مجله علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۴۱، شماره ۴، ۱۳۸۹ (۸۳۱-۸۲۱)

نقشه‌یابی QTL برخی خصوصیات زراعی در سویا (*Glycine max*)

حمیدرضا بابائی[۱]*، حسن زینالی [۲]، علیرضا طالعی[۳]، محسن مردی[۴] و مصطفی پیرسیدی[۵]
۱، ۲، ۳، دانشجوی سابق دکتری، دانشیار و استاد پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۴، ۵، دانشیار و مربی پژوهش مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی
(تاریخ دریافت: ۸۸/۱۰/۲۰ - تاریخ تصویب: ۸۹/۶/۳۱)

چکیده

در طول دهه اخیرتعداد زیادی QTL برای صفات زراعی سویا توسط گروه‌های تحقیقاتی مختلف به ثبت رسیده است. به دلیل اثرات متقابل بین QTLها، محیط و زمینه ژنتیکی در ظهور آنها، تائید نتایج بررسی‌های گذشته و نیز شناسائی QTLهای جدید نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد. به منظور نقشه‌یابیQTLهای کنترل‌کننده برخی صفات زراعی، جمعیتی شامل ۱۴۰ تک بوته F_2 از تلاقی Williams82×RGR-JAP توسط ۱۷ نشانگر SSR و ۷۰ نشانگر AFLP تعیین ژنوتیپ گردید، که سرانجام ۱۲ نشانگر SSR و ۵۰ نشانگر AFLP با توجه به نسبت مندلی مورد انتظار برای تشکیل نقشه ژنتیکی و نقشه‌یابی QTL به کار رفت. ارزیابی فنوتیپی۲۱ صفت زراعی روی خانواده‌های $F_{2:3}$ انجام گردید. در نهایت نقشه ژنتیکی با ۱۳ گروه لینکاژی تشکیل شد که نقشه ژنتیکی به طول ۷۳۳cM را پوشش داد. مکان‌یابی QTLها به روش نقشه‌یابی بازه‌ای مرکب انجام گردید که در مجموع ۱۳QTL برای ۱۰ صفت شناسائی گردید. یک QTL بزرگ اثر با اثرات چندگانه برای برخی از صفات درفاصله دو نشانگر Satt-365 و Satt-489 در گروه لینکاژی U9 شناسائی شد. نتایج بررسی‌های گذشته نیز وجود اینQTL را تائید نمود. یکQTL نیز برای دو صفت طول دوره زایشی و تعداد شاخه فرعی در نزدیکی نشانگرSatt-231 در گروه لینکاژی U4 شناسائی گردید.

واژه‌های کلیدی: **سویا، نقشه‌یابی QTL، صفات زراعی، خانواده‌های $F_{2:3}$، نشانگرهای SSR و AFLP.**

مقدمه

به‌نژادگران به طور سنتی لینه‌های امیدبخش با صفات زراعی مطلوب را برای ایجاد ارقام جدید با عملکرد بالا به کار برده‌اند. این روش تنوع ژنتیکی ژرم پلاسم سویا را کاهش داده است. از طرفی تجزیه ژنتیکی صفات زراعی به دلیل اثرات محیطی، وراثت‌پذیری و کارائی گزینش را کاهش می‌دهد (Sneller, 1994; Gizlice,1996). یکی از پیشرفت‌های مهم و جالب در زمینه نقشه‌یابی ژنوم سویا شناسائی قطعات کروموزومی کنترل‌کننده صفات کمی می‌باشد. بررسی‌های اخیر QTLهای بسیاری را برای خصوصیات زراعی معرفی کرده‌اند (Keim et al., 1989; Dier et al., 1992a, 1992b). با این وجود شناسائی QTLها به دلیل تنوع محیطی دشوار بوده و می‌بایست برای اطمینان از نقشه واقعی QTLها اثرات محیطی کنترل گردد (Paterson et al., 1991). به علاوه ژن‌های کنترل‌کننده یک صفت

* نویسنده مسئول: حمیدرضا بابائی تلفن: ۰۹۱۲-۳۶۶۸۹۷۶ E-mail: 30241hrbabaei@gmail.com

کمی که در یک جمعیت حضور داشته و تفرق می یابند، احتمالاً با ژن‌های جمعیت‌های دیگر متفاوت هستند (Tansksley & Hewitt, 1988). بنابراین برای بهبود یک صفت از طریق کنار هم آوردن QTLهای مکمل ارزیابی جمعیت‌های چندگانه در محیط‌ها و سال‌های مختلف ضروری است. در طول دهه اخیر گروه‌های تحقیقاتی زیادی با انواع جوامع و تکنیک‌های مختلف نقشه‌یابی بیش از ۹۰۰ QTL مرتبط با خصوصیات زراعی مطلوب از جمله: روغن، پروتئین و عملکرد دانه را شناسائی کرده‌اند.

Chung et al. (2003) ۷۶ لاین خالص نوترکیب F_6 حاصل از تلاقی PI 437088A با پروتئین بالا (۴۸٪) با رقم پرمحصول Asgrow A3733 و میزان پروتئین ۴۲٪ را درآزمایشی با شش تیمار آبیاری، دو تکرار در دو سال زراعی ارزیابی نمودند. لینه‌ها با ۳۲۹ نشانگر RAPD و ۱۰۳ نشانگر SSR تعیین ژنوتیپ شدند که ۲۹۴۳ سانتی‌مورگان (cM) از نقشه ژنتیکی برای ۳۵ گروه لینکاژی را پوشش دادند که بر اساس همولوژی SSRها در۲۰ گروه لینکاژی قرار گرفتند. یک QTL مربوط به عملکرد، درصد روغن و پروتئین با مارکر OPAW13a (RAPD) پیوستگی بالائی داشت. این مارکر در گروه لینکاژی LG-I قرار داشت که دو طرف آن توسط مارکرهای Satt-496 و Satt-239 احاطه شده بود. اثرات افزایشی آلل دریافت شده از والد PI437088A به ترتیب برای پروتئین، روغن و عملکرد دانه: ۱، ۰/۶- و۱/۵۴ بود. به عبارتی نسبت ژنتیکی تبدیل پروتئین به روغن ۱/۶ است. با توجه به اینکه این نسبت از نسبت تبدیل انرژی روغن به پروتئین (=۲) کمتراست، مقدار باقیمانده یعنی ۰/۴ واحد انرژی یا کربن مربوط به سایر مواد خشک موجود دردانه می‌شود. بنابراین وقتی پروتئین دانه به طور ژنتیکی افزایش می‌یابد همواره عملکرد دانه کاهش می‌یابد. به عبارتی برای ساخت و ذخیره پروتئین دانه انرژی بیشتری در گیاه مصرف می‌شود.

Specth et al. (2001) در یک بررسی با هدف شناسائی QTLهای مرتبط با تحمل به خشکی جمعیتی متشکل از ۲۳۶ لاین نوترکیب (RIL) از تلاقی Minsoy×Noir را در شش تیمار آبیاری به مدت دو سال برای عملکرد و برخی خصوصیات مهم زراعی مورد بررسی قرار دادند. ضریب رگرسیون حساسیت به خشکی (b) به عنوان معیاری از راندمان مصرف آب تعریف شد. لینه‌ها با ۶۶۵ پرایمر RFLP و SSR و مارکرهای کلاسیک از نظر ژنوتیپی ارزیابی شدند. در نهایت QTLهای مرتبط با عملکرد، b و شاخص راندمان تعرق شناسائی شد که با QTLهای مرتبط با زمان رسیدن روی گروه لینکاژی C2 منطبق بودند. بر اساس نتایج به دست آمده، پیشنهاد گردید که برای اصلاح تحمل به خشکی بهتر است علاوه بر عملکرد درشرایط خشکی، ضریب رگرسیون حساسیت به خشکی نیز لحاظ گردد. دراین بررسی۱۳۰ QTL در۲۰ گروه لینکاژی برای صفات مختلف معرفی گردید.

Panthee et al. (2005) با هدف شناسائی QTLهای کنترل‌کننده پروتئین، روغن و عملکرد دانه، ۱۰۱ لاین اینبرد نوترکیب F_6 حاصل از تلاقی: N87-984-16 ×TN93-99 را توسط ۹۴ نشانگر SSR (چندشکل) از مجموع SSR۵۸۵ تعیین ژنوتیپ نمودند. تجزیه واریانس تک عاملی برای شناسائی QTLها به کار رفت و سپس توسط روش نقشه‌یابی فاصله‌ای مرکب تایید گردید. براساس نتایج حاصل نشانگر Satt570 روی گروه لینکاژی G با QTL پروتئین مرتبط بود و نشانگرهای Satt274,Satt420, Satt479 به ترتیب روی گروه‌های لینکاژی: O, D1b و O و نشانگر Satt317 روی گروه لینکاژی H با QTLهای روغن مرتبط بودند. نشانگرهای Satt002(D_2) و Satt184(D_{1a}) نیز با وزن دانه مرتبط بودند این نتیجه تائیدکننده نتایج بررسی‌های قبلی نیز بود. در این تحقیق ۲۰/۲٪ از تغییرات فنوتیپی روغن، ۹/۴ تا ۱۵ درصد از تغییرات فنوتیپی پروتئین و ۱۰ تا ۱۶/۵ درصد از تغییرات فنوتیپی وزن دانه توسط QTLهای شناسائی شده توجیه گردید.

Tischner et al. (2003) با هدف بررسی اساس ژنتیکی عوامل کنترل‌کننده تشکیل بذر و صفات زایشی مرتبط با آن۲۴۰ لاین خالص F_9 از دو تلاقی Minsoy×Noir1 و Minsoy×Archer را مورد بررسی قرار دادند. در گروه U_{22}، دو QTL مرتبط با تاریخ گلدهی، طول دوره زایشی و رسیدن کامل و در گروه U_{13} دو QTL مرتبط با نر عقیمی (با منشاء پدری و

مادری) و ژن‌های مقاومت به بیماری شناسائی شد. یکی از دو QTL مربوط به گروه U_{22} با QTL راندمان مصرف آب (قبلاً معرفی شده) پیوسته بود. یک QTL نیز روی گروه U_3 شناسائی شد که با تعداد تخمک درغلاف پیوستگی داشت.

Mansur et al. (1996) به منظور تهیه نقشه ژنتیکی خصوصیات زراعی سویا تعداد ۲۸۴ لاین خالص نوترکیب از تلاقی Minsoy×Noir1 را در سه مکان برای دو سال مورد ارزیابی قرار دادند. ژنوتیپ لاین‌ها توسط نشانگرهای SSR، RFLP و نشانگرهای کلاسیک نظیر: رنگ گل و کرک، رنگ پوسته بذر، رنگ ناف بذر و فعالیت پراکسیداز بذر (Ep) تعیین گردید. در حدود ۲۰۰۰cM از نقشه ژنتیکی توسط نشانگرها پوشش داده شد. برای اغلب صفات QTLهای شناسائی شده مربوط به سه گروه لینکاژی بود و برای بیشتر صفات QTLهای یکسان وجود داشت که احتمالاً مربوط به اثرات پلیوتروپی یا مکان‌های ژنی بسیار پیوسته می‌باشد. این نتایج نشان داد که جدا کردن QTLهای صفات از جمله: زمان گلدهی و رسیدن، ارتفاع بوته وخوابیدگی و عملکرد دانه دشوار است اما برای انجام سلکسیون به کمک نشانگر مفید خواهد بود.

Orf et al. (1999) ۲۴۰ لاین نوترکیب (RIL) از سه جمعیت: Minsoy×Noir1، Minsoy×Archer و Noir1×Archer را درآزمایشی با دو تکرار و در چهار محیط برای صفات: ارتفاع و خوابیدگی بوته، روز تا گلدهی، روز تا رسیدن کامل، طول دوره زایشی، وزن صد دانه، درصد روغن و پروتئین دانه، عملکرد دانه، طول و عرض برگ مورد ارزیابی قرار دادند. برای تعیین ژنوتیپ لاین‌ها بیش از ۴۰۰ نشانگر RFLP و SSR به کار رفت. QTLهای معنی‌دار با LOD≥۳ برای کلیه صفات بر روی ۱۷ گروه لینکاژی از۲۰ گروه موجود شناسایی شد. QTLهای بزرگ اثر (R^2>٪۱۰) برای کلیه صفات شناسائی شد که برای بسیاری از صفات بیش از نیمی از تنوع فنوتیپی را توجیه می‌کرد. مقایسه QTLهای صفات در سه جمعیت نشان داد اغلب مکان‌های ژنی دو آللی بوده و در هر سه جمعیت QTLهای یکسان وجود دارد.

Orf et al. (1999) به منظور تعیین اثرات متقابل بین QTLهای عملکرد و محیط، ۲۳۳ لاین خالص سویا (RIL) از تلاقی Minsoy ×Archer (MA) و ۲۴۰ لاین خالص از تلاقی Noir1×Archer (NA) را توسط ۴۰۰ نشانگر SSR و AFLP تعیین ژنوتیپ نمودند. مواد ژنتیکی در سه محیط مختلف برای اغلب صفات زراعی مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تجزیه و برآورد اثرمتقابل بین دو QTL لاین‌های خالص براساس ژنوتیپ نشانگر در مکان ژنی یا QTL به چهار زیرجامعه تفکیک و تفاوت میانگین عملکرد زیرجوامع به عنوان اثر متقابل QTLها لحاظ گردید. در این بررسی یک اثر متقابل معنی‌دار بین دو QTL در گروه‌های لینکاژی U_3 وU_9 برای جامعه NA درهرسه محیط و یک اثر متقابل برای جامعه MA بر روی گروه‌های لینکاژی U_8 و U_{14} فقط در یک محیط برآورد شد که نشان‌دهنده تأثیر محیط در بروز اثر متقابل بین QTLهای صفات کمی می‌باشد.

Reyna & Sneller (2001) در یک بررسی به منظور ارزیابی آلل‌های افزاینده عملکرد، رقم Archer (زودرس و مناسب عرض‌های جغرافیائی بالا) در محیط و زمینه ژنتیکی جدید، با دو رقم Pioneer9641 و Asgrow A5403 (دیررس و مناسب عرض‌های جغرافیائی پائین) تلاقی دادند. ۳۰۰ ایزولاین نوترکیب F_7 حاصل ضمن تعیین ژنوتیپ، در چهار سری بر مبنای QTLهای مرتبط با عملکرد در چهار محیط در عرض‌های جغرافیائی پائین طی دو سال برای عملکرد، ارتفاع و زمان رسیدن مورد ارزیابی قرار گرفتند. تجزیه داده‌ها نشان داد هیچکدام از اثرات نشانگرهای مرتبط با صفات در سری‌های جداگانه و همچنین میانگین آنها معنی‌دار نمی‌باشد. این نتایج آشکار ساخت که آلل‌های Archer نسبت به آلل‌های دو رقم دیگر یعنی: Pioneer9641 و Asgrow A5403 (سازگار به عرض‌های جنوبی) برتری ندارند. آنها نتیجه‌گیری نمودند که ممکن است عوامل ژنتیکی افزاینده عملکرد در رقم Archer به زمینه ژنتیکی جدید وارد نشده باشند و یا نوترکیبی و اثرات متقابلQTLها با یکدیگر و با محیط، توانائی تظاهر آلل‌های عملکرد را تحت تأثیر قرار داده باشد.

همان طور که در قسمت بالا اشاره شد اثرات متقابل بین QTLها، محیط و زمینه ژنتیکی در ظهور QTLها اثرگذار است. انجام بررسی‌های بیشتر با مواد ژنتیکی مختلف در برخی موارد منجر به شناسائی QTLهای

جدید یا تائید نتایج قبلی می‌شود. لذا، این پژوهش با هدف شناسائی آلل‌های جدید و مفید در ژنوتیپ‌های موجود یا اطمینان از نتایج بررسی‌های قبلی برای به کارگیری آنها در برنامه‌های اصلاحی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

در سال زراعی ۱۳۸۷، ۱۴۰ لینه از جمعیت F_2 حاصل از تلاقی Williams-82×RGR-JAP با فواصل بین بوته 5cm و بین خطوط 60cm در مزرعه‌ای با بافت لومی کشت گردید. رقم Williams-82 با مشخصات زراعی که در جدول ۳ برای آن ذکر شده یک رقم خارجی از گروه رسیدن III می‌باشد که رشد نامحدود، با وزن دانه متوسط و معمولاً تعداد شاخه کمی دارد و به عنوان یک رقم زراعی برای مصارف روغنی کشت می‌گردد. رقم RGR-JAP یک رقم ژاپنی است، از گروه رسیدن IV می‌باشد که دارای وزن دانه بالا، سبز رنگ و بدلیل کیفیت پروتئین مطلوب بیشتر برای مصارف خوراکی و فراورده‌های پروتئینی مورد استفاده قرار می‌گیرد. کلیه عملیات زراعی برای ایجاد سبز مطلوب و بوته‌های نرمال به روش معمول اعمال گردید. بذر هر بوته F_2 جداگانه برداشت و سال بعد (۱۳۸۸) به عنوان فامیل‌های F_3 در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با دوتکرار کشت و صفات زراعی مختلف شامل: مراحل فنولوژیک، صفات مرفولوژیک و زراعی درطول دوره رشد و پس از برداشت صفات: عملکرد دانه و اجزاء آن و درصد روغن و پروتئین اندازه گیری و ثبت گردید.

به منظور ارزیابی میزان تنوع موجود بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی تجزیه واریانس صفات مختلف برای خانواده‌های $F_{2:3}$ انجام گردید. علاوه براین سایر آماره‌های مربوط به میزان تنوع از جمله ضریب تغییرات صفت، واریانس و انحراف استاندارد برای خانواده‌های F_3 به همراه والدین محاسبه گردید. قبل از انجام تجزیه QTL، نرمال بودن داده‌های فنوتیپی توسط نرم‌افزار آماری MSTAT-C انجام گردید و صفاتی که توزیع آنها از توزیع نرمال تفاوت معنی‌دار داشت توسط تبدیل‌های: جذر، لگاریتم، $Y=X^{1/4}$، $Y=1/X$ به توزیع نرمال تبدیل شدند.

برای انجام ارزیابی ژنوتیپی، در مرحله پنج برگی۳ تا ۴ برگ تازه توسعه یافته به ابعاد ۲×۳cm از هر بوته برداشت و در یک تکه ورقه آلومینیوم نازک قرار داده شد و در ظرف مخصوص ازت مایع غوطه‌ور گردید. نمونه‌ها بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و در فریزر $-80^{\circ}C$ قرار داده شد. نمونه‌ها به همراه ازت مایع در هاون چینی سائیده و پس از به دست آمدن بافت پودری سفید مقدار۵۰ میلی‌گرم از آن را در تیوب‌های دو میلی‌لیتری ریخته و برای استخراج DNA در فریزر حفظ گردید. در زمان استخراج، نمونه‌ها از فریزر خارج و استخراج با استفاده از کیت (شرکت Bioneer) مطابق دستورالعمل موجود انجام گردید. به منظور تعیین کیفیت و کمیت DNA استخراج شده، از الکتروفورز افقی ژل آگارز ۱٪ (۹۵v به مدت ۴۵ دقیقه) استفاده شد. پس از تعیین کمیت و کیفیت DNA، غلظت نمونه‌ها به میزان ۳۰-۲۰ نانوگرم در هر میکرو لیتر DNA رقیق‌سازی گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای نشانگرهای SSR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر در حجم ۱۵µl شامل: دو میکرو لیتر DNA ژنومی، ۱/۵ میکرو لیتر PCR Buffer (10x)، ۰/۵ میکرولیتر 1Mm dnTPs، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای پیشرو و پسرو، ۱/۲ میکرولیتر کلریدمنیزی ۱۵ میلی‌مولار، ۰/۱ میکرولیتر آنزیم Tag Polimeras DNA و در نهایت با افزودن ۷/۷ میکرو لیتر آب مقطر استریل حجم نهائی به ۱۵ میکرو لیتر رسانده شد. چرخه حرارتی شامل: مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه حرارتی اصلی شامل: دمای ۹۴ درجه به مدت ۳۰ ثانیه (واسرشت‌سازی)، دمای ۶۰- ۴۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه (بسته به دمای اتصال آغازگر)، دمای ۷۲ درجه به مدت ۴۵ ثانیه (بسط رشته DNA) و در انتها دمای ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه جهت بسط نهائی تنظیم گردید. برای تفکیک محصول PCR از الکتروفورز ژل عمودی پلی‌اکریل‌آمید استفاده شد. رنگ‌آمیزی با نیترات نقره و عکس‌برداری از ژل نیز با دستگاه دنسیتیومتر انجام گردید.

در این بررسی از ۴۷ آغازگر SSR جهت بررسی چندشکلی در والدین استفاده شد. از این تعداد ۱۷ آغازگر بر روی والدین چندشکلی نشان دادند که برای بررسی چندشکلی یا تعیین ژنوتیپ نتاج در جمعیت F_2

به کار رفت.

کلیه مراحل کار برای تجزیه نشانگر AFLP شامل: هضم آنزیمی با آنزیم‌های برشی EcoRI, MseI، اتصال سازگارسازها به قطعات حاصل از هضم، تکثیر اولیه و تکثیر انتخابی طبق روش ووس و همکاران (۱۹۹۵) انجام گردید. مراحل هضم و تکثیر اولیه به روش معمول و تکثیر انتخابی با استفاده از آغازگرهای انتخابی برچسب‌دار انجام و توسط دستگاه Licor. محصول PCR تفکیک گردید. در این بررسی از ۱۵ ترکیب آغازگری به کار رفته ۱۰ ترکیب آغازگری بر روی والدین دارای چندشکلی بودند که برای تعیین ژنوتیپ نتاج به کار رفت. این ۱۰ ترکیب آغازگری تعداد ۸۰ نشانگر AFLP را تولید نمودند.

امتیازدهی باندهای نشانگر همبارز SSR برای تجزیه آماری جمعیت F_2 به صورت: حضور باند برای والد اول با علامت A، حضور باند برای والد دوم با علامت B، حضور باند برای هر دو والد با علامت H انجام شد.

برای نشانگر غالب AFLP، در حالتی که والد اول دارای باند و والد دوم فاقد باند بود، حضور باند در نتاج با علامت D و عدم حضور باند با علامت B و در حالت عکس وقتی والد اول فاقد باند و والد دوم دارای باند بود، حضور باند در نتاج با علامت C و عدم حضور باند با علامت A امتیازدهی صورت گرفت. داده‌های گمشده نیز با علامت " – " معرفی گردید.

جهت تهیه نقشه ژنتیکی از نرم‌افزار Mapmaker3.0 با LOD معادل ۳ و حداکثر فاصله پیوستگی ۵۰cM و تابع کوزامبی استفاده گردید (Lander & Btestein, 1989). نقشه‌یابی QTL با استفاده از نرم‌افزار QTL Cartographer-2 انجام گرفت. آستانه LOD برای شناسائی QTLها برابر ۲/۵ و حداقل پویش ژنومی ۲cM منظور گردید. نقشه‌یابی به روش فاصله‌ای مرکب (CIM) به دو صورت رگرسیون گام به گام پیشرو و پسرو و آستانه $p(F_{in}) = p(F_{out}) = ۰/۰۱$ صورت گرفت.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس صفات نشان داد: خانواده‌های $F_{2:3}$ از حیث کلیه صفات به جز طول دوره زایشی، طول و عرض برگ در سطح ۱٪ و ۵٪ معنی‌دار بودند. البته این سه صفت توسط آزمون‌های مقایسه میانگین تفاوت معنی‌دار دارند. صفت ثانوی "ارتفاع/عملکرد دانه" که در بسیاری از مقالات ذکرشده است، بیانگر عملکرد دانه در واحد ارتفاع است و در واقع شاخصی برای گزینش ژنوتیپ‌های پاکوتاه با تعداد گره بالا و فاصله میان‌گره کوتاه و پرمحصول می‌باشد (جدول۱).

جدول۱- نتایج تجزیه واریانس صفات مختلف در خانواده‌های $F_{2:3}$ سویا

صفت	میانگین مربعات	صفت	میانگین مربعات
شروع گلدهی	۱۱۴/۶**	ارتفاع/ عملکرد دانه	۰/۰۲**
شروع غلاف بندی	۸۵/۴**	ارتفاع بوته	۴۲۰/۸**
پرشدن کامل دانه	۱۳۵/۵**	تعداد گره در ساقه	۱۱/۶**
طول دوره پرشدن دانه	۵۳/۲*	تعداد گره نازا	۴/۴۵**
رسیدن کامل	۱۲۹/۵**	تعداد شاخه فرعی	۲/۰۹**
طول دوره زایشی	۳۲/۴	طول برگ	۱ /۱
عملکرد دانه	۲۵۱/۶**	عرض برگ	۱/۰۱
وزن صد دانه	۷۸/۱**	سطح برگ	۱۶۹ /۹
تعداد دانه در بوته	۱۶۳۲/۸**	درصد روغن	۱/۳۲**
تعداد غلاف در بوته	۲۱۸/۲*	درصد پروتئین	۶/۲۶**
تعداد دانه در غلاف	۰/۵۸*		

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

جدول ۴ مقادیر آماره‌های اندازه‌گیری شده خانواده‌های $F_{2:3}$ را در مقایسه با والدین نشان می‌دهد. مقادیر حداقل و حداکثر اغلب صفات در جمعیت از دامنه این مقادیر در والدین بیشتر است. این موضوع نشان‌دهنده وجود خصوصیت تفکیک متجاوز در توزیع فراوانی این صفات است که در نتیجه ترکیب آلل‌های دو والد و تظاهر فنوتیپ خارج از دامنه والدین می‌باشد. ضریب تغییرات اغلب صفات، واریانس و انحراف معیار نیز به عنوان دیگر معیارهای پراکندگی در اغلب صفات بالا می‌باشد که وجود تنوع لازم برای انجام تجزیه QTL را تائید می‌نماید. توزیع فراوانی صفات مورد بررسی نرمال بود و در مواردی که با توزیع نرمال اختلاف معنی‌دار داشت توسط تبدیل‌هائی که در قسمت مواد و روش‌ها ذکر شد تبدیل به توزیع نرمال گردید.

تهیه نقشه پیوستگی

از ۴۷ نشانگر همبارز SSR مورد بررسی ۱۷ نشانگر بر روی والدین چند شکلی نشان دادند که نسبت‌های ژنوتیپی ۱۲ نشانگر با نسبت ۱:۲:۱، تفاوت معنی‌دار نداشت و از حدود ۸۰ نشانگر غالبAFLP تعداد۵۰

نشانگر برخوردار از نسبت ۳:۱ (عدم باند: وجود باند) مجموعاً ۶۲ نشانگر برای تشکیل گروه‌های لینکاژی مورد استفاده قرار گرفت که از این تعداد ۳۸ نشانگر ۱۳ گروه لینکاژی را تشکیل دادند. طول کل ژنومی که با استفاده از این نشانگرها پوشش داده شد برابر با ۷۳۳cM و متوسط فاصله بین نشانگرها ۱۹/۸cM بود. با وجود اینکه گروه لینکاژی نشانگرهای SSR مشخص می‌باشد اما به دلیل اینکه تعداد کم آنها در این بررسی و قرار نگرفتن در بیشتر گروه‌های تشکیل شده، گروه‌های لینکاژی تحت عنوان U_1-U_{13} معرفی گردید.

تجزیه ژنوتیپی

به طورکلی از مجموع ۲۱ صفت ارزیابی شده QTL۱۳ برای ۱۰ صفت بر روی پنج گروه لینکاژی مشاهده گردید:

برای عملکرد دانه یک QTL با LOD ۶/۹ در گروه لینکاژی U9 (کروموزوم C_2 سویا) بین دو نشانگر Satt-365 وSatt-489 مشاهده گردید. این QTL، ۱۸٪ از تغییرات فنوتیپی صفت را توجیه می‌کند (جدول۴).

برای وزن صد دانه یک QTL با LOD ۶/۳ در گروه لینکاژی U9 بین دو نشانگر Satt-365 و Satt-489 و یک QTL با LOD معادل ۳/۱۱ در گروه لینکاژی U13 در فاصله cM نشانگر

AF-J2 قرار گرفته است. مقدار R^2 برای QTL اولی ۱۹٪ و برای QTL دومی ۳۳٪ به دست آمد (جدول۴).

برای تعداد شاخه فرعی دو QTL شناسائی گردید که اولین QTL با LOD معادل ۲/۵ در فاصله ۲cM از نشانگر Satt-231 (کروموزوم E) و دومین QTL با LOD ۳/۸ درفاصله ۲/۲cM از نشانگر Satt-489 قرارگرفته است. مقدار R^2 برای QTL اولی ۱۱٪ و برای QTL دومی ۱۹٪ به دست آمد (جدول۴).

برای صفت تعداد روز تا شروع گلدهی، یک QTL بزرگ اثر در گروه لینکاژی U9 با LOD بالای ۳۰/۶ در فاصله ۳/۱cM از دو نشانگر Satt-365 و Satt-489 قرار گرفته است. مقدارR^2 نیز متناسب با مقدار LOD، ۷۳٪ از تغییرات فنوتیپی را توجیه می‌کند (جدول۴).

برای طول دوره پر شدن دانه، دو QTL مشاهده شد که یکی در گروه لینکاژی U1 با LOD معادل ۲/۹ در فاصله ۴cM از نشانگر AF-A5 و دیگری با LOD معادل ۳/۵ در گروه لینکاژی U4 در بین دو نشانگر Satt-231 و Satt-263 (کروموزوم E) فاصله ۱۵cM از نشانگر Satt-231 قرار گرفته است. مقادیر R^2 برای دو QTL به ترتیب برابر ۱۷٪ و ۳۱٪ می‌باشد (جدول۴).

West et al. (2005) ارتباط نشانگر Satt-231 با تجمع ازت در مرحله زایشی پرشدن دانه (R_5-R_6) گزارش کرده‌اند. ارتباط نشانگر Satt-263 با وزن صددانه توسط Fasoula et al. (2004) و Sato et al. (2005) گزارش شده است.

برای صفت تعداد روز تا رسیدن کامل، یک QTL بزرگ اثر با LOD معادل ۳۹/۸ و R^2 برابر ۷۳٪ در گروه لینکاژی U9 در فاصله ۲cM از نشانگر Satt-489 قرار گرفته است (جدول۴).

برای صفت ارتفاع بوته، یک QTL با LOD معادل ۹/۱ در گروه لینکاژی U9 در فاصله ۳/۱ از نشانگر Satt-489 قرار گرفته است که ۳۵٪ از تغییرات فنوتیپی این صفت را توجیه می‌کند (جدول۴).

برای صفت "ارتفاع/ عملکرد دانه" نیز درگروه U9، یک QTL با LOD معادل ۲/۴۴ در فاصله ۲cM از نشانگر Satt-489 قرار گرفته است که ۱۰٪ تغییرات فنوتیپی این صفت را توجیه می‌کند. (جدول۴).

برای درصد روغن دانه، در گروه U9 یک QTL نسبتاً بزرگ اثر با LOD معادل ۱۵/۲ و R^2 برابر ۳۸٪ در فاصله ۰/۱cM از نشانگر Satt-489 قرار گرفته است (جدول۴).

Specth et al. (2001) وجود یک QTL در مجاورت نشانگر Satt-365 را گزارش کرده‌اند که برای صفت روز تا شروع گلدهی LOD برابر ۱۹، برای روز تا رسیدن کامل LOD معادل ۷/۲، برای عملکرد دانه LOD برابر ۹/۱ و برای ارتفاع بوته LOD برابر ۹/۵ به دست آمده است. یک QTL نیز در نزدیکی نشانگر Satt-489 گزارش کرده‌اند که LOD آن برای شروع گلدهی ۱۹، برای رسیدن کامل ۱۳، برای ارتفاع ۲۶/۷ و برای عملکرد دانه برابر ۹/۱۲ به دست آمده است.

Ort et al. (1999) نیز وجود QTLهای پیوسته با نشانگر Satt-365 برای صفات شروع گلدهی، رسیدن کامل و سطح برگ و QTLهای مرتبط با نشانگر Satt-489 برای صفات: ارتفاع بوته، خوابیدگی بوته، شروع رسیدن، طول دوره زایشی، رسیدن کامل و تعداد دانه در بوته گزارش کرده‌اند. Liu & Abe (2003) ارتباط نشانگر Satt489 با عدم حساسیت به طول روز برای شروع گلدهی، Su et al. (2010) ارتباط نشانگر Satt489 با تعداد روز تا گلدهی، Yamanaka et al. (2001) ارتباط نشانگر Satt489 با تعداد روز تا گلدهی را گزارش کرده‌اند. Dua et al. (2009) ارتباط نشانگر Satt365 با تحمل به خشکی، Terry et al. (2000) ارتباط نشانگر Satt365 با تحمل گیاه سویا به کرم میوه خوار ذرت را گزارش کرده‌اند.

همبستگی فنوتیپی ساده (جدول ۲) بین صفاتی که دراین بررسی جایگاه ژنی مشترک داشتند نشان می‌دهد که مراحل شروع گلدهی با رسیدن کامل و عملکرد دانه با تعداد شاخه فرعی دارای همبستگی معنی‌دار می‌باشند. اما بین تمامی این صفات همبستگی معنی‌داری وجود ندارد.

لازم به ذکر است به منظور ارتباط دقیق‌تر این صفات همبستگی جزئی آنها محاسبه گردید. اما به دلیل ارتباط مستقیم و غیرمستقیمی که صفات بیولوژیکی با یکدیگر دارند تقریباً اغلب همبستگی‌های جزئی معنی‌دار نبود و کمکی به توجیه مطلب نکرد. اگرچه وزن دانه

یکی از اجزاء عملکرد دانه محسوب می‌شود. اما بین وزن دانه و عملکرد همبستگی کمتری از تعداد دانه در بوته با عملکرد وجود دارد. از طرف دیگر بین تعداد دانه در بوته با وزن دانه در سویا همبستگی منفی وجود دارد. در واقع آنچه مقدار عملکرد دانه را در گیاه تعیین می‌کند وزن کل دانه‌ها در گیاه است. بسیاری از ارقام پرمحصول دانه ریز بوده و افزایش وزن دانه همواره افزایش عملکرد دانه را به دنبال ندارد. بنابراین اغلب به‌نژادگران ترجیح می‌دهند برای افزایش عملکرد سراغ تعداد دانه در بوته بروند (Bravo, 1981). در ارتباط با درصد روغن و عملکرد دانه نیز همبستگی مثبت معنی‌داری وجود ندارد. از طرف دیگر با وجود اینکه تعداد شاخه فرعی و عملکرد دانه دو صفت مجزا محسوب می‌شوند، اما تأثیر غیرمستقیم آنها روی یکدیگر اجتناب‌ناپذیر است. زیرا معمولاً با افزایش تعداد شاخه‌های فرعی در سویا تعداد غلاف در بوته و به تبع آن تعداد دانه در بوته افزایش می‌یابد.

جدول ۲- ضرایب همبستگی فنوتیپی بین صفات مورد بررسی در خانواده‌های F_3 سویا

صفت	PRO	OIL	LS	LW	LL	RP	R8	FS	R6	R5	R1	SN	NN	NB	SP	PD	PH	YH	NS	SW
SY	۰/۱۳	-۰/۱۱	۰/۱۰	۰/۱۰	۰/۱۲	۰/۰۰	-۰/۰۷	-۰/۱۴	-۰/۲۳**	-۰/۱۹*	-۰/۰۸	-۰/۱۵	۰/۱۴	۰/۳۵**	۰/۵۶**	۰/۶۳**	۰/۰۴	۰/۷۱**	۰/۹۹**	۰/۰۸
SW	۰/۱۸*	۰/۰۶	۰/۰۳	۰/۰۴	-۰/۰۳	-۰/۱۲	-۰/۴۰**	-۰/۱۳	-۰/۳۷**	-۰/۳۸**	-۰/۳۷**	-۰/۱۳	۰/۰۱	۰/۱۶	۰/۱۴	-۰/۰۲	-۰/۱۱	۰/۱۲	۰/۰۹	۱
NS	۰/۱۴	-۰/۱۱	۰/۱۰	۰/۱۰	۰/۱۲	-۰/۰۱	-۰/۰۸	-۰/۱۴	-۰/۲۳**	-۰/۱۹*	-۰/۰۹	-۰/۱۵	۰/۱۵	-۰/۳۵**	۰/۵۵**	۰/۶۴**	۰/۰۵	۰/۷۱**	۱	
YH	۰/۲۷**	۰/۰۸	۰/۰۴	-۰/۰۲	۰/۱۳	۰/۰۱	-۰/۳۴**	-۰/۱۶	-۰/۴۲**	-۰/۴۱**	-۰/۳۸**	-۰/۴۴**	-۰/۴۴**	۰/۲۸**	۰/۴۶**	۳۸۰**	-۰/۵۹**	۱		
PH	-۰/۱۸*	-۰/۳۱**	۰/۱۰	۰/۱۶	۰/۰۱	۰/۰۲	۰/۵۲**	۰/۱۴	۰/۴۸**	۰/۵۲**	۰/۵۷**	۰/۵۸**	۰/۷۹**	-۰/۲۲*	-۰/۰۶	۰/۱۰	۱			
PD	۰/۱۸*	۰/۲۴**	-۰/۰۹	-۰/۱۳	۰/۰۲	۰/۰۳	۰/۱۳	-۰/۰۳	-۰/۰۴	-۰/۰۲	۰/۱۲	-۰/۰۱	۰/۳۳**	۰/۳۹**	-۰/۲۷**	۱				
SP	-۰/۰۵	۰/۱۳	۰/۲۰*	۰/۲۴**	۰/۱۲	-۰/۰۳	-۰/۲۲**	-۰/۱۵	-۰/۲۵**	-۰/۲۲*	-۰/۲۳**	-۰/۱۵	-۰/۱۸*	-۰/۰۰۴	۱					
NB	-۰/۰۸	۰/۲۹**	-۰/۲۲**	-۰/۲۱*	-۰/۲۴**	-۰/۲۰*	-۰/۴۴**	-۰/۲۷**	-۰/۴۳**	-۰/۳۴**	-۰/۳۹**	-۰/۳۹**	۰/۰۹	۱						
NN	-۰/۰۹	۰/۲۶**	۰/۰۵	۰/۱۱	-۰/۰۳	۰/۰۶	۰/۴۲**	۰/۱۱	۰/۴۰**	۰/۴۲**	۰/۴۲**	۰/۴۴**	۱							
SN	-۰/۰۱	-۰/۵۳**	۰/۰۲	-۰/۰۸	-۰/۰۴	۰/۰۶	۰/۶۰**	۰/۲۸**	۰/۵۰**	۰/۴۳**	۰/۶۳**	۱								
R1	۰/۰۱	-۰/۵۸**	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۰۶	-۰/۰۶	۰/۸۶**	۰/۱۹*	۰/۷۴**	۰/۸۱**	۱									
R5	-۰/۰۶	-۰/۴۴**	-۰/۰۲	۰/۰۰۳	-۰/۰۳	۰/۱۴	۰/۸۰**	۰/۰۰۲	۰/۷۸**	۱										
R6	۰/۰۲	-۰/۳۹**	۰/۰۲	۰/۰۰۷	۰/۰۷	۰/۲۸**	۰/۸۱**	۰/۶۲**	۱											
FS	۰/۰۵	-۰/۰۹	۰/۰۴	۰/۰۰۱	۰/۱۲	۰/۲۷**	۰/۳۱**	۱												
R8	۰/۰۵	-۰/۶۰**	۰/۰۲	۰/۰۲	۰/۰۵	۰/۴۵**	۱													
RP	۰/۰۸	۰/۱۵	-۰/۰۴	-۰/۰۴	۰/۰۱	۱														
LL	۰/۱۵	-۰/۱۳	۰/۹۰**	۰/۷۴**	۱															
LW	۰/۱۶	-۰/۱۶	۰/۹۵**	۱																
LS	۰/۱۶	-۰/۱۴	۱																	
OIL	-۰/۵۴**	۱																		
PRO	۱																			

SY: عملکرد دانه SW: وزن صد دانه NS: تعداد دانه در بوته YH: ارتفاع/عملکرد PH: ارتفاع بوته PD: تعداد غلاف در بوته SP: تعداد دانه در غلاف NB: تعداد شاخه فرعی NN: تعداد گره در ساقه SN: تعداد گره نازا R_1: شروع گلدهی R_5: شروع پر شدن دانه R_6: پرشدن کامل دانه R_8: رسیدن کامل FS: طول دوره پرشدن دانه RP: طول دوره زایشی LL: طول برگ LW: عرض برگ LS: سطح برگ OIL: درصد روغن PRO: درصد پروتئین.

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد.

نتیجه‌گیری کلی

براساس نتایج حاصل اغلب QTLها در گروه لینکاژی U9 بین دو نشانگر Satt-489 و Satt-365 ظاهر شده‌اند که به نظر می‌رسد یک جایگاه ژنی مشترک برای این صفات باشد و لازم است از نشانگرهای دیگر برای یافتن نشانگر پیوسته با QTL مورد نظر استفاده شود تا بتوان از آن برای گزینش به کمک نشانگر استفاده نمود.

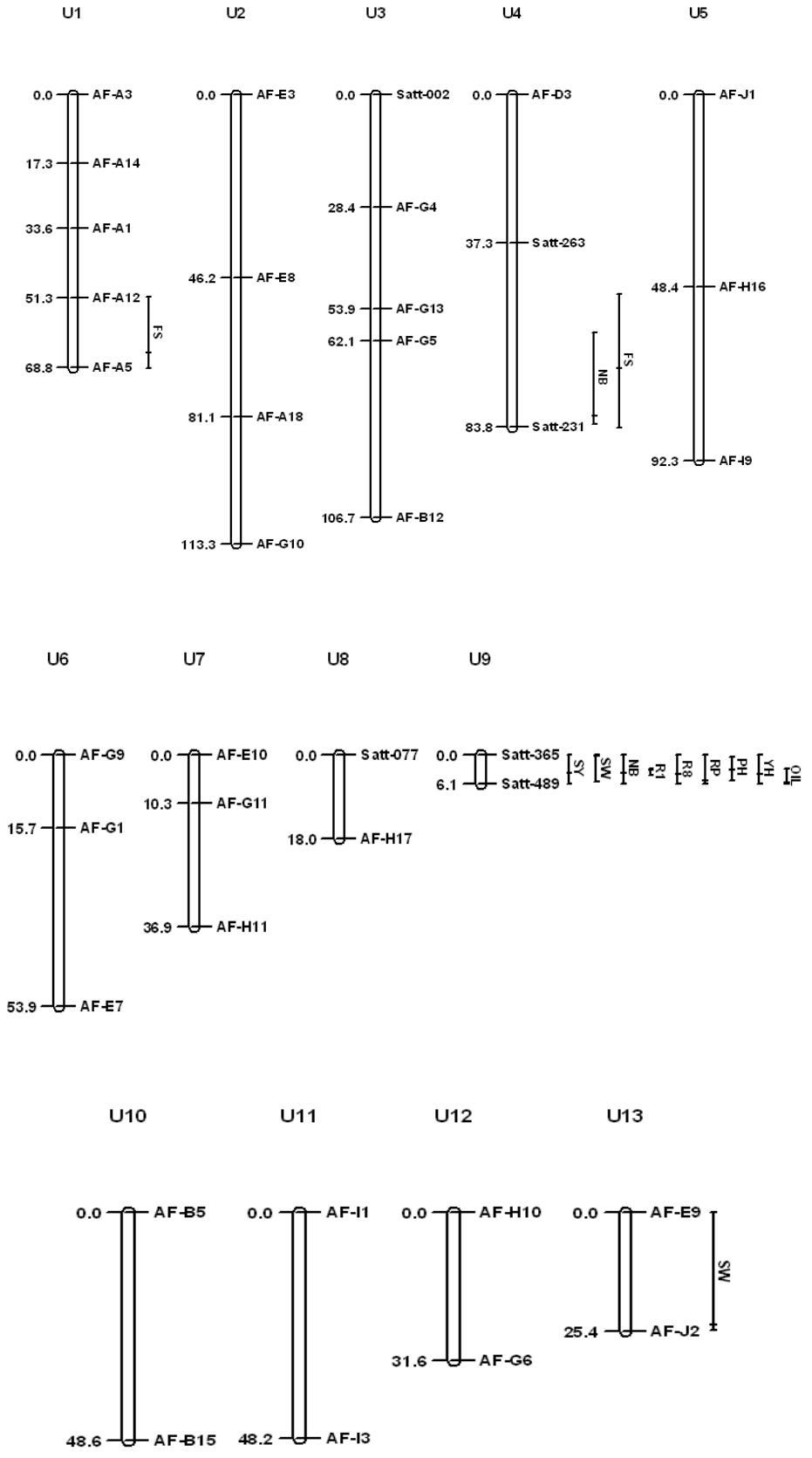
جدول۳- پارامترهای آماری صفات مورد بررسی در والدین و خانواده‌های F_3 سویا

صفت	والدین		خانواده های $F_{2:3}$					
	Williams82	RGR-JAP	حداقل	میانگین	حداکثر	ضریب تغییرات	واریانس	انحراف استاندارد
وزن صددانه (گرم)	۱۴/۷۳	۲۸/۲۲	۱۵/۶	۲۸/۹	۴۲/۴	۰/۲۲	۳۹/۰۴	۶/۲۵
عملکرد دانه (گرم)	۱۱/۲	۱۰/۷	۸/۸	۱۹/۷	۳۵/۳	۰/۲۷	۲۷/۵	۵/۲۴
تعداد دانه در بوته	۷۶	۳۷/۹	۲۸/۹۵	۶۴/۵	۱۰۶	۰/۲۶	۲۷۱/۷	۱۶/۵

ارتفاع/ عملکرد دانه	۰/۱۴	۰/۱۲	۰/۱۲	۰/۳	۰/۸۴	۰/۳۷	۰/۰۱	۰/۱۰
ارتفاع بوته (cm)	۱۱۰	۹۳	۳۰	۷۴/۹	۱۱۰	۰/۱۹	۲۱۰/۴	۱۴/۵۱
تعداد غلاف دربوته	۴۰/۲	۲۰	۲۱/۳	۴۴/۴	۶۸/۴	۰/۲۳	۱۰۰/۴	۱۰/۰۲
تعداد دانه در غلاف	۱/۸۹	۱/۹	۰/۲۷	۰/۴	۰/۷۸	۰/۲۲	۰/۰۱	۰/۱۰
تعداد شاخه فرعی	۱	۴	۱/۲	۳/۹	۶/۱	۰/۲۶	۱/۰۴	۱/۰۲
تعداد گره در ساقه	۱۷	۱۹/۸	۷/۲	۱۶/۲	۲۱/۹	۰/۱۵	۵/۸۰	۲/۴۱
تعداد گره نازا	-	-	۰/۶	۳/۸	۷/۹	۰/۳۹	۲/۲۲	۱/۴۹
شروع گلدهی (روز)	۴۵	۷۱	۵۱/۸	۶۷/۲	۸۲	۰/۱۱	۵۱/۹۳	۷/۲۱
شروع پرشدن دانه (روز)	۷۷	۹۷	۷۵/۸	۸۴/۷	۱۰۵	۰/۰۷	۴۰/۲۲	۶/۳۴
پرشدن کامل دانه (روز)	۱۰۵	۱۲۶	۱۰۲/۸	۱۱۶/۵	۱۳۷/۵	۰/۰۷	۶۶/۸۷	۸/۱۸
دوره پرشدن دانه (روز)	۲۸	۲۹	۲۲	۳۱/۸	۴۴/۹	۰/۱۶	۲۵/۲	۵/۰۲
رسیدن کامل دانه (روز)	۱۱۷	۱۳۷	۱۲۴	۱۴۰	۱۵۵	۰/۰۶	۶۴/۸	۸/۰۵
طول دوره زایشی (روز)	۷۲	۶۶	۶۲	۷۳	۸۱/۲	۰/۰۵	۱۵/۱۳	۳/۸۹
طول برگ (cm)	۹/۷	۱۲/۷	۸	۱۰/۲	۱۲	۰/۰۸	۰/۶۰	۰/۷۸
عرض برگ (cm)	۶/۲	۷	۴	۶/۵	۸	۰/۱۱	۰/۵۴	۰/۷۳
سطح برگ (cm^2)	۴۷/۸	۷۲/۶	۱۱/۴	۵۳	۷۸/۱	۰/۱۹	۱۰۸/۳	۱۰/۳۱
درصد روغن	۲۱/۸	۲۰/۸	۲۱/۵	۲۳/۱۲	۲۵/۵۹	۰/۰۳	۰/۶۶	۰/۸۱
درصد پروتئین	۳۱/۲	۳۶/۸	۲۶/۷۴	۳۱/۲۱	۳۵/۵۵	۰/۱۰	۱۰/۱۶	۳/۱۸

جدول۴- جایگاه و ناحیه پوشش‌دهنده (یک LOD کمتر در دو طرف نقطه اوج منحنی QTL)، مقدارLOD، اثر افزایشی، غالبیت و R^2، QTLهای صفات در خانواده‌های F_3 سویا

صفت	LG	جایگاه QTL	ناحیه پوشش‌دهنده	موقعیت نشانگری		LOD	اثرات ژنی		R^2
				نشانگر۲	نشانگر۱		A	D	
عملکرد دانه	U_9	۳/۹	۰ – ۶/۱	Satt-489	Satt-365	۶/۹	۱۳۰	۱۹/۰۱	۰/۱۸
وزن صد دانه	U_9	۰/۱	۰ - ۵/۶	Satt-489	Satt-365	۶/۳	-۳/۸	۲/۲۴	۰/۱۹
وزن صد دانه	U_{13}	۲۴	۰- ۲۵	AF-J2	AF-E9	۳/۱۱	۳/۱	-۵/۳	۰/۳۳
تعداد شاخه فرعی	U_4	۸۱	۶۰ - ۸۳	Satt-231	Satt-263	۲/۵	۰/۳۱	۰/۵۵	۰/۱۱
تعداد شاخه فرعی	U_9	۳/۹	۰ - ۶/۱	Satt-489	Satt-365	۳/۸	-۰/۷۶	-۰/۱۵	۰/۱۹
شروع گلدهی	U_9	۳/۲	۲/۹ – ۴/۴	Satt-489	Satt-365	۳۰/۶	۱۰/۵	۲/۰۳	۰/۷۳
طول دوره پر شدن دانه	U_1	۶۵/۲	۵۱ – ۶۹	AF-A5	AF-A12	۲/۹	۰/۰۸	-۰/۰۲	۰/۱۷
طول دوره پر شدن دانه	U_4	۶۸/۸	۵۰/۲ – ۸۴	Satt-231	Satt-263	۳/۵	-۰/۰۲	۰/۱۷	۰/۳۱
رسیدن کامل	U_9	۴	۰ – ۶/۱	Satt-489	Satt-365	۳۹/۸	۱۰/۶	-۰/۱۴	۰/۷۳
طول دوره زایشی	U_9	۵/۵	۰ – ۶/۱	Satt-489	Satt-365	۲/۳	۱/۴۵	-۰/۹	۰/۰۷
ارتفاع بوته	U_9	۳/۲	۰/۳ – ۵/۴	Satt-489	Satt-365	۹/۱	۱۲/۴	-۰/۶	۰/۳۵
ارتفاع/ عملکرد دانه	U_9	۴/۲	۰ - ۶/۱	Satt-489	Satt-365	۲/۴۴	-۰/۰۵	-۰/۰۲	۰/۱۰
درصد روغن دانه	U_9	۶	۲/۹ – ۶/۱	Satt-489	Satt-365	۱۵/۲	۰/۰۱	-۰/۰۰۳	۰/۳۸



شکل۱- جایگاه QTLها برای صفات مورد بررسی روی گروه‌های لینکاژی

علائم اختصاری: SW: وزن صد دانه؛ SY: عملکرد دانه؛ PH: ارتفاع بوته؛ YH: ارتفاع/ عملکرد؛ NB: تعداد شاخه فرعی؛ R1: شروع گلدهی؛ R8: رسیدن کامل؛ RP: طول دوره زایشی؛ OIL: درصد روغن دانه؛ FS: طول دوره پرشدن دانه.

REFERENCES

1. Bravo, J. A., Fehr, W. R. & Cianzo, S. R. (1981). Use of small-seeded soybean parents for the improvement of large- seeded cultivars. *Crop Science*, 21, 430-432.
2. Chung, J., Babka, H. L., Graef, G. L., Staswick, P. E., Lee, D. J., Cregan, P. B., Shoemaker, R. C. & Specht, J. E. (2003). The Seed Protein, Oil, and Yield QTL on Soybean Linkage Groupe I. *Crop Science*, 43, 1053-1067.
3. Diers, B. W., Cianzio, S. D. & Shoemaker, R. C. (1992a). Possible identification of quantitative trait loci affecting iron efficiency in soybean. *Journal of Plant Nutr*, 15, 2127-2136.
4. Diers, B. W., Keim, P., Fehr, W. R. & Shomaker, R. C. (1992b). RFLP analysis of soybean seed protein and oil contant . *Theoritical & Applied Genetic*, 83, 608- 612.
5. Dua, W. B., Wangb, M., Fua, S. & Yu, D. (2009). Mapping QTLs for seed yield and drought susceptibility index in soybean (*Glycine max* L.) across different environments. *Journal of Genetics and Genomics*, 36, 721-731.
6. Fasoula, V. A., Donna, K. H. & Boerma, H. R. (2004). Validation and designation of quantitative trait loci for seed protein, seed oil and seed weight from two soybean populations. *Crop Science*, 44, 1218- 1225.
7. Gizlice, Z., Carter, T. E., Gerig, T. M., & Burton, J. W. (1996). Genetic diversity patterns in North American public soybean cultivars basd on coefficient of parentage. *Crop Science*, 36, 753- 765.
8. Lander, E. S. & Botestein, D. (1989). Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage map. *Genetics*, 121, 185-199.
9. Liu, B. & Abe, J. (2009). QTL Mapping for Photoperiod Insensitivity of a Japanese Soybean Landrace Sakamotowase. *Journal of Heredity*, 1, 3.
10. Mansur, L. M., Orf, J. H., Chase, K., Jarvik, T., Cregan, P. B. & Lark, K. G. (1996). Genetic Mapping of Agronomic Traits Using RlLs of Soybean. *Crop Science*, 36, 1327- 1336.
11. Orf, J. H., Chase, K., Adler, F. R., Mansur, L. M. & Lark, K. G. (1999). Genetic of Soybean A gronomic Traits: II. Interactions between Yield Quantitative Trait Loci in Soybean. *Crop Science*, 39, 1652- 1657.
12. Orf, J. H., Chase, K., Jarvik, T., Mansur, L. M., Cregan, P. B., Adler, F. R. & Lark, K. G. (1999). Genetic of soybean a gronomic traits: I. Comparison of three related recombinant inbred populations. *Crop Science*, 39, 1642- 1651.
13. Panthee, D. R., Pantalon, V. R., West, D. R., Saxton, A. M. & Sams, C. E. (2005). Quantitative trait loci for seed protein and oil concentration and seed size soybean. *Crop Science*, 45, 2015-2022.
14. Paterson, A. H., Damon, S., Hewitt, J. D., Rabinwitch, H. D., Lincoln, S. E., Lander, E. S. & Tanskley, S. D. (1991). Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: comparison across species, generation, and environments. *Genetics*, 127, 181-197.
15. Reyna, N. & Sneller, C. H. (2001) Evaluation of marker-assisted introgression of yield QTL alleles into adapted soybean. *Crop Science*, 41, 1317-1321.
16. Sato, Y., Matsuba, S., Kawaguchi, K., Ishimoto, M. & Funatsuki, H. (2005). Mapping of QTL associated with chilling tolerance during reproductive growth in soybean. *Theoritical & Applied Genetic*, 142 (1-2), 137-142.
17. Sneller, C. H. (1994). Pedigree analysis of elite soybean lines. *Crop Science*, 34, 1515- 1522.
18. Soybean Genetics Committee. (1997). Giudelines on evidence necessary for the assignment of gene symbols. *Soybean Genetic Newletter*, 24, 17-18.
19. Specht, J. E., Chse, K., Macrander, M., Graef, G. L., Markwell, J. P., Germann, M., Orf, J. H. & Lark, K. G. (2001). Soybean Response to Water: QTL Analysis of Drought Tolerance. *Crop Science*, 41,493-509.
20. Su, C. F., WeiGuo, L., TuanJie1, Z. & JunYi1, G. (2010). Verification and fine-mapping of QTLs conferring days to flowering in soybean using residual heterozygous lines. *Chinese Science Bulletin*, (2010) 55, 499-508.
21. Tankesley, S. D. & Hewitt, J. (1988). Use of molecular markers in breeding for soluble solids contant in tomato- a re-examination. *Theoritical & Applied Genetic*, 75, 81-823.
22. Terry, L. I., Chase, K., Jarvik, T., Orf, J. H., Mansur, L. M. & Lark, K. G. (2000). Soybean Quantitative Trait Loci for Resistance to Insects. *Crop Science*, 40, 375–382.
23. Tischner, T., Allphin, L., Chase, K., Orf, J. H. & Lark, K. G. (2003). Genetics of abortion and reproductive traits in soybean. *Crop Science*, 43, 464- 473.
24. Vos, P., Hoger, R., Bleeker, M., Reijans, M., Teovan, D. H., Hornes, M., Frijers, A., Pote, J., Peleman, J., Kuiper, M. & Zabean, M. (1995). AFLP: a new technicue for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 23(21), 4407- 4414.
25. West, D. R., Saxton, A. M., Sams, C. E., Rayford, W. E. & Panthee, D. R. (2005). Genomic Regions Governing Soybean Seed Nitrogen Accumulation. *Journal of the American Chemists' Society*, 81(1), 77-81.

26. Yamanaka, N., Ninomiya, S., Hoshi, M., Tsubokura, Y., Tsubokura, Y. M., Nagamura, Y., Sasaki, Y. & Harada, K. (2001). An informative linkage map of soybean reveals QTLs for flowing time, leaflet morphology and regions of segregation distortion. *DNA Res*, 8, 61–72.