

بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های نخود با استفاده از نشانگر مولکولی SSR

رضا میردیریکوند*

استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد خرم‌آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، خرم‌آباد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۴/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۲۶

چکیده

بهره‌برداری از تنوع ژنتیکی یکی از عوامل مهم در به‌نژادی گیاهان زراعی است. این تحقیق به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی ۳۵ ژنوتیپ نخود با استفاده از ۱۵ جفت آغازگر SSR، انجام شد. پس از استخراج DNA، انجام واکنش‌های PCR و الکتروفورز، آغازگرها در مجموع ۴۹ آلل را در تمام ژنوتیپ‌ها تکثیر کردند. متوسط تعداد آلل تکثیر شده به ازای هر آغازگر ۳/۲۶ آلل بود. آغازگر SSR35 با پنج آلل، همراه با آغازگرهای SSR14، SSR21، SSR26 و SSR63 با چهار آلل، بیشترین و آغازگرهای SSR61 و SSR7 با ۲ آلل، کمترین آلل را تکثیر نمودند. بر اساس ضرایب تشابه به‌دست‌آمده ارزش‌های تشابه دامنه‌ای از ۰/۱۰ تا ۰/۸۰ با میانگین ۰/۴۰ درصد را داشتند. میزان اطلاعات چندشکلی (PIC)، از ۰/۲۰ تا ۰/۸۸ متغیر بود (با متوسط ۰/۵۰). بیشترین و کمترین میزان PIC به ترتیب مربوط به آغازگرهای SSR62 و SSR21 بود. تجزیه خوشه‌ای با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA انجام شد و ژنوتیپ‌ها در هشت گروه قرار گرفتند. گروه‌بندی تا حدودی توانست ژنوتیپ‌های مختلف نخود را از همدیگر تفکیک نماید. تفکیک ژنوتیپ‌ها از طریق تجزیه هم‌هنگ اصلی و پلات‌های دو و سه‌بعدی نیز تقریباً تأییدکننده تجزیه خوشه‌ای بود. ضریب همبستگی کوفنتیک بالا بیانگر ارتباط مؤثر بین داده‌های مولکولی، روش تجزیه خوشه‌ای و صحت گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بود. از تنوع موجود می‌توان در برنامه‌های اصلاح نخود استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، میزان اطلاعات چندشکلی (PIC)، نخود، نشانگر SSR

مقدمه

دانه نخود دارای حدود ۲۰ درصد پروتئین بوده و منبع مناسبی برای تأمین کالری مورد نیاز انسان است (Singh *et al.*, 2008). در بین حبوبات، نخود رتبه سوم دنیا را دارد. ایران از نظر سطح زیرکشت این محصول رتبه چهارم و از نظر تولید رتبه ششم دنیا را دارد (FAO, 2012)، در ایران حدود ۷۷۰ هزار هکتار معادل ۶/۲ درصد از اراضی محصولات سالانه برداشت شده در سال زراعی ۹۲-۱۳۹۱ به حبوبات اختصاص یافته است. از این مقدار نخود ۶۱/۳ درصد، عدس ۲۰/۲ درصد و لوبیا ۱۴/۹۵ درصد از سطح برداشت را به خود اختصاص داده‌اند (Ministry of jihade-agriculture, 2014). آگاهی از میزان تنوع و فاصله ژنتیکی بین افراد یا جوامع، در انتخاب والدین مناسب جهت تولید هیبریدهای برتر از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار است. ضمن این‌که تنوع ژنتیکی از ارکان اصلی کشاورزی پایدار محسوب می‌شود (Sharma *et al.*, 2002). با اطلاع از میزان تنوع منابع ژنتیکی و بهره‌برداری از آن می‌توان ارقام جدید و مطلوب‌تر برای مناطق مختلف ایجاد و توصیه نمود. ساده‌ترین راهی که پیش روی به‌نژادگران جهت افزایش

عملکرد در واحد سطح وجود دارد، گزینش رگه‌های پرمحصول است (Joshig & Nguyen, 1993). اما لازمه‌ی گزینش، تنوع است و بایستی از میزان تنوع ژنتیکی موجود در گیاهان زراعی و خویشاوندان وحشی آن‌ها و فاصله‌ی ژنتیکی در بین افراد یا جمعیت‌ها اطلاع کافی داشت تا بتوان در برنامه‌های به‌نژادی، امکان سازماندهی ژرم‌پلاسم و نمونه‌گیری مؤثر از ژنوتیپ‌ها را فراهم آورد (Ismaili *et al.*, 2010).

آگاهی از تنوع ژنتیکی و مدیریت منابع ژنتیکی، به‌عنوان اجزاء مهم طرح‌های اصلاح‌نباتات تلقی می‌شوند. در واقع تنوع مبنای همه گزینش‌هاست و دسترسی به تنوع ژنتیکی، اساس کارهای اصلاحی و انتخاب ژنوتیپ‌ها و نمونه‌های گیاهی مورد نظر می‌باشد، روش‌های مختلفی برای برآورد تنوع ژنتیکی در گونه‌های گیاهی وجود دارد که از آن جمله می‌توان استفاده از صفات مورفولوژیکی (یا نشانگرهای مورفولوژیک)، اگرانومیک، سیتولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی (نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA) را نام برد. به‌نژادگران گیاهی معمولاً استفاده از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA را نسبت به سایر نشانگرها جهت اطمینان از صحت تنوع بر اساس نشانگرهای مورفولوژیک، ترجیح می‌دهند. این نشانگرها ابزاری قوی در

*نویسنده مسئول: تلفن همراه: ۰۹۱۶۳۶۷۷۷۰، drikvand_r@yahoo.com

وحشی تنوع بیشتر و مکان‌های ژنی متنوع‌تری نسبت به وارپته‌های زراعی داشتند. تجزیه هم‌هنگ اصلی، تفاوت بین وارپته‌های زراعی و نمونه‌های وحشی را به خوبی از هم متمایز نمود.

هدف از انجام این مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی ۳۵ ژنوتیپ نخود با استفاده از ۱۵ آغازگر SSR بود. تنوع این ژنوتیپ‌ها با استفاده از نشانگر SSR قبلاً بررسی نشده بود.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق ۳۵ ژنوتیپ نخود شامل ارقام اصلاح‌شده، ژنوتیپ‌های امیدبخش و دو رقم محلی که بذر آن‌ها از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان لرستان تهیه شده بودند، مورد استفاده قرار گرفت. اسامی آن‌ها در جدول ۱ آورده شده است.

استخراج DNA با استفاده از روش CTAB انجام شد (Doyle & Doyle., 1990). برای حذف RNA و پروتئین، آنزیم‌های RNase و پروتئیناز به نمونه‌ها اضافه شد. کیفیت نمونه‌های DNA با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد و دستگاه پیکودراپ مدل Pico 200 (ساخت کمپانی Pico drop انگلستان) تعیین گردید. سپس از DNA نمونه‌هایی با غلظت ۵۰ ng تهیه شد. بر اساس مطالعات قبلی (Qadir et al., 2007)، تعداد ۱۵ آغازگر SSR انتخاب و مورد استفاده قرار گرفتند (جدول ۲). واکنش‌های PCR به صورت زیر انجام گرفت. یک چرخه در دمای ۹۴ درجه و به مدت یک دقیقه، ۴۰ چرخه در دمای ۹۴ درجه و به مدت پنج دقیقه، اتصال آغازگرها به مدت یک دقیقه و در دمای بین ۵۰ تا ۶۵ درجه (بسته به نوع آغازگر)، سپس تکثیر نمونه‌ها به مدت ۲ دقیقه و در دمای ۷۲ درجه و تکثیر نهایی در همین دما و به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. واکنش در حجم ۱۵ میکرولیتر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر My cyclor ساخت کمپانی Bio Rad انجام شد. پس از انجام مراحل تکثیر، به هر نمونه سه میکرولیتر از محلول رنگ‌آمیزی ژل رد و بافر بارگیری (به نسبت ۱/۵: ۱/۵ میکرولیتر) افزوده شد. ژل ۳/۵ درصد که ترکیبی از ۵۰ درصد آگارز معمولی و ۵۰ درصد آگارز متافور بود، با استفاده از بافر TBE^۲ تهیه شد. سپس نمونه‌ها در چاهک بارگیری شدند. الکتروفورز با ولتاژ ۱۰۰ و به مدت دو ساعت و نیم اجرا گردید.

تهیه نقشه‌های ژنتیکی، مکان‌یابی ژن‌ها و بررسی تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاسم گیاهی می‌باشند (Khush, 1999).

در مطالعات متعددی با استفاده از نشانگرهای مولکولی بخصوص نشانگر SSR تنوع ژنتیکی نخود مطالعه شده است که می‌توان به چند مورد اشاره نمود.

Aggarwal et al, (2015) تنوع ژنتیکی ۱۲۵ رقم زراعی نخود هندوستان را با استفاده از نشانگرهای ISSR بررسی نمودند. میزان اطلاعات چندشکلی آغازگرها بین ۰/۲۶ تا ۰/۹۱ در ۰/۷۲ متوسط بود. محققان (Torutaeva et al., 2014) در بررسی تنوع ژنتیکی ۲۴ نمونه نخود در قرقیزستان با استفاده از ۹ نشانگر SSR، میزان پروتئین و مواد معدنی مشخص نمودند که میزان اطلاعات چندشکلی آغازگرها بین ۰/۷۱ تا ۰/۹۰ با متوسط ۰/۸۳ است. Ghaffari et al, (2014) تنوع ژنتیکی و تمایزات جغرافیایی ۶۰ نمونه نخود شامل ارقام محلی، وارپته‌های زراعی و لاین‌های معرفی شده از مرکز بین‌المللی تحقیقات کشاورزی در مناطق خشک^۱ (ICARDA) را با استفاده از صفات مورفولوژیک و ۱۴ نشانگر ریزماهواره مورد بررسی قرار دادند. نشانگرها سطح بالایی از چندشکلی را در ارقام مورد بررسی نشان دادند. میزان اطلاعات چندشکلی^۲ (PIC) آغازگرها از ۰/۳۱ تا ۰/۸۹ متغیر بود. اغلب نشانگرها PIC > ۰/۵ داشتند که بیانگر کارآبودن این نشانگرها در برآورد تنوع ژنتیکی نمونه‌های مورد مطالعه بود. در بررسی‌های دیگری (Sefera et al., 2011)، محققان تنوع ژنتیکی ۴۸ رقم نخود را با استفاده از ۴۸ نشانگر SSR مورد بررسی قرار دادند. اطلاعات چندشکلی آغازگرها بین ۰/۳۷-۰/۹۱ و میانگین ۰/۷۷ بود. Naghavi et al, (2012) تنوع ژنتیکی ۳۰۷ وارپته محلی نخود را که در چهار منطقه ایران جمع‌آوری شده بود، با ۱۶ نشانگر ریزماهواره مورد بررسی قرار دادند. تعداد آلل در هر مکان نشانگر ریزماهواره از هشت تا ۲۸ متغیر بود (با متوسط ۱۹/۳۱). بالاترین سطح تنوع ژنتیکی در بین خودهای ناحیه شمال وجود داشت. تجزیه کلاستر بر اساس داده‌های مولکولی نشان داد که خودهای ناحیه شمال به‌طور کاملاً مجزایی از خودهای سه منطقه دیگر تفکیک شده‌اند. (Choudhary et al., 2012)، با استفاده از ۱۰۰ آغازگر SSR تنوع ۳۸ نمونه نخود بانک ژن را مورد بررسی قرار دادند. تعداد آلل تکثیرشده در هر مکان ژنی از ۲ تا ۱۱ متغیر بود (با متوسط ۴/۸ آلل در هر مکان). اطلاعات چندشکلی آغازگرها از ۰/۰۴ تا ۰/۸۰ متغیر بود و متوسط آن برابر ۰/۳ بود. در این مطالعه ژنوتیپ‌های

^۱ International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA)

^۲ Polymorphic Information Content

^۲ Tris Boric Acid EDTA

جدول ۱- اسامی ژنوتیپ‌های نخود مورد استفاده در تحقیق

Table 1. Names or identity of chickpea genotypes used in the study

شماره	نام/شناسه	منشأ	شماره	نام/شناسه	منشأ
No.	Name/Identity	Origin	No.	Name/Identity	Origin
1	ILC-249	ICARDA	19	Flip03-123c	ICARDA
2	ILC-1929	ICARDA	20	Flip03-71c	ICARDA
3	Flip03-135c	ICARDA	21	Flip05-18c	ICARDA
4	ILC-3279	ICARDA	22	Flip06-23c	ICARDA
5	ILC-3996	ICARDA	23	Flip05-28c	ICARDA
6	ILC-202	ICARDA	24	Flip05-11c	ICARDA
7	ILC-72	ICARDA	25	Flip05-19c	ICARDA
8	Flip05-46c	ICARDA	26	Flip07-31c	ICARDA
9	ILC-5928	ICARDA	27	Flip08-12c	ICARDA
10	ILC-194	ICARDA	28	Flip05-15c	ICARDA
11	ILC-482	ICARDA	29	Flip08-58c	ICARDA
12	Gerit	LOCAL-IRAN	30	Flip03-110c	ICARDA
13	Arman	ICARDA	31	Flip98-55c	ICARDA
14	Hashem	ICARDA	32	Flip01-50c	ICARDA
15	Be Vanij	LOCAL-IRAN	33	Flip04-18c	ICARDA
16	Flip05-16c	ICARDA	34	Flip08-14c	ICARDA
17	Flip88-85c	ICARDA	35	Flip93-93c	ICARDA
18	Flip03-87c	ICARDA			

با ۲ آلل کمترین آلل را تکثیر نمودند. در مجموع آغازگرها ۴۹ آلل را در تمام ژنوتیپ‌ها تکثیر کردند، متوسط تعداد آلل تکثیرشده به‌ازای هر آغازگر ۳/۲۶ آلل بود. در مطالعه‌ای (Hajibarati et al., 2014) تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های نخود، با استفاده از نشانگرهای ریزماهوره بررسی شد و متوسط آلل تکثیرشده به‌ازای هر آغازگر ۳/۵ گزارش گردید. اغلب آغازگرها چندشکلی مناسبی را ایجاد کردند. تعداد آلل تکثیرشده توسط آغازگرها متفاوت است. با توجه به این‌که هر آغازگر شامل دو انتهای ۳' و ۵' است که در هنگام تکثیر DNA قطعات جدید در امتداد ۳' و ۵' شروع به تکثیر می‌کنند، انتهای ۳' آغازگر مهم‌ترین قسمت جهت اتصال مؤثر آغازگر در واکنش PCR می‌باشد (Erllich, 1989). بنابراین ممکن است در برخی موارد انتهای ۳' آغازگر اتصال مؤثر با ناحیه مکمل خود نداشته است و باند کمتری تکثیر شده باشد. میزان اطلاعات چندشکلی به‌دست‌آمده در جدول ۲ آورده شده است. این مقادیر از ۰/۲۰ تا ۰/۸۸ متغیرند (با متوسط ۰/۵۰). بیشترین مقدار میزان اطلاعات چندشکلی مربوط به آغازگرهای SSR1 و SSR21 است که به‌ترتیب برابر ۰/۸۸ و ۰/۶۶ درصد بود و کمترین آن به‌میزان ۰/۲۰ و ۰/۲۵ به‌ترتیب مربوط به آغازگرهای SSR25 و SSR62 است.

میانگین تعداد آلل هر نشانگر ریزماهوره مناسب‌بودن هر مکان ژنی را برای تخمین تنوع ژنتیکی نشان می‌دهد (Roder et al., 1998). بنابراین آغازگرهایی که تعداد آلل زیادی نشان داده‌اند برای بررسی تنوع ژنتیکی مناسب تشخیص داده می‌شوند. با توجه به‌میزان PIC و تعداد آلل (اطلاعات موجود در جدول فوق)، در این تحقیق مشخص شد که آغازگرهای شماره ۱۳، ۱۱، ۸، ۷، ۶، ۴، ۱ و ۱۵ برای بررسی تنوع ژنتیکی نیست به سایر آغازگرها مناسب‌تر هستند.

برای تعیین اندازه قطعات از نشانگر با باندهای استاندارد ۱۰۰ bp استفاده گردید. مشاهده و عکس‌برداری زیر نور UV به کمک دستگاه Gel Doc XR ساخت کمپانی Bio Rad انجام شد. داده‌ها بدین صورت امتیازدهی شدند که به‌حضور نوار کد ۱ و عدم حضور نوار کد صفر داده شد. در حقیقت وجود یا عدم وجود نوار (چندشکلی) با اعداد صفر و یک برای هر ژنوتیپ مشخص گردید. برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس داده‌های مولکولی، از ضریب تشابه جاکارد و روش^۱ UPGMA استفاده شد. تجزیه خوشه‌ای برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها و تجزیه هم‌هنگ اصلی نیز با استفاده از نرم‌افزار NTSYS، (Rohlf, 1998) انجام شد. اطلاعات چندشکلی آغازگرها (PIC) با استفاده از رابطه^۲ $PIC = 1 - \sum p_{ij}^2$ محاسبه شد که در این رابطه p_{ij} فراوانی آلل i در مکان ژنی j است (Anderson et al., 1993).

نتایج و بحث

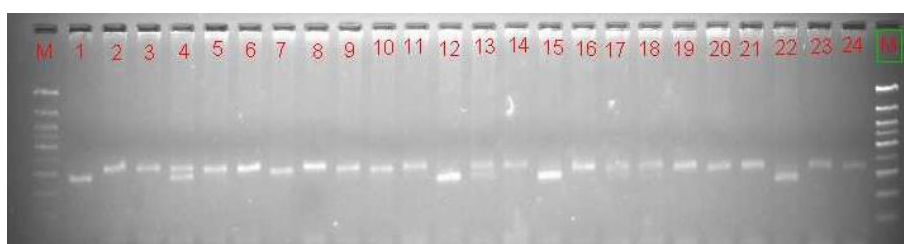
در نتیجه استفاده از ۱۵ جفت آغازگر SSR جهت تکثیر DNA در ۳۵ ژنوتیپ نخود، چندشکلی مشاهده شد (شکل ۱). اطلاعات مربوط به چندشکلی و تعداد نوارهای تکثیرشده توسط هر یک از این آغازگرها، در جدول ۲ آورده شده است. آغازگرها در تمام ژنوتیپ‌ها مکانی برای تکثیر داشته‌اند، به‌طوری‌که در تمام ژنوتیپ‌ها باند قابل امتیازدهی تکثیر شد، بنابراین این آغازگرها توالی مکمل بر روی ژنوم ژنوتیپ‌های مورد مطالعه داشتند. آغازگر SSR35 با پنج آلل و آغازگرهای SSR14، SSR21، SSR26 و SSR63 با تعداد چهار آلل بیشترین آلل را تکثیر کردند. آغازگرهای SSR61 و SSR7 نیز

² Unweighted Pair Group Method whit Arithmetic Average

جدول ۲- نام، دمای اتصال و اطلاعات چندشکلی به دست آمده آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش

Table 2. Name, annealing temperature and polymorphic information of primers

ردیف No.	نام آغازگر Primer	دمای اتصال Annealing temperature	تعداد باندهای تکثیر شده Number of amplified bands	تعداد باندهای چندشکل Number of polymorphic bands	درصد چندشکلی Polymorphic %	میزان اطلاعات چندشکلی PIC
1	SSR1	60	3	2	66	0.66
2	SSR42	52	3	2	66	0.44
3	SSR38	52	3	1	33	0.38
4	SSR21	52	4	2	50	0.88
5	SSR25	60	3	2	66	0.25
6	SSR28	50	3	2	66	0.61
7	SSR26	52	4	2	50	0.58
8	SSR22	55	3	1	33	0.55
9	SSR35	55	5	2	40	0.37
10	SSR62	55	3	2	66	0.20
11	SSR61	59	2	2	100	0.62
12	SSR58	60	3	1	33	0.28
13	SSR7	65	2	2	100	0.64
14	SSR14	60	4	2	50	0.48
15	SSR63	65	4	2	50	0.57



شکل ۱- الگوی نواری تعدادی از ژنوتیپ‌های نخود با استفاده از آغازگر SSR61 در ژل آغاز

Fig. 1. Banding pattern of some chickpea genotypes using SSR61 primer in agarose gel

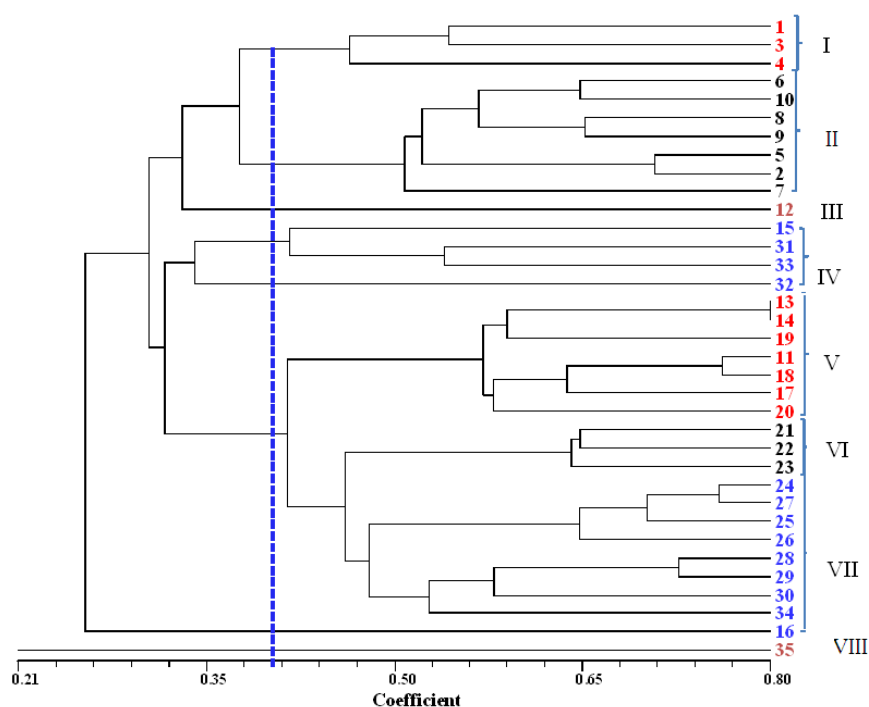
متوسط ۰/۸۳ است. (Ghaffari *et al.*, 2014) تنوع ژنتیکی ۶۰ نمونه نخود شامل ارقام محلی، واریته‌های زراعی و لاین‌های معرفی شده از ICRDA را با استفاده از صفات مورفولوژیک و ۱۴ نشانگر ریزماهواره مورد بررسی قرار دادند. میزان اطلاعات چندشکلی آغازگرها از ۰/۳۱ تا ۰/۸۹ متغیر بود. اغلب نشانگرها ۰/۵ > PIC داشتند. نتایج مطالعه ایشان در خصوص دامنه تغییرات PIC تقریباً مشابه نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر است. در بررسی‌های دیگری (Sefera *et al.*, 2011) تنوع ژنتیکی ۴۸ رقم نخود که در ۹ کشور معرفی شده بودند، با استفاده از ۴۸ نشانگر SSR مورد بررسی قرار گرفت. محتوای اطلاعات چندشکلی آغازگرها (PIC)، بین ۰/۹۱-۰/۳۷ و میانگین ۰/۷۷ بود. با توجه به مواد ژنتیکی و توالی آغازگرهای مورد استفاده در مطالعات مختلف، میزان PIC ممکن است در دامنه‌های متفاوتی قرار گیرد. (Botstian *et al.*, 1980) گزارش دادند که آغازگرهایی که PIC بزرگ‌تر از ۰/۵ داشته باشند، حاوی اطلاعات مفید زیاد، آن‌هایی که مقادیر PIC بین ۰/۲۵ و ۰/۵ دارند اطلاعات مفید و آغازگرهایی که PIC کمتر

به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که نشانگرهایی که بیشترین PIC را دارند، بهتر از دیگر نشانگرهای مورد استفاده توانسته‌اند فاصله ژنتیکی ارقام را مشخص کنند. در حالی که سایر نشانگرهای با مقدار کم PIC، به خوبی توانایی جداسازی ژنوتیپ‌ها را ندارند. نتیجه دیگر این است که ارتباط خاصی بین افزایش تعداد آلل و مقدار PIC محاسبه شده وجود ندارد (جدول ۲). محققان (Hajibarati *et al.*, 2014)، متوسط اطلاعات چندشکلی آغازگرهای ریزماهواره را در بررسی تنوع ژنتیکی نخود، ۰/۴۸ گزارش نمودند که نتایج تحقیق حاضر تقریباً با آن مطابقت دارد. در بررسی Aggarwal *et al.* (2015) که تنوع ژنتیکی ۱۲۵ رقم زراعی نخود با استفاده از نشانگرهای ISSR بررسی گردید، میزان اطلاعات چندشکلی آغازگرها بین ۰/۲۶ تا ۰/۹۱ با متوسط ۰/۷۲ گزارش شده است. (Torutaeva *et al.*, 2014) تنوع ژنتیکی ۲۴ نمونه نخود قرقیزستان را با استفاده از ۹ نشانگر SSR برای صفات میزان پروتئین و مواد معدنی مورد مطالعه قرار دادند و نتیجه گرفتند که میزان اطلاعات چندشکلی آغازگرها بین ۰/۷۱ تا ۰/۹۰ با

دندروگرام ژنوتیپ‌ها تعیین شد (Jamshidi, 2011). با قطع دندروگرام در نقطه ۴۰ درصد، هشت گروه به دست آمد که به صورت زیر می‌باشند. گروه یک: شامل ژنوتیپ‌های شماره ۱، ۳ و ۴ که هر سه ژنوتیپ منشأ ایکاردا دارند. گروه دو: شامل ژنوتیپ‌های شماره ۲، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۰ است که همه منشأ ایکاردا دارند. گروه سه: در این گروه ژنوتیپ شماره ۱۲ (رقم محلی گریت) به تنهایی قرار گرفته است. به نظر می‌رسد این ژنوتیپ با سایر ژنوتیپ‌ها در سطح مولکولی تفاوت‌هایی دارد. البته در کنار این ژنوتیپ، ژنوتیپ شماره ۱۵ (رقم محلی بیوه‌نیچ) قرار گرفته است، البته در گروهی دیگر، چون این دو ژنوتیپ جزو ارقام محلی کشور هستند، بنابراین احتمال دارد توالی‌های مشابهی را داشته باشند و تکثیر این توالی موجب شده باشد که در گروه‌بندی کنار هم قرار گیرند. علاوه بر این در گروهی که رقم بیوه‌نیچ قرار گرفته (گروه ۴)، ژنوتیپ‌های ۳۱، ۳۲ و ۳۳ قرار گرفته‌اند که همگی از ژنوتیپ‌های با منشأ ایکاردا هستند. گروه پنج: در این گروه ژنوتیپ‌های شماره ۱۱، ۱۳، ۱۴، ۱۷، ۱۸، ۱۹ و ۲۰ قرار گرفته‌اند. ژنوتیپ‌های شماره ۱۳ (آرمان، FILIP90-96C) و ۱۴ (هاشم، FILIP84-48C) جزو ارقام زراعی اصلاح‌شده با منشأ ایکاردا هستند. این دو ژنوتیپ از نظر بسیاری صفات شبیه به هم بوده و در سطح وسیع در مناطق معتدل و نیمه‌گرمسیر دیم کشور کاشت می‌شوند. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، در کنار همدیگر در این گروه قرار دارند. سایر ژنوتیپ‌های این گروه از مرکز بین‌المللی ایکاردا معرفی شده‌اند. در گروه شش، ژنوتیپ‌های شماره ۲۱، ۲۲ و ۲۳ قرار گرفته‌اند که همگی از مرکز ایکاردا معرفی شده‌اند. گروه هفت شامل ژنوتیپ‌های شماره ۱۶، ۲۴، ۲۵، ۲۶، ۲۷، ۲۸، ۲۹، ۳۰ و ۳۴ است. البته در کنار این گروه، ژنوتیپ شماره ۳۵ در گروهی جداگانه قرار گرفته است (گروه هشت). تمامی این ژنوتیپ‌ها جزو لاین‌های پیشرفته‌اند که از مرکز ایکاردا معرفی شده‌اند. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، گروه‌بندی فوق تا حدودی توانسته ژنوتیپ‌ها را از هم تفکیک نماید، ولی به‌طور کامل این کار انجام نشده است. به‌عنوان مثال ژنوتیپ‌های محلی گهر و بیوه‌نیچ تقریباً در کنار هم قرار گرفته‌اند، یا ارقام اصلاح‌شده هاشم و آرمان نیز در یک گروه قرار دارند، ولی لاین‌های پیشرفته با منشأ ایکاردا در گروه‌های متفاوتی قرار گرفته‌اند. ممکن است این ژنوتیپ‌ها در سطح مولکولی تفاوت‌هایی با هم داشته باشند یا این که نشانگر مورد استفاده نتوانسته است تنوع موجود را نشان دهد.

از ۰/۲۵ دارند، حاوی اطلاعات مفید اندکی هستند. در تحقیق حاضر میزان اطلاعات چندشکلی آغازگرها به‌طور متوسط برابر ۰/۵۰ بود این موضوع بیانگر این است که آغازگرها حاوی اطلاعات مفیدی بوده و به‌عبارت دیگر دارای توالی‌های مکمل مکان‌هایی در ژنوتیپ‌های مورد بررسی هستند که این توالی‌ها در ژنوتیپ‌ها تغییراتی دارند؛ به‌عبارتی از نظر طول با هم متفاوتند، زیرا پس از تکثیر چندشکلی نشان دادند.

ماتریس تشابه بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه با استفاده از ضریب تشابه جاکارد و روش UPGMA تشکیل گردید. ارزش‌های تشابه دامنه‌ای از ۰/۱۰ تا ۰/۸۰ درصد را داشتند. متوسط ضرایب تشابه ۰/۴۰ بود. کمترین تشابه ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های شماره ۳۵ و ژنوتیپ‌های شماره ۱، ۲، ۳، ۵، ۱۱ و ۱۲، ۱۰ (۰/۱۰) و بین ژنوتیپ‌های ۵ و ۳۰، ۱۲ (۰/۱۲) وجود داشت. رقم محلی گریت (شماره ۱۱) با اکثر لاین‌ها ضریب تشابه کمی داشت. به نظر می‌رسد چون گریت از ارقام محلی لرستان است و سایر ژنوتیپ‌ها از مراکز بین‌المللی وارد کشور شده‌اند، تشابه کمتری با رقم گریت دارند. بیشترین تشابه بین ژنوتیپ‌های شماره ۱۳ و ۱۴ یعنی ارقام هاشم (FILIP84-48C) و آرمان (FILIP90-96C) (۰/۸۰)، وجود داشت. این دو رقم حاصل پروژه‌های اصلاحی مشترک مراکز تحقیقاتی کشور با مؤسسه ICARDA هستند، خصوصیات زراعی مطلوب و تقریباً مشابه هم را دارند و بیشتر در مناطق معتدل و نیمه‌گرمسیر دیم کشور کشت می‌شوند. تنوع تقریباً بالایی بین ژنوتیپ‌ها وجود داشت؛ به‌طوری‌که ژنوتیپ‌هایی با درصد تشابه ژنتیکی کم و ژنوتیپ‌هایی با درصد تشابه ژنتیکی بالا در بین آن‌ها وجود داشت. در مطالعات مختلف ضریب تشابه بین ژنوتیپ‌های مختلف نخود محاسبه شده است؛ از جمله می‌توان به مطالعه Gemechu & Endashaw (2012) اشاره کرد که در آن تنوع ژنتیکی ۱۵۵ نمونه نخود زراعی اتیوپی با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که دامنه تنوع در داخل جمعیت‌ها ۷۳ درصد و در بین جمعیت‌ها ۲۷ درصد است. در حالی که تنوع در بین توده‌های محلی از ۳۶ تا ۵۷ درصد متغیر بود. (Hajibarati et al, 2014) با محاسبه ضریب تشابه جاکارد، ارزش‌های تشابه بین ژنوتیپ‌ها نخود را از ۰/۴۷ تا ۰/۹۴ گزارش دادند. با توجه به این‌که در مطالعات مختلف از ژنوتیپ‌های مختلف و نشانگرهای با توالی متفاوت استفاده می‌شود، دامنه تشابه ژنوتیپ‌ها نیز متفاوت خواهد بود. گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در شکل ۲ نشان داده شده است. در این شکل میانگین ضرایب تشابه جهت تعیین محل برش



شکل ۲- دندروگرام ژنوتیپ‌های نخود با استفاده از روش UPGMA بر اساس ضریب تشابه جاکارد

Fig. 2. Dendrogram of chickpea genotypes using UPGMA method based on Jaccard's similarity coefficient

تحقیق مبین آن است که همبستگی تقریباً مناسبی بین ماتریس ضرایب تشابه جاکارد و کوفنتیک وجود دارد که این موضوع صحت گروه‌بندی انجام شده را تأیید می‌کند. به‌منظور توزیع فضایی ژنوتیپ‌ها بر اساس فاصله آن‌ها از همدیگر از روش تجزیه هم‌هنگ اصلی (PCoA)^۱ استفاده شد. تجزیه هم‌هنگ اصلی در شکل ۳ به‌صورت دوبعدی و در شکل ۴ به‌صورت سه‌بعدی نشان داده شده است.

با مقایسه فواصل فضایی و فواصل ژنتیکی که در روش تجزیه خوشه‌ای به‌دست آمده است، مشاهده می‌شود که هر دو روش ژنوتیپ‌ها را تقریباً به‌طور مشابهی از همدیگر تفکیک نموده‌اند. همان‌طور که در شکل دو بعدی ملاحظه می‌شود، ارقام محلی گریت و بیوه‌نیچ (شماره‌های ۱۲ و ۱۵)، نزدیک هم و در ناحیه ۲ قرار گرفته‌اند. همچنین دو رقم زراعی اصلاح‌شده آرمان و هاشم (شماره‌های ۱۳ و ۱۴) نیز در مجاور هم، ولی در نواحی ۳ و ۴ قرار گرفته‌اند. بنابراین در این مورد نتایج تجزیه کلاستر را تأیید می‌نمایند.

علاوه‌براین اغلب لاین‌های پیشرفته با منشأ ایکاردا در ناحیه ۱ این پلات قرار گرفتند. در پلات سه‌بعدی نیز ارقام محلی گریت و بیوه‌نیچ (شماره‌های ۱۲ و ۱۵) در کنار هم و ارقام اصلاح‌شده هاشم و آرمان (شماره‌های ۱۳ و ۱۴)

ضریب همبستگی بین ماتریس ضرایب کوفنتیک و ماتریس تشابه که به این همبستگی اصطلاحاً همبستگی کوفنتیک گویند، در این مطالعه، $r = 0.76$ بود که برآزش تقریباً مناسب ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها است و صحت گروه‌بندی را نشان می‌دهد. این ضریب همبستگی می‌تواند به‌عنوان معیاری برای نکویی برآزش گروه‌بندی باشد (Ismaili et al., Rohlff, 1998 & Schaut et al., 1999). در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های گندم دیم با استفاده از نشانگر نیمه تصادفی ISJ، همبستگی بین ماتریس ضرایب کوفنتیک و ماتریس ضرایب تشابه جاکارد را ۰/۸۶ برآورد نمودند که بیانگر برآزش مناسب ژنتیکی بین ارقام و صحت گروه‌بندی بود. نتایج تحقیق حاضر نیز تقریباً با نتایج تحقیق فوق تطابق دارد.

همچنین (Panwar et al., 2010) در بررسی روابط ژنتیکی ژنوتیپ‌های ارزن با استفاده از نشانگرهای RAPD، SSR و ژن نشانگر سیتوکروم P450، با انجام آزمون مانتل ضریب همبستگی کوفنتیک بالایی (۰/۹۵) بین ماتریس تشابه نشانگرها به‌دست آوردند. برخی محققان بر این نکته تأکید دارند که ضریب همبستگی کوفنتیک بالا دلالت بر مؤثر بودن تجزیه خوشه‌ای در تفکیک ژنوتیپ‌ها بر اساس داده‌های مولکولی دارد (Tilman et al., 1996). نتایج این

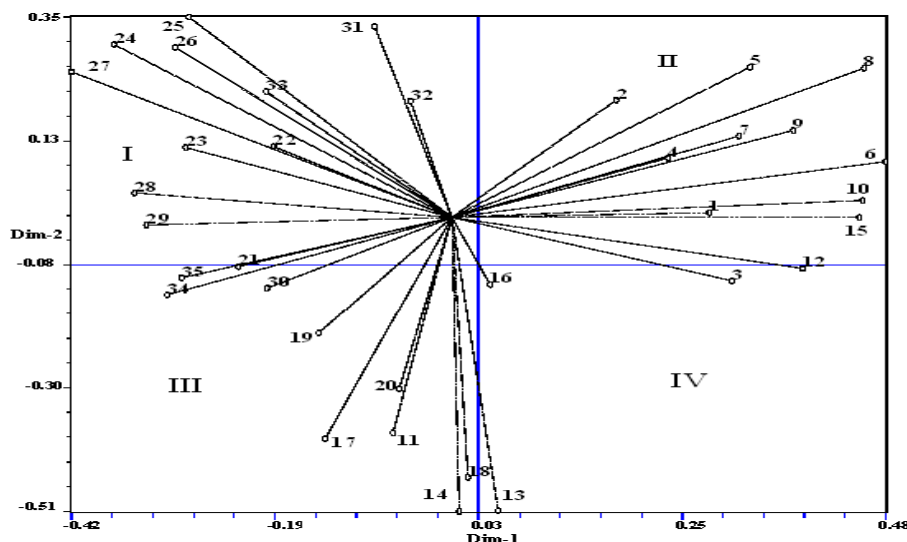
^۱ Principle Coordinate Analysis

نتایج به دست آمده با استفاده از نشانگرهای SSR و محاسبه میزان اطلاعات چندشکلی آغازگرها (PIC) نشان داده که مقدار PIC این آغازگرها در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه تقریباً بالا بوده و بیانگر این است که آغازگرها نواحی مکمل برای تکثیر در ژنوتیپ‌ها را داشته و برای بررسی تنوع ژنتیکی نخود مناسب هستند. گروه‌بندی صورت گرفته تا حدودی توانست ژنوتیپ‌های نخود شامل ارقام محلی، ارقام زراعی اصلاح شده و لاین‌های معرفی شده از ایکاردا را از هم تفکیک نماید، به طوری که این ژنوتیپ‌ها تقریباً در گروه‌های جداگانه قرار گرفتند. همچنین این گروه‌بندی توانست فاصله ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های نخود را نشان دهد.

چنانچه تنوع ژنوتیپ‌ها با استفاده از صفات زراعی نیز بررسی شود، می‌توان از این تنوع ژنتیکی و فاصله ژنتیکی که بین ژنوتیپ‌های نخود مورد مطالعه مشاهده شده است، برای کارهای اصلاحی بعدی و انجام تلاقی بین ژنوتیپ‌ها، به منظور بالابردن کیفیت و کمیت عملکرد که هدف نهایی در اصلاح گیاهان است و همچنین سایر صفات، استفاده کرد. پیشنهاد می‌شود تنوع ژنوتیپ‌ها با استفاده از صفات زراعی نیز بررسی شود تا با تلفیق نتایج دو روش، بتوان نتیجه بهتری گرفت و از آن بهره بیشتری برد.

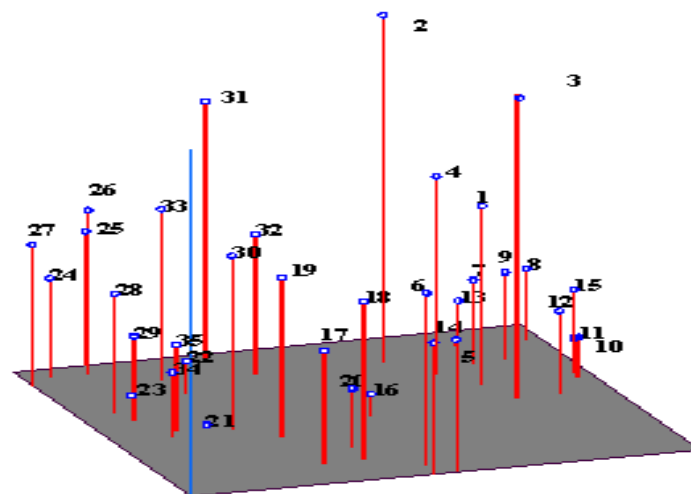
نزدیک به هم قرار گرفته‌اند و اغلب لاین‌های معرفی شده با منشأ ایکاردا در قسمت سمت چپ این پلات قرار گرفته‌اند. بنابراین نتیجه گرفته می‌شود که از پلات‌های دو و سه بعدی می‌توان جهت تأیید روش گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها استفاده نمود.

Choudhary *et al*, (2012) در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های نخود با نشانگرهای SSR و سپس استفاده از تجزیه هم‌هنگ اصلی توانستند تفاوت بین واریته‌های زراعی و نمونه‌های وحشی نخود را به خوبی تشخیص دهند. Schaut & Stam (1997) از تجزیه هم‌هنگ اصلی با استفاده از داده‌های به دست آمده از نشانگر AFLP، نشان دادند که این تجزیه، اطلاعات حاصل از تجزیه خوشه‌ای را تأیید نموده و ارقام دو ردیفه و شش‌ردیفه جو را به صورت گرافیکی متمایز می‌نماید. (Ismaili *et al*, (2010) با استفاده از داده‌های به دست آمده از نشانگر ISJ نشان دادند که تجزیه هم‌هنگ اصلی و پلات‌های دو بعدی و سه بعدی ژنوتیپ‌های گندم نان و گندم دوروم را به خوبی از هم تفکیک می‌نمایند و نتایج این پلات‌ها با نتایج به دست آمده از تجزیه خوشه‌ای با هم مطابقت دارند.



شکل ۳- نمودار پراکنش دو بعدی ژنوتیپ‌های نخود بر اساس تجزیه هم‌هنگ اصلی با استفاده از داده‌های آغازگر SSR

Fig. 3. dimensional graph of chickpea genotypes based on principle co-ordinate analysis using SSR primers data



شکل ۴- نمودار سه بعدی ژنوتیپ‌های نخود بر اساس تجزیه همابنگ اصلی با استفاده از داده‌های آغازگر SSR

Fig. 4. Three dimensional graph of chickpea genotypes based on principle co-ordinate analysis using SSR primers data

منابع

1. Aggarwal, H., Rao, A., Kumar, A., Singh, J., Rana, S.J., Naik, P.K., and Chhonkar, V. 2105. Assessment of genetic diversity among 125 cultivars of chickpea (*Cicer arietinum* L.) of Indian origin using ISSR markers. Turkish Journal of Botany 39: 218-226.
2. Anderson, J.A., Churchill, G.A., Autrique, J.E., Tanksley, S.D., and Sorrells, M.E. 1993. Optimization parental selection for genetic linkage maps. Genome 36: 181-186.
3. Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., and Davis, R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics 32: 314-331.
4. Choudhary, P., Khanna, S.M., Jain, P.K., Bharadwaj, C., Kumar, J., Lakhera, P.C., and Srinivasan, R. 2012. Genetic structure and diversity analysis of the primary gene pool of chickpea using SSR markers. Genetics and Molecular Research 11: 891-905.
5. Doyle, J.J., and Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.
6. Erlich, H.A. 1989. Polymerase Chain Reaction. Journal of Clinical Immunology 9(6): 437-447.
7. Food and Agricultural Organization. 2012. Food and Agricultural Organization Statistical Database. Rome. Available at Web site www.faostat.fao.org
8. Ghaffari, P., Talebi, R., and Keshavarzi, F. 2014. Genetic diversity and geographical differentiation of Iranian landrace, cultivars, and exotic chickpea lines as revealed by morphological and microsatellite markers. Physiology and Molecular Biology of Plants 20(2): 225-233.
9. Gemechu, K., and Endashaw, B. 2012. Genetic diversity and population structure of Ethiopian chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasm accessions from different geographical origins as revealed by microsatellite markers. Plant Molecular Biology Reporter 30(3): 654-665.
10. Hajibarati, Z., Saidi, A., Talebi, R., and Hajibarati, Z. 2014. Assessment of genetic diversity of chickpea germplasm (*Cicer arietinum* L.) by using SSR molecular marker. Crop Biotechnology 6: 85-94. (In Persian with English Summary).
11. Ismaili, A., Nazarian, F., Samiei, K., and Drikvand, R. 2010. Evaluation of genetic diversity among rainfed wheat genotypes using semi-random ISJ molecular marker. Final Research Report Lorestan University. (In Persian with English Summary).
12. Jamshidi, S. 2011. NTSYSpc 2.02, implementation in molecular biodata analysis (clustering, screening, and individual selection). Proceedings of 4th International Conference on Environmental and Computer Science. Singapore, 16-18 September, 2011, pp. 165-169.
13. Josphig, C.P., and Nguyen, H.T. 1993. RAPD analysis based intervarietal genetic relationships among hexaploid wheat's. Plant Science 93: 95-103.
14. Khush, G.S. 1999. Green revolution: preparing for the 21st century. Genome 42: 646-655.

15. Ministry of Jihade-Agriculture of Iran. 2014. Crop Agricultural Statistical Database. Volume I. Available at Web site [www http://amar.maj.ir](http://amar.maj.ir). (In Persian).
16. Naghavi, M.R., Rashidi Monfared, S., and Huberto, G. 2012. Genetic diversity in Iranian chickpea (*Cicer arietinum* L.) landraces as revealed by microsatellite markers. *Czech Journal of Genetic and Plant Breeding* 48 (3): 131-138.
17. Panwar, P., Nath, M., Yadav, V.K., and Kumar, A. 2010. Comparative evaluation of genetic diversity using RAPD, SSR and cytochrome p450 gene based markers with respect to calcium content in finger millet (*Eleusine coracana* L. Gaertn.). *Journal of Genetics* 89: 121-133.
18. Qadir, S.A., Datta, S., Singh, N.P., and Kumar, S. 2007. Development of highly polymorphic SSR markers for chickpea (*Cicer arietinum* L.) and their use in parental polymorphism. *Indian Journal of Genetetic* 67(4): 329-333.
19. Roder, M.S., Korsun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M.H., Leroy, P., and Ganal, M.W. 1998. A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149: 2007-2023.
20. Rohlf, M. 1998. NTSYSpc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 20.02. Department of Ecology and Evaluation. State University of New York.
21. Schaut, J.W., Qi, X., and Stam, P. 1997. Association between relationship measures based on AFLP markers, pedigree data and morphological traits in barely. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 1169-1168.
22. Sefera, T., Abebie, B., Gaur, P.M., Assefa, K., and Varshney, R.K. 2011. Characterization and genetic diversity analysis of selected chickpea cultivars of nine countries using simple sequence repeat (SSR) markers. *Crop and Pasture Science* 62(2): 177-187.
23. Sharma, K.K., Crouch, J.H., and Hosh, C. T. 2002. Application of biotechnology for crop improvement: prospects and constraints. *Plant Science* 163: 381-395.
24. Singh, R., Sharma, P., Rajeev, K., Varshney, R., Sharma, S.K., and Singh, N.K. 2008. Chickpea improvement. Role of wild species and Genetic Markers. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews* 25: 267-314.
25. Tilman, D., Wedin, D., and Knopps, J. 1996. Productivity and sustainability influenced by biodiversity in grassland ecosystems. *Nature* 379: 718- 720.
26. Torutaeva, E., Asanaliev, A., Prieto-Linde, M.L., Zborowska, A., Ortiz, R., Bryngelsson, T., and Garkava-Gustavsson, L. 2014. Evaluation of microsatellite-based genetic diversity, protein and mineral content in chickpea accessions grown in Kyrgyzstan. *Hereditas* 151: 81-90.

Investigation of genetic diversity among chickpea genotypes using SSR markers

Mir Drikvand*, R.

Department of Plant Breeding, Khorramabad Branch, Islamic Azad University, Khorramabad, Iran

Received: 11 July 2015
Accepted: 16 January 2016

DOI: 10.22067/ijpr.v8i1.48163

Introduction

Utilization of genetic diversity in crop plants is very important for breeding objectives. Chickpea is the third most important grain legume and its seeds contain protein that is an important energy source for human. It ranks third worldwide among grain legumes. In Iran this crop cultivated at about 473000 hectares with an average annual production of 195000 tons. Genetic diversity of chickpea genotypes using SSR markers were examined in several studies. The objective of this study was investigation of genetic diversity among some chickpea genotypes using molecular data obtained from SSR primers.

Materials & Methods

Genetic diversity of 35 chickpea genotypes (Including cultivated, local variety and promising line) were assessed using 15 SSR primers. These primers were selected from previous study. DNA was extracted from two-week old plants of each genotype following the protocol of CTAB-method. After DNA extraction, the quantity of DNA was measured under 0.8% agarose gel electrophoresis. DNA concentration was estimated using Picodrop. The final DNA concentration of each template stock was adjusted to 50 ng/μl. The PCR was performed in a Thermal Cycler (Bio-Rad Model thermal cycler) in a volume of 15 μL. The amplification step was as follows: 1 cycle at 94°C for 1 min, then 40 cycles comprising 94°C for 5 min, annealing of primer at 50-65°C (depending on the primer) for 1 min. The final extension was carried out at 72°C for 10 min. The amplification products were electrophoresed on 3.5% agarose gels (combination of 50% Metaphor and 50% LE Agarose), and for staining, 3 μL Gel Red and dye (the 1.5:1.5 ratio) was added to each sample. Photographed was performed using the Bio-Rad Gel Doc. Molecular data was analyzed using the NTSYS-pc software version 2.02.

Results & Discussion

All of fifteen SSR primers were generated scorable bands. Totally 49 alleles (ranged between 2 to 5 alleles per each locus) with an average 3.26 allele per locus was distinguished. These results are agreement with the results of some study and did not match to other. One of the reasons may be due to the use of different genetic material and SSR markers.

Majority of primers identified high level of polymorphism. Jaccard similarity coefficient values among genotypes, ranged from 0.10 to 0.80, average value of similarity coefficient was 0.40. The highest similarity was found between Hashem and Arman genotypes. Polymorphic information content (PIC) ranged from 0.20 to 0.88 (average 0.50). The highest (0.88) and the lowest (0.20) value of PIC was pertained to SSR21 and SSR62 Primers, respectively. A high mean PIC value can be attributed to the use of more informative markers. Unweighted pair group method of the arithmetic average (UPGMA), based on Jaccard similarity clustering form a dendrogram with eight genotypes group. Eight groups can be distinguished by truncating the dendrogram at mean similarity coefficient value of 0.40. Clustering somewhat was distinguished chickpea genotypes, as cultivated genotypes and local were put together. In the present study SSR markers almost succeed in separation of genotypes but this marker could not separate promising chickpea completely. Principal co-ordinate analysis (PCoA) was carried out on the mean pairwise genetic distances to display the

*Corresponding Author: drikvand_r@yahoo.com; Mobile: 09163672770

genetic relationship of genotypes in the PCoA 2D and 3D plot. 2 and 3D plot were confirmed the results of cluster analysis. Cophenetic correlation showed that molecular data and cluster was corresponded.

Conclusion

SSR primers that used in this study are more informative in chickpea genotypes. The genotypes almost showed diverse and distinct SSR patterns. It was concluded that SSR marker was suitable for evaluation of genetic diversity in chickpea genotypes and this genetic diversity can be used in chickpea breeding programs. To achieve better results in crossing programs, we recommended also these genotypes get evaluated using morphological and agronomic traits.

Key words: Chickpea, Genetic diversity, PIC, SSR marker