

## ارزیابی تنوع ژنتیکی ژرم پلاسم نخود (*Cicer arietinum* L.) با استفاده از نشانگر مولکولی SSR

زهرا حاجی‌برات<sup>۱</sup>، عباس سعیدی<sup>۲\*</sup>، رضا طالبی<sup>۳</sup>، زهرا حاجی‌برات<sup>۴</sup>

۱، ۴. کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران.

۲. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.

۳. استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج، سنندج.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۲/۳۰ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۶/۲۰)

## Assessment of Genetic Diversity of Chickpea Germplasm (*Cicer arietinum* L.) by Using SSR Molecular Marker

Z. HAJIBARAT<sup>1</sup>, A. SAIDI<sup>2\*</sup>, R. TALEBI<sup>3</sup>, Z. HAJIBARAT<sup>4</sup>

1, 4. M.Sc. Students of Agriculture Biotechnology, Biotechnology Department, Faculty of Energy Engineering and New Technologies, University of Shahid Beheshti, Tehran, Iran, 2. Associate Professor, Biotechnology Department, Faculty of Energy Engineering and New Technologies, University of Shahid Beheshti, Tehran, Iran

3. Assistant Professor, Department of Plant Breeding, Sanandaj Branch, Islamic Azad University, Sanandaj, Iran.

(Received: May. 20, 2014 - Accepted: Sep. 10, 2014)

### Abstract

Identification of genetic diversity and classification of genetic resources (germplasm) are of important and essential activities in breeding and management of plant genetic resources. In order to study of genetic diversity of chickpea genotypes, 38 pair's primers of SSR were used on 18 landrace and 30 improved varieties. After genomic DNA extraction and PCR reaction, primers produced 117 polymorphic bands and the mean of polymorphic band per primer was 3.5. The highest value of polymorphic information content (PIC) belonged to TAA170 primer (0.77) and the lowest value of PIC belonged to Cstms5 primer (0.08). Mean of PIC for all primers was 0.48. Calculated Jacard similarity coefficient ranged from 0.47 to 0.94 among genotypes. In order to assess genetic relationships, cluster analysis was performed by method NJ with Splitstree (ver 4.13.1) software. Results of this study revealed that SSR molecular markers has a valuable potential for evaluation and discrimination of chickpea genotypes.

**Keywords:** Chickpea, Polymorphic information content, Cluster analysis, Microsatellite marker

### چکیده

شناخت تنوع ژنتیکی و طبقه‌بندی ذخایر توارثی (ژرم‌پلاسم) از فعالیت‌های مهم و ضروری در به‌نژادی و مدیریت حفظ ذخایر ژنتیکی گیاهان می‌باشد. در این آزمایش تنوع ژنتیکی ۴۸ ژنوتیپ نخود با استفاده از ۳۸ جفت نشانگر ریزماهوره مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از استخراج DNA ژنومی و انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، آغازگرها در مجموع ۱۱۷ باند چندشکل تولید نمودند که متوسط تعداد باند چندشکل به ازای هر آغازگر ۳/۵ بود. میانگین PIC برای کل آغازگر ۰/۴۸ به دست آمد و بیشترین میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) مربوط به آغازگرهای TAA170 با مقدار ۰/۷۷ و کمترین مقدار آن مربوط به آغازگر Cstms5 با مقدار ۰/۰۸ بود. با محاسبه ضریب تشابه جاکارد، ارزش‌های تشابه بین ژنوتیپ‌ها دامنه‌ای از ۰/۴۷ تا ۰/۹۴ را داشتند. تجزیه خوشه‌بندی با روش NJ و با استفاده از نرم‌افزار (Splitstree ver 4.13.1) به منظور بررسی روابط ژنتیکی انجام شد. در مجموع این نتایج مطالعه بر روی نخود با آغازگرهای SSR، نشان داد که این آغازگرها در گیاه نخود کارایی بالایی دارند و نشانگرهای مورد استفاده توانستند تمامی ژنوتیپ‌ها را به خوبی از هم جدا کنند.

**واژه‌های کلیدی:** نخود زراعی، محتوای اطلاعات چندشکلی، تجزیه خوشه‌ای، نشانگر ریزماهوره

## مقدمه

نخود (*Cicer arietinum* L.) بعد از لوبیا و نخود فرنگی مهم‌ترین حبوبات جهان می‌باشد. این محصول در طول مناطق حاره‌ای و نیمه‌حاره‌ای و نواحی معتدل به طور وسیعی گسترش پیدا کرده است (Singh, 1997). در حدود ۱۵ درصد (۹,۳ میلیون تن) از کل محصولات حبوبات جهانی را به خود اختصاص داده است (Anonymous, 2007). برای اصلاح ارقام نخود و نیز نگهداری و حفظ ذخایر توارثی بررسی تنوع موجود بین ارقام نخود از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Tilman and Wedin, 1996). ارزیابی تغییرات ژنتیکی نخود برای اصلاح نخود و نگهداری منابع ژنتیکی، راهنمایی برای انتخاب والدین برای اصلاح هیبریدها مفید می‌باشد. جهت تعیین تنوع ژنتیکی گیاهان، از نشانگرهای مختلفی مانند نشانگرهای مورفولوژیک، بیوشیمیایی و DNA استفاده می‌شود (Sharma *et al.*, 1995a). در بین این روش‌ها، نشانگرهای DNA دقیق‌ترین و مطمئن‌ترین نشانگرها محسوب می‌شوند (Naghavi *et al.*, 2004). ریزماهورها یا ردیف تکراری ساده (SSR)، تکرارهای پشت سرهم کوچکی از DNA هستند که معمولاً دو تا پنج جفت باز طول داشته و در ژنوم اغلب یوکاریوت‌ها یافت می‌شوند (Litt and Luty, 1989). نحوه توارث همباز ریزماهورها، سطح بالای پلی‌مورفیسم و سادگی کار باعث شده است که برای بسیاری از موارد مفید باشند (Kashi and Soller, 1999). از کاربردهای نشانگرهای ریزماهور می‌توان به تجزیه ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها، تجزیه شجره و تعیین خویشاوندی و مکان‌یابی ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی اشاره کرد (Li *et al.*, 2000). اما گزارشات اخیر وجود طیف وسیعی از منابع ژنومی شامل کشف مارکرهای جدید SSR در سرتاسر جهان ارایه می‌دهد (Lichtenzweig *et al.*, 2005; Sathy *et al.*, 2006a,b; Varshney *et al.*, 2007; Nayak *et*

*al.*, 2010 Choudhary *et al.*, 2006;)

Saeed و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه‌ای برای بررسی تنوع ژنتیکی ۴۴ ژنوتیپ نخود زراعی ایرانی از ۱۹ نشانگر SSR استفاده و سطح قابل قبولی از تنوع ژنتیکی را گزارش کردند Safera و همکاران (۲۰۱۱) برای بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های تیپ کابلی از ۴۲ نشانگر SSR استفاده شد. در میان ۴۲ نشانگر مورد استفاده، ۳۰ نشانگر دارای پلی‌مورفیسم بالایی بودند. نتایج نشان داد که مارکر SSR می‌تواند اطلاعات مفیدی برای مدیریت منابع ژنتیکی در برنامه اصلاحی نخود داشته باشد. تلاش‌های بسیاری در مورد شناسایی نخود اصلاح‌شده با استفاده از مارکر SSR در نقاط مختلف جهان صورت گرفته است (Chowdhury *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2011; Sefera *et al.*, 2008). در این آزمایش تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم نخود با استفاده از ۳۸ نشانگر ریزماهوره مورد بررسی و مقایسه قرار گرفته است.

## مواد و روش‌ها

ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در این تحقیق از مرکز بین‌المللی تحقیقات مناطق خشک و نیمه خشک<sup>۱</sup> و مرکز بین‌المللی تحقیقات کاربردی و فناوری پایدار<sup>۲</sup> تهیه گردید. این ارقام شامل ۱۸ توده بومی و ۳۰ رقم اصلاحی بودند (جدول ۱). فرایند استخراج DNA از نمونه‌های برگ‌ی با استفاده از CTAB تغییر یافته (Saghai-Marouf *et al.*, 1984) انجام شد. تعیین غلظت نمونه‌های DNA با استفاده از ژل آگارز ۱ درصد انجام گردید. پس از تعیین غلظت نمونه‌های DNA، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از ۳۸ نشانگر ریزماهوره انجام شد. مشخصات نشانگرهای SSR در جدول ۲ آورده شده است.

1. ICARDA  
2. ICARST

جدول ۱- ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در این تحقیق

ردیف	ژنوتیپ	منشا	ردیف	ژنوتیپ	منشا
1	L7	توده بومی ایران-خوی	25	L45	توده بومی ایران- کرمان
2	ICCV2	ICARDA	26	L33	توده بومی ایران - مغان
3	ILC482	ICARDA	27	LMR29	ICARDA
4	Flip2005.5c	ICARDA	28	ILC1929	ICARDA
5	LMR144	ICARST	29	آرمان	ایران
6	8EL93IM2446	ICARDA	30	ILC3279	ICARDA
7	L28	توده بومی ایران- چهرم	31	Flip2005.1c	ICARDA
8	L69	توده بومی ایران- ارومیه	32	LMR153	ICARST
9	L38	توده بومی ایران- تربت حیدریه	33	ILC588	ICARDA
10	آزاد	ایران	34	Flip2005.3c	ICARDA
11	L26	توده بومی -کشور ترکیه	35	LMR81	ICARST
12	L18	توده بومی ایران - تربت حیدریه	36	پیروز	ایران
13	هاشم	ایران	37	L32	توده بومی ایران- خوی
14	FlipO4.13c	ICARDA	38	L5	توده بومی ایران- تربت حیدریه
15	L13	توده بومی ایران- کرج	39	L58	توده بومی - کشور قبرس
16	L21	توده بومی ایران- تربت حیدریه	40	Flipo3-119c	ICARDA
17	L60	توده بومی -کشور قبرس	41	ILC263	ICARDA
18	ILC533	ICARDA	42	کاکا	ایران
19	Flipo3.27c	ICARDA	43	جم	ایران
20	L37	توده بومی ایران-خوی	44	ILC3397	ICARDA
21	Flipo3 .109c		45	Flip5187-3C	ICARDA
22	L50	توده بومی ایران- اردبیل	46	LMR165	ICARST
23	L68	توده بومی ایران- نیشابور	47	L17	توده بومی ایران- کرمانشاه
24	LMR159	ICARST	48	LMR134	ICARST

استفاده از اتیدیوم بروماید ۱ میکروگرم در میکرولیتر انجام و عکس برداری ژل از دستگاه ژل داک با استفاده نور ماورای بنفش استفاده شد. تجزیه آماری داده‌های مولکولی باندهای مشاهده شده بر اساس حضور (۱) یا عدم حضور (۰)، امتیازبندی شدند. برای تشکیل ماتریس داده‌های خام، ستون‌ها به توده‌ها یا ارقام و سطرها به باندها اختصاص یافت. برای بدست آوردن ماتریس فاصله ژنتیکی از نرم‌افزار NTSYSpc (ver 2.02) استفاده شد. به منظور گروه‌بندی و تفسیر روابط ژنتیکی از روش‌های تجزیه خوشه‌ای NJ با استفاده از نرم‌افزار Splitstree ver (4.13.1) بهره گرفته شد. اندازه‌گیری پارامترهای ژنتیکی (تعداد آلل مشاهده شده و تعداد آلل مؤثر، شاخص شانون، تنوع ژنی و هتروزیگوتی مشاهده شده) با استفاده از نرم‌افزار PopGene (Ver 1.31) صورت گرفت. برای اثبات دندروگرام حاصل توسط بوت‌استرپ با تکرار ۱۰۰ چک شد. محتوای اطلاعات

اجزای واکنش ۲۵ میکرولیتر PCR شامل ۲.۵ میکرولیتر بافر (۱۰ برابر)، ۲ میکرولیتر DNA ژنومی، ۰.۹ میکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی‌مولار، ۲ میکرولیتر آغازگر (۱ میکرومولار)، ۰.۲۵ میکرولیتر مخلوط نوکلئوتیدی (۱۰ میلی‌مولار) و ۰.۳ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمرز (۱ واحد در میکرولیتر) که با برنامه PCR طبق چرخه‌های زیر در دستگاه ترموسایکلرمدل اپندورف تکثیر شدند. یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه دردمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۵ چرخه واسرشت‌سازی دردمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در ۶۰-۴۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و مرحله سنتز به دمای مدت ۹۰ ثانیه دردمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و یک چرخه بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به منظور آشکارسازی چندشکلی بین نمونه‌ها از دستگاه الکتروفوروز ژل آگارز متافور ۳ درصد استفاده شد. رنگ‌آمیزی ژل با

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$$

چندشکلی (PIC) که نشان‌دهنده ارزش هر نشانگر می‌باشد بر اساس رابطه زیر محاسبه گردید:

جدول ۲- توالی پرایمرهای SSR مورد استفاده در این مطالعه

No	Locus	primer sequence		Source	Remarks
1	GA 20	L: TAT GCA CCA CAC CTC GTA CC R: TGA CGG AAT TCG TGA TGT GT	(CT)23	Winter <i>et al.</i> (2000)	Agarose metaphore3%
2	TA 113	L: TCTGCAAAAAC TATTACGTTAATACCA R: TTGTGTGTAATGGATTGAGTATCTCTT	(TAA)26	Winter <i>et al.</i> (2000)	Agarose metaphore3%
3	TA 130	L: TCTTTCTTTGCTTCCAATGT R: GTAATCCACGAGAAATCAA	(TAA)19	Winter <i>et al.</i> 1999	Agarose metaphore3%
4	TA 22	L: TCTCCAACCCTTTAGATTGA R: TCGTGTTACTGAAATGTGGA	(ATT)40	Winter <i>et al.</i> 1999	Agarose metaphore3%
5	TA 25	L: AGTTTAAATGGCTGGTTCTAAGATAAC R: AGGATGATCTTTAATAAATCAGAATGA	(TAA)45	Unknown	Agarose metaphore3%
6	TA 3	L: AAATCTCAAAATCCCAAAAT R: ATCGAGGAGAGAAGAACCAT	(TAA)11	Winter <i>et al.</i> (2000)	Agarose metaphore3%
7	TA 37	L: ACTTACATGAATTATCTTTCTGGTCC R: CGTATTCAAAATATCTTTTCATCAGTCA	(TTA)20	Winter <i>et al.</i> (2000)	Agarose metaphore3%
8	TA 39	L: TTAGCGTGGCTAACTTTATTGTC R: ATAAATATCCAATCTGGTAGTTGACG	(TAA)20	Unknown	Agarose metaphore3%
9	TA 5	L: ATCATTCAATTTCTCAACTATGAAT R: TCGTTAACACGTAATTTCAAGTAAAGAT	(TTA)29	Unknown	Agarose metaphore3%
10	TA 76s	L: TCCTCTCTTCGATATCATCA R: CCATTCTATCTTTGGTGCTT	(AAT)7;(AA	Winter <i>et al.</i> 1999	Agarose metaphore3%
11	TA 89	L: ATCCTTCACGCTTATTTAGTTTACATA R: CAAGTAAAAGAGTCACTAGACCTCACA	(TAA)2TAT(TAA)24	Unknown	Agarose metaphore3%
12	TA 96	L: TGTTTGGGAGAAGAGTGATTC R: TGTGCATGCAAAATCTTACT	(AT)3(TTA)30 (AT)3	Bharadwaj <i>et al.</i> (2011).	Agarose metaphore3%
13	TR 1	L: CGTATGATTTTGCCGCTAT R: ACCTCAAGTTCTCCGAAAGT	(TAA)31	Unknown	Agarose metaphore3%
14	TR 19	(s)L: TCAGTATCACGTGAATTCGT R: CATGAACATCAAGTTCTCCA	(TAA)27	Unknown	Agarose metaphore3%
15	TR 20	L: ACCTGCTTGTTAGCACAAT R: CCGCATAGCAATTTATCTTC	(TAA)18	Winter <i>et al.</i> (2000)	Agarose metaphore3%
16	TR 58	L: CTCTATATTTGTTTGTCTTTTCGTTTTG R: TAAAATGTGTAGGGTGCAGAATAAATA	(TAA)21	Winter <i>et al.</i> (2000)	Agarose metaphore3%
17	TR 59	L: AAAAGGAACCTCAAGTGACA R: GAAAATGAGGGAGTGAGATG	(TA)3(TAA)17(TAA)4	Unknown	Agarose metaphore3%
18	TS 12	L: CTTAAATAATAAAAATCCTAAATAAT R: TAATCATATGAGAATCTTAGAATATCAC	(TAA)36	Bharadwaj <i>et al.</i> (2011).	Agarose metaphore3%
19	TS 45	L: TGACACAAAATGTCTCTTGT R: TGTCTTAAACGTAACCTAACCTAA	(TAA)8(A)3(TAA)18	Winter <i>et al.</i> (2000)	Agarose metaphore3%
20	TA 47	L: TTTTATAGGTGCTTTTTGTGTCTTT R: TCTGAATAGGAAATAAGAAAGGTAGGTT	(TAA)21	Tekeoglu <i>et al.</i> (2002)	Agarose metaphore3%
21	TA 28	L: TAATTGATCATACTCTCACTATCTGCC R: TGGGAATGAATATATTTTGAAGTAAA	(TAA)37CAA(TAA)30	Bharadwaj <i>et al.</i> (2011).	Agarose metaphore3%
22	TA 146	L: CTAAGTTAATATGTTAGTCCTTAAATTA R: ACGAACG(C)AACATTAATTTTATATT	(TTA)29	Unknown	Agarose metaphore3%
23	GA 34	L: CCT TTG CAT GTA TGT GGC AT R: CCGTTTATAAAGGATGTAZ(T?)GAGAC	(CT)11	Unknown	Agarose metaphore3%
24	TA 53	L: GGAGAAAATGGTAGTTTAAAGAGTACTAA R: AAAAATATGAAGACTAACTTTGCATTTA	(TTA)57	Tekeoglu <i>et al.</i> (2002)	Agarose metaphore3%
25	TA 59	L: ATCTAAAGAGAAATCAAAATGTGCGAA R: GCAAATGTGAAGCATGTATAGATAAAG	(TAA)29	Bharadwaj <i>et al.</i> (2011).	Agarose metaphore3%
26	TA 110	L: AACTATAGGTATAGGCATTTAGGCAA R: TTCTTTATAAATATCAGACCGGAAAGA	(TTA)22	Bharadwaj <i>et al.</i> (2011).	Agarose metaphore3%
27	GA 24	L: TTG CCA AAA CCA ATA ACT CTG R: TCC CTT TTA CAC AAG GCC AG	(GA)19	Unknown	Agarose metaphore3%
28	TA 176s	sL: ATTTGGCTTAAACCCTCTTC sR: TTTATGCTTCTCTCTTCG	(TAA)40(GAA)9	Winter <i>et al.</i> (2000)	Agarose metaphore3%
29	TA 78s	L: CGGTAAATAAGTTCCCTCC R: CATCGTGAATTTGAAGG	(TTA)30	Unknown	Agarose metaphore3%
30	TA 159	L: GCTTCTATATATTCAAACCTGA GCA R: AGTGGTTTTGTATATCAGATTTGT	(TAA)11(CAA)31(TAA)22	Unknown	Agarose metaphore3%
31	CaSTMS 4	L: AATATATGAATTTGGTTTCAGACATC R: AAACAAATAATAGAAAATTTAGTCTCC	(AT)6(GT)42AT(GT)5CT(GT)10	Bharadwaj <i>et al.</i> (2011).	Agarose metaphore3%
32	CaSTMS 5	L: TACAACCTTTAAGTTCAATAAGTTTGA R: AACTTCTCGAATTAGTAAATTAAGTTG	(GA)19	Unknown	Agarose metaphore3%
33	TAA 170	L: TATAGAGTGAGAAGAAGCAAAGAGGAG R: TATTTGCATCAATGTTCTGTAGTGT	(TTA)33	Unknown	Agarose metaphore3%
34	TS 43	L: AAGTTTGGTCAACACACATTCATAA R: TAAATTCACAACTCAATTTATTGGC	(ATT)33	Winter <i>et al.</i> (2000);	Agarose metaphore3%
35	TA127	L: AAATGTAAAGACTCTCATTTTTCTTTATT R: TCAAATTAACATACATCATGTCACACAC	(GTT)5(ATT)23	Unknown	Agarose metaphore3%
36	TA118	L: ACAAGTCACATGTGTTCTCAATA R: GGAAGGTTAAGAAATTTTACAATAC	(TAA)45	Unpublished (P. inter)	Agarose metaphore3%
37	TA72	L: GAAAGATTTAAAAGATTTCCACGTTA R: TTAGAAGCATATTTGGGATAAGAGT	(ATT)36	Nayak <i>et al.</i> (2010);	Agarose metaphore3%
38	TS35	L: GGTCACATGCATAAGTAATAGCAATA R: ACTTTCGCGATTCAGCTAAAATA	(TAA)9T(A)3(TAA)13	Unknown	Agarose metaphore3%

## نتایج و بحث

در این تحقیق ۳۸ نشانگر SSR برای ارزیابی تنوع ژنتیکی ۴۸ ژنوتیپ نخود (۱۸ رقم بومی و ۳۰ رقم اصلاح شده) مورد استفاده قرار گرفت. از ۳۸ نشانگر به مورد استفاده در این آزمایش، ۳۷ نشانگر چندشکلی بالایی را نشان دادند. در مجموع ۱۱۷ آلل در ژنوتیپ‌های مورد ارزیابی با میانگین ۳,۲۵ آلل به ازای هر نشانگر تکثیر شدند. نشانگر TAA170 با ۷ آلل بیشترین و نشانگرهای TR1 با ۱ آلل کمترین تعداد آلل را تولید نمودند. تعداد آلل‌های مشاهده شده شاخص مناسبی از تنوع ژنتیکی است (Nevo, 1978).

میزان محتوای چندشکلی نشانگرهای مورد استفاده بین ۰,۰۸ تا ۰,۷۷ متغیر بود. میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی ۰,۵ که در (جدول ۲) آمده است. بیشترین میزان PIC مربوط به نشانگر TAA170 (۰,۷۷) و کمترین میزان PIC به نشانگر Cstms5 (۰,۰۸) اختصاص داشت. تنوع ژنی یا هتروزیگوتی مورد انتظار نشانگرها نشان داد که در محدوده‌های بین ۰,۰۲ تا ۰,۷۴ متغیر بود و میانگین تنوع ژنی ۰,۶۳ برآورد گردید. بیشترین میزان تنوع ژنی به نشانگر TAA170 (۰,۷۴) و کمترین میزان تنوع ژنی به نشانگر TR1 (۰,۰) اختصاص یافت. بیشترین هتروزیگوتی مورد انتظار مربوط به نشانگر TAA170 (۰,۷۷) و کمترین هتروزیگوتی مورد انتظار مربوط به نشانگر TR1 (۰,۰) بود.

برای ارزیابی تنوع ژنتیکی در میان ژنوتیپ‌ها داخل هر گروه ارقام بومی و اصلاحی از چهار پارامتر تنوع ژنتیکی به طور جداگانه برای هر گروه محاسبه گردید (جدول ۳). تعداد آلل مشاهده شده برای ارقام بومی در محدوده بین ۱ تا ۷ آلل که بالاترین و پایین‌ترین تعداد آلل مشاهده شده به ترتیب مربوط به نشانگر TAA170 و TR1 بود. میانگین تعداد آلل مشاهده شده نشانگرها به مقدار ۳,۰۸ است. تعداد آلل مشاهده شده نشانگرها در بین ارقام اصلاحی در

محدوده بین ۱ تا ۶ آلل که بالاترین و پایین‌ترین تعداد آلل مشاهده شده به ترتیب به نشانگر TAA170 و TR1 اختصاص یافت و میانگین تعداد آلل مشاهده شده نشانگرها به مقدار ۳ محاسبه شد. میانگین هتروزیگوتی نشانگر TAA170 در بین ژنوتیپ‌های اصلاحی بالاترین مقدار (۰,۷۴۱۲) را داشت. میانگین هتروزیگوتی نشانگرها ۰,۴۸۴۶ گزارش گردید. پایین‌ترین مقدار هتروزیگوتی مربوط به نشانگر TR1 با مقدار صفر مشاهده شد.

میزان محتوای اطلاعات چندشکلی نشانگرها ارقام بومی در محدوده‌ای بین ۰,۱ تا ۰,۷۹ متغیر بود. میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی به میزان ۰,۴۹ و بالاترین میزان محتوای اطلاعات چندشکلی مربوط به نشانگر TAA170 با مقدار ۰,۷۹ و پایین‌ترین میزان مربوط به نشانگر TA72 و Cstms5 با مقدار ۰,۱ ملاحظه شد. در صورتی که محتوای اطلاعات چندشکلی ارقام اصلاح شده بین ۰,۰۶ تا ۰,۶۶ متغیر بود و میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی دارای مقدار ۰,۴۷ برآورد گردید. هتروزیگوتی مشاهده شده برای ارقام بومی در محدوده بین صفر تا یک بود که پایین‌ترین مقدار هتروزیگوتی مشاهده شده مربوط به نشانگرهای TA3 و TA72 و GA24 و Cstms4 و Cstms5 و TS12 و TA5 بود. بالاترین مقدار هتروزیگوتی مشاهده شده مربوط به نشانگر TA47 و TA37 و TAA170 گزارش می‌گردد. میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده (H0) نشانگرها برابر با ۰,۳۵ می‌باشد.

نشانگر ریزماهواره (SSR) مارکر مولکولی مناسب و رایج برای مطالعات ژنتیکی می‌باشد این نشانگر ساده، با سطح چندشکلی بالا، تکرارپذیری بالا و از الگوی توارث هم بارز برخوردار است (Powell et al., 1996). در میان این دو گروه مورد مطالعه، مشاهده شد که توده‌های بومی تغییرات ژنتیکی بالاتری نسبت به ارقام اصلاحی داشتند و پارامترهای ژنتیکی (تعداد آلل مشاهده شده، تنوع ژنی و PIC) از

۰,۱۵ تا ۰,۷۶ مشاهده شد که بیشترین این مقدار مربوط به نشانگر TAA170 با مقدار (۰,۷۶) و کمترین مقدار مربوط به نشانگر TA72 (۰,۱۵) بود.

مقدار بالاتری برخوردار بودند. تعداد آلل در هر لوکوس همبستگی مثبت و معنی‌داری با PIC و تنوع ژنی داشتند که مطابق با نتایج Upadhyaya و همکاران (۲۰۰۸) است. میانگین هتروزیگوتی بین

جدول ۳- نتایج حاصل از بررسی ژرم پلاسِم نخود با استفاده از نشانگر SSR

ردیف	نام نشانگر	(na) تعداد آلل		(ne) تعداد آلل مؤثر شده		H0 هتروزیگوتی مشاهده شده		شاخص شانون (I)		He		PIC	
		L	C	L	C	L	C	L	C	L	C	L	C
1	Cstms4	2.00	2.00	1.67	1.96	0.00	0.00	0.68	0.60	0.50	0.41	0.49	0.40
2	Cstms5	2.00	2.00	1.12	1.07	0.00	0.00	0.15	0.21	0.06	0.18	0.06	0.10
3	TA110	2.00	3.00	1.47	1.18	0.22	0.10	0.29	0.57	0.15	0.33	0.15	0.32
4	TS 43	3.00	3.00	2.16	1.91	0.22	0.30	0.82	0.90	0.48	0.55	0.50	0.51
5	GA20	3.00	3.00	2.79	2.12	0.11	0.23	0.88	1.06	0.54	0.66	0.50	0.64
6	GA24	2.00	2.00	1.38	1.14	0.00	0.00	0.24	0.45	0.13	0.28	0.12	0.27
7	GA34	4.00	4.00	2.76	2.79	0.67	0.70	1.13	1.12	0.65	0.65	0.64	0.64
8	TA53	4.00	2.00	1.95	1.92	0.28	0.37	0.88	0.68	0.49	0.50	0.48	0.49
9	TA96	3.00	3.00	2.34	1.66	0.05	0.03	0.71	0.97	0.41	0.59	0.40	0.59
10	TR1	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
11	TA159	4.00	3.00	2.73	2.71	0.05	0.13	1.12	1.05	0.64	0.65	0.63	0.63
12	TA5	3.00	3.00	1.41	2.08	0.00	0.07	0.87	0.56	0.53	0.30	0.52	0.29
13	TA113	3.00	3.00	2.22	2.07	0.22	0.03	0.76	0.87	0.52	0.56	0.51	0.55
14	TA76	2.00	2.00	2.00	1.72	0.11	0.06	0.61	0.69	0.43	0.51	0.42	0.49
15	TAA27	2.00	2.00	1.60	1.76	0.17	0.10	0.62	0.56	0.44	0.38	0.44	0.38
16	TR58	3.00	3.00	1.86	1.79	0.61	0.63	0.68	0.79	0.45	0.47	0.44	0.46
17	TA28	4.00	4.00	3.10	2.53	0.05	0.00	1.12	1.24	0.61	0.69	0.60	0.67
18	TA59	2.00	2.00	1.99	1.96	0.05	0.00	0.68	0.69	0.49	0.51	0.49	0.49
19	TA118	2.00	2.00	1.97	1.92	0.22	0.20	0.67	0.68	0.48	0.51	0.48	0.49
20	TS35	4.00	3.00	1.90	1.91	0.66	0.60	0.93	0.78	0.48	0.49	0.47	0.54
21	TR59	2.00	2.00	1.94	1.99	0.72	0.63	0.69	0.68	0.51	0.50	0.50	0.48
22	TR20	3.00	3.00	2.73	2.06	0.50	0.50	0.82	0.05	0.52	0.65	0.51	0.63
23	TR19	3.00	3.00	2.44	2.38	0.55	0.60	0.97	0.99	0.54	0.61	0.58	0.59
24	TA22	3.00	3.00	2.73	2.05	0.39	0.53	0.85	0.05	0.52	0.65	0.51	0.63
25	TA130	2.00	2.00	1.18	1.26	0.05	0.10	0.36	0.29	0.21	0.16	0.21	0.15
26	TA78	4.00	4.00	3.26	2.49	0.61	0.63	1.07	1.24	0.61	0.71	0.59	0.69
27	TA176	4.00	4.00	3.43	2.71	0.61	0.70	1.14	1.29	0.64	0.73	0.62	0.71
28	TA25	4.00	4.00	3.30	2.79	0.66	0.80	1.15	1.27	0.65	0.72	0.63	0.70
29	TS72	4.00	4.00	3.46	2.95	0.89	0.97	1.19	1.31	0.68	0.73	0.66	0.71
30	TA47	3.00	3.00	2.65	2.45	1.00	0.93	0.98	1.04	0.60	0.64	0.60	0.62
31	TA37	3.00	3.00	2.51	2.43	1.00	1.00	0.96	0.99	0.59	0.62	0.54	0.60
32	TAA170	6.00	7.00	5.22	3.68	1.00	1.00	1.45	1.79	0.74	0.83	0.50	0.79
33	TS 12	4.00	2.00	1.97	2.43	0.00	0.10	1.02	0.68	0.61	0.51	0.59	0.49
34	TS 45	3.00	2.00	1.18	1.82	0.05	0.03	0.73	0.29	0.46	0.16	0.45	0.15
35	TA146	3.00	3.00	2.23	2.64	0.94	0.93	1.03	0.87	0.63	0.57	0.62	0.55
36	TA72	3.00	2.00	1.12	1.27	0.00	0.03	0.43	0.21	0.21	0.11	0.21	0.10
37	TA3	2.00	2.00	1.80	2.00	0.00	0.00	0.69	0.64	0.51	0.46	0.50	0.44
38	TA39	3.00	4.00	3.01	2.72	0.72	0.70	1.04	1.23	0.64	0.69	0.63	0.64
	Mean	3.00	2.86	2.25	2.09	0.35	0.36	0.80	0.83	0.48	0.51	0.47	0.49

na = Observed number of alleles

ne = Effective number of alleles [Kimura and Crow (1964)]

I = Shannon's Information index [Lewontin (1972)]

یک با میانگین ۰,۵۵ متغیر بود. بیشترین هتروزیگوتی در بین ژنوتیپ‌های نخود نشانگر TAA170 داشت. الگوی بانندی SSR با استفاده از نشانگر TAA170 در شکل (۱) آورده شده است. الگوی تنوع ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های مورد آزمایش نشان داد که تغییرات ژنتیک مشاهده شده، برای

با توجه به نتایج Singh و همکاران (۲۰۰۸) تعداد آلل مشاهده شده در محدوده بین ۲ تا ۵ آلل با میانگین PIC ۰,۷۸ با استفاده از ۱۸ جفت مارکر SSR در بین کولتیوارها بدست آمد. همگی نشانگرها باندهای چندشکل (پلی‌مورف) تولید نمودند. هتروزیگوتی مشاهده شده برای ژنوتیپ‌ها از صفر تا

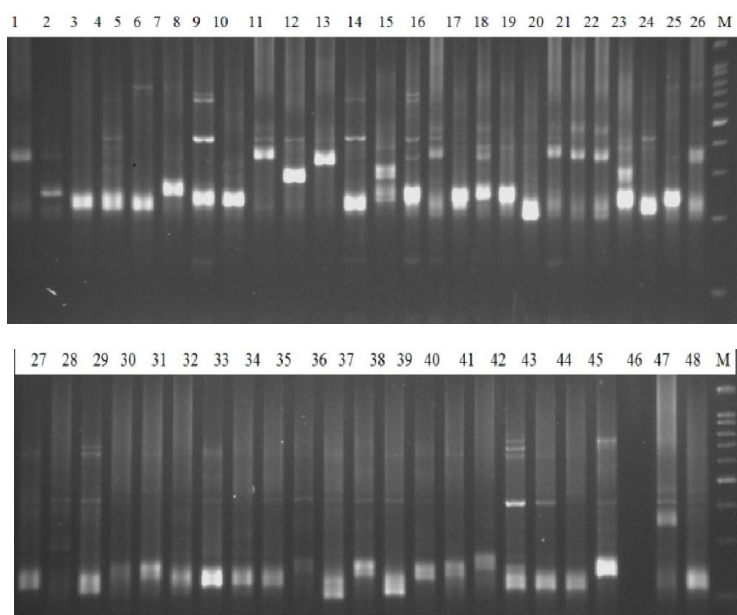
نتایج دیگر مطالعات بود (Iruela *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2004; Rao *et al.*, 2006) از میان ۳۸ نشانگر مورد استفاده، نشانگر TAA170 نشانگر مناسبی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی و دارای چندشکلی بالا، شاخص شانون و تنوع ژنی بالاتری نسبت به سایر مارکرها می‌شود. در این آزمایش نشان داده شد که نشانگر SSR نشانگر مناسبی برای بررسی تنوع ژنتیکی ارقام نخود زراعی می‌باشد. از طرف دیگر تنوع ژنتیکی بالا در ارقام بومی نسبت به ارقام اصلاحی این امکان را فراهم می‌سازد تا این ارقام در برنامه اصلاحی مورد توجه بیشتری قرار گیرند.

#### آنالیز تجزیه خوشه‌ای

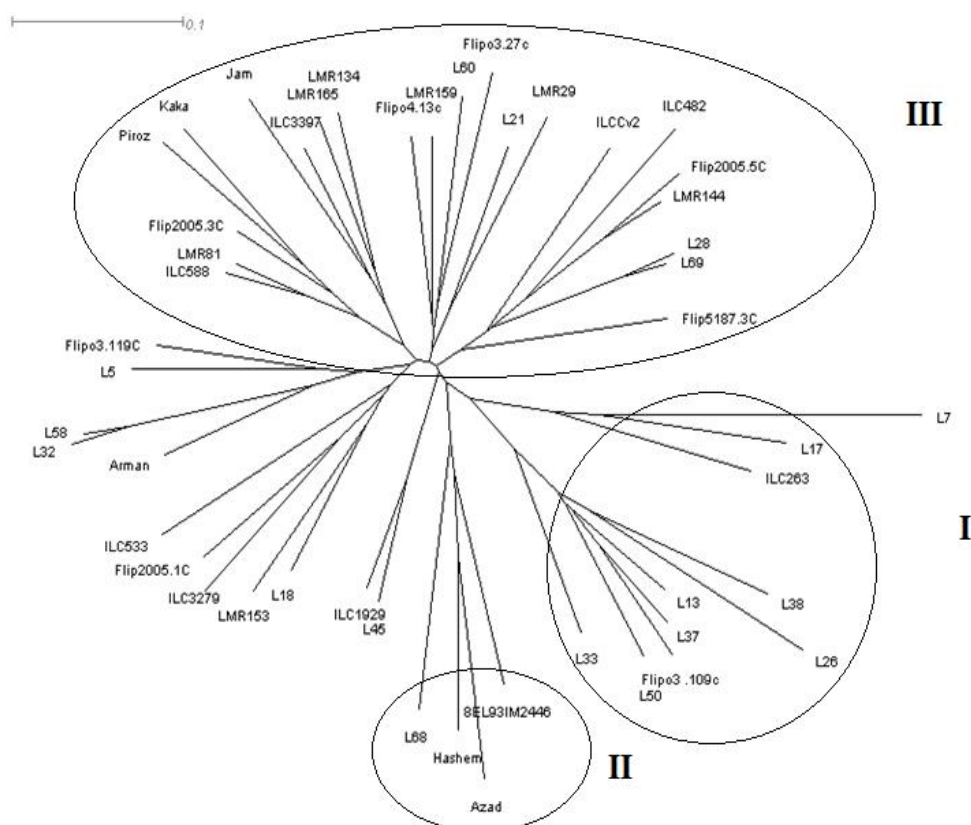
نتایج حاصل از دندوگرام ژنوتیپ‌های نخود زراعی نشان داد که این ژنوتیپ‌ها به ۳ گروه تقسیم‌بندی شدند. کلاستر I: شامل توده‌های بومی که تقریباً تمامی ارقام بومی در این کلاستر جای گرفتند. کلاستر II: شامل ۴ ژنوتیپ (Azad, Hashem, ) شامل بیشترین تعداد ژنوتیپ (۳۴ ژنوتیپ) که تمامی ارقام اصلاحی در این کلاستر قرار گرفتند (شکل ۲).

مدیریت ژرمپلاسم و استفاده در برنامه‌های اصلاحی می‌باشد (Tanya *et al.*, 2011).

Upadhyaya و همکاران (۲۰۰۸) در یک مطالعه وسیع گزارش کردند که مجموعه‌ای از ژرمپلاسم ۲۹۱۵ ژنوتیپ نخود با استفاده از ۴۸ نشانگر SSR، میانگین تعداد آلل ۳۵ آلل در هر لوکوس و PIC ۰,۸۵ گزارش کردند، در حالی که Sefera و همکاران (۲۰۱۱) ۴۸ رقم نخود با میانگین تعداد آلل ۱۰,۵ آلل در هر لوکوس و PIC ۰,۷۷ با استفاده از ۴۸ نشانگر SSR گزارش کردند. تعداد آلل مشاهده شده بیشتر در این تحقیق در مقایسه با مطالعات انجام شده Hüttel و همکاران (۱۹۹۹)، Singh و همکاران (۲۰۰۳)، و Singh (۲۰۰۸) نشان دادند که باید از یک مجموعه بیشتری از نشانگر میکروستلایت استفاده کرد. هتروزیگوتی در گونه‌های خودگشن به عنوان مثال نخود نتایجی از ۰,۰ تا ۱,۵۸ درصد گزارش شده است (Gowda, 1981). در میان این دو گروه مورد مطالعه پارامترهای تعداد آلل مشاهده شده، تعداد آلل مؤثر، محتوای اطلاعات چندشکلی، هتروزیگوتی مشاهده شده و تنوع ژنی تغییرات ژنتیکی بالاتری در توده‌های بومی نسبت به ارقام اصلاح شده نشان دادند که مطابق با



شکل ۱- الگوی باندهای SSR با استفاده از نشانگر TAA170، M: نشانگر به اندازه ۱۰۰ bp می‌باشد.



شکل ۱- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژرم‌پلاسم نخود بر اساس داده‌های مولکولی نشانگرهای SSR

## REFERENCES

- Anonymous (2007) FAOSTAT. The Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome.
- Choudhary S, Sethy NK, Shokeen B, Bhatia S (2006) Development of sequence-tagged microsatellites site markers for chickpea (*Cicer arietinum* L.) Mol. Ecol. Notes 6: 93-95.
- Choudhary S, Kaur J, Chhuneja P, Sandhu JS, Singh I, Singh S, Sirari A (2013) Assessment of genetic diversity in kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes in relation to seed size using SSR markers, Journal of Food Legumes. 26(1): 2696-2699.
- Chowdhury MA, Vandenberg V, Warkentin T (2002) Cultivar identification and genetic relationship among selected breeding lines and cultivars in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Euphytica, 127: 317-325.
- Gowda CLL (1981) Natural outcrossing in chickpea. Int. Chickpea Newslett. 5: 6-12
- Huttel B, Winter P, Weising K, Coumane W, Weigand F, Kahl G (1999) Sequence-tagged microsatellite markers for chickpea (*Cicer arietinum* L.) Genome, 42: 210-217.
- Iruela M, Rubio J, Cubero JI, Gil J (2002) Phylogenetic analysis in the genus *Cicer* and cultivated chickpea using RAPD and ISSR markers. Theor. Appl. Genet. 104: 643-651.
- Kashi Y, Soller M (1999) Functional roles of microsatellites and minisatellites. In: Goldstein D.B. and Schlötterer C (Eds). Microsatellites: Evolution and Application. 10-23. Oxford University Press, Oxford.
- Lichtenzweig J, Scheuring C, Dodge J, Abbo S (2005) Construction of BAC and BIBAC libraries and their applications for generation of SSR



- markers for genome analysis of chickpea, *Cicer arietinum* L. Theor. Appl. Genet. 110: 492-510.
- Litt M, Luty JA (1989) A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. Am. J. Hum. Genet. 44: 397-401.
- Liu W, Li S, Zhang A, Liu D (2007) Genetic diversity revealed by RAPD markers in plum collection of China. Acta Horticulturae, 734: 287-294.
- Naghavi MR, Mardi M, Ramshini HA, Fazelinasab B (2004) Comparative analysis of the genetic diversity among bread wheat genotypes based on RAPD and SSR markers. Iran. J. Biotech. 2: 195-202. (In Persian)
- Nayak SN, Zhu H, Varghese N, Datta S (2010) Integration of novel SSR and gene-based SNP marker loci in the chickpea genetic map and establishment of new anchor points with *Medicago truncatula* genome. Theor. Appl. Genet. 120: 1415-1441.
- Nevo E. (1978) Genetic variation in natural populations: patterns and theory. Theoretical Population Biology, 13: 121-77.
- Nguyen TT, Taylor PWJ, Redden RJ, Ford R (2004) Genetic diversity estimates in *Cicer* using AFLP analysis. Plant Breed. 123: 173-179.
- Omidbakhsh Fard MA (2005) Study of genetic diversity in durum wheat using SSR marker. M.Sc. Thesis. Univ. of Tehran. pp. 91. (In Persian).
- 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.
- Rao LS, Rani PU, Deshmukh PS, Kumar PA (2006) RAPD and ISSR fingerprinting in cultivated chickpea (*Cicer arietinum* L.) and its wild progenitor *Cicer reticulatum* Ladizinsky. Genet. Res. Crop Evol. 54: 1235-1244.
- Ribeiro-Carvalho C, Guedes-Pinto H, Iregas G (2004) High levels of genetic diversity throughout the range of the Portuguese wheat landrace Barbela. Ann. Bot. 94: 699-705.
- Röder MS, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier MH, Leroy P, Ganal MW (1998) A microsatellite map of wheat. Genet. 149: 2007-2023.
- Sefera T, Abebie B, Gaur PM, Assefa K (2011) Characterization and genetic diversity analysis of selected chickpea cultivars of nine countries using simple sequence repeat (SSR) markers. Crop Pasture Sci. 62: 177-187.
- Sethy NK, Choudhary S, Shokeen B, Bhatia S (2006a) Identification of microsatellite markers from *Cicer reticulatum*: molecular variation and phylogenetic analysis. Theor. Appl. Genet. 112: 347-357.
- Sethy NK, Shokeen B, Edwards KJ, Bhatia S (2006b) Development of microsatellite markers and analysis of intraspecific genetic variability in chickpea (*Cicer arietinum* L.) Theor. Appl. Genet. 112: 1416-1428.
- Singh KB (1997) Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Field Crops Res. 53: 161-170.
- Singh KB, Ocampo B (1997) Exploitation of wild *Cicer* species for yield improvement in chickpea. Theor. Appl. Genet. 95: 418-423.
- Singh R, Singhal V, Randhawa GJ (2008) Molecular analysis of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars using AFLP and STMS markers. J. Plant Biochem. Biotechnol. 17: 167-171.
- Tanya P, Taeprayoon P, Hadkam Y, Srinives P (2011) Genetic diversity among *Jatropha* and *Jatropha*-related species based on ISSR markers. Plant. Mol. Biol. Rep. 29: 252-264.
- Tilman D, Wedin D (1996) Productivity and sustainability influenced by

- biodiversity in grassland ecosystem. Nature: 718-720.
- Upadhyaya HD, Dwivedi SL, Baum M, Varshney RK (2008) Genetic structure, diversity, and allelic richness in composite collection and reference set in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *BMC Plant Biol.* 8: 106-112.
- Varshney RK, Horres R, Molina C, Nayak S (2007) Extending the Repertoire of Microsatellite Markers for Genetic Linkage Mapping and Germplasm Screening in Chickpea. Available at [[http://www.icrisat.org/journal/volume5/hickpea\\_PigeonPea/cp5.pdf](http://www.icrisat.org/journal/volume5/hickpea_PigeonPea/cp5.pdf)].