

شناسایی نشانگرهای SSR پیوسته با صفات مورفولوژیک در ژنوتیپ‌های لوبیا چشم بلبلی (*Vigna unguiculata* L. Walp) تحت تنش خشکی

خسرو مفاخری^۱، محمدرضا بی‌همتا^{۲*} و علیرضا عباسی^۳

۱. دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، گروه به‌نژادی و بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

۲. استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

۳. دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۳/۲۸ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۶/۲۶)

Identification of SSR markers associated with morphological traits in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) genotypes under drought stress condition

Khosro Mafakheri¹, Mohammad Reza Bihanta^{2*}, Ali Reza Abbasi³

1. Ph.D Student, Department of Biotechnology and Plant Breeding, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

2. Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Tehran, Tehran, Iran.

3. Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Tehran, Tehran, Iran.

(Received: Jun. 17, 2015 - Accepted: Sep. 16, 2015)

Abstract

In the current investigation, 22 SSR primer pairs were used to identify molecular markers associated with morphological traits in cowpea (*Vigna unguiculata* L.) based association analysis, markers produced 186 locations in 32 cowpea genotypes. 22 SSR primers pair amplified 8.45 for each primer location and the average polymorphism information content (PIC) ranged from 0.445 to 0.25 (Vm25) and 0.625 (Vm5) were varied, respectively. Cluster analysis based on Dice, Jaccard and Simple Maching similarity coefficients based on molecular traits revealed primarily two major groups. Stepwise regression analysis between molecular data as independent variables, and morphological data as dependent variables was performed to identify informative markers associated with the studied traits. SSR loci associated with economic and biological yield, in normal conditions and in drought stress condition were Vm70 and Vm33, and Vm3 and Vm26 respectively. In drought stress condition the maximum variation of number of days to 50% flowering, days to 50% maturity of pods and pod length (99.9%, respectively) was accounted by Vm22, Vm31 and Vm26 markers. While in the normal condition the maximum variation of traits sheath thickness, width of pod and days to 50% flowering (99.9%) was accounted by Vm14, Vm34 and Vm34 markers. In both normal and drought conditions most of the used SSR primers showed significant association with the studied traits, so we can use these markers along with morphological traits in breeding cowpea genotypes to identify drought tolerant and hardy cultivars suitable for the preparation and use mapping populations.

Keywords: Cowpea, Positive Markers, Morphological Traits, Molecular markers.

چکیده

به منظور شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات مورفولوژیک در ژنوتیپ‌های لوبیا چشم‌بلبلی، از ۲۲ جفت نشانگرهای ریزماهواره (SSR) استفاده شد. آغازگرها، ۱۸۶ مکان در ۳۲ ژنوتیپ لوبیا چشم‌بلبلی تولید کردند. میانگین تعداد مکان‌ها ۸/۴۵ مکان برای هر آغازگر و میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) برای آغازگرها ۰/۴۴۵ تا ۰/۶۲۵ (Vm25) تا ۰/۶۲۵ (Vm5) متغیر بود. به منظور بررسی فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها تجزیه خوشه‌ای برای داده‌های حاصل از نشانگرهای SSR براساس ضرایب تشابه دایس و جاکارد ژنوتیپ‌ها را در دو گروه اصلی قرار داد. به منظور شناسایی نشانگرهای مولکولی مثبت، تجزیه رگرسیون گام به گام بین داده‌های مولکولی به عنوان متغیرهای مستقل و صفات مورفولوژیک به عنوان متغیرهای وابسته در هر دو شرایط خشکی و نرمال انجام گرفت. نشانگرهای مرتبط با صفات عملکرد اقتصادی و بیولوژیک به ترتیب در شرایط نرمال Vm70 و Vm33، در خشکی Vm3 و Vm26 بودند. در تنش خشکی بیشترین تغییرات مربوط به صفات تعداد روز تا ۵۰٪ گلدهی، تعداد روز تا ۵۰٪ رسیدگی غلاف و طول غلاف (۹۹/۹ درصد) به ترتیب توسط نشانگرهای Vm22، Vm31 و Vm26 تبیین شد و در شرایط نرمال بیشترین تغییرات مربوط به صفات ضخامت غلاف، عرض غلاف و تعداد روز تا ۵۰ درصد گلدهی (۹۹/۹ درصد) توسط نشانگرهای Vm14، Vm34 و Vm34 تبیین شدند. در هر دو شرایط تنش خشکی و نرمال اکثر آغازگرهای مورد استفاده روی صفات ارتباط نشان دادند، بنابراین می‌توان از این آغازگرها همراه با اطلاعات صفات مورفولوژیک در اصلاح لوبیا چشم‌بلبلی جهت شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به تنش خشکی، مناسب برای تهیه جمعیت‌های نقشه‌یابی و تولید ارقام متحمل استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: لوبیا چشم‌بلبلی، نشانگرهای مثبت، صفات مورفولوژیک و نشانگرهای مولکولی.

مقدمه

لوبیا چشم بلبلی (*Vigna unguiculata* L.) گیاهی است از Fabaceae و زیر خانواده پروانه‌آساها که منشأ آن را آفریقا ذکر کرده‌اند (Majnoun, 2008). لوبیا چشم‌بلبلی گیاهی است خودگشن، میزان دگرگشتی آن کمتر از ۱٪ بوده و دیپلوئید $2n=2x=22$ است که اندازه ژنومی آن تقریباً ۶۲۰Mbp تخمین زده شده است. در مورد منشأ آن تحقیقات باستان‌شناسی نشان داده که احتمالاً دارای سه منشأ آفریقا، آسیا و آمریکای جنوبی می‌باشد (Tindal, 1983; Kotzeh, 1995). هر گل لوبیا چشم‌بلبلی ۱۰ پرچم دارد که ۹ پرچم آن به هم چسبیده و یکی آزاد است. تا سال ۱۹۷۰ بیش از ۸۵٪ ارقام حبوبات از طریق گزینش رگه‌های خالص و تنها ۱۴٪ درصد ارقام از طریق دورگ‌گیری به دست آمده بود. در دهه‌های اخیر دورگ‌گیری و به ویژه روش گزینش شجره‌ای (و روش‌های تغییر یافته آن) مهمترین روش‌های به‌نژادی حبوبات شده است. در لوبیا بیشتر از روش‌های وارد کردن واریته‌های جدید، گزینش رگه‌های خالص، گزینش شجره‌ای، تلاقی برگشتی، جهش و گزینش توده‌ای استفاده شده است (Yazdi Samadi et al., 2010). علیرغم تنوع بالا در ژرم‌پلاسما توده‌های گیاهی و به خصوص ژرم‌پلاسما لوبیا چشم‌بلبلی در داخل کشور کمتر از این تنوع جهت شناسایی ژنوتیپ‌هایی با عملکرد بالا و توان تحمل بالا به تنش‌های محیطی استفاده شده است. با توجه به اینکه تنوع گیاهان زراعی همبستگی مثبتی با پراکندگی جغرافیایی آنها دارد و گیاهان زراعی طی سال‌ها زیستن در شرایط محیطی متفاوت حاوی ژن‌های متنوعی شده‌اند (Julier et al., 2000). جهت تعیین و بهره‌برداری از 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). یکی از نشانگرهای مولکولی ریزماهورها هستند، ریزماهوره 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، سطوح بالای پلی‌مورفیسم و سادگی کار باعث شده است که در بسیاری از موارد مفید باشد (Kashi and Soller, 1999).

با توجه به تأثیر شرایط نامساعد محیطی بر رشد گیاهان، خشکی هنوز عمده‌ترین محدودیت در تولید محصولات زراعی محسوب می‌شود، به گونه‌ای که از بین تنش‌های زنده و غیرزنده، خشکی به تنهایی مسبب ۴۵٪ از کاهش عملکرد محصولات زراعی می‌باشد (Belhassen, 1996). میزان تولید حبوبات در سال زراعی ۹۳-۱۳۹۲، حدود ۶۱۵ هزار تن می‌باشد که ۴۶/۰۸ درصد از آن مربوط به اراضی با کشت آبی و ۵۳/۹۲ درصد آن مربوط به اراضی با کشت دیم می‌باشد. از کل میزان تولید حبوبات در کشور، محصول لوبیا ۳۶/۸ درصد می‌باشد. در سال زراعی ۹۳-۱۳۹۲، سطح لوبیا کشور حدود ۱۱۶ هزار هکتار برآورد شده که معادل ۰/۹۸ درصد از کل سطح محصولات زراعی و ۱۴/۱ درصد از کل سطح برداشت حبوبات می‌باشد و اراضی آبی ۹۷/۹۶ درصد و بقیه به صورت کشت دیم می‌باشد. استان فارس با ۲۴/۱ درصد از کل سطح برداشت لوبیا کشور بیشترین و تهران با ۱۱ هکتار کمترین سطح لوبیا در کشور را دارا می‌باشند. عملکرد لوبیا کشور در اراضی آبی ۱۹۴۴ کیلوگرم در هکتار و در اراضی دیم ۲۱۲۶ کیلوگرم در هکتار می‌باشد (Agriculture statistics, 2014). خشکی یکی از عوامل محدود کننده تولید این محصول در جهان است. گیاه لوبیا به شرایط آب، خاک و کیفیت آن خیلی حساس بوده و عملکرد آن حتی در دوره‌های کوتاه مدت تنش

زراعی مورد مطالعه مانند عملکرد بیولوژیکی و وزن هزار دانه مرتبط بوده و به عنوان نشانگرهای مثبت برای برنامه‌های گزینش به کمک این نشانگرها این صفت معرفی شدند.

نشانگرهای مولکولی بویژه نشانگرهای مبتنی بر DNA با ایجاد تعداد نامحدودی نشانگر و با حذف اثرهای ناشی از عوامل محیطی، توانسته است بسیاری از مشکلات نشانگرهای مورفولوژیک را برطرف کند (Li et al., 2008; Mengoni et al., 2000). در دو دهه اخیر، نشانگرهای مولکولی ابزار مناسبی برای مطالعه صفات پیچیده در گونه‌های گیاهی فراهم کرده‌اند و اصلاح گیاهان با تاکید بر روی شناسایی مکان‌های ژنی کنترل کننده صفات کمی و انتخاب به کمک نشانگر (MAS) گسترش یافته است (Thudi et al., 2014). درجه چندشکلی نشانگرهای توسط دو پارامتر، درصد مکان‌های چندشکل و متوسط تعداد آلل‌ها در هر مکان ژنی تعیین می‌شود. درجه چند شکلی با استفاده از شاخص تنوع نی (Nei 1973) و میزان اطلاعات چند شکلی (PIC) نشان داده می‌شود. یکی از پارامترهای متداول برای اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی، تنوع در سطح مکان ژنی منفرد است که این پارامتر مشابه PIC در لاین‌های خالص است. متوسط تنوع در مجموع چندین مکان ژنی از فرمول زیر محاسبه می‌شود:

$$PIC = 1 - \frac{1}{L} \sum_{i=1}^L D_i = 1 - \frac{1}{L} \sum_{i=1}^L \sum_{j=1}^L P_{ij}^2$$

این پارامتر مشابه هتروزیگوتی مورد انتظار در یک مکان ژنی برای موجودات دیپلوئید با تعادل هاردی-واینبرگ است. رابطه بین این دو پارامتر روشی را برای مقایسه سطح تنوع ژنتیکی در موجودات هاپلوئید، جایی که تعیین سطح تنوع امکانپذیر است و موجودات دیپلوئید که با استفاده از آنها امکان تعیین سطح هتروزیگوتی وجود دارد، فراهم می‌کند.

صدمه می‌بیند. کاهش آماس سلولی اولین اثر تنش خشکی است که موجب می‌شود سرعت رشد محصول و اندازه نهایی آن کاهش یافته و به دنبال آن سرعت رشد و نمو، ساقه و برگ کم شده و نهایتاً عملکرد کاهش می‌یابد (Jolaei 2005). از این رو ژنوتیپ‌های که آب قابل دسترس را با کارایی بیشتری مصرف نموده و قادر به تحمل تنش خشکی باشند، یک هدف عمده برای افزایش عملکرد محصولات زراعی در محیط‌های مستعد تنش خشکی می‌باشند لذا شناسایی ژنوتیپ‌های سازگار با تحمل به تنش خشکی می‌تواند در گزینش ژنوتیپ‌های سازگار به کار گرفته شود (Waines and Ehdaie, 1993). افزایش دما در مناطق مستعد تنش خشکی، شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل که بتوانند در شرایط سخت هم عملکرد قابل قبولی داشته باشند ضروری به نظر می‌رسد. توارت کمی تحمل به خشکی و اثر متقابل آن با محیط یکی از چالش‌های موجود در امر شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به تنش خشکی است (Takeda et al., 2008). از دیدگاه به‌نژادی تحمل به تنش خشکی یک صفت کمی و پیچیده است و روش اندازه‌گیری مستقیمی برای آن وجود ندارد که این امر باعث مشکل شدن شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به تنش خشکی می‌شود (Abdolshahi et al., 2010). روش‌های مولکولی از قبیل مکان‌یابی ارتباطی از عدم تعادل پیوستگی بین مکان‌های ژنومی برای شناسایی و مکان‌یابی جایگاه صفات کمی استفاده می‌شود. در پژوهشی Agrama و همکاران (۲۰۰۷)، ارتباط بین صفات زراعی و نشانگرهای مولکولی را با استفاده از چهار صفت زراعی و ۱۲۳ نشانگر ریزماهواره (SSR)، بر روی ۹۲ ژنوتیپ برنج مورد بررسی قرار دادند. Roy و همکاران (2006)، با استفاده از تجزیه ارتباط براساس رگرسیون چندمتغیره در ۵۵ لاین گندم، ۵۵ نشانگر SSR، ۳۸ نشانگر SAMPL و ۵۴ نشانگر AFLP را شناسایی کردند که حداقل با یکی از ۱۴ صفت

گام بین داده‌های مولکولی و صفات مورفولوژیک انجام دادند و بیان نمودند که اکثر آغازگرهای مورد استفاده روی صفات مورد مطالعه مؤثر بودند. Ioandik و همکاران (2002)، با استفاده از ۳۳ نشانگر SSR و صفات مورفولوژیک، تجزیه ارتباط انجام دادند، و نشانگرهای مرتبط با زمان گلدهی تحت رژیم‌های مختلف رشدی را در جو شناسایی کردند.

با توجه به اهمیت تنش خشکی در حبوبات و به خصوص در لوبیا چشم‌بلبلی و با توجه به اینکه تاکنون مطالعات تجزیه ارتباطی و شناسایی نشانگرهای آگهی‌بخش برای بسیاری از صفات مورفولوژیک مهم مرتبط با مقاومت به خشکی در لوبیا چشم‌بلبلی گزارش نشده است. بنابراین این پژوهش به منظور شناسایی نشانگرهای مولکولی مرتبط و پیوسته با عملکرد و برخی صفات مهم مرتبط با تنش خشکی در برخی ژنوتیپ‌های لوبیا چشم‌بلبلی پایه‌ریزی شد. به صورتی که هدف اصلی شناسایی نشانگرهای مثبت و آگاهی بخش مرتبط و پیوسته با صفات مورفولوژیک در لوبیا چشم‌بلبلی با استفاده از نشانگرهای SSR با رگرسیون گام به گام بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی مورد مطالعه در این آزمایش شامل ۳۰ ژنوتیپ لوبیا چشم‌بلبلی به همراه دو رقم لوبیا چشم‌بلبلی مشهد و پرستو (جدول ۲) با مبداء جغرافیایی گسترده و براساس مطالعه Mafakheri و همکاران (۲۰۱۵)، تهیه شده از بانک ژن گروه زراعت و اصلاح نباتات پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران بودند. ژنوتیپ‌ها در مزرعه تحقیقاتی گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، در دو شرایط تنش خشکی و آبیاری نرمال در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در ۳ تکرار و هر تکرار شامل ۳۲ کرت (واحد) آزمایشی به طول ۲ متر، که هر واحد شامل ۳

از این رو، تعیین ارتباط بین نشانگرهای مولکولی و صفات مورفولوژیک، می‌تواند گام مؤثری در استفاده از گزینش جمعیتی باشد. پیوستگی ژنتیکی بین نشانگرها و مکان‌های صفات کمی، محتمل‌ترین توجیه برای وجود ارتباط بین نشانگرهای مولکولی و نمود صفات کمی باشد (Virk *et al.*, 1999). استفاده از پیوستگی بین نشانگرهای مولکولی و ژن‌های کنترل‌کننده صفات کمی، فرآیند به‌نژادی گیاهی را تسریع کرده است به طوری که به جای ارزیابی صفات، گزینش غیرمستقیم به کمک نشانگرهای پیوسته با صفات که با استفاده از مطالعات مبتنی بر تجزیه پیوستگی انجام گرفته است. هرچند در مطالعات مبتنی بر تجزیه پیوستگی، تعداد کمی از ژنوتیپ‌ها به عنوان والدین جمعیت در حال تفرق برای شناسایی چندشکلی‌های مرتبط با صفات مورد مطالعه غربال می‌شوند که این خود محدودیت دیگری را ایجاد می‌کند، زیرا ممکن است نشانگرهای شناسایی شده در این والدین برای گزینش به کمک نشانگرها در زمینه‌های ژنتیکی والدین و ارقام دیگر مفید نباشد. برای غلبه بر این محدودیت‌ها روش مکان‌یابی ارتباطی یا تجزیه ارتباطی معرفی گردید، که نه تنها امکان مکان‌یابی دقیق ژن‌ها را فراهم می‌کند، بلکه امکان شناسایی نواحی کروموزومی دیگر را که در مطالعات مبتنی بر پیوستگی امکان‌پذیر نبود را نیز میسر کرد. که ابتدا در انسان و برای شناسایی مکان‌های کنترل‌کننده صفات مندلی و سپس در علوم گیاهی رو به گسترش است (Rashidi Monfared *et al.*, 2008; Abdollahi Mandoulakani *et al.*, 2016; Gebhardt *et al.*, 2004; Jun *et al.*, 2008). تجزیه ارتباطی در رابطه با صفات متنوع با نشانگرهای مولکول متعدد انجام گرفته است. Abdollahi Mandoulakani and Azizi (2014)، تجزیه ارتباطی را در مورد ۱۶ آغازگر ISSR با ۱۵ صفت مورفولوژیک در ۸۰ ژنوتیپ یونجه با استفاده از تجزیه رگرسیون گام به

شدند و مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۱). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در ترموسایکلر بیورد (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتری شامل ۲ میکرولیتر DNA (50ng/μL)، ۱/۵ میکرولیتر بافر (10x) بافر PH 8.3، ۱/۲ میکرومول (25mM) MgCl₂، ۱ میکرومول از dNTPs (10mM)، ۱ میکرومول از F(10Pmol) آغازگر، ۱ میکرومول R(10Pmol) آغازگر و ۰/۲ میکرو مول (5U/μL) آنزیم تک پلیمرز انجام گرفت. چرخه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به صورت: ۴ دقیقه واسرشت‌سازی اولیه در ۹۴ درجه و ۳۵ چرخه شامل ۴۰ ثانیه در ۹۴ درجه (جهت واسرشت سازی)، ۴۰ ثانیه در دمای اتصال آغازگرها (جدول-۱)، ۲ دقیقه در ۷۲ درجه (جهت بسط) و بسط نهایی در ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه بود. بعد از انجام PCR، محصولات تکثیری ابتدا نمونه‌های روی ژل آگارز ۱٪ ارزیابی شدند و سپس نمونه‌ها با حجم مساوی از فرمامید ۹۸ درصد مخلوط شده و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا DNA دو رشته‌ای تک رشته‌ای شوند و به عبارتی باز شوند سپس تیوب‌ها روی یخ قرار داده شدند و به مقدار ۸ میکرولیتر از محتوای داخل تیوب‌ها روی ژل آکریل‌امید شش درصد واسرشت‌ساز بارگذاری گردید. ژل‌ها با نیترات نقره رنگ آمیزی (Bassam *et al.*, 1991)، و با اسکنر مدل Bio Read ژل‌ها اسکن شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

امتیازدهی الگوی نواری به صورت یک و صفر براساس وجود و یا عدم وجود باند در هر مکان امتیازدهی شدند. شاخص PIC با استفاده از فرمول $PIC=1-\sum P_i^2$ محاسبه شد. در این فرمول P_i فراوانی آلل iام در یک مکان مشخص می‌باشد. تعداد آلل‌های مؤثر نیز به کمک نرم‌افزار Popgene نسخه ۱/۳۱ (Yeh *et al.*, 1999) محاسبه شد. برای

ردیف کاشت با فاصله بین ردیف ۷۰ سانتی‌متر و فاصله بین بوته در هر ردیف ۱۵ سانتی‌متر بود، کشت شدند. آزمایش در دو شرایط جداگانه تنش خشکی و آبیاری نرمال اجرا شد (Mafakheri *et al.*, 2015)، به‌صورتی که آزمایش اول، شرایط نرمال آبیاری بود و طبق عرف زراعی منطقه هر ۷ روز یک بار آبیاری انجام می‌گرفت و آزمایش دوم، شرایط تنش هر ۱۴ روز یک بار آبیاری سطح مزرعه صورت می‌گرفت. در دو شرایط آزمایش تمامی صفات مورفولوژیک شامل ارتفاع بوته، وزن ۱۰۰ دانه، عملکرد بیولوژیک، عملکرد اقتصادی، شاخص برداشت، طول غلاف، ضخامت غلاف، عرض غلاف، تعداد دانه در غلاف، تعداد غلاف در بوته، طول دانه، عرض دانه و ضخامت دانه و صفات فنولوژیکی تعداد روز تا ۵۰ درصد جوانه‌زنی، تعداد روز تا ۵۰ درصد گلدهی، تعداد روز تا ۵۰ درصد تولید غلاف و تعداد روز تا ۵۰ درصد رسیدگی غلاف مطابق با دیسکریپتور IPGRI در هر تکرار اندازه‌گیری و ثبت شدند.

استخراج DNA ژنومی تجزیه داده‌ها:

برای استخراج DNA برای هر ۳۲ ژنوتیپ تعداد ۵ عدد بذر در گلدان‌های پلاستیکی در گلخانه کاشته شدند و پس از رشد رویشی تا مرحله ۵ برگگی از برگ‌های جوان و سالم با حذف دم‌برگ برگ‌ها، نمونه‌برداری شد. استخراج DNA به روش CTAB انجام گرفت. کیفیت و کمیت DNA استخراجی با نانودرآپ و الکتروفورز ژل آگارز (۱٪) تعیین و سپس به غلظت ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر برای انجام واکنش PCR رقیق سازی شد. ۲۲ جفت آغازگر SSR (ریزماهواره) براساس محتوای اطلاعات چندشکلی آنها در گزارشات قبلی (Fathi, 2010; Hong *et al.*, 1993; Li *et al.*, 2001; Diouf and Hilu, 2005; Nie *et al.*, 1979) انتخاب

۱۳ انجام گرفت. همچنین روابط ژنتیکی بین نمونه‌ها با استفاده از ماتریس تشابه دایس Dice محاسبه و دندروگرام حاصل با استفاده از روش WARD با استفاده از نرم افزار Ntsyse ترسیم گردید.

شناسایی نشانگرهای مثبت مرتبط با صفات مورفولوژیک مورد مطالعه، تجزیه رگرسیون گام به گام با در نظر گرفتن مکان‌های نشانگری به عنوان متغیرهای مستقل و صفات مورفولوژیک به عنوان متغیرهای وابسته با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های لوبیا چشم‌بلبلی

نام آغازگر	توالی رفت و برگشت	اندازه	موتیف	دمای اتصال
Vm3	5' GAG CCG GGT TCA ATA GGT A 3' 5' GAG CCA GGG CAC AGG TAG T 3'	171	(AG) ₂₇	58
Vm5	5' AGC GAC GGC AAC AAC GAT 3' 5' TTC CCTGCA ACA AAA ATA CA 3'	188	(AG) ₃₂	56
Vm11	5' CGG GAA TTA ACG GAG TCA CC 3' 5' CCC AGA GGC CGC TAT TAC AC 3'	195	(TA) ₄ (AC) ₁₂	56
Vm12	5' TTG TCA GCG AAA TAA GCA GAG A 3' 5' CAA CAG ACG CAG CCC AAC T 3'	157	(AG) ₂₇	61
Vm13	5' CAC CCG TGA TTG CTT GTT G 3' 5' GTC CCC TCC CTC CCA CTG 3'	135	(CT) ₂₁	63
Vm14	5' AAT TCG TGG CAT AGT CAC AAG AGA 3' 5' ATA AAG GAG GGC ATA GGG AGG TAT 3'	144	(AG) ₂₄	62
Vm19	5' TAT TCA TGC GCC GTG ACA CTA 3' 5' TCG TGG CAC CCC CTA TC 3'	241	(AC) ₇ -(AC) ₅	60
Vm22	5' GCG GGT AGT GTA TAC AAT TTG 3' 5' GTA CTG TTC CAT GGA AGA TCT 3'	217	(AG) ₁₂	58
Vm23	5' AGA CAT GTG GGC GCA TCT G 3' 5' AGA CGC GTG GTA CCC ATG TT 3'	174	(CT) ₁₆	62
Vm25	5' CCA CAA TCA CCG ATG TCC AA 3' 5' CAA TTC CAC TGC GGG ACA TAA 3'	240	(TC) ₁₈	60
Vm26	5' GGC ATC AGA CAC ATA TCA CTG 3' 5' TGT GGC ATT GAG GGT AGC 3'	294	(TC) ₁₄	59
Vm31	5' CGC TCT TCG TTG ATG GTT ATG 3' 5' GTG TTC TAG AGG GTG TGA TGG TA 3'	200	(CT) ₁₆	60
Vm33	5' GCA CGA GAT CTG GTG CTC CTT 3' 5' CAG CGA GCG CGA ACC 3'	270	(AG) ₁₈ (AC) ₈	62
Vm34	5' AGC TCC CCT AAC CTG AAT 3' 5' TAA CCC AAT AAT AAG ACA CAT A 3'	216	(CT) ₁₄	54
Vm35	5' GGT CAA TAG AAT AAT GGA AAG TGT 3' 5' ATG GCT GAA ATA GGT GTC TGA 3'	127	(AG) ₁₁ -(T) ₉	58
Vm36	5' ACT TTC TGT TTT ACT CGA CAA CTC 3' 5' GTC GCT GGG GGT GGC TTA TT 3'	160	(CT) ₁₃	60
Vm37	5' TGT CCG CGT TCT ATA AAT CAG C 3' 5' CGA GGA TGA AGT AAC AGA TGA TC 3'	289	(AG) ₅ -(CCT) ₁₃ -(CT) ₁₃	60
Vm39	5' GAT GGT TGT AAT GGG AGA GTC 3' 5' AAA AGG ATG AAA TTA GGA GAG CA 3'	212	(AC) ₁₃ -(AT) ₅ -(TACA) ₄	58
Vm40	5' TAT TAC GAG AGG CTA TTT ATT GCA 3' 5' CTC TAA CAC CTC AAG TTA GTG ATC 3'	200	(AC) ₁₈	59
Vm68	5' CAA GGC ATG GAA AGA AGT AAG AT 3' 5' TCG AAG CAA CAA ATG GTC ACA C 3'	254	(GA) ₁₅	59
Vm70	5' AAA ATC GGG GAA GGA AAC C 3' 5' GAA GGC AAA ATA CAT GGA GTC AC 3'	186	(AG) ₂₀	58
Vm71	5' TCG TGG CAG AGA ATC AAA GAC AC 3' 5' TGG GTG GAG GCA AAA ACA AAA C 3'	225	(AG) ₁₂ -(AAAG) ₃	30

جدول ۲. کد و مبدأ ژنوتیپ‌های لوبیا چشم‌بلبلی مورد آزمایش

شماره	کد ژنوتیپ	کد دسترسی	مبدأ	وضعیت حساس / مقاوم به خشکی	شماره	کد ژنوتیپ	کد دسترسی	مبدأ	وضعیت حساس / مقاوم به خشکی
1	175	62-069-00276	India	نیمه مقاوم	17	8	62-034-00008	Columbia	حساس
2	107	62-002-00157	Afghanistan	نیمه مقاوم	18	196	62-157-00297	America	مقاوم
3	210	62-157-00310	America	حساس	19	203	62-157-00304	America	نیمه مقاوم
4	43	62-069-00048	India	حساس	20	162	62-110-00255	Nigeria	نیمه مقاوم
5	141	62-071-00218	India	نیمه مقاوم	21	193	62-157-00294	America	نیمه مقاوم
6	49	62-019-00004	Brazil	مقاوم	22	294	62-157-00424	America	نیمه مقاوم
7	307	62-157-00444	America	مقاوم	23	174	62-069-00273	India	نیمه مقاوم
8	186	62-157-00287	America	مقاوم	24	192	62-157-00293	America	نیمه مقاوم
9	220	62-157-00324	America	نیمه مقاوم	25	232	62-157-00341	America	حساس
10	222	62-157-00331	America	نیمه مقاوم	26	30	62-069-00030	India	مقاوم
11	291	62-157-00421	America	حساس	27	17	62-117-00017	Paraguay	نیمه مقاوم
12	7	62-034-00007	Columbia	نیمه مقاوم	28	76	62-015-00110	Belgium	حساس
13	37	62-153-00041	Turkey	مقاوم	29	9	62-157-00311	America	حساس
14	215	62-157-00318	America	حساس	30	229	62-157-00336	America	نیمه مقاوم
15	246	62-157-00355	America	نیمه مقاوم	31	Parasto	62-157-00347	America	مقاوم
16	313	62-157-00451	America	مقاوم	32	Mashhad	62-071-10003	Iran	مقاوم

نتایج و بحث

از ۲۲ جفت آغازگر SSR مورد استفاده در این مطالعه، تمامی ۲۲ جفت آغازگر چندشکلی نشان دادند، در مجموع ۱۸۶ مکان توسط ۲۲ جفت آغازگر تکثیر شدند (جدول ۳). در مجموع ۷۴۰ باند برای کل ژنوتیپ‌های مورد مطالعه مشاهده شد که از این تعداد ۳۴۶ باند چندشکلی نشان دادند به صورتی که میانگین چندشکلی در کل ژرم‌پلاسم بررسی شده ۴۴/۵۹ درصد بود. چندشکلی بالای مشاهده شده در این مطالعه را می‌توان به کارایی بالای روش SSR، وسعت جغرافیایی نمونه‌های بررسی شده و تعداد زیاد ژنوتیپ‌های مورد مطالعه نسبت داد (Veronesi *et al.*, 2010; Zaccardelli *et al.*, 2003). Abdollahi Mandoulakani و همکاران (۲۰۱۰)، در مطالعه‌ای تجزیه ارتباط برای صفات مورفولوژیک در بادام زمینی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره (SSR) را انجام دادند و گزارش کردند که همه مکان‌های ریزماهواره‌ای مورد استفاده الگوی نواری چندشکل بین ژنوتیپ‌های مورد استفاده تولید کردند

به صورتی که در مجموع ۸۰ آلل در جمعیت بادام-زمینی مورد مطالعه تولید شد. به صورتی که میانگین تعداد آلل‌ها ۶/۱۱۵ آلل برای هر مکان ریزماهواره و میانگین میزان اطلاعات چندشکل برای جایگاه‌ها ۰/۸۰ و از ۰/۴۷ (برای نشانگر pPGPseq-2C11) تا ۰/۹۵ (برای نشانگر PM183) متغیر بود.

در این مطالعه برای تعیین ارتباط بین صفات کمی مورد مطالعه با داده‌های مولکولی و شناسایی نشانگرهای مرتبط با این صفات از روش رگرسیون گام به گام استفاده شد. در این حالت برای هر صفت به طور جداگانه رگرسیون مرحله‌ای انجام شد و هر صفت کمی به عنوان متغیر وابسته (Y) و کلیه نشانگرها مولکولی به عنوان متغیر مستقل (X) در نظر گرفته شدند و رگرسیون مرحله‌ای محاسبه گردید. در این روش در ابتدا اولین X (اولین نشانگر) دارای بیشترین رابطه بوده و ابتدا وارد مدل می‌شود و به همین ترتیب سایر متغیرها (Xها) در معادله منظور می‌شوند. با توجه به نتایج تجزیه رگرسیون تحت شرایط نرمال (جدول ۴) و تحت شرایط تنش خشکی

تعداد روز تا ۵۰٪ جوانه‌زنی و طول غلاف نشانگرهای Vm68 و Vm26 اولین نشانگرهای بود که وارد مدل شدند.

محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) محاسبه شده برای ۲۲ جفت آغازگر مورد استفاده با متوسط ۰/۴۴۵ درصد از ۰/۲۵ برای آغازگر Vm25 تا ۰/۶۲۵ برای آغازگر Vm5 متغیر بود. میزان اطلاعات چند شکل، یکی از شاخص‌های مهم جهت مقایسه نشانگرهای مختلف از لحاظ قدرت تمایز آنها می‌باشد. مقادیر بالای این معیار دلالت بر چند شکلی بالا و وجود آلل‌های نادر در یک جایگاه نشانگری است که در تفکیک و تمایز افراد نقش بسزایی دارد (Agarama and toinstra 2003). بنابراین آغازگر Vm5 با بیشترین مقدار PIC، بهتر از سایر نشانگرهای به کار رفته توانست فاصله ژنتیکی نمونه‌ها را مشخص کند. اگرچه برخی از ریزماهورها دارای تعداد آلل مشابه می‌باشند، ولی به واسطه اینکه فراوانی این آلل‌ها متفاوت است، محتوای اطلاعات چندشکلی مختلفی را نشان می‌دهند. بررسی تنوع ژنتیکی نخودهای ایرانی به همراه نخودهای خارجی نشان داد که محتوای اطلاعات چندشکلی برای آغازگرهای مورد بررسی از ۰/۴۴ تا ۰/۸۴ متغیر می‌باشد (Saeed *et al.*, 2011). تعداد زیاد آلل‌های تکثیر شده در این مطالعه با استفاده از ۲۲ جفت آغازگر SSR با PIC بالا می‌تواند تعداد زیاد نمونه‌های مورد مطالعه را به خوبی تفکیک نماید به صورتی که تعداد آلل‌ها با میانگین ۲ از ۴ برای آغازگر Vm25 تا ۱۴ برای Vm26 متغیر بود و همچنین تعداد آلل‌های مؤثر با میانگین ۱/۲۰۵ از ۱/۰۵۹ برای آغازگر Vm25 تا ۱/۹۳۶ برای Vm3 متغیر بود (جدول-۳). Apadahaya و همکاران (۲۰۰۸)، نیز مقدار محتوای اطلاعات چندشکلی را با متوسط ۰/۸۵۴ از ۰/۴۶۷ تا ۰/۹۷۴ گزارش کردند. در مطالعه Castreo و همکاران (۲۰۱۱)، مقدار PIC بین ۰/۴۶ تا ۰/۹۰ متغیر بود. در مطالعه‌ای به منظور شناسایی

(جدول ۵)، برای اکثر صفات مورد بررسی تعداد زیادی آلل وارد مدل شده و تغییرات بالای از صفات را توجیه کردند که از آنها می‌توان در اصلاح صفات وابسته به نشانگر استفاده کرد. در شرایط نرمال بیشترین تعداد نشانگر برای صفات ضخامت دانه و عرض غلاف (۳۳ نشانگر) و کمترین تعداد نشانگر برای صفت تعداد روز تا ۵۰٪ جوانه زدن (۲ نشانگر) شناسایی شدند. همچنین در شرایط نرمال بیشترین و کمترین ضریب تبیین برای صفات وزن ۱۰۰ دانه ($R^2 = 68\%$) طول غلاف (۱۶/۹٪) مشاهده شد، و برای اکثر صفات مورد بررسی نشانگر Vm68 وارد مدل رگرسیونی شده و درصد بالایی از تغییرات مربوط به صفت را توجیه می‌کند. نشانگر Vm68 برای صفات تعداد دانه در غلاف، تعداد روز تا ۵۰٪ جوانه‌زنی، تعداد روز تا ۵۰٪ غلافدهی و تعداد روز تا ۵۰٪ رسیدگی غلاف اولین متغیری بود که وارد مدل رگرسیونی شد. و نشانگر Vm70 به عنوان نشانگر سرگروه برای صفت عملکرد اقتصادی وارد مدل رگرسیونی شد. تحت شرایط تنش خشکی نیز براساس نتایج تجزیه رگرسیون تعدادی از نشانگرهای که درصد بالاتری از صفات موفولوژیک را توجیه نموده اند مشخص گردید (جدول ۶). به صورتی که تحت شرایط تنش خشکی بیشترین تعداد نشانگر برای صفت طول غلاف (۳۵ نشانگر) و کمترین تعداد نشانگر برای صفت عرض غلاف (۳ نشانگر) شناسایی شدند. تحت شرایط تنش خشکی بیشترین و کمترین ضریب تبیین (R^2) به ترتیب برای صفات ضخامت دانه (۶۷/۴٪) و تعداد روز تا ۵۰٪ گلدهی (۱۸/۹٪) مشاهده گردید. در این شرایط نیز آلل‌های از نشانگر یا نشانگرهای Vm26 و Vm68 در اکثر صفات مورد بررسی اولین متغیرهای بودند که وارد مدل رگرسیونی شدند. بنابراین درصد بالای از تغییرات مربوط به صفات را توجیه کردند. به طوری که برای صفات وزن ۱۰۰ دانه، تعداد غلاف در بوته، عرض غلاف، وزن بیولوژیک، تعداد دانه در غلاف،

صفات مورد بررسی اولین متغیرهای بودند که وارد مدل رگرسیونی شدند و بنابراین درصد بالایی از تغییرات مربوط به صفات را توجیه می‌کنند (Mohammad Ali و Upadhyaya (Pour Yamchi *et al.*, 2012 همکاران (۲۰۰۸)، در یک مجموعه وسیع از ژرم‌پلاسم ۲۹۱۵ ژنوتیپی نخود با استفاده از ۴۸ نشانگر SSR، میانگین تعداد آلل ۳۵ آلل در هر مکان ژنی و PIC را ۰/۸۵ گزارش کردند. در حالی که Sefera و همکاران (۲۰۱۱)، ۴۸ رقم نخود را با میانگین تعداد آلل ۱۰/۵ آلل در هر لوکوس و PIC را ۰/۷۷ با استفاده از ۴۸ نشانگر SSR گزارش کردند.

نشانگرهای آگهی بخش ریزماهواره در ژنوتیپ‌های نخود کابلی تحت شرایط تنش خشکی، ارتباط بین ۱۳۷ باند از ۱۶ ریزماهواره و ۲۰ صفت کمی اندازه-گیری شده در ۶۴ ژنوتیپ نخود کابلی تحت شرایط تنش خشکی انتهایی فصل مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین تعداد آلل، برای صفت ارتفاع بوته (۲۰) و کمترین تعداد آلل برای صفت وزن دانه با غلاف (۶) شناسایی شد. بیشترین و کمترین ضریب تبیین کل به ترتیب برای صفات ارتفاع بوته (۸۵/۱) و تعداد گره (۴۲/۷) مشاهده گردید. با توجه به نتایج تجزیه رگرسیونی تحت شرایط تنش خشکی ال‌هایی از نشانگرهای TA113 و ICCM0074 که در اکثر

جدول ۳. توالی آغازگرهای SSR استفاده شده، تعداد کل مکان‌های تکثیر شده، محتوای اطلاعات چندشکل (PIC)

نام آغازگر	موتیف	تعداد آلل‌ها	تعداد آلل‌های مؤثر	PIC
Vm3	(AG) ₂₇	۸	۱/۹۳۶	۰/۵۰
Vm5	(AG) ₃₂	۶	۱/۳۲۴	۰/۶۳
Vm11	(TA) ₄ (AC) ₁₂	۷	۱/۲۲۸	۰/۲۹
Vm12	(AG) ₂₇	۸	۱/۳۰۳	۰/۵۹
Vm13	(CT) ₂₁	۹	۱/۲۱۶	۰/۳۴
Vm14	(AG) ₂₄	۵	۱/۳۲۴	۰/۵۵
Vm19	(AC) ₇ .(AC) ₅	۷	۱/۲۲۲	۰/۴۳
Vm22	(AG) ₁₂	۶	۱/۱۷۳	۰/۳۸
Vm23	(CT) ₁₆	۱۰	۱/۲۰۶	۰/۴۸
Vm25	(TC) ₁₈	۴	۱/۰۵۹	۰/۲۵
Vm26	(TC) ₁₄	۱۴	۱/۱۶۲	۰/۴۳
Vm31	(CT) ₁₆	۸	۱/۱۵۸	۰/۴۱
Vm33	(AG) ₁₈ (AC) ₈	۱۲	۱/۶۲۷	۰/۳۸
Vm34	(CT) ₁₄	۸	۱/۳۷۴	۰/۵۹
Vm35	(AG) ₁₁ .(T) ₉	۹	۱/۲۱۸	۰/۴۰
Vm36	(CT) ₁₃	۶	۱/۰۸۷	۰/۴۲
Vm37	(AG) ₅ .(CCT) ₁₃ .(CT) ₁₃	۸	۱/۱۹۹	۰/۴۷
Vm39	(AC) ₁₃ .(AT) ₅ .(TACA) ₄	۱۳	۱/۱۵۹	۰/۵۰
Vm40	(AC) ₁₈	۷	۱/۳۴۹	۰/۵۴
Vm68	(GA) ₁₅	۸	۱/۱۲۸	۰/۳۴
Vm70	(AG) ₂₀	۱۲	۱/۳۱۴	۰/۵۸
Vm71	(AG) ₁₂ .(AAAG) ₃	۱۱	۱/۲۲۸	۰/۳۲

تجزیه ارتباط نشان داد که در شرایط آبیاری نرمال مکان‌های ریزماهوره‌ای Vm14 با Vm34 با ۳۳ صفت و در شرایط تنش خشکی مکان ریزماهوره‌ای Vm26 با ۳۵ صفت، با بیشترین تعداد صفت مرتبط بودند (جدول‌های ۴ و ۵). همچنین مکان ریزماهوره‌ای Vm26 بیشترین تعداد آلل (۱۴) را در ژرمپلاسم مورد بررسی نشان داد. آغازگر Vm25 با کمترین تعداد آلل (۴) را نشان داد. نشانگرهای مرتبط با صفات عملکرد اقتصادی و بیولوژیک به ترتیب در شرایط نرمال Vm70 و Vm33 و در شرایط تنش خشکی Vm3 و Vm26 بودند. در حالت تنش خشکی بیشترین تعداد نشانگر مثبت برای صفات تعداد روز تا ۵۰٪ گلدهی، تعداد روز تا ۵۰٪ رسیدگی غلاف و طول غلاف (۹۹/۹ درصد) به ترتیب توسط نشانگرهای Vm22، Vm31 و Vm26 تبیین شد. در حالی که در شرایط نرمال بیشترین تعداد نشانگر مثبت مربوط به صفات ضخامت غلاف، عرض غلاف و تعداد روز تا ۵۰ درصد گلدهی (۹۹/۹ درصد) که توسط نشانگرهای Vm14، Vm34 و Vm34 تبیین شدند. Shafii Khorshidi و همکاران (۲۰۱۲)، در مطالعه‌ای به منظور شناسایی نشانگرهای آگهی بخش ریزماهوره در ژنوتیپ‌های لوبیا معمولی (*Phaseolus vulgaris*) گزارش کردند ارتباط بین ۱۴ صفت زراعی و ۳۸۶ نشانگر مولکولی حاصل از مطالعه ۲۱ جفت آغازگر ریزماهوره در ۴۶ ژنوتیپ لوبیا معمولی موجود در کلکسیون بانک ژن دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، با استفاده از رگرسیون گام به گام، سطح اطلاعات چندشکلی (PIC) از ۰/۳۲ تا ۰/۷۸ برای نشانگرهای SSR متفاوت بود. ارتباط تعداد نشانگر SSR با حداقل یکی از ۱۴ صفت کمی معنی‌دار بود که می‌توان از آنها در انتخاب مقدماتی در برنامه‌های اصلاحی استفاده نمود. با استفاده از نشانگرهای آگاهی بخش مرتبط با

صفات مهم زراعی از جمله اجزای عملکرد، به خصوص نشانگرهایی که مکان کروموزومی آنها مشخص می‌باشد، می‌توان با تولید لاین‌های با جایگزینی کروموزومی، صفات زراعی مورد نظر را در یک لاین فاقد آن صفت از طریق تلاقی انتقال داد. توالی‌یابی باندهای آگاهی‌بخش و مقایسه آنها با توالی‌های موجود در بانک‌های اطلاعاتی به اطمینان انتخاب به کمک نشانگر و همسانه‌سازی آنها می‌افزاید. Abdollahi Mandoulakani و همکاران (۲۰۱۴)، برای شناسایی نشانگرهای ISSR پیوسته با صفات مورفولوژیک در جمعیت‌های یونجه زراعی گزارش کردند که ۱۶ آغازگر مورد استفاده، ۱۱۷ مکان در ۸۰ ژنوتیپ یونجه تولید کرد. میانگین تعداد مکان‌ها ۷/۳ مکان برای هر آغازگر بود. میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) برای آغازگرها از ۰/۶۵ (آغازگر UBC849) تا ۰/۹۳ (آغازگر ۴۴۳) متغیر بود. نتایج تجزیه رگرسیون گام به گام نشان داد که نشانگرهای مرتبط با صفات وزن خشک کل و وزن خشک برگ یکسان بودند و همچنین بیشترین تغییرات مربوط به صفت میزان کلروفیل (۸۲ درصد) توسط نشانگرهای A12، UBC812، UBC808، UBC849، ۴۲۵، ۴۵۶ و ۸۴۸ تبیین شد در حالی که آغازگرهای ۴۲۵ و UBC808، ۱۵ درصد از تغییرات مربوط به صفت وزن تر برگ را تبیین کردند. اکثر آغازگرهای مورد استفاده روی صفات مورد مطالعه مؤثر بودند. Mohammadi و همکاران (۲۰۱۰)، با استفاده از نشانگرهای SSR و رگرسیون گام به گام ۱۷ نشانگر را در یونجه شناسایی نمودند که رابطه معنی‌داری با حداقل یک صفت از ۱۱ صفت مورفولوژیک مطالعه شده نشان داد. Rashidi Monfared و همکاران (۲۰۰۸)، با استفاده از نشانگرهای SSAP، ۳۲ نشانگر را در گندم شناسایی نمودند که حداقل با یکی از صفات زراعی مورد مطالعه ارتباط معنی‌داری نشان دادند.

جدول ۴. شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات و میزان تغییرات توجیه شده این صفات به کمک نشانگرها تحت شرایط آبیاری نرمال

Plant characteristics	صفات گیاهی	تعداد نشانگرهای آگهی بخش	R ² _{max} (%)	R ² _T (%)	نشانگر سر گروه
Economical yield(g)	عملکرد اقتصادی (gr)	5	21.9 %	63 %	Vm70
Biological yield(g)	عملکرد بیولوژیک (gr)	6	52.3 %	80.4 %	Vm33
Harvest index	شاخص برداشت	24	27.2 %	98.9 %	Vm33
100 Grain weight	وزن ۱۰۰ دانه	15	68 %	98.7 %	Vm14
Number of grain per pod	تعداد دانه در غلاف	31	34 %	99 %	Vm68
Number of Pod per plant	تعداد غلاف در بوته	11	24.2 %	78 %	Vm22
Grain length(mm)	طول دانه (mm)	24	57.4 %	99.8 %	Vm39
Grain width(mm)	عرض دانه (mm)	31	49 %	99.89 %	Vm39
Grain thickness (mm)	ضخامت دانه (mm)	33	52.8 %	99.9 %	Vm14
Plant height (cm)	ارتفاع گیاه (cm)	11	24.2 %	77.4 %	Vm22
Date to 50% germination	تعداد روز تا ۵۰٪ جوانه زنی	2	56.1 %	65 %	Vm68
Date to 50% flowering	تعداد روز تا ۵۰٪ گلدهی	27	20.7 %	99.9 %	Vm34
Date to 50% pod emerging	تعداد روز تا ۵۰٪ غلافدهی	4	22.1 %	50.7 %	Vm68
Date to 50% maturing	تعداد روز تا ۵۰٪ رسیدگی	3	25.5 %	48.9 %	Vm68
Pod length (cm)	طول غلاف (cm)	16	16.9 %	97.3 %	Vm5
Pod thickness (mm)	ضخامت غلاف (mm)	31	27.1 %	99.9 %	Vm14
Pod width (mm)	عرض غلاف (mm)	33	52.9 %	99.9 %	Vm34

R²_{max}: بیشترین R² مربوط به یک نشانگر برای صفات کمی (%)
R²_T: مجموع کل R² نشانگرها آگاهی بخش برای صفات کمی (%)

کروموزومها مشخص نمود (Naghavi *et al.*, 2007). فاصله ژنتیکی بین جمعیت‌های مختلف مورد بررسی متغیر بود. بالا بودن دامنه فاصله ژنتیکی نشان از تنوع بالایی جمعیت‌های مورد مطالعه می‌باشد و از جمعیت‌هایی با فاصله ژنتیکی زیاد می‌توان به‌عنوان والدین تلاقی در برنامه‌های اصلاحی استفاده کرد. براساس ارزیابی دندروگرام‌های روش‌های مختلف تجزیه خوشه‌ای مشخص شد که روش متوسط فاصله بین گروه‌ها (UPGMA)، بهتر از سایر روش‌ها بود. تجزیه کلاستر به روش UPGMA (Un-Weighted Pair Group Methods Analysis) برای رسم دندروگرام استفاده گردید، با توجه به نتایج ضریب همبستگی کوفنتیک ماتریس تشابه جاکارد و دایس با الگوریتم UPGMA برای رسم دندروگرام استفاده گردید.

بنابراین با توجه به نتایج برخی از نشانگرها با بیش از یک صفت ارتباط نشان می‌دهند، با توجه به وجود همبستگی معنی‌دار بین صفات مورفولوژیک می‌توان دریافت که ممکن است برخی از این صفات پیوستگی بسیار نزدیکی با همدیگر دارند و یا احتمالاً به صورت پلیوتروپی مکان‌های کروموزومی را شامل شده‌اند. برای درک این موضوع تهیه نسل‌های تفرق و نقشه‌های پیوستگی ضروری می‌باشد. نتایج این تحقیق در دادن اطلاعات اولیه در خصوص انتخاب غیر مستقیم صفات از طریق نشانگرهای مرتبط مفید خواهد نمود. البته برای اطمینان از وجود ارتباط پیوستگی بین نشانگرها و صفات مختلف زراعی نیاز به تهیه جمعیت‌های تفرق مانند F_۲، RIL و DH می‌باشد تا بر اساس این جمعیت‌ها نقشه‌های پیوستگی تهیه و سپس محل مکان‌های کنترل‌کننده این صفات را بر روی

جدول ۵. شناسایی نشانگرهای پیوسته با صفات و میزان تغییرات توجیه شده این صفات به کمک نشانگرها تحت شرایط

تنش خشکی

Plant characteristics	صفات گیاهی	تعداد نشانگرهای آگهی بخش	R ² _{max} (%)	R ² _T (%)	نشانگر سر گروه
Economical yield(g)	عملکرد اقتصادی (gr)	8	22.4 %	76.5 %	Vm3
Biological yield(g)	عملکرد بیولوژیک (gr)	8	38.4 %	84.6 %	Vm26
Harvest index	شاخص برداشت	5	20 %	56.2 %	Vm39
100 Grain weight	وزن ۱۰۰ دانه	6	41.9 %	71.2 %	Vm68
Number of grain per pod	تعداد دانه در غلاف	10	60.3 %	94.1 %	Vm26
Number of Pod per plant	تعداد غلاف در بوته	4	33.4 %	59.2 %	Vm68
Grain length (mm)	طول دانه (mm)	6	60.1 %	87.4 %	Vm12
Grain width (mm)	عرض دانه (mm)	16	32.3	98.2	Vm70
Grain thickness (mm)	ضخامت دانه (mm)	8	67.4 %	93.6 %	Vm12
Plant height (cm)	ارتفاع گیاه (cm)	4	33.4 %	59.2 %	Vm61
Date to 50% germination	تعداد روز تا ۵۰٪ جوانه‌زنی	14	41.7 %	97.4 %	Vm26
Date to 50% flowering	تعداد روز تا ۵۰٪ گلدهی	31	18.9 %	99.9 %	Vm22
Date to 50% pod emerging	تعداد روز تا ۵۰٪ غلاف‌دهی	26	27.1 %	99.9 %	Vm31
Date to 50% maturing	تعداد روز تا ۵۰٪ رسیدگی	6	32.4 %	73.6 %	Vm40
Pod length (cm)	طول غلاف (cm)	35	29.7 %	99.9 %	Vm26
Pod thickness (mm)	ضخامت غلاف (mm)	11	44.6 %	93.9 %	Vm14
Pod width (mm)	عرض غلاف (mm)	3	46.1 %	67.6 %	Vm68

R²_{max}: بیشترین R² مربوط به یک نشانگر برای صفات کمی (%)

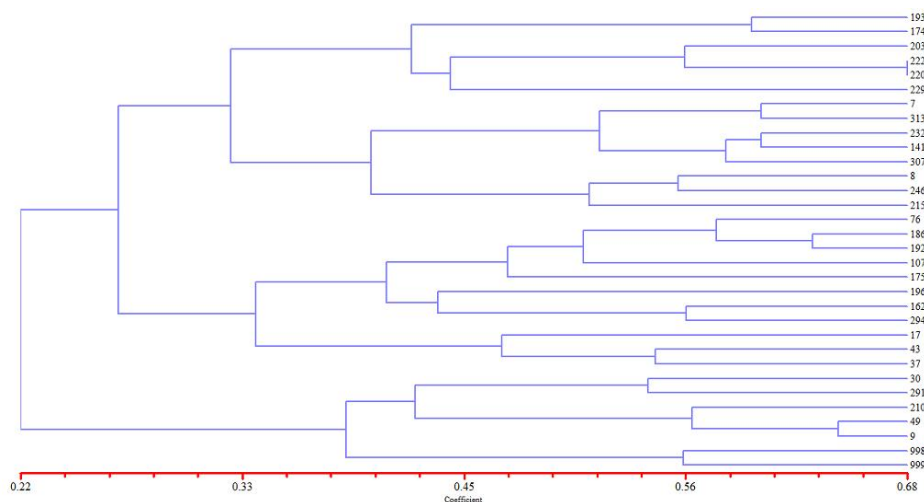
R²_T: مجموع کل R² نشانگرها آگاهی بخش برای صفات کمی (%)

عملکرد بالا تحت شرایط تنش بودند و ژنوتیپ باکد دسترسی ۳۰ که دارای عملکرد متوسط (قابل قبول) تحت شرایط تنش بود باهم و در کنار دو رقم شاهد پرستو (۹۹۸) و مشهد (۹۹۹) در یک کلاستر قرار گرفتند. گروه دوم به ۴ زیرگروه تقسیم شد به صورتی که ژنوتیپ‌ها تقریباً به‌طور کامل به گروه‌های مشخص مطابق با جمعیت‌های مختلف تقسیم نشدند. ژنوتیپ‌ها بطور مساوی در طول دندروگرام توزیع شدند و توزیع ژنوتیپ‌ها به این صورت وجود تنوع ژنتیکی زیاد درون توده‌ای را تایید کرد (شکل‌های ۱ و ۲). اگرچه نشانگر SSR تاحدودی ژنوتیپ و جمعیت‌های مورد مطالعه را متمایز ساخت ولی مقدار

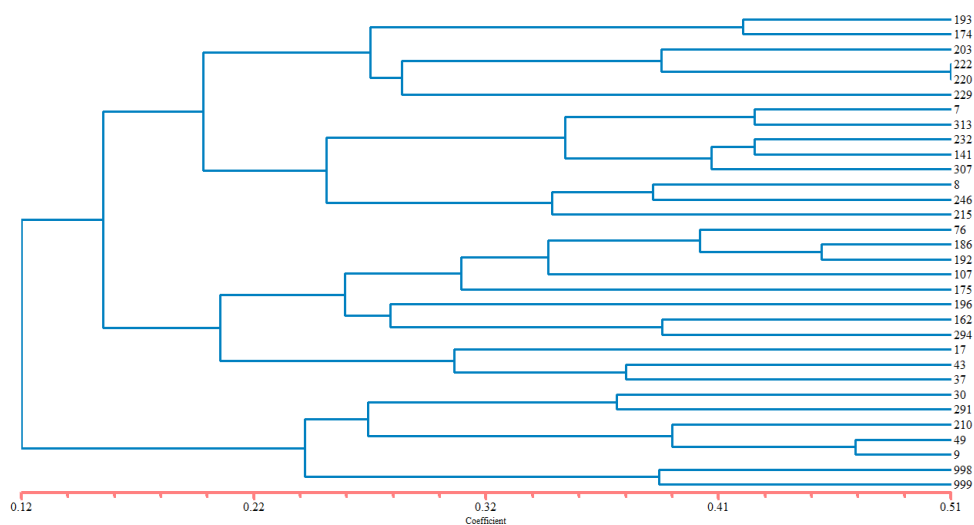
ضریب همبستگی کوفنتیک بین ماتریس تشابه جاکارد و دایس و ماتریس کوفنتیک حاصل از دندروگرام با الگوریتم UPGMA به ترتیب بیشتر از سایر روش‌ها بود. با توجه به نتایج دندروگرام‌های ترسیم شده، ۳۲ ژنوتیپ لوبیا چشم‌بلبلی مورد بررسی در دو گروه اصلی دسته‌بندی شدند. که گروه اول شامل هفت ژنوتیپ (۳۰، ۲۹۱، ۲۱۰، ۴۹، ۹، ۹۹۸ و ۹۹۹) بودند که چهار ژنوتیپ (۲۹۱، ۲۱۰، ۹ و ۹۹۸) با منشاء آمریکا، یک ژنوتیپ از جمعیت (۱ هندوستان) (۳۰)، یک ژنوتیپ از جمعیت آسیا (۴) ژنوتیپ (۹۹۹) و ژنوتیپ ۴۹ از جمعیت آمریکا لاتین (۳) بود. اما نکته جالب اینکه ژنوتیپ‌های ۲۹۱ و ۲۱۰ که دارای

هتروتیک باشند (شکل‌های ۱ و ۲). می‌توان از ژنوتیپ‌های مربوط به گروه‌های هتروتیک متفاوت به عنوان والدین تلاقی در برنامه‌های اصلاحی تولید هیبرید یا سمی‌هیبرید بهره گرفت. البته فاصله ژنتیکی تنها عامل مؤثر در شناسایی والدین مناسب برای تولید هیبرید مناسب نیست و باید فاکتورهای دیگری از قبیل قابلیت ترکیب‌پذیری و فاصله ژنتیکی براساس صفات مورفولوژیک نیز در نظر گرفته شود (Brummer, 1999; Brummer *et al.*, 1995).

کم ارزش PhiPT نشان می‌دهد که تمایز بین جمعیت‌ها زیاد است ($P=0.01$ و $\Phi_{IT}=0.226$). با توجه به وجود تنوع ژنتیکی نسبتاً بالای درون جمعیت‌ها، گروه‌های هتروتیک جهت شناسایی میزان تشابه و تفاوت ژنوتیپ‌ها در بین ۳۲ ژنوتیپ مورد مطالعه با استفاده از تجزیه خوشه‌ای به روش Complete linkage مبتنی بر ضرایب تشابه دایس و جاکارد تعیین شد. که ژنوتیپ‌ها در ۳ گروه اصلی قرار گرفتند و هرکدام از گروه‌های اصلی نیز شامل دو زیرگروه بودند که می‌توانند معرف گروه‌های



شکل ۱. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های لوبیا چشم‌بلبلی براساس الگوریتم UPGMA با روش دایس



شکل ۲. دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های لوبیا چشم‌بلبلی براساس الگوریتم UPGMA با روش جاکارد

بنابراین نتایج می‌توان گفت نشانگرهای SSR استفاده شده در این مطالعه توزیع یکنواختی در ژنوم ژرم‌پلاسما لوبیا چشم‌بلبلی مورد مطالعه دارند و احتمال دارد این مورد دلیلی بر پیوستگی تعداد بیشتری از نشانگرهای SSR مطالعه شده با صفات زراعی مورد مطالعه در این پژوهش باشند. همچنین توالی‌یابی نشانگرهای تولیدی توسط آغازگرهای دارای ضریب تبیین (R^2) بالا و مقایسه آنها با توالی‌های موجود در بانک‌های اطلاعاتی به اطمینان استفاده از آنها در برنامه‌های انتخاب به کمک نشانگر و همسانه‌سازی براساس نقشه می‌افزاید (Abdollahi Mandoulakani *et al.*, 2014).

Abdollahi Mandoulakani و همکاران (۲۰۱۰)، برای شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات مورفولوژیک در بادام‌زمینی از تجزیه ارتباط با استفاده از نشانگر SSR استفاده نمودند و بیان کردند که این روش برای شناسایی مکان‌های آگهی بخش مرتبط با صفات مورفولوژیک مفید و مطمئن بوده و نشانگرهای حاصل از این مطالعات می‌تواند در برنامه‌های گزینش به کمک نشانگر و تهیه جمعیت‌های نقشه‌یابی استفاده شوند. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که چنانچه از تعداد بیشتری آغازگر استفاده شود می‌توان به شناسایی نشانگرهایی که دارای ارتباط مؤثر و مثبت بالایی یا صفات مرتبط با عملکرد باشد امیدوار بود و از نتایج این مطالعات در برنامه‌های به‌نژادی لوبیا چشم‌بلبلی و شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به تنش خشکی استفاده کرد.

تجزیه رگرسیون گام به گام، رابطه معنی‌داری بین برخی از نشانگرهای SSR و صفات مورفولوژیک مطالعه شده در ژنوتیپ‌های مورد بررسی نشان داد، باتوجه به نتایج تجزیه رگرسیون مرحله‌ای تحت شرایط نرمال و تنش خشکی برای اکثر صفات مورد بررسی تعداد زیادی آلل وارد مدل شده و درصد بالایی از تغییرات صفات را توجیه کردند

که از آنها می‌توان در اصلاح وابسته به نشانگر استفاده نمود در شرایط آبیاری نرمال و تنش خشکی بیشترین تعداد نشانگر برای به ترتیب برای صفات ضخامت دانه و عرض غلاف (۳۳ نشانگر)، و طول غلاف (۳۵ نشانگر) و شناسایی گردید. Skot و همکاران (۲۰۰۵)، از نشانگرهای AFLP برای شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات مهم زراعی در چاودار استفاده کردند آنها ۳ نشانگر پیوسته با صفت تاریخ خوشه‌دهی را شناسایی نمودند که با مکان‌های کنترل کننده این صفت در کروموزوم ۷ پیوستگی نشان دادند و گزارش نمودند که نشانگرهای AFLP و رگرسیون گام‌به‌گام برای شناسایی نشانگرهای آگهی بخش برای صفات زراعی مفید می‌باشد. نشانگرهای مولکولی بویژه نشانگرهای مبتنی بر DNA با ایجاد تعداد نامحدودی نشانگر و با حذف اثرهای ناشی از عوامل محیطی، توانسته است بسیاری از مشکلات مربوط به نشانگرهای مورفولوژیک را برطرف کند (Mengoni *et al.*, 2000). از این رو، تعیین ارتباط بین نشانگرهای مولکولی و صفات مورفولوژیک، می‌تواند گامی مؤثر در استفاده از گزینش جمعیتی باشد. پیوستگی ژنتیکی بین نشانگرها و مکان‌های ژنی صفات کمی، محتمل‌ترین توجیه برای وجود رابطه بین نشانگرهای مولکولی و نمود صفات کمی است (Virk *et al.*, 1996).

در رابطه با اکثر صفات فنولوژیکی و مورفولوژیکی، شانگرهای Vm 70 و Vm 68 اولین نشانگرهایی بودند که وارد مدل رگرسیونی شده است و از طرفی دیگر در رابطه با عملکرد نشانگر Vm 70 اولین متغیری بود که وارد مدل رگرسیونی گردید. بنابراین با توجه به نتایج برخی از نشانگرها با بیش از یک صفت ارتباط نشان می‌دهند، با توجه به وجود همبستگی معنی‌دار بین صفات مورفولوژیکی می‌توان دریافت که ممکن است برخی از این صفات پیوستگی

نشانگرها براساس نتایج بدست آمده با صفات زیادی در ارتباط هستند که بعد از تایید و ارزیابی در جمعیت‌های بزرگ‌تر با استفاده از داده‌های فنوتیپی چند ساله می‌توانند در برنامه‌های به‌نژادی لوبیا چشم‌بلبلی به منظور شناسایی ژنوتیپ‌هایی با تحمل و عملکرد بالاتر تحت تنش خشکی مؤثر باشند. چالش اصلی در تجزیه ارتباط متمایز ساختن روابط حقیقی بین نشانگرها و صفات از روابط کاذب ناشی از ساختار جمعیت و روابط خویشاوندی است که البته در این بین تأثیر روابط خویشاوندی در ارایه نتایج مثبت کاذب بیشتر از ساختار جمعیت می‌باشد (Li et al., 2011). نتایج این مطالعه نشان داد استفاده از ترکیب سیستم نشانگرهای مولکولی و مرفولوژیک در شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات مهم زراعی و مورفولوژیکی لوبیا چشم‌بلبلی مؤثر می‌باشد. البته بهتر است جهت افزایش کارایی شناسایی نشانگرهای مرتبط، از نشانگرهای بیشتر و مؤثرتر مانند SNP در کنار SSR در مطالعات تجزیه ارتباط استفاده شود. همچنین لازم است نشانگرهای شناسایی شده در چنین مطالعاتی در جمعیت‌های بزرگ مورد بررسی قرار گیرد تا از ارتباط آنها با صفات مورد مطالعه اطمینان حاصل شود و بدین گونه کارایی کاربرد این نشانگرها در برنامه‌های به‌نژادی لوبیا چشم‌بلبلی افزایش یابد.

بسیار نزدیکی با همدیگر دارند و یا احتمالاً به صورت پلیوتروپی مکان‌های کروموزومی را شامل شده‌اند. در تهیه نقشه‌های پیوستگی اطلاعات نشانگری بدست آمده از تجزیه‌های ارتباطی در جهت انتخاب پرایمرهای مناسب مفید خواهد بود. چنانکه بعضی از این نشانگرها جهت انجام کارهای اصلاحی در گونه‌های دیگر استفاده شده اما در دسترس نبودن جمعیت‌های در حال تفرق جهت نقشه‌یابی، در اختیار نبودن زمان کافی و نبود لینکاژ مناسب بین صفات زراعی و نشانگرهای ملکولی از جمله مهمترین محدودیت‌ها در زمینه شناسایی نشانگرهای مرتبط با صفات زراعی می‌باشد (Gupta et al., 2005).

در این مطالعه تجزیه ارتباط نشان داد که در شرایط آبیاری نرمال مکان‌های ریزماهوراهای Vm14 با Vm34 با ۳۳ صفت و در شرایط تنش خشکی مکان ریزماهوراهای Vm26 با ۳۵ صفت، با بیشترین تعداد صفت مرتبط بودند. در مطالعه تجزیه ارتباط صفات مورفولوژیک گندم نان بوسیله نشانگرهای AFLP, SSR, و SAMPL به روش رگرسیون گام‌به‌گام، ۵۱ نشانگر شناسایی شدند که با حداقل یکی از صفات ارتباط داشتند و پیشنهاد شد که این نشانگرها قابلیت کاربرد در برنامه‌های اصلاح به کمک نشانگر را دارند (Roy et al., 2006). که این

REFERENCES

- Agriculture statistics, crops, (2014) First volume. Ministry of Agriculture. (In Persian).
- Abdollahi Mandoulakani B, and Azizi H (2010) Identification of ISSR markers associated with morphological traits in cultivated alfalfa (*Medicago sativa* L.) populations. *Journal of Cellular and Molecular* 2: 260-268.
- Abdollahi Mandoulakani B, Alami A, and Esfahani M (2010) Association analysis for morphological traits in peanut (*Arachis hypogea* L.) using microsatellite markers. *Iranian Journal of Crop Sciences* 12: 510-519.
- Agartha HA, Tuinstra MR (2003) Phylogenetic diversity and relationship among sorghum accessions using SSRs and RAPDs. *Afr. J. Biotechnol.* 2: 334-340.
- Abdolshahi R, Omid M, Talei A R, Yazdi Samadi, B (2010) Evaluation of bread wheat genotypes for drought tolerance. *Esci. J. Crop Prod.* 3: 159-171.
- Agrama HA, Eizenga GC, Yan W (2007) Association mapping of yield and its components in rice cultivars. *Mol. Breeding.* 19: 341-356.

- Brummer EC (1999) Capturing heterosis in forage crop cultivar development. *Crop Science*. 32: 939-943.
- Brummer E C, Bouton J H and Kochert G (1995) Analysis of annual *Medicago* species using RAPD markers. *Genome* 38: 362-367.13.
- Belhassen E (Ed) (1996) Drought in higher plants: Genetical, Physiological and Molecular biological analysis. ENSAINRA SGAP, Montpellier, France.
- Diouf D, Hilu KW (2005) Microsatellites and RAPD markers to study genetic relationships among cowpea breeding lines and local varieties in Senegal. *Genetic Resources and Crop Evolution* 52:1057-1067.
- Fathi M (2005) Study of genetic diversity cowpea (*Vigna unguiculata* L.) with molecular and morphological markers. MSc. Thesis, College of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran.
- Gebhardt C, Ballvora A, Walkemeier B, Oberhagemann P, Schuler K (2004) Assessing genetic potential in germplasm collections of crop plants by marker-trait association: a case study for potatoes with Quantitative variation of resistance to late blight and maturity type. *Molecular Breeding* 13: 93-102.
- Jun TH, Van K, Kim MY, Lee SH, Walker DR (2008) Association analysis using SSR markers to find QTL for seed protein content in soybean. *Euphytica* 62: 179-191.
- Julier B, Huyghe CH, Ecall CH (2000) within and among cultivar genetic variation in alfalfa: forage quality, morphology and yield. *Crop Science* 4: 362-365.
- Jolaei M (2010) The effect of mild water stress on some physiological characteristics and the level of enzyme activity of anti-oxidants of different cultivars of wheat. M.Sc. Thesis, College of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran (in Persian).
- Li X, Wei Y, Moore KJ, Michaud R, Viands DR, Hansen JL, Acharya A, and Brummer EC (2011) Association Mapping of Biomass Yield and Stem Composition in a tetraploid Alfalfa Breeding Population. *The plant genome* 4: 24-35
- Li Q, Liu QC, Zhai H, Ma DF, Wang X, Li XQ, Wang YP (2008) Genetic diversity in main parents of sweet potato in china as revealed by ISSR Markers. *Acta Agronomica Sinica* 34: 972-977.
- Litt M, Luty JA (1989) A hyper variable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet* 44: 397-401.
- Ivancic V, Hackett CA, Nevo E, Keith R, Thomas WTB, Forster BP (2002) Analysis of simple sequence repeats (SSRs) in wild barley from the Fertile Crescent: associations with ecology, geography and flowering time. *Plant Molecular Biology*. 48: 511-527.
- International Board for Plant Genetic Resources (1983) Descriptors for cowpea. IBPGR Secretariat, Rome.
- Mafakheri Kh, Bihamta M R, Abbasi A R, and Rasollnia A R (2015) Genetic Diversity of Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) Germplasm Based on Agronomic and Morphological Traits. *Seed and Plant Improvement Journal* 31: 135-162.
- Majnoun Hosseinei N (2008) Legumes agriculture and production. The university press center, Tehran, Iran 103129.
- Mohammad Ali Pour Yamchi H, Bihamta MR, Peighambari SA, Naghavi MR (2012) Identify informative markers microsatellite in Kabuli chickpea genotypes under drought stress .12th Iranian Genetic Congress, Tehran, Iran.
- Mohammadi R, Naghavi M R, Maali Amiri R, Rezaii M (2010) Identify informative markers Microsatellite in

- cultivated alfalfa (*Medicago sativa* L.) Iran. Modern Genetics Journal 2: 57-66.
- Mengoni A, Gori A and Bazzicalupo M (2000) Use of RAPD and microsatellite (SSR) variation to assess genetic relationships among populations of tetraploid alfalfa, *Medicago sativa*. Plant Breeding, 119: 113-117.
- Naghavi M R, Mardi M, Ramshini H A, 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).
- Naghavi M R, Ghareyazie B, and Hosseini Salak Deh Gh (1384) Molecular markers. The university press center, Tehran, Iran. (In Persian).
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc Natl Acad Sci USA 70:3321-3323. Doi: 10.1073/pnas/70.12.3321.
- Naghavi M, Jahansouz M R (2005) Variation in the Agronomic and Morphological Traits of Iranian Chickpea Accessions. J. of Integrative Plant Biology 47: 375-379.
- Kashi Y, Soller M (1999) Functional roles of microsatellites and minisatellites. In: Goldstein D.B. and Schlitterer C (Eds). Microsatellites: Evolution and Application. 10-23. Oxford University Press, Oxford.
- Rashidi Monfared S, Mardi M, Hosseinzadeh A H, Naghavi M (2008) Association analysis between important Agronomic traits and SSAP markers in durum wheat. Modern Genetics Journal 3: 29-35. (In Persian).
- Roy JK, Bandopadhyay R, Rustgi S, Balyan H S and Gupta P K (2006) Association analysis of agronomically important traits using SSR, SAMPL and AFLP markers in bread wheat. Current Sci. 5: 683-689.
- Saeed A, Hovsepyan H, Darvishzadeh R, Imtiaz M, Panguluri S K and Nazaryan R (2011) Genetic diversity of Iranian accessions, improved lines of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and their wild relatives using simple sequence repeats. Plant Molecular Biology Reporter DOI 10.1007/s11105-011-0294-5.
- 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.
- Skot L, Humphreys MO, Armstead IP, Heywood S, Skot KP, Sanderson R, Thomas ID, Chorlton KH, Sackville Hamilton NR (2005) An association mapping approach to identify flowering time genes in natural populations of *Lolium perenne* L. Molecular Breeding. 15: 233-245.
- Shafii Khorshidi M, Bihamta MR, Khialparast F, Naghavi M (2012) Identify informative markers Microsatellite in beans (*Phaseolus vulgaris*.) genotypes 12th Iranian Genetic Congress, Tehran, Iran.
- Takeda S, Matsuoka M (2008) Genetic approaches to crop improvement: responding to environmental and population change. Nature. 9: 444-457.
- Takeda S, Matsuoka M (2008) Genetic approaches to crop improvement: responding to environmental and population change. Nature 9: 444-457.
- Thudi M, Upadhyaya HD, Rathore A, Mal Gaur P, Krishnamurthy L, Roorkiwal M, Nayak SN, Kumar Chaturvedi S, Sarathi Basu P, Gangarao NVPR, Fikre A, Kimurto P, Sharma PC, Sheshashayee MS, Tobita S, Kashiwagi J, Ito O, Killian A, Kumar Varshney R (2014) Genetic Dissection of drought and heat tolerance in Chickpea through genome-wide and candidate gene based association mapping approaches. PloS ONE 9:e96758.
- Yazdi Samadi B, Mohammadi V, Abd

- Mishani S (2010) Breeding crops. University Publication Center. Tehran. Iran.
- Yeh FC, Boyle T, Rongcai Y, Ye Z, Xian JM (1999) POPGENE version 3.1. <http://www.ualberta.ca/~fyeh/fyeh>.
- Zaccardelli M, Gnocchi S, Carelli M, Scotti C (2003) Variation among and within Italian alfalfa ecotypes by means of bioagronomic characters and amplified fragment length polymorphism analyses. Plant Breeding 122: 61-65.
- Veronesi F, Charles B, Huyghe C (2010) Alfalfa. Springer Sci. 395-436.
- Virk PS, Ford-Lloyd BV, Jackson MT, Pooni HS, Clemeno TP, Newbury HJ (1996) Marker-assisted prediction of agronomic traits using diverse rice germplasm. Third International Rice Genetics Symposium, Manilla, Philippines. 307-316.
- 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.