

تعیین تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های نخود (*Cicer arietinum* L.) متحمل به تنش خشکی با استفاده از نشانگرهای SSR و CAPS

سروش صابری محمودآبادی^۱، سعیدرضا وصال^{۲*}، عبدالرضا باقری^۳، سعید ملک‌زاده شفارودی^۴

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲. پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۳. گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

۴. گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۴/۲۹ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۹/۲۶)

Determination of genetic variation of drought tolerant chickpea genotypes using SSR and CAPS markers

Soroush Saberi Mahmoodabaadi¹, Saeedreza Vessal², Abdolreza Bagheri³, Saeed Malekzadeh Shafaroudi⁴

1. M.Sc. of Agricultural Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

2. Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

3. Department of Biotechnology and Plant breeding, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

4. Department of Biotechnology and Plant breeding, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

(Received: Jul. 19, 2020 - Accepted: Dec. 16, 2020)

Abstract

Chickpea is the second most important pulses in arid and semi-arid regions of the world. This product is often cultivated as rainfed crop, so drought stress causing 50% yield loss. In this research, 11 SSR and 6 CAPS primer pairs were used to evaluate genetic variation among 9 chickpea candidate genotypes for drought tolerant and 2 common sensitive cultivars. Ten effective SSRs were again evaluated in a population containing random genotypes for cold-tolerance. SRR band analysis in final experiment generated 40 alleles, of which 37 were polymorphic. The average number of polymorphic alleles for each gene site was 3.9 with the range of 2-9 alleles. The polymorphic information content (PIC) varied from 0.21 to 0.85. The cluster analysis, based on the UPGMA algorithm and Jaccard's similarity coefficient, splited the genotypes into nine distinct groups including four groups of drought tolerant genotypes, two relatively drought tolerant groups and other three groups belonging to the random population. The polymorphism results of the SSR and CAPS markers indicated that the two genotypes MCC544 and MCC392 were more distinctive from other drought tolerant genotypes. MCC537 and MCC696 were also highly related in a separate group, and the MCC80 was allocated in average position among tolerant genotypes. MCC427 and a common cultivar MCC358 were classified into one group as well as the international cultivar MCC252 with MCC302 genotypes. The results indicated the lack of a genetic similarity between selected population of drought tolerant candidates and cold tolerant candidates. This could indicate that there might be no pleiotropic effect among the genes involved in these stresses, which can be important for breeding purposes of this crop.

Keywords: Chickpea, drought, SSR marker, CAPS marker, polymorphism.

چکیده

نخود دومین حبوبات مهم مناطق خشک و نیمه‌خشک جهان بوده و اغلب به‌صورت دیم کشت‌شده و تنش خشکی عملکرد آن را تا ۵۰٪ کاهش می‌دهد. در این پژوهش میزان تنوع ژنتیکی ۹ ژنوتیپ نخود منتخب متحمل به خشکی ۲ رقم حساس رایج، با استفاده از ۱۱ آغازگر SSR و ۶ آغازگر CAPS تعیین و ۱۰ آغازگرهای SSR مؤثر، دوباره در جمعیت تصادفی ژنوتیپ‌های کاندیدای متحمل به سرما بررسی شد. آنالیز باندهای SSR در آزمایش نهایی در مجموع ۴۰ آلل تولید کرد که ۳۷ آلل چند شکل بودند. میانگین تعداد آلل‌های چند شکل به ازای هر مکان ژنی ۳/۹ و در دامنه ۲-۹ بود. محتوای اطلاعات چند شکل (PIC) نیز بین ۰/۲۱ تا ۰/۸۵ متغیر بود. آنالیز خوشه‌ای بر اساس الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه جاکارد، ژنوتیپ‌ها را در ۹ گروه شامل چهار گروه از ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی، دو گروه حساس و سه گروه دیگر متعلق به جمعیت تصادفی تفکیک نمود. چندشکلی‌های SSR و CAPS نشان دادند که دو ژنوتیپ MCC544 و MCC392 در گروه متحمل‌ها متمایزتر و تفاوت ژنتیکی آن‌ها با بقیه ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی بیشتر بود، درحالی‌که MCC537 و MCC696 نیز با قرابت بالا در گروه دیگری قرار گرفتند و MCC80 حد وسط ژنوتیپ‌های متحمل قرار گرفت. MCC427 با رقم رایج کشور MCC358 در یک گروه و رقم بین‌المللی MCC252 با MCC302، در گروه نسبتاً حساس به خشکی قرار گرفتند. همچنین شباهت ژنتیکی میان ژنوتیپ‌های جمعیت منتخب متحمل به خشکی و نیز متحمل به سرما وجود نداشت که می‌تواند به دلیل عدم وجود اثر پلئوتروپی ژن‌ها در این نوع تنش‌ها بوده و برای اهداف به‌نژادی نخود نیز می‌تواند با اهمیت باشد.

واژه‌های کلیدی: تنش خشکی، چندشکلی، نخود، SSR، CAPS.

مقدمه

نخود (*Cicer arietinum* L.) گیاهی از خانواده بقولات (Fabaceae)، دیپلوئید ($2n=2x=16$) و دارای ژنوم نسبتاً کوچک (۷۴۰ Mb) است که در میان حبوبات با سطح زیر کشت بیش از ۱۷/۸ میلیون هکتار و تولید بیش از ۹/۶ میلیون تن، رتبه دوم جهانی را دارا است (FAO, 2018). این گیاه از طریق بهبود حاصلخیزی خاک و قرار گرفتن در تناوب، باعث پایداری سیستم‌های زراعی به‌ویژه غلات می‌گردد (Qureshi et al., 2015). ایران از نظر سطح زیر کشت نخود سومین رتبه جهان و از نظر میزان تولید در جایگاه هفتم است، ولی از نظر عملکرد در واحد سطح رتبه‌های آخر جهانی را از آن خود کرده است (FAO, 2018). در حدود ۹۰ درصد سطح زیر کشت نخود در ایران به‌صورت دیم است و در زمان گلدهی به خشکی حساس بوده و این تنش به‌عنوان مهم‌ترین عامل در کاهش عملکرد نخود نقش دارد (Ganjeali et al., 2011). بررسی‌ها نشان داده است که از بین تنش‌های مختلف زیستی و غیر زیستی، خشکی به‌تنهایی ۵۰٪ عملکرد نخود را کاهش می‌دهد (Saxena, 2003).

به‌طورکلی مقاومت به خشکی در نخود حاصل یک یا ترکیبی از مکانیزم‌های فرار، اجتناب و تحمل است و اصلاح‌کنندگان می‌توانند با استفاده از آن‌ها نسبت به ایجاد ارقام مناسب اقدام کنند (Hussain, 2006; Varshney et al., 2018). با توجه به اهمیت حبوبات به‌عنوان یکی از منابع تأمین پروتئین، تحقیق در زمینه کاهش اثرات تنش خشکی اهمیت بالایی دارد (Petit et al., 1999; Rehman, 2009).

در سال‌های اخیر استفاده از فناوری‌های زیستی از جمله نشانگرهای مولکولی در تسریع روش‌های کلاسیک به‌نژادی بسیار مؤثر بوده است. نشانگرهای مولکولی یکی از ابزارهای قوی و مورد اطمینان برای ارزیابی خویشاوندی ژنتیکی، انتخاب گیاهان برتر و

بررسی شباهت یا تفاوت میان نمونه‌های مختلف هستند (Rehman, 2009; Varshney, 2018). در این میان، ریزماهورها (SSRها) از جمله نشانگرهای ژنتیکی هستند که به علت ویژگی‌هایی چون تکرارپذیری بالا، هم بارزی و مبتنی بودن بر PCR با اهمیت می‌باشند (Lahoot et al., 2016). نشانگر CAPS نیز از دیگر نشانگرهای کاربردی بوده و ترکیبی از PCR و RFLP است که بر اساس SNP‌های موجود در ESTها است (Semagn et al., 2006). در چشم‌انداز برنامه‌های اصلاح نخود برای تحمل به خشکی، شناسایی و دسته‌بندی ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی و شناخت مجموعه صفات مؤثر در آن با اهمیت است (Ganjeali et al., 2009). لذا یک سلسله مطالعات اساسی و دامنه‌داری در این زمینه صورت گرفته است.

در این راستا پژوهشی بر روی عملکرد دانه در نخود تحت شرایط تنش خشکی بر اساس صفات فیزیولوژیکی و زراعی مؤثر در تنش خشکی و مکان‌یابی QTL مرتبط با این صفات توسط نشانگرهای SSR انجام گرفت. نتایج این بررسی‌ها نشان داد که شاخص عملکرد بالا، گلدهی زودرس و بلوغ زودرس از جمله صفات مهم در افزایش عملکرد دانه تحت خشکی بودند (Rehman et al., 2011). با توجه به مشاهدات Varshney و همکاران (۲۰۱۴) با استفاده از تعداد زیادی نشانگر SSR، ارزیابی QTL و خوشه‌بندی فنوتیپی تحمل به خشکی دو جمعیت تفرق یافته را نقشه‌یابی نمودند. در این بررسی چند QTL کاملاً پیوسته با صفات تحمل به خشکی شناسایی شدند که مهم‌ترین ناحیه موجود در آن‌ها شامل ۴۸٪ QTL‌های بزرگ اثر برای ۱۲ صفت بود که در حدود ۵۸/۲۰٪ تغییرات فنوتیپی تحمل به خشکی را توجیه می‌کرد و شامل هفت نشانگر SSR (NCPGR127، ICCM0249، TAA170، NCPGR21، TR11، GA24 و STMS11) بسیار مرتبط با صفات خشکی بود. از

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، سه آزمایش با اهداف ارزیابی و گزینش نشانگرهای SSR و CAPS، تعیین قرابت بین ژنوتیپ‌های کاندیدای متحمل به خشکی و شاهد و همچنین استفاده از نشانگرهای پلی‌مورف و مؤثر حاصل از آزمایش اول و دوم در تعیین میزان شباهت ژنتیکی میان دو مجموعه محدود از ژنوتیپ‌های کاندیدای متحمل به سرما و کاندیدای متحمل به خشکی به مرحله اجرا درآمد.

آزمایش اول

مواد گیاهی استفاده شده شامل ۹ ژنوتیپ کاندیدای متحمل به خشکی بر اساس معیار عملکرد دانه در تنش (MCC544، MCC392، MCC352، MCC552، MCC80، MCC537، MCC696، MCC427، MCC302) که طی مطالعات مورفوفیزیولوژیکی قبلی تعیین شده بودند (Ganjeali *et al.*, 2009; Ganjeali *et al.*, 2010; Ganjeali *et al.*, 2011(a); Ganjeali *et al.*, 2011(b); 2014) و ۲ رقم شاهد حساس MCC358 (کرج ۳۱-۶۰-۱۲) و رقم بین‌المللی MCC252(ILC482) بوده است (جدول ۱). تمامی بذور از بانک بذر پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی تهیه شد. کشت بذور و تولید گیاهچه‌های واجد حداقل چهار برگ حقیقی به ازای هر ژنوتیپ چهار بذر در گلدان‌های دو لیتری حاوی ترکیب خاکی شامل خاک مزرعه، ماسه و خاک‌برگ به نسبت مساوی و در دمای 25 ± 4 درجه سانتی‌گراد درون گلخانه تحقیقاتی پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد صورت گرفت.

ارزیابی مولکولی و تجزیه و تحلیل داده‌ها

استخراج DNA از برگ‌های کاملاً باز شده گیاه و با روش تغییریافته CTAB صورت گرفت (Doyle

جمله صفات مورفولوژی و فنولوژی مؤثر در خشکی شامل: وزن خشک هوایی، ارتفاع گیاه، وزن گیاه، جوانه‌زنی اولیه، جوانه‌زنی ثانویه، روز تا ۵۰٪ گلدهی و روز تا بذردهی شناسایی شد.

همچنین در پژوهشی، بررسی فیزیولوژیکی و گزینش ژنوتیپ‌های نخود به وسیله شاخص‌های کمی مقاومت به خشکی در ۱۵۰ ژنوتیپ نخود کابلی در شرایط تنش و غیر تنش انجام گرفت. پنج ژنوتیپ شامل MCC180، MCC252، MCC283، MCC358 و MCC361، به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. بر اساس نتایج شاخص‌های تحمل به خشکی، میانگین هندسی بهره‌وری، میانگین بهره‌وری و میانگین هارمونیک، معیارهای مناسب برای گزینش ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی معرفی شدند. شاخص‌های حساسیت به تنش و پاسخ به خشکی، همبستگی مثبت و معنی‌داری را به ترتیب با عملکرد در شرایط تنش و دارای تنش خشکی، نشان دادند. همچنین قابلیت فرار از خشکی و اجتناب از تنش خشکی انتهایی به عنوان یک عامل مؤثر در مقاومت به خشکی ذکر شد. این نتایج ژنوتیپ‌های MCC544، MCC696 و MCC693 را به عنوان ژنوتیپ‌های منتخب متحمل به خشکی تعیین کرد (Ganjeali *et al.*, 2009).

تحقیق حاضر در راستای پژوهش‌های پیشین (Ganjeali *et al.*, 2009; Ganjeali *et al.*, 2011(a); Ganjeali *et al.*, 2014; Nezami *et al.*, 2012; *al.*, 2011(b)) و با هدف گزینش نشانگرهای مناسب و تعیین میزان قرابت و تمایز ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی منتخب بانک بذر دانشگاه فردوسی مشهد انجام گرفت تا با معرفی نشانگرهای مناسب، بتوان گامی اساسی در تسریع شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی در نخود برداشت.

نرم‌افزارهای Excel 2013 و NTsys (ver. 2.02) استفاده شد.

میزان اطلاعات چندشکلی (PIC) به‌عنوان یکی از ویژگی‌های مهم نشانگرهای مولکولی برای ارزیابی قدرت تمایز آن‌ها (Junjian *et al.*, 2002) با استفاده از معادله ۱ محاسبه گردید. در این فرمول P_i فراوانی آلل i ام در یک مکان ریزماهواره است که برای n آلل بسط داده می‌شود (Nei *et al.*, 1973).
معادله (۱) $PIC = 1 - \sum P_i^2$

آزمایش دوم

در این بخش از شش آغازگر CAPS حاصل از مطالعه Jagnathan و همکاران (۲۰۱۵) که بر اساس SNP‌های موجود در ناحیه hot-spot QTL بر روی کروموزوم ۴ نخود و همبسته با بسیاری صفات مرتبط با تحمل به خشکی معرفی شده بودند، استفاده شد (C1: CGMM139، C2: CGMM145، C3: CGMM148، C4: CGMM150، C5: CGMM152، C6: CGMM153). واکنش PCR با استفاده از این آغازگرها طبق برنامه توصیه شده Jagnathan و همکاران (۲۰۱۵) انجام گرفت و محصولات حاصل توسط آنزیم‌های اندونوکلاز MseI و EcoRI برش یافتند. برای انجام هضم آنزیمی، پنج میکرولیتر از محصول PCR هر نمونه با ۰/۱ واحد بر میلی‌لیتر آنزیم برشی، بافر آنزیم ۲X و آب مقطر برای حجم ۲۰ میکرولیتر ترکیب و به مدت ۱۶ ساعت در هات بلوک نگهداری و در نهایت قطعات حاصل به‌وسیله الکتروفورز ژل آگارز ۲٪ از یکدیگر تفکیک شدند (شکل ۳).

آزمایش سوم (تکمیلی)

به‌منظور انجام آزمایش تکمیلی و بررسی تکرارپذیری نشانگرهای SSR، آزمایش دیگری طراحی شد که در آن از ۱۰ نشانگر دارای چندشکلی در آزمایش اول، در یک مجموعه ژنوتیپ‌های تصادفی مجدداً مورد

(and Doyle, 1990) که در آن طی مراحل استخراج از آنزیم RNaseA برای حذف RNA موجود در بافت گیاهی استفاده شد. پس از هر استخراج DNA از بافت برگی هر ژنوتیپ، کمیت و کیفیت DNA ژنومی با نانودراپ شرکت ThermoScientific (USA) نسبت جذب نوری در طول موج‌های ۲۶۰ به ۲۸۰ و ۲۶۰ به ۲۳۰ نانومتر بررسی و با مشاهده باندهای واضح توسط الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ تعیین و تأیید گردیدند.

در این پژوهش از آغازگرهای SSR با بیشترین قابلیت تفکیک‌پذیری شناسایی شده در ژنوم نخود استفاده شد که توسط Hüttel و همکاران (۱۹۹۹)، Winter و همکاران (۱۹۹۹)، Rehman و همکاران (۲۰۱۱) و Varshney و همکاران (۲۰۱۴) که بر روی ارقام نخود متحمل و حساس به خشکی آزمایش و بر اساس صفات مرتبط با عملکرد دانه، صفات فنولوژیکی، مورفولوژیکی و ریشه‌گزینش شده بود (جدول ۲). دمای اتصال هر آغازگر در واکنش PCR از طریق گرادیانت دمایی، به‌طور دقیق بهینه‌سازی و تعیین شد. مخلوط واکنش حاوی مسترمیکس یک برابر، ۰/۶ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۱۰ و ۵۰ nM بر میکرولیتر از DNA الگو بود. غلظت واکنشگرهای PCR برای حجم ۲۰ میکرولیتر تنظیم شد. به‌منظور تکثیر قطعات DNA چرخه‌های PCR طی مراحل: بعد از ۵ دقیقه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ چرخه شامل ۴۵ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۴۰ ثانیه در دمای اتصال ۶۵-۵۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و بسط نهایی ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس محصولات تکثیر شده به‌وسیله الکتروفورز ژل آگارز ۲٪ از یکدیگر تفکیک و سپس در دستگاه ژل داگ (USA) UVP و تحت نور UV عکس‌برداری شد. (شکل ۳). جهت تشکیل ماتریس صفر و یک و تجزیه و تحلیل آماری آن‌ها از

مطالعه مشترک بود. میانگین تعداد آلل‌های چند شکل در سایر آغازگرها ۳/۶ باند و در دامنه ۹-۲ آلل متغیر بود. محتوای اطلاعات چند شکل نیز با میانگین ۰/۶۳ و در دامنه ۰/۸۵-۰/۲۱ قرار گرفت (جدول ۲). آغازگر S₉ با مقدار ۰/۸۵ دارای بیشترین میزان چندشکلی و آغازگرهای S₆ و S₇ دارای کمترین آلل چند شکل بودند. با توجه به میانگین PIC بالای نشانگرها، می‌توان دریافت که این نشانگرها از کارایی مناسبی در ارزیابی و گروه‌بندی ژنوتیپ‌های نخود کاندیدای متحمل به خشکی و ارقام شاهد برخوردار بودند. سه مورد از این نشانگرها (S₈، S₉ و S₁₀) توسط Rehman و همکاران (۲۰۱۱) معرفی شده بود که در این مطالعه نتایج بهتری از لحاظ تفکیک ژنوتیپ‌ها نشان دادند. به‌طور کلی، نتایج پژوهش‌های Rehman و همکاران (۲۰۱۱) و Varshney و همکاران (۲۰۱۴) با نتایج بررسی حاضر بسیار مطابقت داشت که می‌تواند تأییدی بر کارایی نشانگرهای توصیه شده برای ارزیابی میزان تنوع و دسته‌بندی ژنوتیپ‌های نخود در زمینه صفات مرتبط با تحمل به خشکی به‌طور خاص و مطالعات ژرم‌پلاسم نخود به‌طور عام باشد.

از طریق محاسبه ضریب کوفتیک، ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA با بیشترین همبستگی ($r=0.86$) که بیانگر انتقال نسبتاً خوب اطلاعات ماتریس فاصله به نمودار است به‌عنوان مناسب‌ترین روش خوشه‌بندی تعیین شد (جدول ۳). خوشه‌بندی ژنوتیپ‌ها از طریق ضریب تشابه جاکارد و الگوریتم UPGMA، توانست آن‌ها را در سه گروه اصلی قرار دهد (شکل ۱). محل برش کلاستر و تعداد خوشه‌های اصلی بر اساس میانگین تشابه جاکارد (۰/۳۴۳) تعیین گردید. دو ژنوتیپ MCC544 و MCC392 موجود در گروه یک، تفاوت ژنتیکی بسیار چشمگیری با دو گروه دیگر داشتند و در گروه کاملاً مجزایی قرار گرفتند و به‌طور مشترک با ژنوتیپ MCC252 دارای

آزمایش قرار گرفتند. این مجموعه شامل ۱۵ ژنوتیپ از بانک بذر پژوهشکده علوم گیاهی بودند که قبلاً در آزمایشات اولیه فیزیولوژیکی Porsa و همکاران (۲۰۱۶)، به‌عنوان ژنوتیپ‌های کاندیدای متحمل به سرما معرفی شده بودند (جدول ۱).

جدول ۱. فهرست ژنوتیپ‌های مورد استفاده در آزمایشات

مختلف این مطالعه

ردیف	نام ژنوتیپ	ردیف	نام اختصاری	نام ژنوتیپ	ردیف	نام اختصاری
1	R ₁	16	G ₁	MCC 791	1	MCC 544
2	R ₂	17	G ₂	MCC 732	2	MCC 352
3	R ₃	18	G ₃	MCC 53	3	MCC 552
4	R ₄	19	G ₄	MCC 785	4	MCC 392
5	R ₅	20	G ₅	MCC 788	5	MCC 80
6	R ₆	21	G ₆	MCC 775	6	MCC 537
7	R ₇	22	G ₇	MCC 463	7	MCC 696
8	R ₈	23	G ₈	MCC 802	8	MCC 427
9	R ₉	24	G ₉	MCC 753	9	MCC 252
10	R ₁₀	25	G ₁₀	MCC 809	10	MCC 358
11	R ₁₁	26	G ₁₁	MCC 814	11	MCC 302
12	R ₁₂			MCC 743		
13	R ₁₃			MCC 815		
14	R ₁₄			MCC 760		
15	R ₁₅			MCC 795		

* حرف R مربوط به ژنوتیپ‌های تصادفی (کاندیدای متحمل به سرما) و حرف G مربوط به ژنوتیپ‌های مربوط به مطالعه خشکی است. MCC خلاصه Mashhad Chickpea Collection است.

واکنش PCR بر روی DNA این ژنوتیپ‌ها توسط بهترین آغازگرهای منتخب از گزارش‌های قبلی (جدول ۲) صورت گرفت. محصولات حاصل با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۲٪ تفکیک و امتیازدهی شدند و نتایج به‌دست‌آمده تجزیه و تحلیل شدند و دندروگرام آن رسم شد. سپس دسته‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس گروه‌های ایجاد شده و سوابق فیزیولوژیکی قبلی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتایج و بحث

تمایز ژنوتیپ‌های مورد بررسی با نشانگرهای SSR

از ۱۱ آغازگر SSR مورد استفاده در این پژوهش، در مجموع ۴۰ قطعه تکثیر شد که از بین آن‌ها ۳۷ باند دارای چندشکلی بودند. آغازگر S₁₁ تنها یک باند تولید کرد که در تمام ۱۱ ژنوتیپ انتخابی مورد

کمترین ضریب تشابه (۰/۱۴) بودند. طبق مطالعات گذشته، ژنوتیپ MCC544 زودرس و دارای عملکرد بالا در شرایط تنش و غیر تنش و MCC392 نیز دارای بالاترین شاخص‌های تحمل خشکی بوده و زودرس است (Ganjeali *et al.*, 2009; Ganjeali *et al.*, 2011(b); و تفاوت بالای خود را با MCC252 که یک رقم دیررس و با افت عملکرد در شرایط تنش است (Ganjeali *et al.*, 2011(a) نشان دادند.

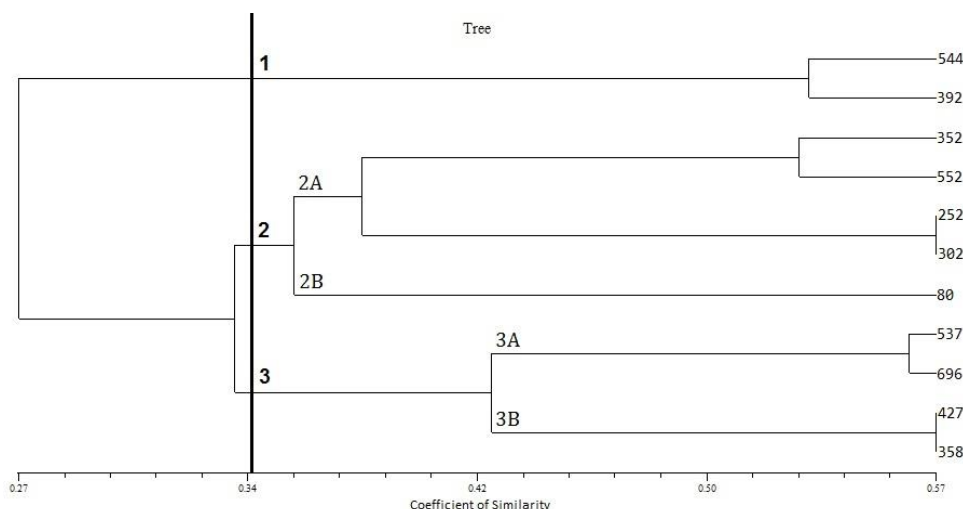
جدول ۲. اطلاعات به‌دست‌آمده از تجزیه و تحلیل باندهای ایجادشده توسط آغازگرهای SSR مورد استفاده در تمام ژنوتیپ‌های مورد آزمایش

ردیف	نام اختصاری	نام آغازگر	گروه پیوستگی (LG)	تعداد آلل‌های چند شکل مشاهده‌شده	اندازه قطعات pic ^۲
1	S ₁	ICCM0249	LG4-	4	193
2	S ₂	NCPGR127	LG4-	2	379
3	S ₃	TAA170	LG4-	4	259
4	S ₄	NCPGR21	LG4-	3	155
5	S ₅	TR11	LG4-	3	215
6	S ₆	GA24	LG4-	2	203
7	S ₇	STMS11	LG4-	2	232
8	S ₈	TR56	LG3-	6	248
9	S ₉	H3F08	LG3-	9	246
10	S ₁₀	TA8	LG1-	4	246
11	S ₁₁	ICCM0065 _b	LG4-	0	195

۱. گروه‌های پیوستگی بر اساس مطالعات Hüttel و همکاران (۱۹۹۹)، Winter و همکاران (۱۹۹۹)، Rehman و همکاران (۲۰۱۱) و Varshney و همکاران (۲۰۱۴). ۲- جفت باز. ۳- محتوای اطلاعات چند شکل محاسبه‌شده در آزمایش حاضر.

جدول ۳. ضرایب کوفنتیک به‌دست‌آمده بین ضرایب تشابه و الگوریتم‌های خوشه‌بندی مورد آزمون.

ضرایب تشابه / الگوریتم	UPGMA	اتصال ساده (Single)	اتصال کامل (Complete)
ضریب تشابه دایس	0.78	0.71	0.67
ضریب تشابه جاکارد	0.86	0.75	0.72
ضریب تشابه تطابق ساده	0.78	0.64	0.71



شکل ۱. تعیین تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های کاندیدای متحمل و حساس به خشکی بر اساس الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه جاکارد. نام ژنوتیپ‌ها به اختصار به صورت عدد آمده است. برش نمودار از محل میانگین ضریب تشابه جاکارد صورت گرفته است. سه شاخه اصلی و زیرشاخه‌ها توسط شماره و حروف بر روی نمودار مشخص شده است.

نیاز به بررسی‌های بیشتر فیزیولوژیکی و زراعی در MCC427 ضروری به نظر می‌رسد.

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی

در بررسی تنوع مولکولی به کمک آنالیز جزء اصلی سه مؤلفه اول که سهم بیشتری از تغییرات را شامل می‌شدند در مجموع % ۶۱/۲۶ از تنوع کل را توجیه کردند (جدول ۴). سه مؤلفه اول در این قسمت به ترتیب معادل با سه نشانگر S₈، S₉ و S₃ است که بیشترین تفکیک‌پذیری و چندشکلی را نشان دادند. این نتیجه به دلیل وجود آل‌های بیشتر و همچنین بر طبق ماتریس صفر و یک به‌دست‌آمده از الگوی باندی مشاهده‌شده آن‌هاست که بر اساس محاسبه نرم‌افزار NTsys در کلاس‌بندی ژنوتیپ‌ها مؤثرتر شناخته شده‌اند.

جدول ۴. نتایج تجزیه به مؤلفه‌های اصلی (برحسب ضریب تشابه جاکارد)

واریانس تجمعی (%)	واریانس مشاهده‌شده (%)	مقادیر ویژه مؤلفه‌ها
40.83	40.83	1.29
52.50	11.66	0.98
61.26	8.76	0.83

دو ژنوتیپ MCC544 و MCC392 به‌طور کاملاً مجزایی در یک طرف و با تفاوت بیشتری قرار گرفتند که تأییدی بر تفاوت محتوای ژنتیکی این دو ژنوتیپ است (شکل ۲). گروه‌های ۲ و ۳ نیز شباهت زیادی با نتایج تجزیه خوشه‌ای داشتند؛ اما نکته قابل‌ملاحظه در این آنالیز آن است که با حذف متغیرهای کم اثرتر در این نمودار برخلاف دندروگرام، ژنوتیپ MCC427 با کمی فاصله از ژنوتیپ نسبتاً حساس MCC358 قرار گرفت که گویای رفتار بینابینی این ژنوتیپ بوده و مطالعات بیشتر مزرعه‌ای، گلخانه‌ای و فیزیولوژیکی برای تعیین دقیق‌تر تحمل به خشکی آن نیاز است. علت این عدم تطابق کامل نتایج می‌تواند ناشی از کاربرد تنها دو متغیر اصلی در تجزیه مؤلفه‌ها باشد

از طرفی در زیرشاخه دیگر 2A که دو ژنوتیپ MCC252 و MCC302 شباهت بسیار بالایی را نشان داده‌اند، طبق گزارش‌های قبلی، از نظر مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی مثلاً دیررسی مشابه یکدیگر بوده و در شرایط تنش خشکی از کاهش عملکرد قابل‌ملاحظه‌ای برخوردار بودند (Ganjeali *et al.*, 2010; Ganjeali *et al.*, 2011(a)). در کنار MCC80 در زیرشاخه 2B قرار گرفته‌اند که اختلاف MCC80 با زیرگروه 2A در زودرسی و عملکرد بالای آن گزارش شده است. همچنین در زیرشاخه دیگر همین گروه دو ژنوتیپ MCC352 و MCC552 به لحاظ برخی خصوصیات از جمله درشتی بذر و ویژگی‌های مورفولوژیکی و رسیدگی بسیار مشابه گزارش شده بودند که نشانگرهای به‌کاررفته نیز به‌خوبی این دسته‌بندی را تأیید نموده است. در زیرشاخه 3A گروه سوم، دو ژنوتیپ MCC537 و MCC696 قرار گرفتند که طبق گزارش‌های گذشته شباهت زیادی در تحمل خشکی و صفات مربوط به آن مانند طول ریشه، ثبات بالای وزن خشک ریشه و اندام هوایی و همچنین ثبات عملکرد در شرایط تنش و غیر تنش داشته‌اند (Ganjeali *et al.*, 2009; Ganjeali *et al.*, 2011(b)). در مطالعات گذشته از طرفی هم متحمل به خشکی بوده و اندکی کاهش عملکرد ناشی از تنش داشته و از نظر مورفولوژی دارای عرض برگ کم و نیز روز تا گلدهی زیاد (دیررس) بود (Ganjeali *et al.*, 2010; Ganjeali *et al.*, 2011(a)). در این دندروگرام نیز همبستگی بالایی با MCC358 نشان داده است که ژنوتیپی دیررس و دارای اندکی تحمل به خشکی نیز است. این نتیجه می‌تواند نشان‌دهنده شباهت دو ژنوتیپ MCC427 با MCC358 باشد که از نظر تحمل به خشکی رفتاری بینابینی و نزدیک به هم داشته‌اند. با این حال،

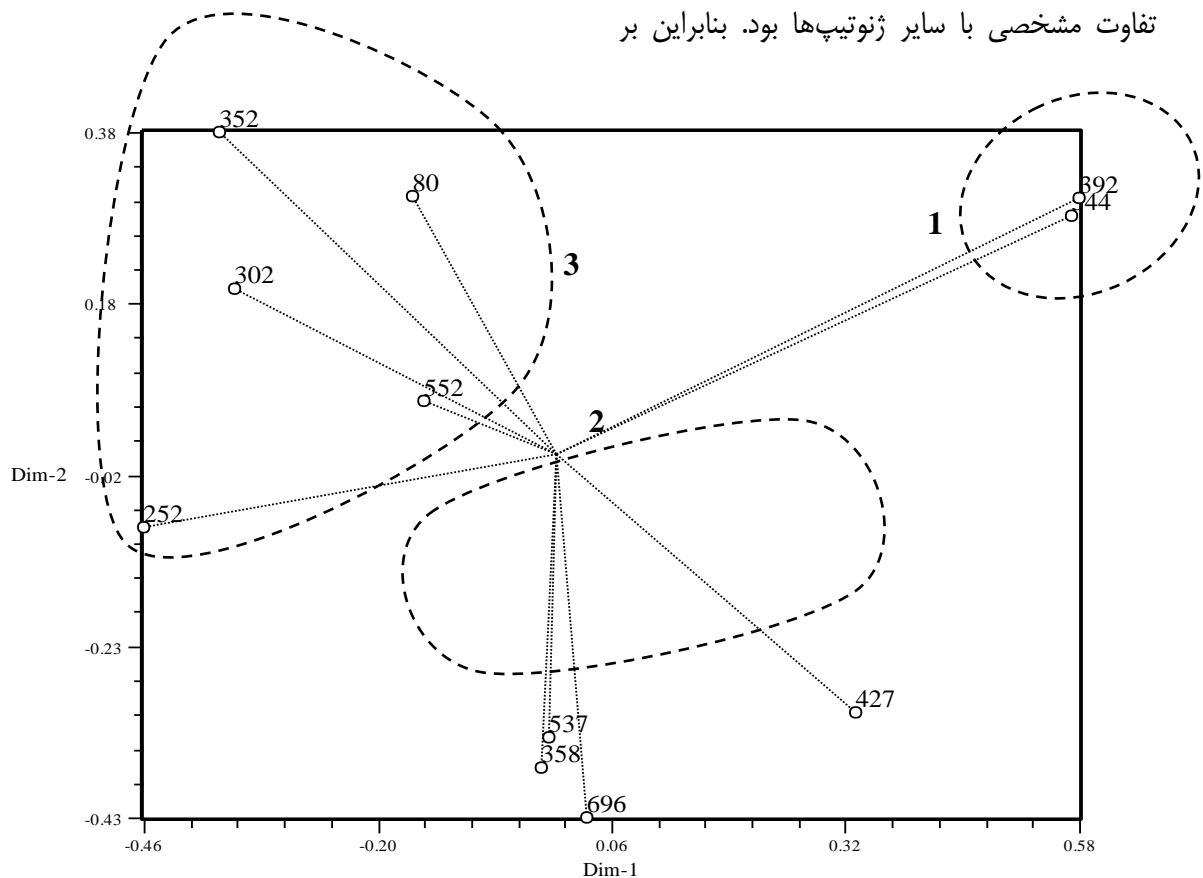
اساس نتایج به‌دست‌آمده انتظار می‌رود که ژنوتیپ MCC80 در نواحی کروموزومی مورد مطالعه دارای توالی ژنی متفاوت و مؤثری در تحمل تنش خشکی نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها باشد. در این نواحی کروموزومی مجموعاً ۲۶ ژن مؤثر در خشکی شناسایی شده است (Kale *et al.*, 2015) که با در نظر گرفتن تفاوت الگوی باندی در این ژنوتیپ می‌توان در مطالعات اصلاحی از این ژن‌ها بهره برد.

گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با نشانگرهای CAPS
 قطعات DNA ۱۱ ژنوتیپ مورد مطالعه توسط آغازگرهای نشانگر CAPS تکثیر یافته و توسط آنزیم‌های برشی خاص خود برش داده شدند. از میان شش نشانگر CAPS انتخابی بر اساس مطالعات Jagnathan و همکاران (۲۰۱۵)، نشانگرهای C₃، C₄، C₅ و C₆ چندشکلی خوبی نشان دادند.

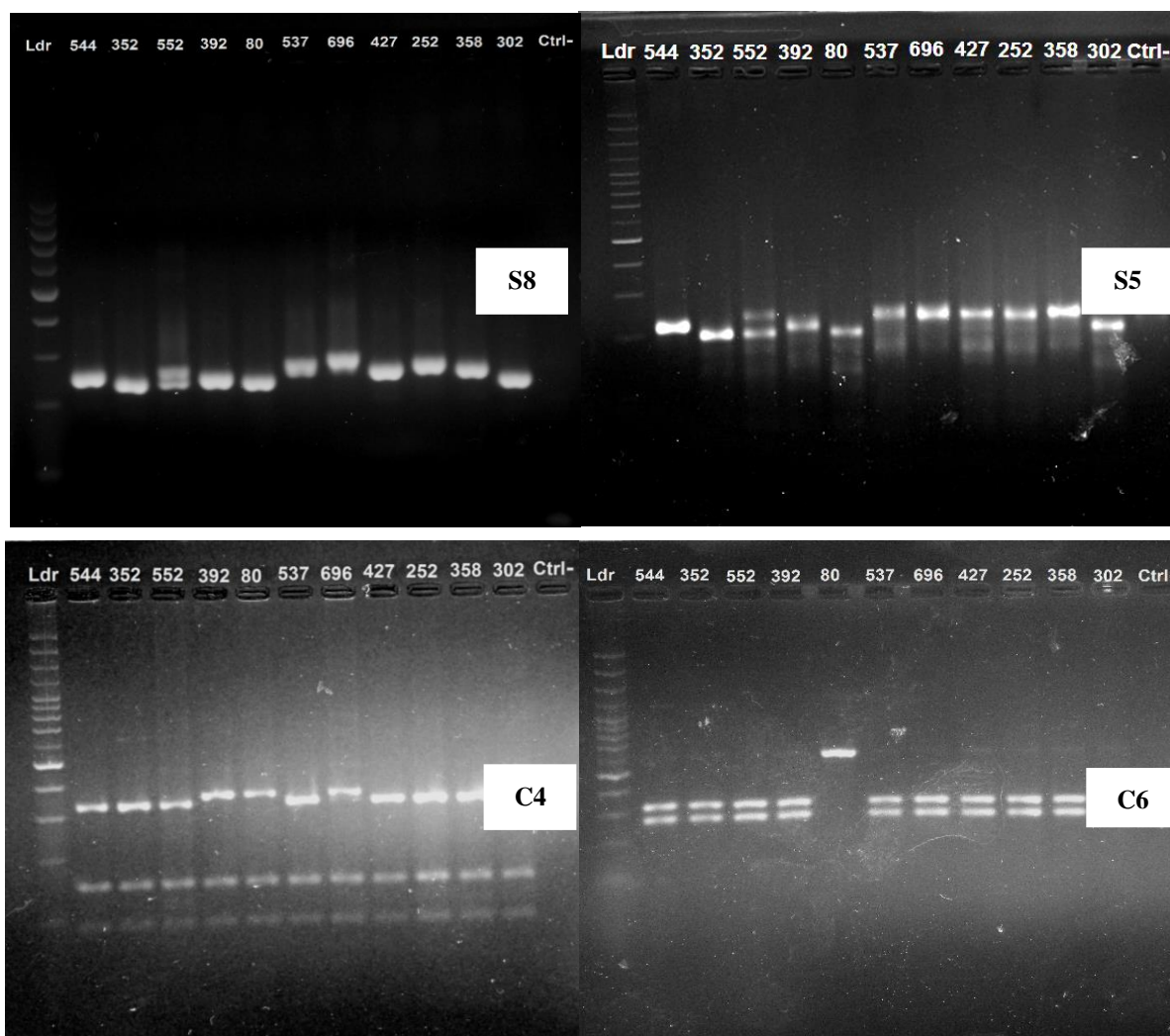
که در اینجا متغیرها همان نشانگرهای چند شکل می‌باشند.

از طریق تجزیه به مؤلفه‌های اصلی و جهت‌گیری ژنوتیپ‌ها روی نمودار آن می‌توان لاین‌های والدینی مکملی انتخاب نمود که در نتایج آن‌ها امکان ظهور ژنوتیپ‌هایی با ترکیب صفات مطلوب مختلف والدینی را داشته باشیم (Olfati *et al.*, 2010).

باندهای حاصل از نشانگرهای CAPS نشان‌دهنده وجود SNP در توالی موجود در ناحیه کروموزومی Hot-Spot QTL گزارش شده در مطالعات Varshney و همکاران (۲۰۱۳) در ژنوتیپ‌های متحمل MCC392، MCC80 و MCC696 است. بروز این چندشکلی‌ها بخصوص در ژنوتیپ متحمل MCC80 بیشتر مشهود بود. (شکل ۳) همچنین این ژنوتیپ در تجزیه خوشه‌ای و نمودار دویبعی حاصل از نشانگرهای SSR نیز دارای تفاوت مشخصی با سایر ژنوتیپ‌ها بود. بنابراین بر



شکل ۲. نمودار بای پلات بر اساس دو مؤلفه اول برای نمایش تنوع ژنوتیپ‌های مورد مطالعه. ژنوتیپ‌ها به‌صورت ۳ گروه شماره‌گذاری و خط‌کشی شدند.

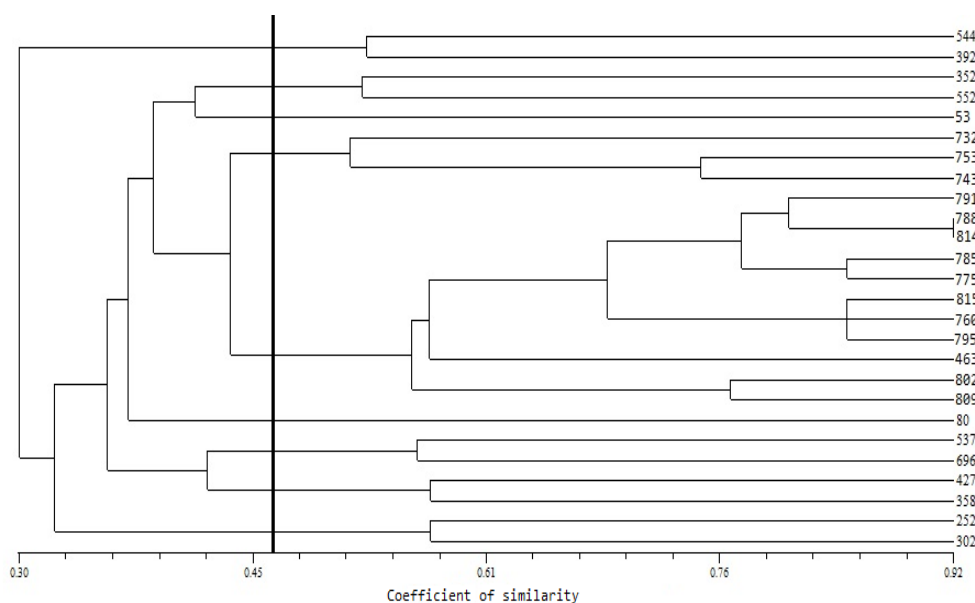


شکل ۳. نمونه‌هایی از چندشکلی مشاهده شده در برخی از آغازگرهای SSR و CAPS بر روی ژل آگارز ۲٪. S و C: نام اختصاری هر آغازگر است. چاهک‌ها به ترتیب از چپ به راست: سایز مارکر +۱۰۰، نام ژنوتیپ‌های G₁ تا G₁₁ و کنترل منفی.

اساس آن در خوشه‌بندی این دو جمعیت، نه گروه اصلی مختلف به دست آمد. لازم به ذکر است که در دندروگرام نهایی شاخه‌های مجموعه ژنوتیپ‌های تصادفی در یکدیگر ادغام شده و شامل سه گروه شدند، درحالی‌که شاخه‌های ژنوتیپ‌های کاندیدای متحمل به خشکی تفکیک بیشتری یافتند و در شش گروه مختلف قرار گرفتند (شکل ۴). این مطلب نشان می‌دهد که با توجه اختصاصی و مرتبط بودن نشانگرها برای صفت خشکی، ژنوتیپ‌های متفاوت در تحمل خشکی نسبت به ژنوتیپ‌های غیر مرتبط با این صفت از گروه‌بندی متمایزتری برخوردار می‌شوند.

آنالیز کلاستر مجموعه ژنوتیپ‌های کاندیدای متحمل به خشکی و مجموعه ژنوتیپ‌های تصادفی

جهت بررسی میزان شباهت بین ژنوتیپ‌های انتخابی متحمل به خشکی و مجموعه ژنوتیپ‌های تصادفی، ماتریس کل ژنوتیپ‌ها ایجاد شد و مجدداً به وسیله نرم‌افزار دندروگرام آن‌ها رسم گردید. با توجه به ضرایب تشابه به دست آمده، ژنوتیپ‌های MCC788 و MCC814 دارای بیشترین میزان تشابه (۰/۹۲) بودند و کمترین تشابه (۰/۱۴) میان ژنوتیپ‌های گروه اول (MCC392 و MCC544) با ژنوتیپ MCC252 دیده شد. میانگین ضرایب تشابه نیز ۰/۴۷ بود که بر



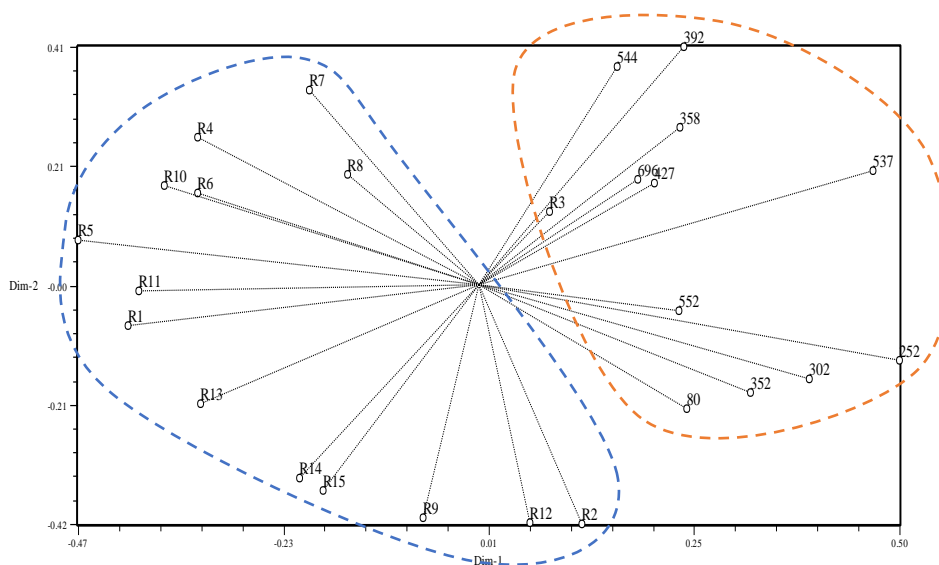
شکل ۴. تنوع ژنتیکی بر اساس الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه جاکارد، برش نمودار از محل میانگین ضریب تشابه جاکارد صورت گرفته است. نه شاخه اصلی شامل شش شاخه از ژنوتیپ‌های کاندیدای متحمل به خشکی و سه شاخه از مجموعه ژنوتیپ‌های تصادفی بر روی نمودار تفکیک شده است.

تجزیه به مؤلفه‌های اصلی کلیه ژنوتیپ‌های مورد مطالعه

در نمودار دوبعدی جهت قرارگیری ژنوتیپ‌های انتخابی و ژنوتیپ‌های تصادفی نسبت به میانگین ضریب تشابه، کاملاً متفاوت و متمایز از یکدیگر قرار گرفتند (شکل ۵). نتایج حاصل از این نمودارها و نتایج دندروگرام نهایی نشان دادند که این دو مجموعه ژنوتیپ کمترین تشابه ژنتیکی را با یکدیگر دارند و در دو گروه کلی مجزا قرار گرفتند که گویای تفکیک‌پذیری مناسب نشانگرهای گزینش شده است. از مجموعه تصادفی تنها ژنوتیپ MCC53 (R_3) در گروه‌بندی نزدیک به ژنوتیپ‌های متحمل قرار گرفت که پیشنهاد می‌شود درباره واکنش به خشکی این ژنوتیپ نیز بررسی صورت گیرد.

در مجموع نشانگرهای SSR مورد استفاده در این مطالعه از قابلیت تفکیک و کارایی بسیار مناسبی برخوردار بودند که از میان آن‌ها نشانگرهای TR56 و H3F08 و TAA170 و TA8 با $PIC > 0.7$ کاراترین نشانگرها در دسته‌بندی این ژنوتیپ‌ها تعیین شدند.

در این دندروگرام نهایی، گروه اول شامل ژنوتیپ‌های متحمل زودرس MCC544 و MCC392 و گروه نهم شامل ژنوتیپ‌های MCC302 و MCC252 با بیشترین فاصله ژنتیکی از یکدیگر قرار گرفتند. این نتایج نشان داد که نشانگرهای منتخب توانستند تمامی ژنوتیپ‌ها را بر اساس شاخص‌ها و برخی صفات مؤثر در تحمل به خشکی که در مطالعات گذشته به آن‌ها اشاره شده است (Abed *et al.*, 2015; Ganjeali *et al.*, 2011(a); Ganjeali *et al.*, 2011(b)) دسته‌بندی کنند. در این دسته‌بندی شباهت‌ها و فواصل ژنتیکی میان ژنوتیپ‌های کاندیدای متحمل به خشکی و ارقام رایج کشور به‌خوبی تعیین گردید و از آنجا که ژنوتیپ‌های کاندیدای متحمل خشکی و متحمل سرما در گروه‌های کاملاً مجزایی قرار گرفتند نشان‌دهنده این است که به احتمال زیاد ژنوتیپ‌های کاندیدای متحمل به سرما شباهت ژنتیکی با ژنوتیپ‌های انتخابی متحمل به خشکی نداشته و از نظر شاخص‌های تحمل با یکدیگر تفاوت دارند.



شکل ۵. نمایش تنوع موجود میان ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در تحمل به خشکی و سرما به وسیله نمودار بای پلات با دو مؤلفه اصلی. مجموعه ژنوتیپ‌های تصادفی به صورت عدد مطابق با جدول ۱ نمایش داده شده‌اند.

مولکولی ژنوتیپ‌های نخود متحمل به خشکی با سایر ژنوتیپ‌ها موفق ظاهر شدند و این نتیجه می‌تواند به گونه‌ای دال بر تأیید ارتباط این نشانگرها با صفات مرتبط با تنش خشکی باشد. این اطلاعات می‌تواند در شناسایی ژنوتیپ‌ها، ژن‌های امیدبخش و نیز اصلاح و تولید گیاه تراریخت نخود مفید باشد.

از میان نشانگرهای CAPS نیز چهار مورد آن (C_3 ، C_4 ، C_5 و C_6) چندشکلی خوبی نشان دادند که برای مطالعات گسترده تشخیصی قابل استفاده هستند. نتایج این پژوهش گویای آن است که نشانگرهای مورد استفاده که در جمعیت‌های بزرگ به تأیید رسیده بودند به نحو مطلوبی در تشخیص

REFERENCES

- Abed M, Ganjeali A, Tahery G, Zare L (2015) Examine the morphological and physiological characteristic of those genotypes hoped to be resistant to drought in chickpea (*Cicer arietinum* L.) in complementary irrigation. *Science J.* 36(3): 573-576
- Doyle JJ and Doyle J L (1990) A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus.* 12: 13-15.
- FAOSTAT (2018) www.fao.org. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Accessed 15 March 2020.
- Ganjeali A, Bagheri A, Porsa H (2009) Evaluation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasm for drought resistance. *Iranian J. of F. Crops Res.* 7(1):183-194.
- Ganjeali A, Porsa H, Bagheri A (2011a) Response of yield and morphophysiological characteristics of earliness chickpea genotypes (*Cicer arietinum* L.) under drought stress. *Iranian J. of Pulses Res.* 2(1): 65-80.
- Ganjeali A, Porsa H, and Bagheri A (2011b) Assessment of Iranian chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasm for drought tolerance. *Agricultural Water Management.* 98(9): 1477-1484.
- Ganjeali A, Rahbarian R, Bagheri A, Malekzadeh Shafaroudi S (2014) Study on drought stress effects on morphological, physiological and biochemical characteristics of chickpea genotypes (*Cicer arietinum* L.) under field condition. *Iranian J. of Pulses Res.* 5(1): 91-102.

- Hussain SS (2006) Molecular breeding for abiotic stress tolerance: drought perspective. Proc. of the Pak. Academy of Sciences. 43(3): 189-210.
- Hüttel B, Winter P, Weising K, Choumane W, Weigand F, and Kahl, G (1999) Sequence-tagged microsatellite site markers for chickpea (*Cicer arietinum* L.). Genome. 42(2): 210-217.
- Jagnathan D, Thaudi M, Kale S, Azam S, Roorkiwal M, Gaur PM, Kishor PBK, Nguyen H, Sutton T, Varshney RK (2015) Genotyping-by-sequencing based intra-specific genetic map refines a “QTL-hotspot” region for drought tolerance in chickpea. Molecular Genetics and Genomics. 290: 559-571.
- Junjian N, Colowit PM, Mackill DJ (2002) Evaluation of genetic diversity in rice subspecies by microsatellite markers. Crop. Science. 42: 601-607
- Kale S, Jagnathan D, Ruperao P, Chen C, Punna R, Kudapa H, Thaudi M, Roorkiwal M, Katta M, Doddamani D, Garg V, Kishor PB, Gaur P, Nguyen H, Batley J, Edwards D, Sutton T, Varshney Rk (2015) Prioritization of candidate genes in “QTL-hotspot” region for drought tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Scientific reports. 5: 15296.
- Lahoot F, Zeinolabedini M, Karimi J, Shahbazi M, Sadeghzadeh B (2016) Assessment of genetic diversity of Iranian and non-Iranian barely genotypes (*Hordeum vulgare* L.) using SSR markers. Crop. Biotech. 6(15): 25-35.
- Mahfoofi S, Amini A, Chaichi H, Jasemi S, Nazeri M, Abedi Oskooyi M, Aminzadeh GH, Rezayi M (2009) Study on Grain Yield Stability and Adaptability of Winter Wheat Genotypes Using Different Stability Indices Under Terminal Drought Stress Conditions. Seed and Plant Improvement J. 25(1): 65-82.
- Mohammadi Nezhad GH, Ghasem Khani M, Zare R, Sardouei Nasab S, Sabouri H (2013) Evaluation of allelic diversity of microsatellite markers in QTL region attributed to salinity tolerance in Iranian rice cultivars. J. of Plant Production. 20(3): 145-157.
- Nezami A, Pooramir F, Momeni S, Porsa H, Ganjeali A, Bagheri A (2012) Evaluation of a subset of chickpea germplasm collection of Ferdowsi University of Mashhad Seed Bank II. Kabuli type chickpeas. Iranian J. of Pulses Res. 20(3): 145-157.
- Qureshi ST, Yasmeen A, Abassi AR, Qureshi AS, Gafoor A, Memnon M, soomro N (2015) Evaluation of chickpea genotypes under different environments for stability of quantitative traits. Sindh University Res. J. (Sci. Ser.), 47(3) 559-562.
- Sabouri A, Sabouri H, Dadras A (2013) Association analysis of closely linked markers to major QTLs Saltol and SKC1 and salt tolerance-related traits in rice varieties. Cereal res. 3(1): 53-68.
- Saxena NP (2003) Management of Agriculture Drought “Agronomic and Genetic Options”. Science Publishers Inc, NH, USA.
- Olfati JA, Samizadeh H, Peyvast Gh, Rabie B, Khodaparast SA (2010) Parental line selection for cucumber hybrid seed production by principal component analysis. International J. of Vegetable Science. 16(4), 316-325.
- Petit JR, Jouzel J, Raynaud D, Barkov NI, Barnola JM, Basile I, Delaygue G (1999) Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. Nat. 399: 429-436.
- Porsa H, Nezami A, Bagheri A, Najibnia S (2016) Agronomic assessment of cold tolerant chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes in fall sowing at Mashhad conditions. Iranian J. of Pulses Res. 7(1): 37-353.
- Rehman A, Malhotra R, Bett K, Tar'an B, Bueckert R, Warkentin T (2011) Mapping QTL associated with traits affecting grain yield in Chickpea (*Cicer arietinum* L.) under terminal drought stress. Crop Science. 51(2): 450-463.

- Rehman AU (2009) Characterization and molecular mapping of drought tolerance in kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.). PhD thesis, University of Saskatchewan, Saskatoon.
- Semagn K, Bjørnstad Å, Ndjiondjop M (2006) An overview of molecular marker methods for plants. African J. of Biotechnology. 5(25): 2540-2568.
- Varshney RK, Thudi M, Nayak SN, Gaur PM, Kashiwagi J, Krishnamurthy L, Tripathi S (2014) Genetic dissection of drought tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.). Theoretical and Appl. Genetics. 127(2): 445-462.
- Varshney RK, Thudi M, Pandey MK, Tardieu F, Ojiewo C, Vadez V, Whitbread AM, Siddique KHM, Nguyen HT, Carberry PS, Bergvinson D (2018) Accelerating genetic gains in legumes for the development of prosperous smallholder agriculture: integrating genomics, phenotyping, systems modeling and agronomy. J Exp Bot. 69: 3293-3312
- Winter P, Pfaff T, Udupa SM, Huttel B, Sharma PC, Sahi S, Arreguin-Espinoza R, Weigand F, Muehlbauer FJ, Kahl G (1999) Characterization and mapping of sequence-tagged microsatellite sites in the chickpea (*Cicer arietinum* L.) genome. Molecular and Gen. Genetics. 262: 90-101.