

## ارزیابی تنوع ژنوتیپ‌های 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<sup>۱</sup>، امید سفالیان<sup>\*</sup><sup>۱</sup>، علی اصغری<sup>۱</sup>، بهنام فیروزی<sup>۱</sup> و فاطمه احمدپور<sup>۱</sup>

۱- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشیاران، دانشجوی دکترای و دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه محقق اردبیلی

Sepehri M<sup>1</sup>, Sofalian O<sup>\*1</sup>, Asghari A<sup>1</sup>, Firooz B<sup>1</sup>, Ahmadpoor F<sup>1</sup>

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 به نژادی و از جمله انتخاب والدین نقش مهمی دارد. تنش سرما یکی از عوامل محیطی است که منجر به بروز تنش اکسیداتیو و تغییرات فیزیولوژیکی، مورفوولوژیکی و بیوشیمیایی در سلول و در مجموع گیاه می‌شود. سویا گرمادوست بوده و به دمای‌های 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 بودست 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 بررسی شده در شرایط سرما شناسایی شدند. این بررسی نشان داد که نشانگرهای مولکولی و مورفوولوژیکی 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

## مقدمه

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 مورفلوژیکی 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 نشانگرهای مطلوب‌تر می‌باشد (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 می‌باشد (Sudupak et al. 2003).

نشانگرهای مولکولی ابزارهای ارزشمندی برای تشخیص و ارزیابی تنوع ژنتیکی بین گونه‌ای و درون گونه‌ای جمعیت‌های مختلف می‌باشد (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 ISSR داشته باشد (Terzopoulos and Bebeli 2008).

نشانگر نشانگری پیچیده‌تری نسبت به نشانگر RAPD تولید می‌کند، که برای تعیین خصوصیت نژادهای بانک ژن و تشخیص Archak et al. (2003). نشانگرهای ISSR برای آشکارسازی چندشکلی ژنتیکی بین نژادها، از طریق تولید تعداد زیاد نشانگر میکروساتلاتایتی 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).

پس از غلات، دومین منبع مهم غذایی بشر، بقولات هستند. سویا با نام علمی (*Glycine max L.*) گیاهی یک ساله از خانواده‌ی بقولات<sup>1</sup>، زیر خانواده پروانه آسا<sup>2</sup> و طایفه *Phaseoleae* می‌باشد. این گیاه بهدلیل استفاده در تعزیه انسان و دام، مهمترین گیاه دانه‌ای 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 تأمین می‌شود. روغن مورد نیاز انسانی از دو منبع حیوانی و گیاهی تأمین 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 Asadi and Faraji 2009 مقام اول تولید را به خود اختصاص داده است (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 معتدل‌هه نیز به میزان زیادی کشت می‌شود و طبیعتاً به دماهای پایین بسیار حساس است و به سادگی در برابر سرما آسیب می‌بیند (Saeidi 2003). بنابراین دما از عوامل مهم در زراعت این گیاه دانه روغنی است. حداقل دما برای جوانه‌زنی بدور 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 معتدل‌هه وقوع تنفس 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

<sup>1</sup> Fabaceae<sup>2</sup> Papilioideae

سرما اعمال شد. در این مرحله صفات میزان کلروفیل (با استفاده از دستگاه کلروفیل متر)، هدایت روزنها (سانتی متر بر ثانیه)، پرولین (بر حسب میکروگرم پرولین در هر گرم وزن تر) و نشت یونی (میزان خسارت به غشاء) اندازه گیری شدند. در نهایت گلدانها به دمای  $25\pm 2$  درجه سانتی گراد برگردانده شده و پس از ۲۴ ساعت بازیابی شدند. تعداد بوته های زنده از هر ژنو تیپ در هر تکرار شمارش شد و درصد زنده مانع بوته ها با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$\times 100$  /تعداد گیاهان زنده /تعداد سرمایه اعمال از قبل

## پیش از اعمال تیمار سرما

میزان کلروفیل با استفاده از دستگاه کلروفیل مدل Spad-502 از کمپانی Konica Minolta با اندازه‌گیری طیف جذبی در محدوده ۶۰۰ nm (۴۰۰-۵۰۰ nm) و در محدوده نور قرمز (۵۰۰-۵۰۰ nm) بدست آمد. هدایت روزنہای با استفاده از دستگاه پرومتر Decagon Devices مورد سنجش قرار گرفت. نشت یونی به روش Dai et al. (2007) از نمونه‌های برگ Bates et al. (1973) اندازه‌گیری شد. پرولین نیز به روش CTAB برداشت شده از ۱۶ ژنوتیپ سویا، براساس روش Saghai-Maroof et al. 2000) انجام شد. واکنش زنجیره‌ای PCR 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 (جدول ۲). چرخه‌های حرارتی واکنش PCR برای آغازگرهای ISSR به شرح زیر بود: مرحله اول) واسرتنه‌سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد؛ مرحله دوم) شامل ۴۰ چرخه (الف) واسرتنه‌سازی به مدت یک دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ب) اتصال آغازگرها به رشته‌های 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 ۵ ساعت با ولتاژ ثابت ۱۲۰ وات در ژل آکارز ۱/۲ درصد انجام گفت و دستگاه ژل‌دک (ساخت شرکت Uvitex) برای

اغلب مزایای ریزماهواره (SSRs) و چندشکلی در طول قطعات تکثیر شده (AFLP) و چندشکلی DNA تکثیر شونده تصادفی (RAPD) در نشانگر ISSR جمع شده است. نشانگرهای مولکولی (RAPD) و صفات مورفو فیزیولوژیک هر دو می توانند تکمیل کننده یکدیگر باشند و نمی توانند به تنها یابار مفید و سودمندی در روش های مختلف اصلاحی محسوب شوند (Mwamburi 2005). بنابراین بررسی اثر سرما بر برخی صفات فیزیولوژیک و رابطه آن با داده های مولکولی به گزینش ژنتیپ های متتحمل به سرما کمک خواهد کرد.

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

مواد و روش‌ها

در این آزمایش ۱۶ ژنوتیپ سویای تهیه شده 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 کرت های خردشده در قالب طرح کاملاً 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 گلدان هایی بود که از ابتدا تا انتهای آزمایش در دمای  $25\pm 2$  درجه سانتی گراد قرار گرفتند. ولی بقیه گلدان ها تا ظهر اولین جفت برگ حقیقی در دمای  $25\pm 2$  درجه سانتی گراد قرار گرفته، سپس به اتاقک سرما در دمای  $15\pm 2$  درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انتقال داده شدند، که این دما در واقع پیش تیمار سرما (خوگیری) بود. سپس گلدان ها به مدت ۱۰ روز در دمای  $5\pm 1$  درجه سانتی گراد قرار گرفتند و بدین ترتیب تنش

گرفت. گروه‌بندی ژنویرهای 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 داده‌های ژنویری و صفات فنوتیپی و همچنین حذف نشانگرهایی که روی صفات اندازه‌گیری شده تاثیر نداشتند. تجزیه رگرسیون گام به گام توسط نرم افزار SPSS 16 انجام شد. نشانگرهای مولکولی به عنوان متغیرهای مستقل و صفات مطالعه به عنوان متغیرهای وابسته در نظر گرفته شدند. تمامی تجزیه‌های مربوط به صفات فیزیولوژیکی مورد مطالعه نیز توسط نرم افزار SPSS و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار Excel انجام گرفت.

### نتایج و بحث

با توجه به نتایج تجزیه واریانس تفاوت بین ژنویرهای از نظر کلروفیل و پرولین و زنده‌مانی در سطح احتمال یک درصد و از نظر صفت هدایت روزنہای در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار به دست آمد، ولی از لحاظ نشت یونی معنی‌دار نبود. اثر متقابل تنش × ژنویر پ 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 در صورت ادامه انجام‌داد، غشا سیتوپلاسمی پاره شده و متعاقباً مواد سلولی به خارج از سلول نشت می‌کند. مقایسات میانگین (جدول ۳) نشان داد تنش سرما میزان کلروفیل را افزایش داد. بیشترین میزان کلروفیل مربوط به رقم M7 و کمترین میزان آن Chen and Ane (2005) Lavina بود. طبق گزارش (Powell et al. 1996) با افزایش مدت زمان سرماده‌ی و کاهش بیشتر محتوی آب نسبی سلول‌های برگ غلاظت کلروفیل در سلول‌های برگ به تدریج 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، ژنویرهای Jk، Safyabad و Hamilton دارای بیشترین میزان هدایت روزنہای و ژنویر Gorga دارای کمترین میزان این صفت می‌باشد. با اعمال تنش سرما میزان هدایت روزنہای کاهش یافت، که این امر در نتیجه بسته شدن روزنہ‌ها صورت گرفته

جدول ۱- ژنویرهای سویا مورد استفاده در آزمایش

شماره	ژنویر	شماره	ژنویر
۹	Jk	۱	
۱۰	Hamilton	۲	
۱۱	Interprise	۳	
۱۲	Lavina	۴	
۱۳	Linford	۵	
۱۴	Liana	۶	
۱۵	T.m.s	۷	
۱۶	Streesland	۸	

جدول ۲- اجزای واکنش PCR برای آغازگرهای ISSR

اجزای واکنش	غلاظت نهایی (میکرولیتر)	مقدار مورد استفاده
بافر	۱X	(۱۰X) PCR
کلرید منزیم (۵۰ میلی مولار)	۰/۸	۰/۸ میلی مولار
مخلوط چهار نوکلوتید (۱۰ میلی مولار)	۰/۲	۰/۱ میلی مولار
آغازگر (۵ میکرولیتر)	۱/۶	۰/۴ میکرو مولار
آنزیم (۵ واحد در میکرولیتر)	۰/۲۶	۱/۳ واحد
DNA (۲۰ نانو گرم در میکرولیتر)	۴	
آب مقطّر دی یونیزه	۱۱/۱۴	
حجم نهایی واکنش	۲۰	

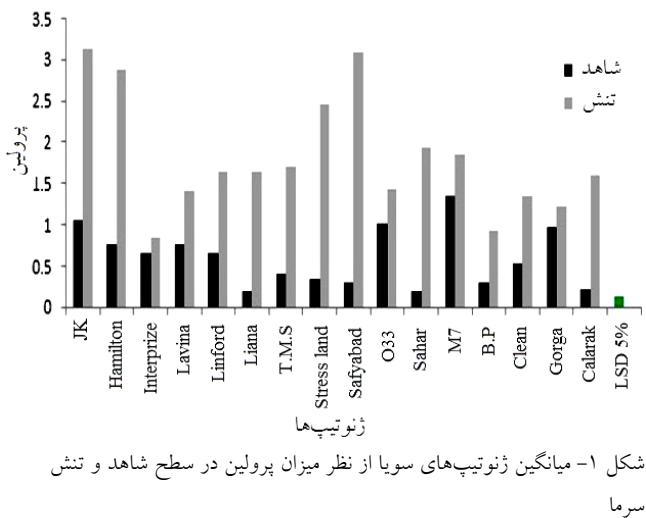
مشاهده و عکس‌برداری از نوارها استفاده شد. در این تحقیق برای تکثیر قطعات DNA ژنومی از ۳۴ آغازگر ISSR تهیه شده از شرکت Bioneer کره جنوبی استفاده شد. الگوهای نواری حاصل به صورت صفر و یک (به ترتیب عدم وجود یا وجود نوار) امتیازدهی شدند. میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) و شاخص نشانگر (MI) محاسبه شد. بین PIC و MI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

$$PIC=2pq \quad (\text{معادله ۱})$$

$$MI=N.PIC \quad (\text{معادله ۲})$$

که در این معادله‌ها  $q$  و  $p$  به ترتیب فراوانی ال 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 Yeh et al. (PopGen 1.32) (Lewontin 1972) با استفاده از نرم‌افزار Mantel (Mantel 1967) (al. 1997) محاسبه شد. آزمون مانتل (Peakall and Smouse 2006) GenAlex 6.4 (صورة نرم‌افزار

تجمع پرولین در ژنوتیپ‌های متتحمل 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 رفتان 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, Safyabad, Hamilton, Stressland, T.M.S 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<sup>۱</sup>، 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, Safyabad, Hamilton و StressLand بود. در گروه دوم شش ژنوتیپ قرار گرفت که عبارت بودند از: Gorga, Lavina, Interprize, Clean, Calarak و B.p. این ژنوتیپ‌ها سوم نیز شش ژنوتیپ قرار گرفتند (شکل ۲). این ژنوتیپ‌ها شامل Sahar, t.m.s, Linford, O33, Liana و M7 بودند. با توجه به نتایج مقایسات میانگین و نمودار انحرافات از میانگین (شکل ۳)

است. طی تنش سرما جذب آب توسط ریشه‌ها در خاک با مشکل روپرور 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 متتحمل به سرما نسبت به ژنوتیپ‌های حساس، کاهش کمتری دارد.

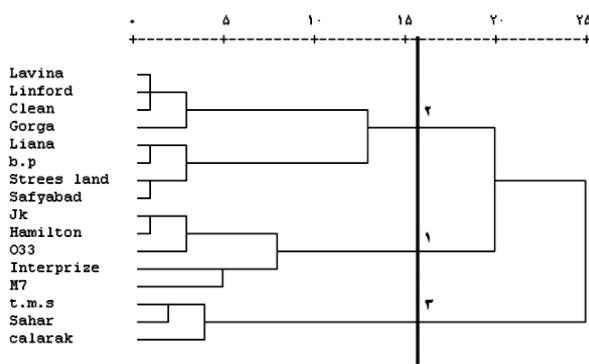
جدول ۳- مقایسه میانگین ژنوتیپ‌های سویا برای صفات فیزیولوژیک

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	۲۲/۷۲	۴۱/۲۲	۰/۸۴
۱۳	B.p	۱۹/۵۰	۳۷/۰۳	۰/۶۱
۱۴	Clean	۱۶/۱۳	۳۲/۴۵	۰/۶۸
۱۵	Gorga	۱۴/۱۸	۳۵/۲۵	۰/۵۱
۱۶	calarak	۱۹/۴۲	۲۲/۵۲	۰/۷۴
	LSD ٪۵	۷/۸۶	۲/۷۷	۰/۳۳۹

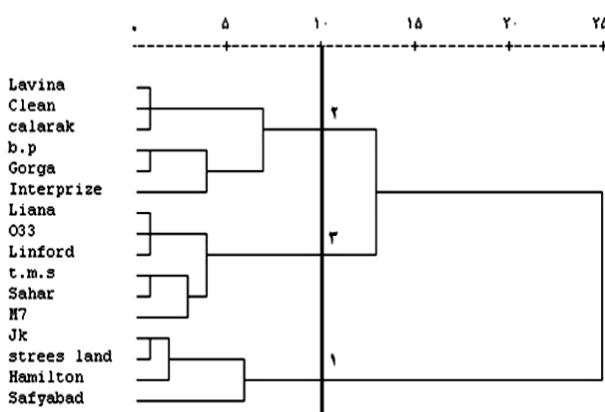
همچنین رقم Jk و Safyabad بیشترین و رقم Interprize کمترین درصد زنده‌مانی را دارا هستند. تحت تنش سرما انرژی متابولیکی کمتری در دسترس گیاه زراعی قرار می‌گیرد، جذب آب و عناصر غذایی محدود می‌شود، آسیمیلاسیون کاهش یافته و رشد متوقف می‌شود (Vitamvas and Prasil 2008). میزان پرولین نیز تحت تنش سرما در تمامی ژنوتیپ‌ها افزایش یافت (شکل ۱). در سطح شاهد ژنوتیپ M7 بیشترین و ژنوتیپ Sahar کمترین میزان پرولین را دارا بود. تحت تنش سرما نیز ژنوتیپ‌های Jk, Safyabad و Hamilton بیشترین میزان پرولین و ژنوتیپ‌های B.p و Interprize کمترین مقدار پرولین را دارا بودند. میزان

<sup>1</sup> Ward

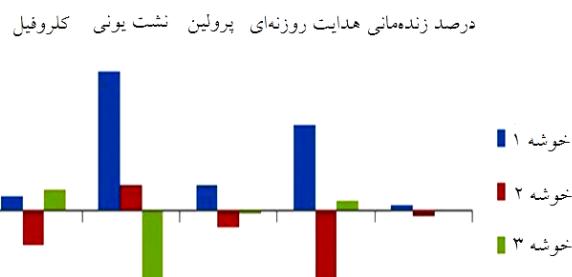
لذا می‌توان آن‌ها را در گروه ژنوتیپ‌های دارای مقاومت ذاتی در برای تنش قرار داد. گروه دوم شامل هشت ژنوتیپ Clean, Lavina, StressLand, Safyabad, Liana, Gorga, Interprise و Linford بود. در گروه سوم فقط سه ژنوتیپ قرار گرفت که عبارت بودند از: Calarak و Sahar t.m.s. این ژنوتیپ‌ها از نظر میزان کلروفیل برتری داشتند و نشت یونی آنها نیز بالا بود. به نظر می‌رسد که در شرایط بدون تنش نیز لاین‌های متتحمل به سرما صفات برتر را نشان داده‌اند.



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



شکل ۳- نمودار درختی حاصل از تجزیه خوش‌ای ژنوتیپ‌های سویا بر اساس صفات اندازه‌گیری شده تحت تنش



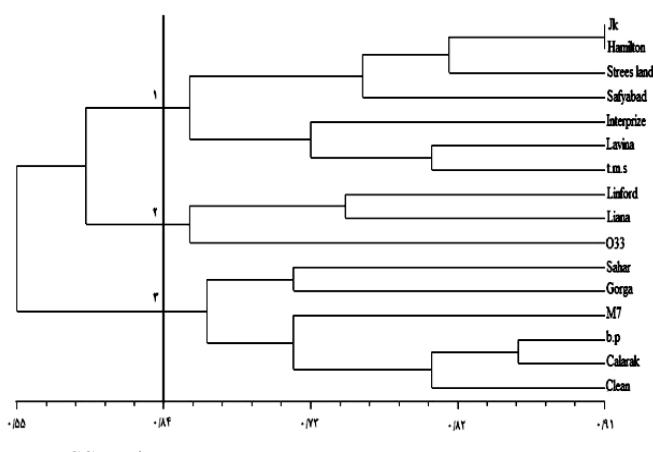
شکل ۴- نمودار درختی حاصل از تجزیه خوش‌ای ژنوتیپ‌های سویا بر اساس صفات اندازه‌گیری شده در سطح شاهد

از ۳۴ آغازگر موجود که بر روی لاین‌های تحت بررسی آزمایش شدند، تعداد ۱۲ آغازگر الگوی نواریندی مناسبی نشان داده و قطعات با وضوح بالا تولید کردند (جدول ۴). 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 ژئی چندشکل بین لاین‌های سویا بالا و میانگین آن برابر با ۸۱/۹۱ درصد بود. بر اساس آغازگرها ISSR مورد استفاده درصد چندشکلی بین ۶۷ تا ۱۰۰ تا ۱۰۰ درصد متغیر بود و بیشترین درصد چندشکلی در آغازگرها 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. آغازگرها 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

شکل ۳- انحراف از میانگین گروه‌های حاصل از تجزیه خوش‌ای برای صفات سطح تنش در ژنوتیپ‌های سویا (خوش ۱ شامل ژنوتیپ‌های Safyabad و Hamilton, Stressland, Jk, Interprise و Gorga, B.p, Calarak, Lavina ۲ شامل M7 و Sahar t.m.s Linford, O33 Liana ۳ شامل M7 و Jk, stress land و Safyabad)

می‌توان اظهار داشت که ژنوتیپ‌های گروه اول غالباً دارای میزان کلروفیل، پرولین و هدایت روزنی‌ای بالا بوده و درصد زندمانی آن‌ها بیش از ۷۰ درصد بود و لذا می‌توان آن‌ها را در گروه متتحمل به سرما قرار داد. ژنوتیپ‌های گروه دوم به دلیل قارت زندمانی کمتر از لحاظ تحمل سرما ضعیف بوده و از نظر سایر صفات مانند هدایت روزنی‌ای و میزان کلروفیل نیز ضعیف بودند. ژنوتیپ‌های گروه سوم نیز از نظر میزان کلروفیل و هدایت روزنی ای نسبت به گروه دوم برتری داشتند. در شرایط شاهد یا بدون تنش (شکل ۴) نیز خوش ۱ اول در برگیرنده ژنوتیپ‌های Jk, Interprise و O33 بود. با توجه به شکل ۵ این لاین‌ها غالباً دارای میزان کلروفیل و هدایت رونه‌ای بالا بودند.

تجزیه خوشهای به روش دورترین همسایه‌ها<sup>۱</sup> بر اساس ضریب تطابق ساده<sup>۲</sup> تعیین شد (شکل ۷). لاین‌ها به سه گروه مجزا تقسیک شدند. لاین‌های Jk، Stressland، Hamilton، Linford، Lavina، Interprize، T.m.s و O33 در گروه اول، لاین‌های M7، Gorga، Sahar، Liana و Clean در گروه دوم و لاین‌های B.p، Calarak، Safyabad، Safiyabad، O33 در گروه سوم قرار گرفتند. ژنتیپ‌های زننگری سویا در نمودار خوشهای حاصل از صفات فیزیولوژیک پس از اعمال نتش سرما نیز در یک گروه قرار داشتند. همچنین، در خوشبندی ژنتیپ‌ها به لحاظ صفات فیزیولوژیک ژنتیپ‌های Liana و Linford در یک Gorga و ژنتیپ‌های Clean، B.p، Calarak و Gorga نیز در یک گروه قرار داشتند. از آنجا که ISSR نشانگرهایی تصادفی هستند، قرار گرفتن ارقامی که از نظر مورفوفیزیولوژیک با هم متفاوتند در کنار هم، شاید به علت تکثیر مناطق غیر رمزکننده Barakat (2004) در تعیین روابط زننگری 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 ژنتیپ‌های Clark و Crawford بودند. این نتایج حاکی از آن بود که تفاوت زیادی بین دو لاین مذکور و سایر ژنتیپ‌های مطالعه شده وجود داشته است. استفاده از تجزیه کلاستر برای گروه‌بندی ژنتیپ‌های مختلف سویا توسط محققان دیگر نیز گزارش شده است (Jaynes et al. 2005 and Mudibu et al. 2011).

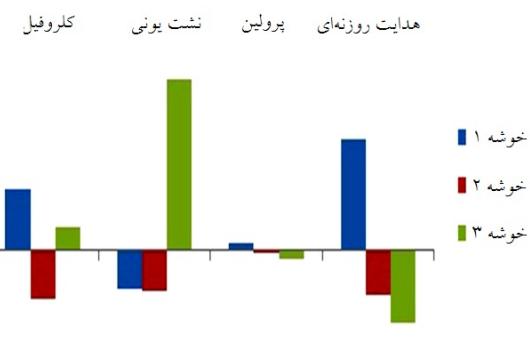


شکل ۷- تجزیه خوشهای ژنتیپ‌های سویا براساس داده‌های نشانگر ISSR

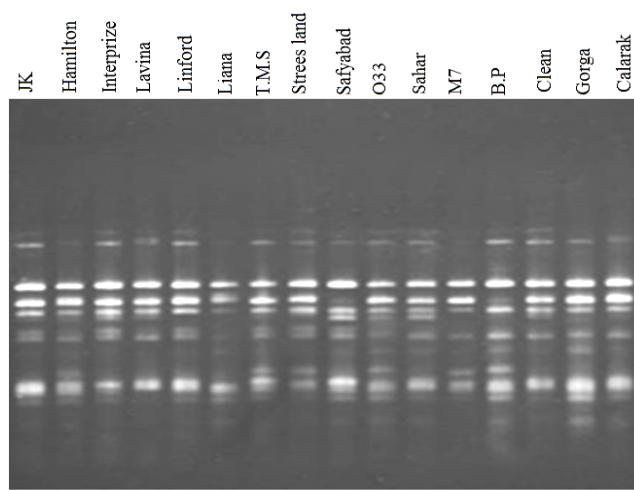
<sup>1</sup> Complete linkage

<sup>2</sup> Simple matching

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 PIC برای آغازگرهای مورد استفاده به ترتیب برابر با ۰/۶۲ و ۰/۳۶ بود، که کارآیی نسبتاً بالای این نشانگر در ارزیابی روابط زننگری لاین‌های سویا در این مطالعه را نشان می‌دهند (جدول ۴). 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 برآورده در هر دو شاخص بود. الگوی نواربندی آغازگر شماره ۱۲ در شکل ۶ نشان داده شده است.



شکل ۵- انحراف از میانگین گروههای حاصل از تجزیه خوشهای برای صفات سطح شاهد در ژنتیپ‌های سویا (خوشه ۱ شامل ژنتیپ‌های M7، O33 و Hamilton)، (خوشه ۲ شامل ژنتیپ‌های Linford، Liana، Stressland، Safiyabad، Gorga، B.p، Clean و Xanthi) و خوشه ۳ شامل Calarak و Sahar (می باشد)



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

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

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

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

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

عكس العمل فیزیولوژیکی گیاه سویا تحت تنش سرما تا حدودی نتیجه بیان ژن یا ژن‌هایی است که الگوی نواری آنها را به دست آورده‌یم (شکل ۸).

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

به منظور بررسی میزان ارتباط داده‌های مولکولی و صفات فیزیولوژیک، آزمون مانتل با استفاده از ماتریس ضریب تطبیق ساده برای داده‌های مولکولی و ماتریس شباهت بر اساس صفات فیزیولوژیک با استفاده از روش اقلیدسی انجام شد. ضرایب همبستگی برابر با  $-0.019$  و  $-0.181$  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 معنی دار و تحت تنش سرما با احتمال ۵ درصد معنی دار بود. به نظر می‌رسد

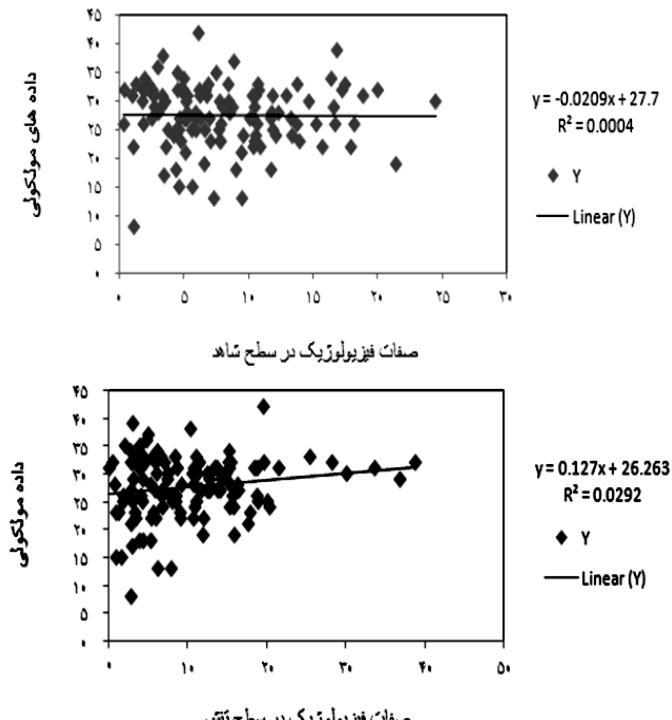
نشانگرها دارای رابطه معنی دار با بیش از یک صفت بودند، به طوری که نشانگر p31m9 با چهار صفت و نشانگرهای p9m3, p12m10, p20m8, p24m4, p13m3 و p32m7 با دو صفت ارتباط داشتند. بین برخی نشانگرها با صفات بررسی شده هیچ ارتباط وجود نداشت. نشانگر p12m10 در هر دو سطح تنش با صفت هدایت روزنه ای ارتباط مثبت داشت.

جدول ۶- ضرایب رگرسیون بین صفات فیزیولوژیک در شرایط شاهد و

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

یکی از دلایل احتمالی رابطه بین نشانگرهای مولکولی و نمود صفات کمی، عدم تعادل پیوستگی دخیل در روابط تصادفی مربوط به فراوانی های آللی همبسته در نمونه های کوچک می باشد. با وجود این، پیوستگی ژنتیکی بین نشانگرها و مکان های ژنی صفات کمی (QTL ها) محتمل ترین توجیه برای این روابط است (Chung et al. 2003). بنابراین به نظر می رسد که نشانگرهای مولکولی در کنار نشانگرهای مورفو لوژیکی ابزار مناسبی برای شناسایی ژنتیپ های برتر می باشند و به گونه ای مکمل هم دیگر هستند.

منتظر بررسی خویشاوندی چند رقم سویا و محاسبه همبستگی بین این نشانگرها، رابطه معنی داری بین ماتریس های تشابه نشانگر مولکولی AFLP و صفات مورفو لوژیک مشاهده نکردند. Nagaoka and Ogihara (1997) نیز با مطالعه لاین های گندم بر اساس برخی صفات مورفو لوژیک و نشانگر SSR، بر وجود ارتباط معنی دار بین ماتریس تشابه صفات مورفو لوژیک و نشانگر مزبور تاکید کردند.



شکل ۸- رابطه داده های 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<sup>۱</sup> انجام شد. در سطح شاهد سه صفت نشت یونی، میزان پرولین و هدایت روزنه ای با تعدادی نشانگر ISSR ارتباط معنی دار نشان دادند (جدول ۶). در سطح تنش همهی صفات با تعدادی از نشانگرهای ISSR مورد مطالعه رابطه معنی داری داشتند (جدول ۷). مقادیر ضرایب تبیین تصحیح شده برای تمامی صفات اندازه گیری شده بالا بود. تعدادی از

<sup>1</sup> Stepwise method

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

نشانگرها	کلروفیل	نشت یونی	پرولین	هدایت روزنهمای	درصد زنده‌مانی
عرض از مبدأ	۳۸/۱۳۹	۲۷/۱۰۵	۱/۴۶۲	۲۱/۹۰۴	۰/۳۱۷
P1m8	۶/۹۳۳			-۰/۴۲۳	
P2m3				-۵/۲۵۴	
P2m4	۰/۲۳۳			-۰/۷۶۶	
P5m1				-۷/۰۵۲	
P5m5				۱/۸۰۱	
P5m6				-۰/۰۵۰	
P8m1				۰/۰۹۵	
P8m3				-۰/۱۷۰	۲/۳۵۸
P8m6				-۳/۰۷۶	
P9m1	۲/۲۷۶			۱/۳۸۹	
P9m3	۱/۲۱۸			-۷/۴۷۸	-۱/۵۱۷
P12m2	۰/۴۵۸			-۰/۰۴۵۲	
P12m10				-۰/۰۴۷	
P13m1				-۰/۰۵۵	
P13m3				-۰/۲۵۶	
P13m9				-۰/۰۳۴	
P19m4	-۰/۳۸۵			-۳/۰۰۴	
P20m1				-۴/۰۸۵	
P20m2	-۳/۷۹۲			-۰/۰۵۵	
P20m8	۴/۲۸۹			-۰/۰۴۷	
P24m2				-۰/۰۴۰	
P24m3				-۰/۰۴۰	
P24m4				-۰/۰۱۰	
P24m7				-۰/۰۹۸	۰/۹۷۰
P31m3				-۰/۰۹۵۶	۰/۹۵۶
P31m9	-۲/۰۶۱			-۰/۰۹۸۸	۰/۹۸۸
P32m3				-۰/۰۶۰۵	۰/۹۹۷
P32m7		R <sup>2</sup> تصحیح شده			

می‌توان آن‌ها را در گروه ژنوتیپ‌های متتحمل به سرما دسته‌بندی کرده و در اصلاح واریته‌های متتحمل به سرما از آن‌ها بهره برد. همچنین داده‌های بدست آمده از کاربرد نشانگرهای ISSR نشان داد که تنوع ژنتیکی لازم بین ژنوتیپ‌های سویا مورد مطالعه به منظور گزینش ژنوتیپ‌های برتر وجود دارد. میانگین بدست آمده برای شاخص‌های MI و PIC نشان‌دهنده کارایی بالای

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) اکثراً دارای میزان کلروفیل، پرولین و هدایت روزنهمای بالایی بوده و زنده‌مانی آن‌ها نیز بیش از ۷۰ درصد می‌باشد و لذا

شناسایی ژنوتیپ‌های برتر متحمل به سرما و استفاده از آن‌ها در برنامه‌های بهنژادی و تولید هیرید به حساب می‌آیند.

#### منابع

- Alyari H, Shekari F (1999) Oil seeds, agriculture and physiology. Amidi publication, Tabriz, 182p (In Farsi).
- Asadi I, Faraji I (2009) Principles of Applied Agriculture oilseeds. Iran's agricultural science publishing p: 93 (In Farsi).
- Awasti AK, Nagaraja GM, Naik GV, Kanginakudru 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, Waycott 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

شنانگرهای ISSR در ارزیابی‌های فیلوزنی ژنوتیپ‌های سویا مورد مطالعه می‌باشد. در کل این بررسی نشان داد که نشانگرهای مولکولی و مورفو لوژیکی در کنار یکدیگر ابزار مناسبی جهت

- 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, Atanassov 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.

- 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 (*Glycine 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-Marof 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 assessed by 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, International 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.