ژنتیک نوین
دوره نهم، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۳
صفحه ۴۷۰- ۴۵۹

ارزیابی تنوع ژنوتیپ های سویا از نظر تحمل به تنش سرما با استفاده از صفات فیزیولوژیک و نشانگر ISSR

Assessment of diversity of soybean (*Glycin max* L.) genotypes for cold tolerance using physiological traits and ISSR markers

مهسا سپهری[۱]، امید سفالیان*[۱]، علی اصغری[۱]، بهنام فیروزی[۱] و فاطمه احمدپور[۱]

۱- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، دانشیاران، دانشجوی دکترای و دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، دانشگاه محقق اردبیلی

Sepehri M[1], Sofalian O*[1], Asghari A[1], Firoozi B[1], Ahmadpoor F[1]

1. Graduated Student, Associated Professors, PhD Student and Graduated Student, University of Mohaghegh Ardabili

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sofalian@uma.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۲/۴/۲۵- تاریخ پذیرش: ۹۳/۳/۱۸)

چکیده

گیاهان دانه‌روغنی نظیر سویا نقش مهمی در تولید انرژی برای انسان دارند. اطلاع از تنوع ژنتیکی بر پایه نشانگرهای گوناگون در برنامه‌های به‌نژادی و از جمله انتخاب والدین نقش مهمی دارد. تنش سرما یکی از عوامل محیطی است که منجر به بروز تنش اکسیداتیو و تغییرات فیزیولوژیکی، مورفولوژیکی و بیوشیمیایی در سلول و در مجموع گیاه می‌شود. سویا گرمادوست بوده و به دماهای پایین حساس می‌باشد. در تحقیق حاضر تحمل سرما در ۱۶ ژنوتیپ سویا با استفاده از برخی صفات فیزیولوژیک مورد ارزیابی قرار گرفت و ارتباط آن با نشانگر مولکولی ISSR بررسی شد. در این آزمایش تعداد ۱۲ آغازگر الگوی نواربندی چندشکل نشان دادند و در مجموع ۹۴ نوار تولید کردند. از این تعداد، ۷۷ نوار چندشکل بدست آمد. تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها به لحاظ صفات فیزیولوژیک در سطح تنش سرما با نمودار خوشه‌ای حاصل از داده‌های مولکولی تا حدودی شباهت داشت که نتایج آزمون مانتل نیز این شباهت نسبی را تایید کرد. بر اساس تجزیه رگرسیون نیز برخی نشانگرهای مثبت در ارتباط با صفات فیزیولوژیک بررسی‌شده در شرایط سرما شناسایی شدند. این بررسی نشان داد که نشانگرهای مولکولی و مورفولوژیکی به موازات هم ابزار مناسبی جهت شناسایی ژنوتیپ‌های برتر در تحمل سرما در گیاه سویا می‌باشند.

واژه‌های کلیدی

تحمل سرما
تنوع ژنتیکی
چندشکلی
سویا
ISSR

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.8.3]

مقدمه

پس از غلات، دومین منبع مهم غذایی بشر، بقولات هستند. سویا با نام علمی (*Glycine max* L.) گیاهی یک ساله از خانواده‌ی بقولات[1]، زیر خانواده پروانه آسا[2] و طایفه *Phaseoleae* می‌باشد. این گیاه به‌دلیل استفاده در تغذیه انسان و دام، مهمترین گیاه دانه-ای بقولات به حساب می‌آید (Whigham 1983). روغن یکی از مواد غذایی اصلی مورد مصرف انسان است و حدود ۲۰ درصد از کالری روزانه مورد نیاز انسان، بسته به رژیم‌های غذایی متفاوت، توسط روغن تامین می‌شود. روغن مورد نیاز انسانی از دو منبع حیوانی و گیاهی تامین می‌شود (Alyari and Shekari 1999). در شرایط کمبود پروتئین حیوانی و گران قیمت بودن آن، گیاهانی مانند سویا بیشتر مورد توجه قرار می‌گیرند. دانه سویا به طور متوسط ۴۰ درصد پروتئین و ۲۰ درصد روغن دارد که از لحاظ ارزش غذایی در میان گیاهان مهم زراعی دانه‌ای، بی‌رقیب است (Rezvani-e-khorshidi et al. 2002).

سویا به‌دلیل تنوع ژنتیکی و سازگاری وسیع، در دامنه گسترده‌ای از عرض‌های جغرافیایی کشت می‌شود و در بین دانه‌های روغنی مقام اول تولید را به خود اختصاص داده است (Asadi and Faraji 2009). در برنامه‌های اصلاح نباتات، اطلاع از میزان تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه و نیز شناسایی ژنوتیپ‌های برتر از نظر صفات مورد نظر اهمیت فراوانی دارد.

سویا بومی مناطق گرمسیری است ولی در مناطق معتدله نیز به میزان زیادی کشت می‌شود و طبیعتا به دماهای پایین بسیار حساس است و به‌سادگی در برابر سرما آسیب می‌بیند (Saeidi 2003). بنابراین دما از عوامل مهم در زراعت این گیاه دانه روغنی است. حداقل دما برای جوانه‌زنی بذور سویا حدود ۱۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. سویا در مراحل جوانه‌زنی، پر شدن دانه و رسیدگی نسبت به سرما آسیب پذیر است. حتی دمای دو درجه سانتی‌گراد برای این گیاه کشنده است (Zhuetal 2003). در مناطق معتدله وقوع تنش سرما در مراحل رویشی گیاهانی مانند سویا، در اغلب مواقع سبب بروز خسارت‌های شدید می‌شود (Mianabadi et al. 2009). این گیاه با وقوع دماهای پایین بالاتر از صفر درجه نیز آسیب‌های زیادی می‌بینند. این صدمات از اختلال در فرآیندهای متابولیکی و سلولی تا تغییر خصوصیات غشاها را شامل می‌شوند (Kasperska 1989). بنابراین یافتن ژنوتیپ‌هایی که تحمل بیشتری نسبت به سرما دارند در برنامه‌های اصلاحی اهمیت فراوانی دارد.

تنوع ژنتیکی گیاهان در سطح مولکولی به وسیله روش‌های متعددی ارزیابی می‌شوند. از جمله آنها نشانگرهای DNA، پروتئینی و مورفولوژیکی است (Murtaza et al. 2005). برخی از محققین اعتقاد دارند که نشانگرهای مولکولی یا نشانگرهای DNA سطح بالاتری از تنوع را آشکار می‌سازند. لذا، برای تعیین تنوع ژنتیکی و انجام کارا و سریع‌تر گزینش از سایر نشانگرها مطلوب‌تر می‌باشند (Wilcox and Cavins 1995). در سال‌های اخیر استفاده از نشانگرهای مولکولی در سطح DNA با توجه به دقت و سرعت بالا ابزار مفیدی جهت مطالعات ژنتیکی می‌باشند (Sudupak et al. 2003). نشانگرهای مولکولی ابزارهای ارزشمندی برای تشخیص و ارزیابی تنوع ژنتیکی بین گونه‌ای و درون گونه‌ای جمعیت‌های مختلف می‌باشند (Xuetal 2000). با توجه به اینکه سیستم نشانگری RAPD از یک آزمایشگاه به آزمایشگاه دیگر، تکرارپذیری کمی دارد و سیستم نشانگری AFLP گران و هزینه‌بر است و نیز سیستم نشانگری SSR نیاز به اطلاعات اولیه از توالی مورد هدف دو طرف نواحی تکراری جهت طراحی آغازگر دارد، لذا سیستم نشانگری ISSR می‌تواند بر این محدودیت‌ها غلبه کند و میزان چندشکلی بیشتر و آشکارسازی راحت‌تری نسبت به نشانگرهای مولکولی دیگر داشته باشد (Terzopoulos and Bebeli 2008). نشانگر ISSR الگوی نشانگری پیچیده‌تری نسبت به نشانگر RAPD تولید می-کند، که برای تعیین خصوصیت نژادهای بانک ژن و تشخیص ارقام زراعی نسبتا خویشاوند استفاده می‌شود (Archak et al. 2003). نشانگرهای ISSR برای آشکارسازی چندشکلی ژنتیکی بین نژادها، از طریق تولید تعداد زیاد نشانگر میکروساتلایتی توزیع شده در سراسر ژنوم، مفید هستند (Awastietal 2004). نشانگر ISSR، نشانگری ساده و دارای قابلیت تکرارپذیری است. این نشانگر به حجم کمی از DNA نیازمند بوده و نیازی به اطلاعات در خصوص توالی DNA ندارد (Busselletal 2005).

[1] Fabaceae
[2] Papilionoideae

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.8.3]

اغلب مزایای ریزماهواره (SSRs) و چندشکلی در طول قطعات تکثیر شده (AFLP) و چندشکلی DNAی تکثیر شونده تصادفی (RAPD) در نشانگر ISSR جمع شده است. نشانگرهای مولکولی و صفات مورفوفیزیولوژیک هر دو می‌توانند تکمیل‌کننده یکدیگر باشند و نمی‌توانند به تنهایی ابزار مفید و سودمندی در روش‌های مختلف اصلاحی محسوب شوند (Mwamburi 2005). بنابراین بررسی اثر سرما بر برخی صفات فیزیولوژیک و رابطه آن با داده-های مولکولی به گزینش ژنوتیپ‌های متحمل به سرما کمک خواهد کرد.

Powell et al. (1996) با استفاده از چهار نشانگر SSR، RAPD ، AFLP و RFLP در ژنوم ۱۲ رقم سویا به ارزیابی خصوصیات این نشانگرها پرداختند. بر اساس نتایج این تحقیق نشانگرهای SSR، AFLP و RFLP همبستگی بالایی با یکدیگر داشته و نتایج آن‌ها با نتیجه حاصل از نشانگر RAPD متفاوت بود. Prabhu et al. (2002) از طریق مطالعه روابط ژنتیکی ۱۰ ژنوتیپ سویا با فنون DAF و RFLP و شجره‌ای گزارش کردند که هر سه روش ذکر شده در زمینه برآورد تنوع ژنتیکی از کارایی لازم برخوردارند.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش ۱۶ ژنوتیپ سویای تهیه‌شده از مرکز تحقیقات مغان (واقع در استان اردبیل) به شرح جدول ۱ از نظر برخی صفات فیزیولوژیک مرتبط با تحمل سرما در مرحله دوبرگی، در مهر ماه سال ۹۰ در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه محقق اردبیلی مورد ارزیابی قرار گرفتند. آزمایش به صورت کرت‌های خردشده در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار انجام گرفت. عامل اول یا کرت اصلی شامل سطح تنش سرما و شاهد و عامل دوم یا کرت فرعی شامل ۱۶ ژنوتیپ سویا بود. تیمار شاهد شامل گلدان‌هایی بود که از ابتدا تا انتهای آزمایش در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. ولی بقیه گلدان‌ها تا ظهور اولین جفت برگ حقیقی در دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته، سپس به اتاقک سرما در دمای۲±۱۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انتقال داده شدند، که این دما در واقع پیش تیمار سرما (خوگیری) بود. سپس گلدان‌ها به مدت ۱۰ روز در دمای ۱±۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و بدین ترتیب تنش سرما اعمال شد. در این مرحله صفات میزان کلروفیل (با استفاده از دستگاه کلروفیل‌متر)، هدایت روزنه‌ای (سانتی‌متر بر ثانیه)، پرولین (بر حسب میکروگرم پرولین در هر گرم وزن تر) و نشت یونی (میزان خسارت به غشاء) اندازه‌گیری شدند. در نهایت گلدان‌ها به دمای ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد برگردانده شده و پس از ۲۴ ساعت بازیابی شدند. تعداد بوته‌های زنده از هر ژنوتیپ در هر تکرار شمارش شد و درصد زنده‌مانی بوته‌ها با استفاده از فرمول زیرمحاسبه شد:

۱۰۰ × (تعداد گیاهان قبل از اعمال تیمار سرما/تعداد گیاهان زنده پس از اعمال تیمار سرما)

میزان کلروفیل با استفاده از دستگاه کلروفیل‌متر مدل Spad-502 از کمپانی Konica Minolta با اندازه‌گیری طیف جذبی در محدوده نور آبی (۴۰۰–۵۰۰ nm) و در محدوده نور قرمز (۶۰۰ nm–۵۰۰) بدست آمد. هدایت روزنه‌ای با استفاده از دستگاه پرومتر برگ ساخت شرکت Decagon Devices مورد سنجش قرار گرفت. نشت یونی به روش Dai et al. (2007) از نمونه‌های برگ تازه ژنوتیپ‌ها اندازه‌گیری شد. پرولین نیز به روش Bates et al. (1973) اندازه‌گیری شد. استخراج DNA از نمونه‌های برگی برداشت شده از ۱۶ ژنوتیپ سویا، براساس روش CTAB (Saghai-Maroof et al. 2000) انجام شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با حجم ۲۰ میکرولیتر حاوی بافر PCR، کلرور منیزیم، آغازگر، dNTP، آنزیم Taq و ۳۰ نانوگرم از DNA ژنومی از هر نمونه انجام گرفت (جدول۲). چرخه‌های حرارتی واکنش PCR برای آغازگرهای ISSR به شرح زیر بود: مرحله اول) واسرشته-سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد؛ مرحله دوم) شامل ۴۰ چرخه الف) واسرشته‌سازی به مدت یک دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ب) اتصال آغازگرها به رشته‌های الگو به مدت یک دقیقه در دمای تست شده (۵۶–۴۶ درجه سانتی‌گراد) و ج) بسط رشته DNA توسط پلیمراز به مدت یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد؛ مرحله سوم) بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد سپس الکتروفورز به مدت ۲/۵ تا سه ساعت با ولتاژ ثابت ۱۲۰ وات در ژل آگارز ۱/۲ درصد انجام گرفت و دستگاه ژل‌داک (ساخت شرکت Uvitec) برای

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.8.3]

جدول ۱- ژنوتیپ‌های سویای مورد استفاده در آزمایش

شماره	ژنوتیپ	شماره	ژنوتیپ
۱	Jk	۹	Safyabad
۲	Hamilton	۱۰	O33
۳	Interprize	۱۱	Sahar
۴	Lavina	۱۲	M7
۵	Linford	۱۳	B.p
۶	Liana	۱۴	Clean
۷	T.m.s	۱۵	Gorga
۸	Streesland	۱۶	Calarak

جدول ۲- اجزای واکنش PCR برای آغازگرهای ISSR

اجزای واکنش	غلظت نهایی	مقدارمورد استفاده (میکرولیتر)
بافر PCR (۱۰X)	۱X	۲
کلرید منیزیم (۵۰ میلی‌مولار)	۲ میلی‌مولار	۰/۸
مخلوط چهار نوکلئوتید (۱۰ میلی‌مولار)	۰/۱ میلی‌مولار	۰/۲
آغازگر(۵ میکرولیتر)	۰/۴ میکرو مولار	۱/۶
آنزیم *Taq* (۵ واحد در میکرولیتر)	۱/۳ واحد	۰/۲۶
DNA (۲۰ نانوگرم در میکرولیتر)		۴
آب مقطر دی یونیزه		۱۱/۱۴
حجم نهایی واکنش		۲۰

مشاهده و عکس‌برداری از نوارها استفاده شد. در این تحقیق برای تکثیر قطعات DNA ژنومی از ۳۴ آغازگر ISSR تهیه شده از شرکت Bioneer کره جنوبی استفاده شد. الگوهای نواری حاصل به‌صورت صفر و یک (به‌ترتیب عدم وجود یا وجود نوار) امتیازدهی شدند. میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) و شاخص نشانگر (MI) محاسبه شد. بین PIC و MI رابطه زیر وجود دارد (Powell et al. 1996):

$PIC=2pq$ (معادله ۱)

$MI=N.PIC$ (معادله ۲)

که در این معادله‌ها q و p به ترتیب فراوانی الل صفر و یک و N تعداد نشانگر در کل جمعیت به ازای هر آغازگر می‌باشد.

شاخص تنوع ژنی نی(Nei 1973) و شاخص اطلاعات شانون (Lewontin 1972) با استفاده از نرم‌افزار PopGen 1.32 (Yeh et al. 1997) محاسبه شد. آزمون مانتل (Mantel 1967) با استفاده از نرم‌افزار GenAlex 6.4 (Peakall and Smouse 2006) صورت گرفت. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها براساس نشانگرها به روش دورترین همسایه‌ها و تجزیه به مولفه‌های هماهنگ اصلی توسط نرم افزار NTsys 2.2 (Rohlf 1998) انجام شد. برای تعیین ارتباط بین داده-های ژنوتیپی و صفات فنوتیپی و همچنین حذف نشانگرهایی که روی صفات اندازه‌گیری شده تاثیر نداشتند. تجزیه رگرسیون گام به گام توسط نرم‌افزار SPSS 16 انجام شد. نشانگرهای مولکولی به عنوان متغیرهای مستقل و صفات مورد مطالعه به عنوان متغیرهای وابسته در نظر گرفته شدند. تمامی تجزیه‌های مربوط به صفات فیزیولوزیکی مورد مطالعه نیز توسط نرم‌افزار SPSS 16 و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام گرفت.

نتایج و بحث

با توجه به نتایج تجزیه واریانس تفاوت بین ژنوتیپ‌ها از نظر کلروفیل و پرولین و زنده‌مانی در سطح احتمال یک درصد و از نظر صفت هدایت روزنه‌ای در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار به دست آمد، ولی از لحاظ نشت یونی معنی‌دار نبود. اثر متقابل تنش × ژنوتیپ فقط برای صفت پرولین در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. تحت تنش سرما نشت یونی افزایش یافت. (Blum 1988; Rizza et al. 1994; Esenta et al. 2003) گزارش کرده‌اند که تنش سرما به غشا سیتوپلاسمی آسیب می‌رساند و درصورت ادامه انجماد، غشا سیتوپلاسمی پاره شده و متعاقبا مواد سلولی به خارج از سلول نشت می‌کند. مقایسات میانگین (جدول۳) نشان داد تنش سرما میزان کلروفیل را افزایش داد. بیشترین میزان کلروفیل مربوط به رقم M7 و کمترین میزان آن مربوط به رقم Lavina بود. طبق گزارش Chen and Ane (2005) با افزایش مدت زمان سرمادهی و کاهش بیشتر محتوی آب نسبی سلول‌های برگ غلظت کلروفیل در سلول‌های برگ به‌تدریج افزایش می‌یابد. این روند می‌تواند ناشی از کند شدن رشد گیاهچه در سرما و کاهش تقسیم سلول باشد که باعث افزایش میزان کلروفیل در واحد سطح می‌شود. براساس نتایج مقایسه میانگین ارقام، ژنوتیپ‌های Jk، Hamilton و Safyabad دارای بیشترین میزان هدایت روزنه‌ای و ژنوتیپ Gorga دارای کمترین میزان این صفت می‌باشد. با اعمال تنش سرما میزان هدایت روزنه‌ای کاهش یافت، که این امر در نتیجه بسته شدن روزنه‌ها صورت گرفته

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

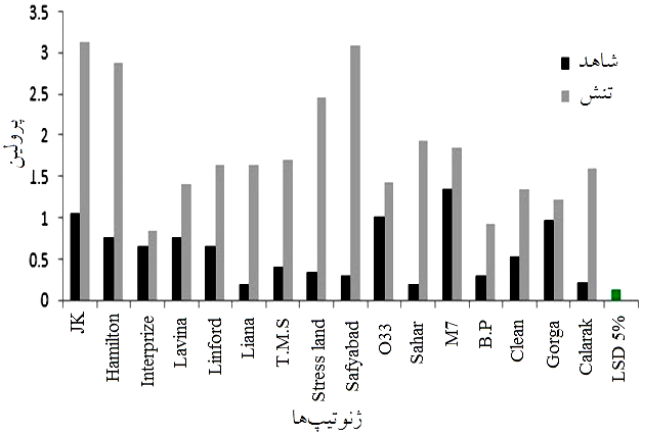
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.8.3]

است. طی تنش سرما جذب آب توسط ریشه‌ها در خاک با مشکل روبرو شده و به میزان قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد. بنابراین بسته شدن روزنه‌ها و کاهش تعرق منجر به حفظ آب درون بافت‌های گیاه می‌شود. هدایت روزنه‌ای در ژنوتیپ‌های متحمل به سرما نسبت به ژنوتیپ‌های حساس، کاهش کمتری دارد.

جدول ۳- مقایسه میانگین ژنوتیپ‌های سویا برای صفات فیزیولوژیک

ردیف	ژنوتیپ	هدایت روزنه‌ای	کلروفیل	درصد زنده‌مانی
۱	Jk	**۲۷/۲۵**	۳۶/۳۳	**۰/۹۲**
۲	Hamilton	۲۶/۸۵	۳۸/۷۷	۰/۸۷
۳	Interprize	۱۶/۳۰	۳۸/۵	**۰/۱۱**
۴	Lavina	۱۶/۸۵	**۳۲/۱۰**	۰/۵۷
۵	Linford	۱۸/۵۵	۳۲/۹۰	۰/۷۹
۶	Liana	۲۰/۴۷	۳۶/۵۲	۰/۷۴
۷	t.m.s	۱۸/۳۸	۳۷//۳۷	۰/۸۳
۸	Streesland	۲۴/۸۳	۳۴/۹۷	۰/۸۵
۹	Safyabad	۲۳/۵۵	۳۳/۱۰	۰//۹۱
۱۰	O33	۲۱/۳۷	۳۵/۶۲	۰/۷۱
۱۱	Sahar	۱۹/۵۷	۳۸	۰/۸۴
۱۲	M7	**٤١/٢٢**	۲۲/۷۲	۰/۸۴
۱۳	B.p	۱۹/۵۰	۳۷/۰۳	۰/۶۱
۱۴	Clean	۱۶/۱۳	۳۲/۴۵	۰/۶۸
۱۵	Gorga	**١٤/١٨**	۳۵/۲۵	۰/۵۱
۱۶	calarak	۱۹/۴۲	۳۲/۵۲	۰/۷۴
LSD ٪۵		۷/۸۶	۳/۷۷	۰/۳۳۹

همچنین رقم Jk و Safyabad بیشترین و رقم Interprize کمترین درصد زنده‌مانی را دارا هستند. تحت تنش سرما انرژی متابولیکی کمتری در دسترس گیاه زراعی قرار می‌گیرد، جذب آب و عناصر غذایی محدود می‌شود، آسیمیلاسیون کاهش یافته و رشد متوقف می‌شود (Vitamvas and Prasil 2008). میزان پرولین نیز تحت تنش سرما در تمامی ژنوتیپ‌ها افزایش یافت (شکل۱). در سطح شاهد ژنوتیپ M7 بیشترین و ژنوتیپ Sahar کمترین میزان پرولین را دارا بود. تحت تنش سرما نیز ژنوتیپ‌های Jk، Hamilton و Safyabad بیشترین میزان پرولین و ژنوتیپ‌های Interprize و B.p کمترین مقدار پرولین را دارا بودند. میزان تجمع پرولین در ژنوتیپ‌های متحمل بیشتر از ژنوتیپ‌های حساس می‌باشد که با نتایج آزمایشات مطابقت دارد (Petcu and Terbea 1995; Konstantinova et al. 2002; Javadian et al. 2007). تجمع پرولین در سلول باعث از بین رفتن رادیکال‌های آزاد اکسیژن، حفاظت آنزیم‌ها از تجزیه شدن، تنظیم اسمزی سلول و حفظ حالت طبیعی غشا می‌شود. در تعدادی از گیاهان تحت تنش سرما تا ۱۰۰ برابر شرایط نرمال غلظت پرولین افزایش می‌یابد (Matysik et al. 2002). به طور کلی می‌توان گفت ژنوتیپ‌های Jk، Hamilton، Safyabad، Streesland و M7 از لحاظ کلیه صفات مورد بررسی در تحمل تنش سرما، نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها برتری داشتند.

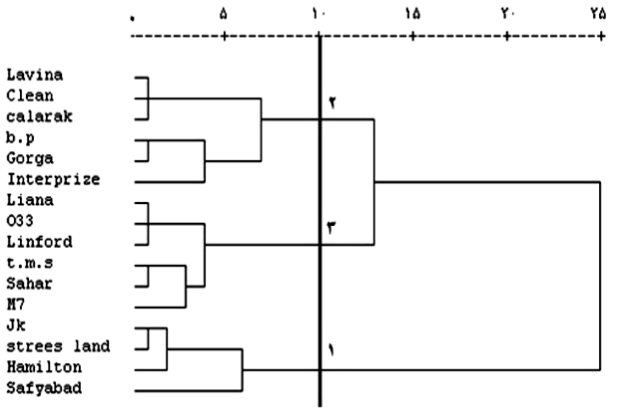


شکل ۱- میانگین ژنوتیپ‌های سویا از نظر میزان پرولین در سطح شاهد و تنش سرما

در تحقیق حاضر، از طریق تجزیه خوشه‌ای به روش وارد[1]، با استفاده از میانگین استاندارد شده صفات و معیار فاصله اقلیدسی، ژنوتیپ‌ها تحت تنش سرما در سه گروه مجزا و در شرایط شاهد نیز در سه گروه قرار گرفتند. در شرایط سرما گروه اول شامل چهار ژنوتیپ Jk، StressLand، Hamilton و Safyabad بود. در گروه دوم شش ژنوتیپ قرار گرفت که عبارت بودند از: Lavina، Clean، Calarak، B.p، Gorga و Interprize، در گروه سوم نیز شش ژنوتیپ قرار گرفتند (شکل۲). این ژنوتیپ‌ها شامل Liana، O33، Linford، t.m.s، Sahar و M7 بودند. با توجه به نتایج مقایسات میانگین و نمودار انحرافات از میانگین (شکل۳)

[1] Ward

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.8.3]

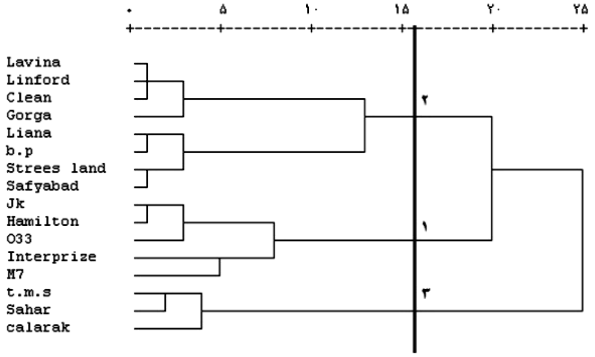


شکل ۲- نمودار درختی حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های سویا بر اساس صفات اندازه‌گیری شده تحت تنش



شکل ۳- انحراف از میانگین گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای برای صفات سطح تنش در ژنوتیپ‌های سویا (خوشه ۱ شامل ژنوتیپ‌های Jk، Stressland، Hamilton و Safyabad؛ خوشه ۲ شامل Lavina، Clean، Calarak، B.p، Gorga و Interprize و خوشه ۳ شامل Liana، O33، Linford، t.m.s، Sahar و M7 می‌باشد)

می‌توان اظهار داشت که ژنوتیپ‌های گروه اول غالبا دارای میزان کلروفیل، پرولین و هدایت روزنه‌ای بالا بوده و درصد زنده‌مانی آن‌ها بیش از ۷۰ درصد بود و لذا می‌توان آن‌ها را در گروه متحمل به سرما قرار داد. ژنوتیپ‌های گروه دوم به دلیل قدرت زنده‌مانی کمتر از لحاظ تحمل سرما ضعیف بوده و از نظر سایر صفات مانند هدایت روزنه‌ای و میزان کلروفیل نیز ضعیف بودند. ژنوتیپ‌های گروه سوم نیز از نظر میزان کلروفیل و هدایت روزنه-ای نسبت به گروه دوم برتری داشتند. در شرایط شاهد یا بدون تنش (شکل۴) نیز خوشه اول در برگیرنده ژنوتیپ‌های Jk، Hamilton، Interprize، O33 و M7 بود. با توجه به شکل ۵ این لاین‌ها غالباً دارای میزان کلروفیل و هدایت رونه‌ای بالا بود، لذا می‌توان آن‌ها را در گروه ژنوتیپ‌های دارای مقاومت ذاتی در برابر تنش قرار داد. گروه دوم شامل هشت ژنوتیپ Clean، B.p، Gorga، Safyabad، StressLand، Liana، Linford و Lavina بود. در گروه سوم فقط سه ژنوتیپ قرار گرفت که عبارت بودند از: t.m.s، Sahar و Calarak. این ژنوتیپ‌ها از نظر میزان کلروفیل برتری داشتند و نشت یونی آنها نیز بالا بود. به نظر می‌رسد که در شرایط بدون تنش نیز لاین‌های متحمل به سرما صفات برتر را نشان داده‌اند.

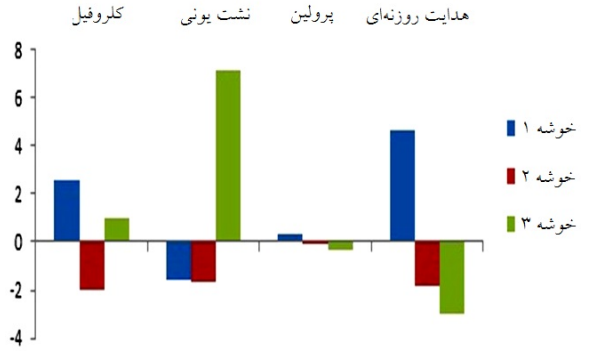


شکل ۴- نمودار درختی حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های سویا بر اساس صفات اندازه‌گیری شده در سطح شاهد

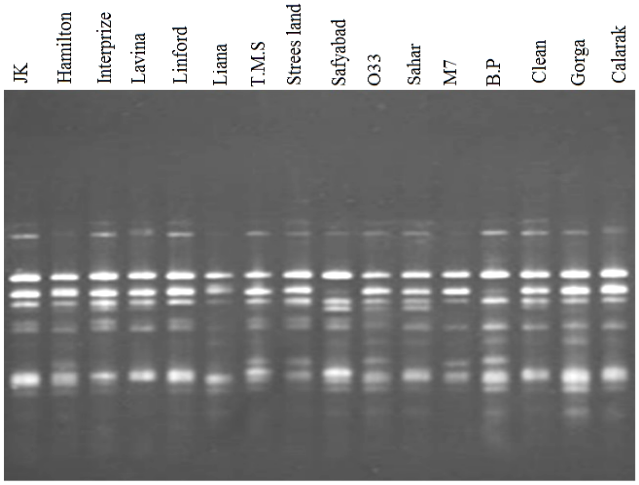
از ۳۴ آغازگر موجود که بر روی لاین‌های تحت بررسی آزمایش شدند، تعداد ۱۲ آغازگر الگوی نواربندی مناسبی نشان داده و قطعات با وضوح بالا تولید کردند (جدول۴). این آغازگرها در مجموع ۹۴ نوار، با میانگین ۷/۸۳ نوار به ازای هر آغازگر ایجاد کردند که از این تعداد، ۷۷ نوار چند شکل و بقیه تک شکل بودند. میزان مکان‌های ژنی چندشکل بین لاین‌های سویا بالا و میانگین آن برابر با ۸۱/۹۱ درصد بود. بر اساس آغازگرهای ISSR مورد استفاده درصد چندشکلی بین ۶۷ تا ۱۰۰ درصد متغیر بود و بیشترین درصد چندشکلی در آغازگرهای دو و ۳۴ (۱۰۰ درصد) و کمترین درصد چندشکلی در آغازگر شماره ۱۷ (۶۶/۶۷ درصد) مشاهده شد. میزان اطلاعات چند شکلی (PIC) به طور جداگانه برای هر جفت آغازگر محاسبه شد. آغازگرهای شماره ۸ و ۹ دارای بیشترین مقدار PIC برابر با ۰/۴۹۹ و آغازگر شماره ۱۳ دارای کمترین مقدار PIC به میزان ۰/۲۴۶ بودند. بنابراین دو آغازگر ۸ و ۹ بهتر از سایر آغازگرها تفاوت ژنتیکی ارقام سویا را نشان دادند. محاسبه شاخص نشانگر (MI) برای هر کدام از

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.8.3]

آغازگرهای مورد استفاده نشان داد که بیشترین میزان شاخص نشانگر مربوط به آغازگر شماره ۳۱ برابر با ۴/۴۶ و کمترین مقدار این شاخص برای آغازگر شماره ۱۹ برابر با ۱/۱۷ بود. میانگین MI و PIC برای آغازگرهای مورد استفاده به‌ترتیب برابر با ۲/۶۲ و ۰/۳۶ بود، که کارآیی نسبتا بالای این نشانگر در ارزیابی روابط ژنتیکی لاین‌های سویا در این مطالعه را نشان می‌دهند (جدول۴). طبق جدول ۵ بیشترین و کمترین میانگین سطح تنوع ژنتیکی بر اساس هر دو شاخص نی و شانون به ترتیب در آغازگرهای شماره ۳۱ و ۱۳ مشاهده شد که حاکی از تطابق برآورد در هر دو شاخص بود. الگوی نواربندی آغازگر شماره ۱۲ در شکل ۶ نشان داده شده است.

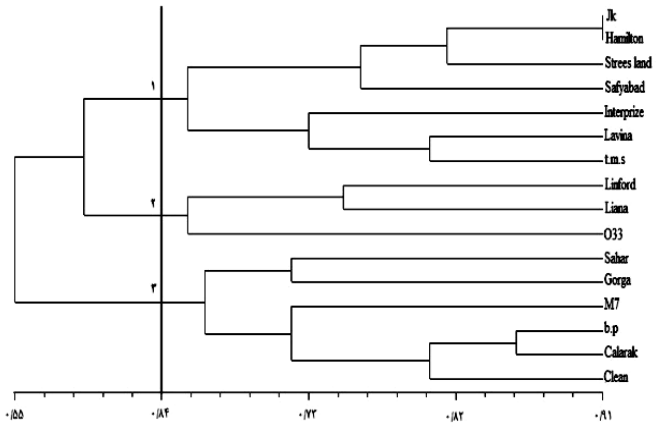


شکل۵- انحراف از میانگین گروه‌های حاصل از تجزیه خوشه‌ای برای صفات سطح شاهد در ژنوتیپ‌های سویا (خوشه ۱ شامل ژنوتیپ‌های Jk، Interprize، Hamilton، O33 و M7، خوشه ۲ شامل ژنوتیپ‌های Clean، B.p، Gorga، Safyabad، Stressland، Liana، Linford و Lavina و خوشه ۳ شامل t.m.s، Sahar و Calarak می‌باشد)



شکل ۶- الگوی نواربندی ISSR تکثیر شده با آغازگر شماره ۱۲ برای مطالعه تنوع در ژنوتیپ‌های سویا

تجزیه خوشه‌ای به روش دورترین همسایه‌ها[1] بر اساس ضریب تطابق ساده[2] تعیین شد (شکل۷). لاین‌ها به سه گروه مجزا تفکیک شدند. لاین‌های Jk، Hamilton، Stressland، Safyabad، Interprize، Lavina و T.m.s در گروه اول، لاین‌های Linford، Liana و O33 در گروه دوم و لاین‌های Sahar، Gorga، M7، B.p، Calarak و Clean در گروه سوم قرار گرفتند. ژنوتیپ‌های Jk، Hamilton، Safyabad و Stressland در نمودار خوشه‌ای حاصل از صفات فیزیولوژیک پس از اعمال تنش سرما نیز در یک گروه قرار داشتند. همچنین، در خوشه‌بندی ژنوتیپ‌ها به لحاظ صفات فیزیولوژیک ژنوتیپ‌های Liana، Linford و O33 در یک گروه و ژنوتیپ‌های Clean، B.p، Gorga و Calarak نیز در یک گروه قرار داشتند. از آنجا که ISSRها نشانگرهایی تصادفی هستند، قرار گرفتن ارقامی که از نظر مورفوفیزیولوژیک با هم متفاوتند در کنار هم، شاید به علت تکثیر مناطق غیر رمزکننده توسط آغازگرهای مورد استفاده در این بررسی باشد. Barakat (2004) در تعیین روابط ژنتیکی و انگشت نگاری شش رقم سویا بر اساس چندشکلی پروتئین و DNA، سه گروه برای آن‌ها تعیین کرد. دو گروه از این دسته‌ها دارای تک ژنوتیپ‌های Clark و Grawford بودند. این نتایج حاکی از آن بود که تفاوت زیادی بین دو لاین مذکور و سایر ژنوتیپ‌های مطالعه شده وجود داشته است. استفاده از تجزیه کلاستر برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مختلف سویا توسط محققان دیگر نیز گزارش شده است (Jaynes et al. 2005 and Mudibu et al. 2011).



شکل ۷- تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های سویا براساس داده‌های نشانگر ISSR

[1] Complete linkage
[2] Simple matching

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.8.3]

جدول ۴- نشانگرهای چند شکل تولید شده توسط آغازگرهای ISSR در لاین‌های سویا مورد بررسی

آغازگر (′3-′5)	شماره آغازگر	PIC	MI	تعداد کل نوارها	تعداد نوارهای چند شکل	تعداد نوارهای مونومورف	درصد چند شکلی
AGACAGACGC	۱	۰/۳۲۷	۲/۹۴۶	۱۰	۹	۱	۹۰
GACAGACAGACA GACA	۲	۰/۴۱۳	۲/۴۷۹	۶	۶	۰	۱۰۰
GACGACGACGACG	۸	۰/۴۹۹	۳/۹۹۹	۹	۸	۱	۸۸/۸۹
TCTCTCTCTCTCTCTCC	۹	۰/۴۹۹	۲/۴۹۸	۶	۵	۱	۸۳/۳۳
TTGTTGTTGTTGTTGC	۱۲	۰/۳۴۱	۲/۳۹۲	۱۰	۷	۳	۷۰
ACACACACACACACACYG	۱۳	۰/۲۴۶	۱/۷۲۳	۱۰	۷	۳	۷۰
AGAGAGAGAGAGAGAGG	۱۷	۰/۳۷۵	۱/۵	۶	۴	۲	۶۶/۶۷
AGAGAGAGAGAGAGAGT	۱۹	۰/۳۹۰	۱/۱۷۰	۴	۳	۱	۷۵
AATAATAATDG	۲۰	۰/۳۶۰	۲/۵۲۵	۹	۷	۲	۷۷/۷۸
GACAGACAGACAGACA	۲۴	۰/۴۸۴	۲/۴۲۰	۷	۵	۲	۷۱/۴۳
CACCACCACGC	۳۱	۰/۴۹۵	۴/۴۵۵	۱۰	۹	۱	۹۰
CACACACACACACACAG	۳۴	۰/۴۷۷	۳/۳۳۹	۷	۷	۰	۱۰۰
میانگین		۰/۳۶۲	۲/۶۲۰	۷/۸۳	۶/۴۱	۱/۴۲	۸۱/۹۱

جدول ۵- میانگین تنوع ژنتیکی در نشانگرهای ISSR مورد بررسی با استفاده از شاخص‌های تنوع نی و اطلاعات شانون

ترکیب آغازگر (′3-′5)	شماره آغازگر	شاخص تنوع نی	شاخص اطلاعات شانون
AGACAGACGC	۱	۰/۲۹۶	۰/۴۵۳
GACAGACAGACA GACA	۲	۰/۲۶۵	۰/۴۱۸
AACAACAACGC	۵	۰/۲۵۲	۰/۳۶۸
GACGACGACGACG	۸	۰/۳۰۴	۰/۴۶۰
TCTCTCTCTCTCTCTCC	۹	۰/۳۶۳	۰/۵۱۸
TTGTTGTTGTTGTTGC	۱۲	۰/۲۲۵	۰/۳۴۵
ACACACACACACACACYG	۱۳	۰/۱۸۲	۰/۲۹۳
AGAGAGAGAGAGAGAGT	۱۹	۰/۲۵۹	۰/۳۹۶
AATAATAATDG	۲۰	۰/۲۵۵	۰/۳۸۸
GACAGACAGACAGACA	۲۴	۰/۲۰۳	۰/۳۲۵

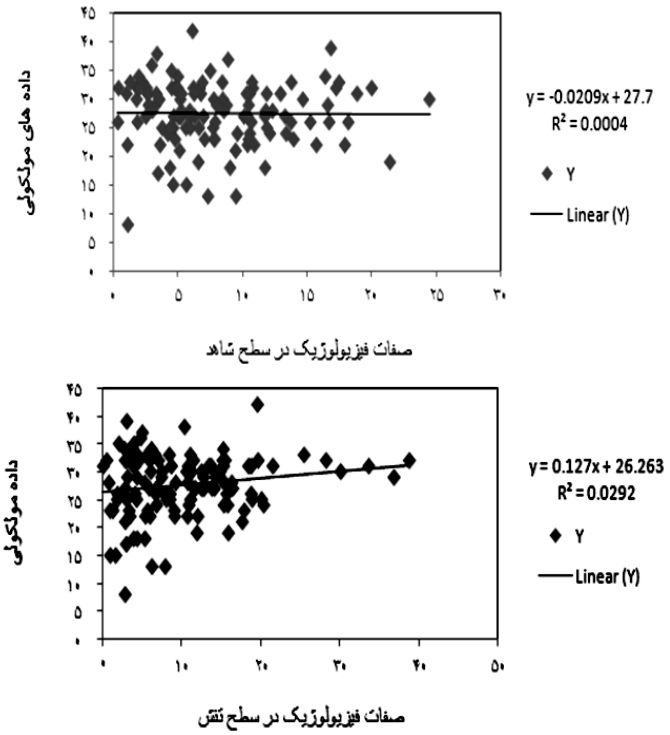
به منظور بررسی میزان ارتباط داده‌های مولکولی و صفات فیزیولوژیک، آزمون مانتل با استفاده از ماتریس ضریب تطابق ساده برای داده‌های مولکولی و ماتریس شباهت بر اساس صفات فیزیولوژیک با استفاده از روش اقلیدسی انجام شد. ضرایب همبستگی برابر با ۰/۰۱۹- و ۰/۱۸۱ به ترتیب برای صفات فیزیولوژیک در سطح شاهد و تنش با داده‌های مولکولی به دست آمدند که با توجه به آزمون مانتل، در سطح شاهد غیر معنی‌دار و تحت تنش سرما با احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. به نظر می‌رسد عکس‌العمل فیزیولوژیکی گیاه سویا تحت تنش سرما تا حدودی نتیجه بیان ژن یا ژن‌هایی است که الگوی نواری آنها را به‌دست آوردیم (شکل ۸).

گزارش‌های متناقضی در زمینه وجود یا عدم وجود تطابق بین نتایج حاصل از نشانگرهای مولکولی و داده‌های مورفولوژیک وجود دارد (Shahnejat-Bushehri et al. 2000; Grativo et al. 2010 and Mudibu et al. 2011). Bonato et al. (2006) پس از استفاده از نشانگر مولکولی AFLP و صفات مورفولوژیک به

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.8.3]

منظور بررسی خویشاوندی چند رقم سویا و محاسبه همبستگی بین این نشانگرها، رابطهٔ معنی‌داری بین ماتریس‌های تشابه نشانگر مولکولی AFLP و صفات مورفولوژیک مشاهده نکردند. Nagaoka and Ogihara (1997) نیز با مطالعه لاین‌های گندم بر اساس برخی صفات مورفولوژیک و نشانگر SSR، بر وجود ارتباط معنی‌دار بین ماتریس تشابه صفات مورفولوژیک و نشانگر مزبور تاکید کردند.



شکل ۸- رابطهٔ داده‌های مولکولی با صفات فیزیولوژیک در شرایط شاهد (الف) و تنش سرما (ب) در سویا

ارتباط نشانگرهای مولکولی ISSR با صفات فیزیولوژیک در دو سطح شاهد و تنش سرما بررسی شد. در این مرحله برای تمام صفات، رگرسیون به روش گام به گام[1] انجام شد. در سطح شاهد سه صفت نشت یونی، میزان پرولین و هدایت روزنه‌ای با تعدادی نشانگر ISSR ارتباط معنی‌دار نشان دادند (جدول۶). در سطح تنش همه‌ی صفات با تعدادی از نشانگرهای ISSR مورد مطالعه رابطه معنی‌داری داشتند (جدول۷). مقادیر ضرایب تبیین تصحیح شده برای تمامی صفات اندازه‌گیری شده بالا بود. تعدادی از نشانگرها دارای رابطه معنی‌دار با بیش از یک صفت بودند، به طوری که نشانگر p31m9 با چهار صفت و نشانگرهای p9m3، p12m10، p13m3، p20m8، p24m4 و p32m7 با دو صفت ارتباط داشتند. بین برخی نشانگرها با صفات بررسی شده هیچ ارتباطی وجود نداشت. نشانگر p12m10 در هر دو سطح تنش با صفت هدایت روزنه‌ای ارتباط مثبت داشت.

جدول۶- ضرایب رگرسیون بین صفات فیزیولوژیک در شرایط شاهد و نشانگرهای ISSR

نشانگر	نشت یونی	پرولین	هدایت روزنه‌ای
عرض از مبدأ	۱۹/۱۹	۰/۰۲۵	۲۴/۷۳۸
P1m4	۱/۲۹۴		
P2m1		۰/۶۳۱	
P2m4	-۷/۸۶۹		
P5m1	-۱۰/۷۸۵		
P8m5		۰/۵۷۷	
P9m5		۰/۲۶۵	
P12m1		-۰/۳۷۲	
P12m10			۶/۳۷۷
P20m1			۴/۲۱۰
P20m2			-۹/۴۸۰
P20m8			۲/۷۷۷
P31m4	۱/۲۹۴		
R^2	۰/۹۵	۰/۸۰	۰/۹۲

یکی از دلایل احتمالی رابطه بین نشانگرهای مولکولی و نمود صفات کمی، عدم تعادل پیوستگی دخیل در روابط تصادفی مربوط به فراوانی‌های آللی همبسته در نمونه‌های کوچک می‌باشد. با وجود این، پیوستگی ژنتیکی بین نشانگرها و مکان‌های ژنی صفات کمی (QTLها) محتمل‌ترین توجیه برای این روابط است (Chung et al. 2003). بنابراین به نظر می‌رسد که نشانگرهای مولکولی در کنار نشانگرهای مورفولوژیکی ابزار مناسبی برای شناسایی ژنوتیپ‌های برتر می‌باشند و به گونه‌ای مکمل همدیگر هستند.

[1] Stepwise method

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.8.3]

جدول ۷- ضرایب رگرسیون بین صفات فیزیولوژیک در سطح تنش سرما و نشانگرهای ISSR

نشانگرها	کلروفیل	نشت یونی	پرولین	هدایت روزنه‌ای	درصد زنده‌مانی
عرض از مبدأ	۳۸/۱۳۹	۲۷/۱۰۵	۱/۴۶۲	۲۱/۹۰۴	۰/۳۱۷
P1m8		۶/۹۳۳			
P2m3					-۰/۴۲۳
P2m4	۰/۲۳۳				
P5m1				-۵/۲۵۴	
P5m5			-۰/۷۶۶		
P5m6		-۷/۰۵۲			
P8m1				۱/۸۵۱	
P8m3					-۰/۰۵۰
P8m6					۰/۰۹۵
P9m1	۲/۲۷۶				
P9m3	۱/۲۱۸	۱/۳۸۹			
P12m2	۰/۴۵۸				
P12m10				۲/۳۵۸	۰/۱۷۰
P13m1		-۳/۰۷۶			
P13m3	-۱/۵۱۷	۷/۴۷۸			
P13m9					۰/۴۵۲
P19m4	-۰/۳۸۵				
P20m1					۰/۰۴۷
P20m2	-۳/۷۹۲				
P20m8	۴/۲۸۹				-۰/۰۵۵
P24m2					۰/۲۵۶
P24m3					-۰/۰۳۲
P24m4		۱۰/۶۲۱		-۳/۰۰۴	
P24m7		-۴/۸۸۵			
P31m3			-۰/۵۷۱		
P31m9	-۲/۰۶۱		۱/۱۱۷	۳/۳۹۴	۰/۲۵۸
P32m3			-۰/۳۰۸		
P32m7	-۰/۶۰۵				-۰/۰۱۰
R^2 تصحیح شده	۰/۹۹۷	۰/۹۸۸	۰/۹۵۶	۰/۹۷۰	۰/۹۹۸

براساس گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای صفات فیزیولوژیک در شرایط تنش سرما و با توجه به نتایج مقایسات میانگین و نمودار انحرافات از میانگین می‌توان اظهار داشت که ژنوتیپ‌های گروه اول (شامل چهار ژنوتیپ Jk، Stressland، Hamilton و Safyabad) اکثرا دارای میزان کلروفیل، پرولین و هدایت روزنه‌ای بالایی بوده و زنده‌مانی آن‌ها نیز بیش از ۷۰ درصد می‌باشد و لذا می‌توان آن‌ها را در گروه ژنوتیپ‌های متحمل به سرما دسته‌بندی کرده و در اصلاح واریته‌های متحمل به سرما از آن‌ها بهره برد. همچنین داده‌های بدست آمده از کاربرد نشانگرهای ISSR نشان داد که تنوع ژنتیکی لازم بین ژنوتیپ‌های سویای مورد مطالعه به منظور گزینش ژنوتیپ‌های برتر وجود دارد. میانگین بدست آمده برای شاخص‌های MI و PIC نشان‌دهنده کارایی بالای

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.8.3]

نشانگرهای ISSR در ارزیابی‌های فیلوژنی ژنوتیپ‌های سویای مورد مطالعه می‌باشد. در کل این بررسی نشان داد که نشانگرهای مولکولی و مورفولوژیکی در کنار یکدیگر ابزار مناسبی جهت شناسایی ژنوتیپ‌های برتر متحمل به سرما و استفاده از آن‌ها در برنامه‌های به‌نژادی و تولید هیبرید به حساب می‌آیند.

منابع

Alyari H, Shekari F (1999) Oil seeds, agriculture and physiology. Amidi publication, Tabriz, 182p (In Farsi).
Asadi l, Faraji l (2009) Principles of Applied Agriculture oilseeds. Iran's agricultural science publishing p: 93 (In Farsi).
Awasti AK, Nagaraja GM, Naik GV, Kanginakludru S, Tangavelu K, Nagaraja J (2004) Genetic diversity and relationships in mulbert (genus Morus) as revealed by RAPD and ISSR marker assays. Bio Medical Central Genetics 5: 1471-2156.
Archak S, Gaikwad AB, Gautam D, Rao EVVB, Swamy KRM, Karihaloo JL (2003) Comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR and AFLP) for genetic analysis of cashew (*Anacardium occidentale* L.) accessions of India. Genome 46: 362-369.
Barakat H (2004) Genetic Fingerprinting and Relationships of Six Soybeans (*Glycine max* L.) Cultivars Based on Protein and DNA Polymorphism. International Journal of Agriculture and Biology 5: 877-883.
Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free prolin for water-stress studies. Plant and Soil 39: 205-207.
Blum A (1988) Plant breeding for stress environment.CRC Press, Boca- Raton, Florida 223p.
Bonato ALV, Galvo ES, Geraldi IO, Arias CAA (2006) Genetic variability among soybean (*Glycine max* L. Merrill) cultivars released in Brazil using AFLP, markers. Genetics and Molecular Biology 29: 692-704.
Bussell JD, Waycot M, Chappill JA (2005) Arbitrarily Amplified DNA Markers as Characters for Phylogenetic Inference. Perspectives in Plant Ecology Evolution Systematics 7: 3-26.
Chen, YZ, Ane L (2005) The relationship between seasonal changes in antioxidative system and freezing tolerance in the leaves in Woody plants. Science Horticulture 73:272-279.
Chung, J, Babka HL, Graef GL, Staswick PE, Lee DJ, Cregan PB, Shoemaker RC, Specht JE (2003) The seed protein, oil, and yield QTL on soybean linkage group I. Crop Science 43: 1053-1067.
Dai F, Zhou MX, Zhang GP (2007) The change of chlorophyll fluorescence parameters in freeze-stressed barley as affected by cold acclimation and irradiance, Plant Physiology and Biochemistry 45: 915-921.
Esenta G, Okke A, Nalbanto B (2003) Effects of salicylic acid and cold on freezing tolerance in winter wheat leaves. Plant Growth Regulation 41: 231-236.
Grativo C, da Fonseca Lira-Medeiros C, Hemerly AS, Gomes Ferreira PC (2010) High efficiency and reliability of inter-simple sequence repeats (ISSR) markers for evaluation of genetic diversity in Brazilian cultivated *Jatropha curcas* L. accessions. Molecular Biology Reports 32: 121-132.
Javadian N, Karimzadeh G, Mahfoozi S (2007) Changes in accumulation of cold-induced total protein, antioxidant enzymes, proline, carbohydrates andchlorophyll fluorescence in wheat. In: The Proceedings of The 6th Asian Crop Science Association Conference, 5-9 Nov, 2007. Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand, 107p.
Jaynes DB, Colvin TS, Kaspar TC (2005) Identifying potential soybean management zones from multi-year yield data. Computers and Electronics in Agriculture 46: 309-327.
Kasperska A (1989) Metabolic consequences of low temperature stress in chilling insensitive plants, in: P.H. Li (Ed) , Low temperature Stress Physiology in Crops , CRC Press , Boca Raton, FL 27-40.
Konstantinova T, Parvanova D, Atanassor A, Djilianov D (2002) Freezing tolerance tobacco transform to accumulate osmoprotectants. Plant Science 163: 157-164.
Lewontin RC (1972) The apportionment of human diversity. Evolutionary Biology 6: 381-398.
Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Research 27: 209-220.
Matysik J, Bhalu AB, Mohnty P (2002) Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. Current Science 82: 525-532.
Mianabadi A, Mousavi bayegi M, sanaeinezhad H, nezami A (2009) Assessment and mapping of early autumn, late spring and winter freezing in khorasan razavi province using GIS, Journal Of Water and Soil (Agricultural Sciences and Technology) 23: 79-90. (In Farsi).
Mudibu J, Nkongolo KKC, Mehes-Smith M, Kalonji-Mbuyi A (2011) Genetic analysis of a soybean genetic pool using ISSR markers: Effects of gamma radiation on genetic variability. International Journal of Plant Breeding and Genetics 5: 253-245.
Murtaza N, Kitaoka M, Ghulam MA (2005) Genetic Differentiation of cotton cultivars by polyacrylamide gel electrophoresis. Journal of Central European Agriculture 6: 69-76.
Mwamburi MT (2005) Associating molecular markers which phenotypes in sweet potatoes and liriopogons using multivariate statistical modeling, Ph.D. dissertation Louisiana State University.
Nagaoka T, Ogihara Y (1997) Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. Theoretical and Applied Genetics 94: 597-602.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.8.3]

Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceeding of the National Academy of Science USA 70: 3321-3323.
Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes 6: 288-295.
Petcu E, Terbea M (1995) Proline content and the conductivity test as screening methods for frost tolerance of winter wheat. Bulgarian Journal of Plant Physiology 21: 3-11.
Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding 2: 225-238.
Prabhu RR, Webb D, Jessen H, Smith SL, Gresshoff PM (1997) Genetic relatedness soybean genotypes using DNA amplification fingerprinting (DAF), RFLP, and pedigree. Crop Science 37: 1590-1595.
Rezvani-e-khorshidi A, Kazemtabar K, Kianosh A (2002) Study of genetic variation of fatty acids and protein content of Soybean (*Glysine max* L.). Agricultural Science Journal 2: 38-45 (In Farsi).
Rizza, F, Crossatti, C, Stancan, M, Cattevelli L (1994) Studies for assessing the influences of hardening on cold tolerance of barley genotypes. Euphytica 75:131-138.
Rohlf FJ (1998) NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.01. Setauket, New York, USA: Exeter Software.
Saeidi H (2003) Plant systematic. Isfahan publication, 522p (In Farsi).
Saghai-Maroof MA, Soliman KM, Jorgensen RA, Allard RW (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81: 8014-8018.
Shahnejat-Bushehri AA, Yazdi-Samadi B, Abd Mishani C (2000) Assessment of genetic relationship among soybean cultivars using DNA amplification fingerprinting (DAF). Iranian Journal of Agricultural Sciences 31: 535-545 (In Farsi).
Sudupak MA, Akkaya MS, Kence A (2003) Genetic relationships among perennial and annual Cicer species growing in Turkey assessedby AFLP fingerprinting. Theoretical and Applied Genetics 108: 937-944.
Terzopoulos PJ, Bebeli PJ (2008) Genetic diversity analysis of Mediterranean faba bean *(Vicia faba* L.) with ISSR markers. Field Crops Research 108: 39-44
Vitamvas P, Prasil LT (2008) WCS120 protein family and frost tolerance during cold acclimation, deacclimation and reacclimation of winter wheat. Plant Physiology and Biochemistry 46: 970-976.
Whigham DK (1983) Soybean, Interntional Rice Research Institute (ed.). Potential productivity of field crops under different environments. IRRI, Los Banos, Philippines 205-225.
Wilcox JR, Cavins JF (1995) Backcrossing high seed protein to a soybean cultivar. Crop Science 35:1036-1041.
Xu X, Peng M, Fang Z, Xu XP (2000) The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length. Nature Genetics 24: 396-9.
Yeh FC, Yang RC, Boyle TBJ, Ye ZH, Mao JX (1997) PopGene, the user-friendly software for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Canada. http: //www.ualberta.ca /~fyeh/.
Zhu YL, Song QJ, Hyten DL, Van Tassell CP, Matukumalli LK, Grimm DR, Hyatt SM, Fickus EW, Young ND, Cregan PB (2003) Single-nucleotide polymorphisms in soybean. Genetics 163: 1123-1134.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1393.9.4.8.3]