/49	0/58	0/39	1/65
UBC825+TOS-1	10	6	60	0/35	0/6	0/41	1/73
UBC808+TOS-2	8	5	62/5	0/39	0/6	0/41	1/74
UBC807+TOS-2	9	5	55/5	0/39	0/66	0/46	1/88
UBC822+TOS-2	7	4	57/14	0/46	0/56	0/37	1/64
UBC809+TOS-2	7	3	42/8	0/42	0/63	0/44	1/82
UBC810+TOS-2	10	5	50	0/41	0/61	0/42	1/77
UBC811+TOS-2	8	2	25	0/36	0/52	0/35	1/63



شکل ۴- الگوی نواری حاصل از تکثیر ژنوتیپ‌های سویا با استفاده از آغازگر UBC808

Figure 4. Band pattern obtained from amplification of soybean DNA results using UBC808 primer, 1 to 9 respectively soybean genotypes studied, Lader (Gene RulerTM 100bp DNA Ladder, fermentas) (100- 1500 bp)



شکل ۵- الگوی نواری حاصل از تکثیر ژنوتیپ‌های سویا با استفاده از نشانگر TOS-2

Figure 5. Band pattern obtained from amplification of soybean DNA results using TOS-5 primer, 1 to 17 respectively soybean genotypes studied, Lader (Gene RulerTM 100bp DNA Ladder, fermentas) (100- 1500 bp)

از بین نشانگرهای مورد استفاده، نشانگر ترکیبی UBC810 + TOS-1 با تعداد ۱۳ باند و بعد از آن، نشانگر ترکیبی UBC809 + TOS-1 با تعداد ۱۲ باند، بیش‌ترین تعداد باند و نشانگر ترکیبی HB-12 + TOS-1 با تعداد شش باند، کم‌ترین تعداد را داشتند. تمام نشانگرها چندشکل بودند. بنابراین، توانستند به‌خوبی تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها را نشان دهند و قادر به تفکیک ژنوتیپ‌ها از هم بودند. نشانگرهای ترکیبی UBC810 + TOS-1 و UBC809 + TOS-1 با تعداد باند بیش‌تر، می‌توانند تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های سویا را بهتر نشان دهند.

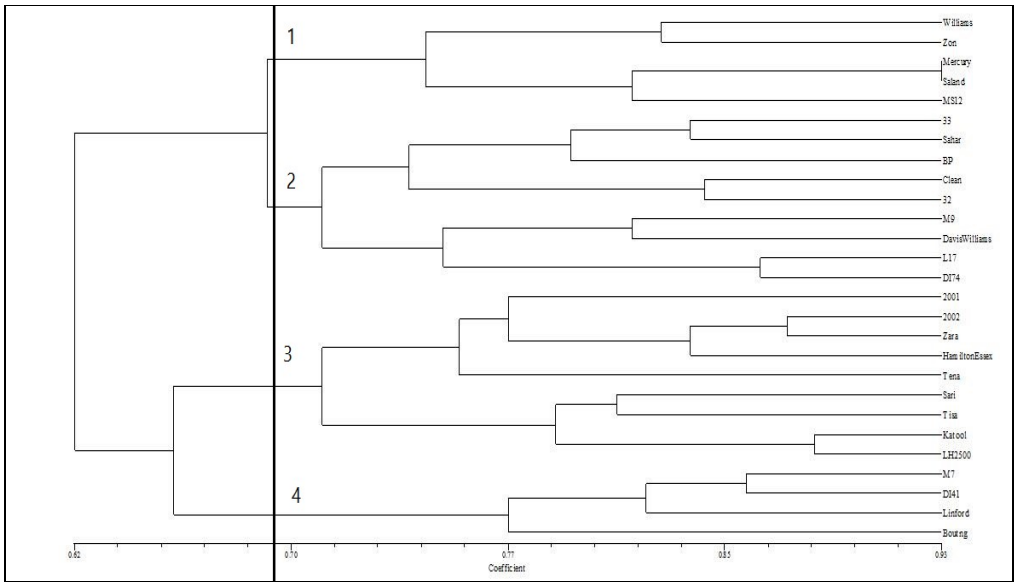
میزان اطلاعات چندشکل (PIC) معادل تنوع ژنتیکی بوده و قدرت تفکیک یک نشانگر را به‌واسطه تعداد آلل‌های چندشکل و فراوانی نسبی این آلل‌ها را در جمعیت تحت مطالعه نشان می‌دهد (Senior *et al.*, 1998). محتوای اطلاعات چندشکل به تفکیک برای هر یک از نشانگرهای مورد مطالعه محاسبه و نتایج مربوطه در (جدول ۳) ارائه شد. بالاترین میزان PIC در نشانگرهای UBC834 + TOS-1، UBC807 + TOS-1، UBC808 و HB-12 به‌میزان ۰/۴۹، ۰/۴۸، ۰/۴۷ و ۰/۴۷ تعیین شد که نشان‌دهنده کارایی بالای این نشانگرها در تمایز ژنوتیپ‌های مورد استفاده در این تحقیق بود. بیش‌ترین تعداد آلل مؤثر به‌ترتیب مربوط به نشانگرهای UBC825، UBC811، HB-12 و UBC807 + TOS-2 در بین کل ژنوتیپ‌ها بود (جدول ۳). ازآن‌جایی‌که یکی از معیارهای مهم در انتخاب نشانگرهای مناسب و سودمند، تعداد آلل‌های مؤثر است، می‌توان از این نشانگرها برای مطالعات بعدی به‌منظور

بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌ها استفاده کرد. یکی از مهم‌ترین شاخص‌ها برای ارزیابی تنوع ژنی در بین ارقام و جمعیت‌ها، شاخص تنوع ژنی نی می‌باشد (Nei, 1972). برآورد شاخص نی نشان داد که میزان تنوع ژنی از ۰/۳۱ تا ۰/۴۹ در بین ژنوتیپ‌ها متغیر بود. نشانگرهای UBC825 و UBC811 بیش‌ترین تنوع ژنی را نشان دادند. نشانگر UBC809 + TOS-1 کم‌ترین میزان تنوع ژنی را نشان داد. میانگین تنوع ژنی در بین ژنوتیپ‌ها ۰/۴۱ بود. شاخص شانون بیانگر میزان چندشکلی در بین ژنوتیپ‌ها است (Shannon, 1948). در این تحقیق میانگین ضریب شانون در بین ژنوتیپ‌ها ۰/۵۹ بود که نشان‌دهنده تنوع نسبتاً بالایی در ژنوتیپ‌های مورد بررسی است. نشانگرهای UBC825، UBC811، TOS-2، HB-12 و UBC807+TOS-2 دارای بیش‌ترین شاخص شانون بودند، این نشان می‌دهد که نشانگرهای مورد اشاره می‌توانند تنوع ژنتیکی درون جمعیتی را بهتر توجیه کنند و نشانگرهای UBC809+TOS-1 و UBC808+TOS-1 دارای کم‌ترین شاخص شانون می‌باشند.

فاصله ژنتیکی بین دو موجود به‌منزله تفاوت قابل توجیه بین آن دو موجود با استفاده از تنوع آللی است. به‌عبارت‌دیگر فاصله ژنتیکی بیانگر میزان تفاوت‌های ژنی بین جمعیت‌ها یا گونه‌هاست که با استفاده از برخی کمیت‌های عددی قابل اندازه‌گیری می‌باشد. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس رتبه‌دهی صفر و یک انجام شد. تجزیه خوشه‌ای بر اساس الگوریتم‌های مختلف و اندازه‌گیری سه ضریب تشابه تطابق ساده، جاکارد و دایس، نشان داد که گروه‌بندی بر اساس ضریب تطابق ساده با استفاده از روش گروه‌بندی دورترین همسایه‌ها از بین روش‌های مورد بررسی بهترین وضعیت جهت گروه‌بندی ارقام را دارا بود و میزان تشابه بین ارقام بر اساس ضریب تطابق ساده بین چهار درصد تا ۸۲ درصد متغیر بود و ضریب کوفنتیک ۶۳ درصد به‌دست آمد که نشان‌دهنده کارآیی نسبتاً بالای این روش در گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها می‌باشد. بیش‌ترین شباهت بین ژنوتیپ‌های Katool و LH2500 (۰/۸۲) بود. و پس از آن‌ها ژنوتیپ‌های Zara و 2002 (۰/۷۸)، DI74 و L17 (۰/۷۵) و M7 و DI41 (۰/۷۲) بیش‌ترین تشابه را داشتند.

ژنوتیپ‌های DI41 و Mercury (۰/۰۴)، Saland و Mercury (۰/۰۶)، 032 و Katool (۰/۰۸)، 2001 و MS12 (۰/۱۱)، Zon و Katool، L17 و Katool (۰/۱۳) کم‌ترین شباهت را داشتند. با توجه به مقادیر تشابه بین ارقام می‌توان نتیجه‌گیری کرد که، تلاقی بین ارقامی که کم‌ترین تشابه را دارند (بیش‌ترین فاصله)، در صورتی‌که از لحاظ صفات فنوتیپی مورد نظر نیز بیش‌ترین فاصله را از هم داشته باشند، بهترین نتیجه را در دست‌یابی به هیبریدها و یا دست‌یابی به تنوع ژنتیکی بیش‌تر خواهد داشت. برش دندروگرام از ناحیه ضریب تشابه ۰/۶۹، ارقام را به چهار گروه تفکیک کرد (شکل ۴). ژنوتیپ‌های Williams، Zon، Mercury، Saland و MS12 در گروه اول قرار گرفتند. گروه دوم نیز شامل ژنوتیپ‌های 33، Sahar، BP، Clean، 32، M9، Davis and Williams، L17 و DI74 بود. ژنوتیپ‌های 2001، 2002، Zara، Hamillton and Essex، Tena، Sari، Tisa، Katool و LH2500 در گروه سوم قرار گرفتند. در گروه چهارم نیز ارقام Boutng، Linford، DI41 و M7 قرار گرفتند. صحت گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس تمامی نشانگرهای به‌کار گرفته‌شده توسط تابع تشخیص کانونی به‌روش خطی فیشر ۹۶/۳ درصد بوده است.

بررسی ژنوتیپ‌ها بر اساس نشانگرهای مولکولی نشان داد که ۹ عامل اول در مجموع توانستند مجموعاً ۶۲/۶۱ درصد از تنوع فاصله‌ای ماتریس فاصله را توجیه نمودند و دو بردار اول توانستند مجموعاً ۲۲/۰۹ درصد از تنوع کل را توجیه کنند که سهم بردار اول ۱۱/۷۸ درصد و سهم بردار دوم ۱۰/۳۹ درصد بود (جدول ۵). در داده‌های مولکولی، درصورتی‌که دو یا سه بردار اول حدود ۱۰ تا ۲۰ درصد از تغییرات مربوط به نشانگرها را توجیه نمایند، اگرچه از نظر آماری ممکن است برای نمایش گرافیکی مناسب نباشد، ولی از نظر ژنتیکی نشان‌دهنده نمونه‌برداری مطلوب نشانگرها از کل ژنوم می‌باشد. به‌عبارت‌دیگر، زمانی‌که تعداد صفات یا باندها به تعداد کمی بردار کاهش یابد، نشانگرهای مورد استفاده تعداد محدودی از کروموزوم‌ها را تحت پوشش قرار می‌دهند و در نتیجه تا حدی نمی‌توانند افراد را از هم‌دیگر به‌خوبی جدا نمایند. اما اگر تعداد بردارها زیاد باشد، نشانگرهای مورداستفاده، کروموزوم‌های بیش‌تری را تحت پوشش قرار داده و نشانگر به‌خوبی تنوع ژنتیکی افراد را تعیین می‌نماید (Mohsenzadeh Golfazani *et al.*, 2012).



شکل ۶- گروه‌بندی ژنوتیپ‌های سویا به‌روش دورترین همسایه‌ها و ضریب تطابق ساده بر اساس نشانگرهای ISSR، رتروترانسپوزون و REMAP

Figure 6. Dendrogram drawn based on complete linkage method and simple similarity matrix for soybean genotypes studied

جدول ۵- مقادیر ویژه، واریانس نسبی و درصد تجمعی برای ۹ بردار اول

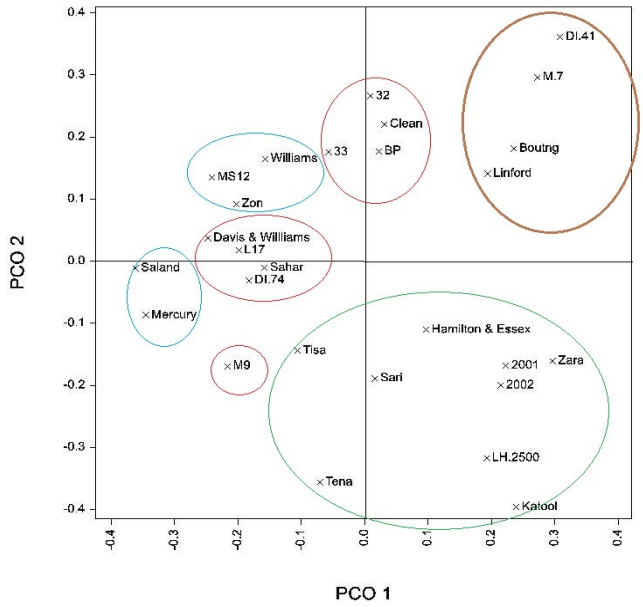
Table 5. Eigenvalues, relative variance and cumulative percentage for 9 Component

بردار Vector	ریشه مشخصه Eigenvalue	درصد واریانس توجیه شده Percentage of variance	درصد تجمعی Cumulative percentage
1	1/22	11/78	11/78
2	1/08	10/39	22/09
3	0/83	7/99	30/08
4	0/7	6/75	36/83
5	0/64	6/19	43/02
6	0/53	5/18	48/2
7	0/52	5	53/2
8	0/5	4/9	58/1
9	0/46	4/51	62/61

بر اساس دو بردار مختصات اصلی نمودار الگوی تنوع میان ژنوتیپ‌های سویا رسم شد (شکل ۷). در نمودار الگوی تنوع ژنوتیپ‌ها که در یک نقطه متمرکز شده‌اند، در یک گروه قرار گرفته‌اند. ژنوتیپ‌های گروه‌های یک تا چهار در تجزیه خوشه‌ای به‌ترتیب با رنگ آبی، قرمز، سبز و قهوه‌ای در نمودار پراکنش مشخص شده‌اند. همان‌طورکه در شکل دیده می‌شود ژنوتیپ‌هایی که در گروه سوم و چهارم در تجزیه خوشه‌ای کنار هم قرار داشتند در نمودار الگوی تنوع حاصل از تجزیه به مختصات اصلی نیز کنار هم قرار گرفته‌اند.

ارتباط نشانگر مولکولی و صفات مرفولوژیک

نتایج بررسی داده‌های مولکولی در ژنوتیپ‌های مورد بررسی با توجه به نسبت مورد انتظار برای یک آغازگر غالب نشان داد که از مجموع ۱۳۰ آغازگر تولید شده، ۷۵ آغازگر نسبت مورد انتظار را نشان دادند که در مرحله بعدی جهت بررسی نحوه ارتباط صفت با نشانگر استفاده شدند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌های جوانه‌زنی بر اساس هر یک از آغازگر نشان داد که از مجموع ۸۵ آغازگر دارای تفرق، ۲۲ آغازگر حداقل در یکی از صفات اندازه‌گیری شده در سطح احتمال پنج درصد دارای تفاوت معنی‌دار در میانگین صفات بودند.



شکل ۷- الگوی دوبعدی پراکنش ژنوتیپ‌های سویا براساس بردار اول و دوم حاصل از تجزیه به مختصات اصلی

Figure 7. Biplot of soybean genotypes based on first and second vector in principal coordinate analysis method

در صفت طول ساقه‌چه، وجود باندهای ۹۸ و ۶۴ در سطح احتمال یک در صد و هم‌چنین حضور باند ۶۸، ۷۶، ۹۶، ۹۹، ۱۲۰ و ۵۹ در سطح احتمال پنج درصد سبب افزایش میانگین طول ساقه‌چه در ژنوتیپ‌ها شد. درحالی‌که وجود باندهای ۶۹، ۷۰ و ۱۰۵ موجب کاهش میانگین طول ریشه‌چه در ژنوتیپ‌ها با اطمینان ۹۵ درصد شد. هم‌چنین وجود آلل ۷۳ موجب کاهش این صفت در ژنوتیپ‌ها با اطمینان ۹۹ درصد شد.

در صفت طول ریشه‌چه، وجود باندهای ۶۴، ۹۸ و ۱۰۵ در سطح احتمال یک درصد و هم‌چنین حضور باند ۶۸، ۷۹ و ۱۲۰ در سطح احتمال پنج درصد سبب افزایش میانگین طول ریشه‌چه در ژنوتیپ‌ها شد. درحالی‌که وجود باندهای ۶۵، ۷۰، ۷۲ و ۸۷ موجب کاهش میانگین طول ریشه‌چه در ژنوتیپ‌ها در سطح احتمال پنج درصد شد.

در صفت وزن تر ریشه‌چه، وجود باندهای ۶۴، ۸۱ و ۹۸ در سطح احتمال پنج درصد سبب افزایش میانگین وزن‌تر ریشه‌چه در ژنوتیپ‌ها شد. درحالی‌که وجود باند ۶۳ موجب کاهش میانگین وزن تر ریشه‌چه در ژنوتیپ‌ها در سطح احتمال پنج درصد شد.

در صفت وزن تر ساقه‌چه، وجود باندهای ۵۲، ۸۱ و ۹۸ در سطح احتمال پنج درصد و باند ۶۴ در سطح احتمال یک درصد سبب افزایش میانگین وزن تر ریشه‌چه در ژنوتیپ‌ها شد. درحالی‌که وجود باند ۱۲۶ موجب کاهش میانگین وزن تر ساقه‌چه در ژنوتیپ‌ها در سطح احتمال پنج درصد شد. در صفت وزن خشک ریشه‌چه، وجود باندهای ۵۲، ۵۹، ۶۴، ۶۸ و ۱۱۰ در سطح احتمال پنج درصد و باندهای ۸۱ و ۹۸ در سطح احتمال یک درصد سبب افزایش میانگین وزن‌تر ریشه‌چه در ژنوتیپ‌ها شد. درحالی‌که وجود باند ۱۱ در سطح احتمال پنج درصد و باندهای ۱۰۵ و ۱۲۶ موجب کاهش میانگین وزن‌خشک ریشه‌چه در ژنوتیپ‌ها در سطح احتمال یک درصد شدند. در صفت وزن خشک ساقه‌چه نیز وجود باندهای ۱۷، ۶۴، ۹۶ و ۹۸ در سطح احتمال پنج درصد و باند ۵۲ در سطح احتمال یک درصد سبب افزایش میانگین وزن خشک ساقه‌چه در ژنوتیپ‌ها شد.

در صفت سرعت رشد ساقه‌چه، وجود باندهای ۹۸ و ۶۴ در سطح احتمال یک درصد و باند ۸۷ در سطح احتمال پنج درصد سبب افزایش میانگین سرعت رشد ساقه‌چه در ژنوتیپ‌ها شد. درحالی‌که وجود باند ۱۰۵ موجب کاهش میانگین سرعت رشد ساقه‌چه در ژنوتیپ‌ها در سطح احتمال یک درصد شد.

در صفت سرعت رشد ریشه‌چه، وجود باندهای ۶۴ و ۹۸ در سطح احتمال یک درصد و هم‌چنین حضور باند ۹۶ و ۱۰۰ در سطح احتمال پنج درصد سبب افزایش میانگین

سرعت رشد ریشه‌چه در ژنوتیپ‌ها شد. درحالی‌که وجود باند ۷۳ در سطح احتمال یک در صد و باندهای ۶۵، ۶۹ و ۷۰ در سطح احتمال پنج درصد موجب کاهش میانگین سرعت رشد ریشه‌چه در ژنوتیپ‌ها شدند.

در صفت تفاوت وزن‌خشک و تر ریشه‌چه تنها وجود باندهای ۶۴، ۸۱، ۸۹ و ۹۸ در سطح احتمال پنج درصد سبب افزایش تفاوت وزن خشک و تر ریشه‌چه در ژنوتیپ‌ها شد. در صفت تفاوت وزن‌خشک و تر ساقه‌چه نیز وجود باند ۶۴ در سطح احتمال یک درصد و باندهای ۸۱ و ۹۸ در سطح احتمال پنج درصد سبب افزایش میانگین تفاوت وزن‌خشک و تر ساقه‌چه در ژنوتیپ‌ها شدند. درحالی‌که وجود باندهای ۷۲ و ۱۲۶ موجب کاهش میانگین تفاوت وزن‌خشک و تر ساقه‌چه در ژنوتیپ‌ها در سطح احتمال پنج درصد شد.

در صفت ضریب آلومتریک نیز وجود باندهای ۱ و ۵۴ در سطح احتمال پنج درصد سبب کاهش میانگین ضریب آلومتریک در ژنوتیپ‌ها شد درحالی‌که تنها وجود باند ۷۳ سبب افزایش میانگین ضریب آلومتریک ژنوتیپ‌ها در سطح احتمال یک درصد شد.

نتایج آزمون مانتل

آزمون منتل همبستگی بین دو ماتریس تشابه داده‌های جوانه‌زنی و مولکولی را ۰/۲ محاسبه کرد که ارتباط این دو ماتریس معنی‌دار نیست. اختلاف دیده شده در دو تجزیه خوشه‌ای حاصل از داده‌های جوانه‌زنی و نشانگرهای مولکولی بین ژنوتیپ‌ها طبیعی می‌باشد، زیرا صفات جوانه‌زنی وابسته به شرایط اجرایی و محیط دارد و ژنوتیپ‌ها می‌توانند واکنش متفاوتی نسبت به شرایط محیطی نشان دهند، ولی نشانگرهای مولکولی اختلاف در ژنوم را نشان می‌دهند یا قادر به تکثیر قسمت‌هایی از ژنوم بودند که نتوانست صفات اندازه‌گیری شده در این تحقیق را توجیه کند. ممکن است استفاده از نشانگرهایی که مرتبط با صفات متفاوت و مراحل نموی متفاوتی نسبت به این تحقیق طراحی شده بودند نیز دلیل بر این اختلاف باشد. مطالعات نیز شاهد بر وجود این تفاوت‌ها در الگوی گروه‌بندی و ژنوتیپ در میان گروه‌های مختلف در روش‌های مختلف تجزیه‌وتحلیل تنوع می‌باشد. بورلاکو و همکاران (Burlacu *et al*., 2011) گزارش دادند که صفات می‌تواند تحت تأثیر عوامل بسیاری ازجمله: شرایط محیطی، حجم نمونه، زمان اندازه‌گیری و غیره قرار گیرد که موجب بروز این تفاوت‌ها می‌شود. درحالی‌که از این بابت نیز که کل ژنوم از نظر ژنتیکی تحت پوشش قرار گرفته باشد، اطمینان نداریم.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس برای صفات مورد بررسی در شرایط تنش و بدون تنش نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین ارقام، سطوح تنش و اثر متقابل (رقم × تنش) از نظر تمامی صفات جوانه‌زنی اندازه‌گیری شده وجود دارد و نشان‌دهنده واکنش متفاوت ارقام در سطوح مختلف تنش می‌باشد. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای به‌روش متوسط فاصله بین گروه‌ها با معیار فاصله اقلیدوسی بر اساس صفات جوانه‌زنی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را در چهار گروه مجزا قرار داد. بالا بودن معیارهای مختلف تنوع ژنتیکی مانند تنوع ژنی نی، شاخص شانون و میزان PIC، برای آغازگرهای UBC825، UBC811، TOS-2، HB-12، UBC834+TOS-1، UBC807+TOS-1، UBC807+TOS-2 و UBC808 نشان داد که این آغازگرها در تمایز ژنوتیپ‌های سویا کارآیی بالایی داشتند و می‌توان از این آغازگرها در بررسی تنوع ژنتیکی استفاده نمود. هم‌چنین به‌دلیل این‌که در تجزیه به مختصات اصلی تعداد مؤلفه‌های زیاد، درصد کمی از تغییرات کل را توجیه کردند، بنابراین آغازگرهای مورد استفاده ناحیه کروموزومی زیادی را تحت پوشش قرار داده و در نتیجه توانستند ژنوتیپ‌ها را به‌خوبی از هم‌دیگر جدا نمودند و تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها را تعیین کردند. نتایج آزمون منتل در این تحقیق نشان داد همبستگی بین دو ماتریس تشابه داده‌های جوانه‌زنی و مولکولی معنی‌دار نیست.

تشکر و قدردانی

نگارندگان از مسئولین بانک ژن مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

Bourgeais-Chaillou, P., Perez-Alfocea, F. and Guerrier, G. 1992. Comparative effects of N–sources on growth and physiological responses of soyabean exposed to NaCI–stress. Journal of Experimental Botany, 43: 1225-33. **(Journal)**

Burlacu, M.C., Calistru A.E. and Leonte, C. 2011. Evaluation of the genetic diversity among some oilseed rape (Brassica napus) cultivars revealed by RAPD markers compared with morphological traits evaluation. Lucrări Ştiinţifice, 54: 1-4. **(Journal)**

Drazkiewicz, M. 1994. Chlorophyllase: occurrence, functions, mechanism of action, effects of external and internal factors (Review). Photosynthetica, 30:321–331. **(Journal)**

Farokhi, A. and Ghaleshi, S. 2005. Investigation of the effect of salinity on seed size and their interactions on intensity, seed conversion efficiency and soybean seedling growth. Iranian Journal of Agriculture Science, 36: 1233-39. (In Persian) **(Journal)**

Khan, F., Siddiqi, T.O., Mahmooduzzafar. and Ahmad A. 2009. Morphological changes and antioxidant defence systems in soybean genotypes as affected by salt stress. Journal of Plant Interactions, 4: 295-306. **(Journal)**

Malekmohamadi, Z., Sabori, H., Biabani, A. and Hezarjaribi, E. 2017. Study of Genetic Diversity of Soybean (*Glycine max*) using ISSR Markers. Journal of Crop Breeding, 8: 133-24. **(Journal)**

Mohsenzadeh Golfazani, M., Mohammad, F., Hasani Kumleh, S.H. and Samizadeh Lahiji, H. 2016. Grouping of some canola genotypes in various drought stress treatment in Germination Stages based on multivariate statistical methods. Iranian Journal of Seed Sciences and Research, 3: 53-65. (In Persian) **(Journal)**

Mohsenzadeh Golfazani, M., Samizade Lahiji, H., Alami, A., Shoayi Deylami, M. and Talesh Sasani, S. 2012. Study of Genetic Diversity of Flue-Cured Tobacco (*Nicotiana Tabacum* L.) Genotypes using ISSR and Retrotransposon Markers. Iranian Journal of Field Crop Science, 43: 371-80. (In Persian) **(Journal)**

Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. The American Naturalist, 106: 283-92. **(Journal)**

Niakan, M., Tajari, M. and Ghorbani, M. 2008. The effect of salinity stress on allelopathic potential of canola by studying some growth factors, chlorophyll a ,b amount, antioxidant enzyme and nitrate reductase activity of soybean seedlings in hydroponic culture. Iranian Journal of Biology, 21: 315-25. (In Persian) **(Journal)**

Panjoo, M., Nazarian-Firouzabadi, F., Ismaili, A. and Ahmadi, H. 2014. Evaluation of Genetic Diversity among Soybean (*Glycine max*) Genotypes, Using ISJ and RAPD Molecular Markers. Journal of Plant Physiology and Breeding, 4: 55-65. **(Journal)**

Saghai-Maroof, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A. and Allard, R. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proceedings of the National Academy of Sciences, 81(24): 8014-8018. **(Journal)**

Scott, S., Jones, R. and Williams, W. 1984. Review of data analysis methods for seed germination 1. Crop science, 24: 1192-99. **(Journal)**

Seitova, A.M., Ignatov, A.N., Suprunova, T.P., Tsvetkov, I.L., Deineko, E.V., Dorokhov, D.B., Shumnyi, V.K. and Skryabin, K.G. 2004. Genetic variation of wild soybean Glycine soja Sieb. et Zucc. in the far east region of the Russian Federation. Russian Journal of Genetics, 40: 165-71. **(Journal)**

Senior, M., Murphy, J., Goodman, M. and Stuber, C. 1998. Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system. Crop science, 38: 1088-98. **(Journal)**

Shahnejat Bushehry, A. 2003. Genetic diversity in soybean as determined by RAPD and DAF markers. Iranian Journaof Agricultural Sciencesl, 34: 625-33. (In Persian) **(Journal)**

Shannon, C.E. 1948. A mathematical theory of communication. The Bell system technical journal, 27: 379-423. **(Journal)**

Younessi Hamzekhanlu, M., Izadi Darbandi, A., Halajian, M.T., Pirvali Byranvand, N. and Majdabadi, A. 2012. Investigation of genetic diversity of mutant soybean lines with high nitrogen fixation power using RAPD molecular markers. MG.genetics, 4: 49-54. (In Persian) **(Journal)**

Grouping of some soybean genotypes in various salt stress treatment in Germination Stages and Study of Genetic Diversity using Molecular Markers

Mahdi Porkar[1], Mohammad Mohsenzadeh Golfazani[2*], Hassan Hassani[3], Habibollah Samizadeh[4]

Received: August 2, 2021 Accepted: October 18, 2021

Abstract

In the present study, 11 ISSR, 2 Retrotransposon and 15 Retrotransposon + ISSR composed markers (REMAP) were evaluated among 27 genotypes of Soybean. 130 polymorphic bands were produced from 28 primers. The maximum percentage of polymorphism were 77% for UBC808, 54% for TOS-2 and 70% in UBC808 + TOS-1 marker. The mount of Nei′s, Shanon and PIC index for UBC808, UBC811, UBC825, HB-12, TOS-2, UBC807 + TOS1 and UBC834 + TOS-1 indicated that theses markers could be used to assessment of genetic variation. The result of cluster analysis using complete linkage algorithms clustered 27 studied genotype in 4 distinct groups with 4, 9, 9 and 5 genotype in respected group. Discriminant function analysis using the Fisher′s linear method showed that the complete linkage method separated the genotypes with 96/3 percent accuracy. Morphological characteristics of genotype were evaluated in a completely randomized design with factorial arrangements whit two factors, The first factor were salt stress treatments at 0 (check), 30, 60 and 90 mM NaCl and the second factors was genotypes. ANOVA showed significant differences among varieties and level of Treatment for all measured morphological traits, and in interaction of cultivar × stress for all traits except Shoot fresh weight, shoot dry weight, root dry weight and shoot's weight difference between wet and dry. The cluster analysis based on within group′s method clustered genotype at different salt stress treatment in 4 clusters, and the accuracy of cluster analysis revealed by discriminant analysis was 92/6%. The correlation between the two similarity matrices was not significant by Mantel test. Analysis using marker-assisted selection of bands that enhance salt tolerance traits mean they can be used to identify resistant soybean genotypes.

Keywords: Cluster analysis ISSR, Polymorphism, PIC, Retrotransposon

How to cite this article

Porkar, M., Mohsenzadeh Golfazani, M., Hasani, H. and Samizadeh Lahiji, H.A. 2022. Grouping of some soybean genotypes in various salt stress treatment in germination stages and study of genetic diversity using molecular markers. Iranian Journal of Seed Science and Research, 9(2): 13-29. (In Persian)**(Journal)**

DOI: 10.22124/jms.2022.6149

COPYRIGHTS

Copyrights for this article are retained by the author(s) with publishing rights granted to the Iranian Journal of Seed Science and Research

The content of this article is distributed under Iranian Journal of Seed Science and Research open access policy and the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY4.0) License. For more information, please visit http://jms.guilan.ac.ir/

1. MSc of Agricultural Biotechnology, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. taktirandaz.0131@gmail.com
2. Assistant Professor of Agricultural Biotechnology, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. mohsenzadeh.mohamad@guilan.ac.ir
3. Associate professor, Biochemistry, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. kumleh@yahoo.com
4. Professor, Plant Biotechnology, Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran. hsamizadeh@guilan.ac.ir

*Corresponding author: mohsenzadeh.mohamad@guilan.ac.ir