نشریهٔ پژوهش‌های حبوبات ایران
جلد۶ شمارهٔ۲، صفحهٔ ۱۸-۹، نیمهٔ دوم ۱۳۹۴

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 6, No. 2, 2015, p. 9-18

بررسی فیلوژنی ژنوتیپ‌های نخود ایکاردا با تودهٔ بومی بیونیج (Bivanij) غرب ایران

مهین رحیمی[1]، فرهاد نظریان فیروزآبادی[2*] و احمد اسماعیلی[3]

۱- دانش‌آموخته بیوتکنولوژی دانشگاه پیام نور واحد کرج
۲- دانشیار بیوتکنولوژی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان
۳- دانشیار ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۱/۰۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۲۴

چکیده

با وجود اینکه ایران یکی از خاستگاهای عمده نخود (*Cicer arietinum* L.) در دنیا به شمار می‌آید، اطلاعات اندکی از ساختار تنوع ژنتیکی این گیاه در ایران موجود است. در این تحقیق، تنوع ژنتیکی ۱۸ ژنوتیپ نخود اصلاح شده و مورد کشت و کار در غرب ایران با استفاده از نشانگر تصادفی RAPD مورد مطالعه قرار گرفتند. از میان ۱۸ آغازگری که در مطالعه به‌کار رفتند، ۱۷ آغازگر (آغازگر OPM-05 قطعه‌ای تولید نکرد) در مجموع ۲۰۸ قطعه DNAی واضح و قابل امتیازدهی تکثیر نمودند. از مجموع کل تعداد باندهای حاصل، تعداد ۲۰۱ باند چندشکل (۹۶/۶۶٪) بودند. متوسط تعداد باننددهی به‌ازای هر آغازگر۱۲/۲ باند بود. تجزیه خوشه‌ای داده‌ها براساس ضریب تشابه دایس (Dice) و به روش UPGMA (ضریب همبستگی کوفنتیک؛ r =۰/۹۸) ژنوتیپ‌های نخود را به شش گروه تقسیم نمود. بر مبنای دندروگرام حاصل، بیشترین فاصله ژنتیکی بین رقم بومی و خوشه ششم به‌دست آمد. قرارگرفتن بخش وسیعی از ژنوتیپ‌ها در داخل یک گروه، بیانگر این نکته است که با وجود عدم حضور ژنوتیپ‌های تکراری در این ژرم‌پلاسم، اکثر ژنوتیپ‌ها شباهت ژنتیکی بسیار بالایی با یکدیگر نشان می‌دهند. همچنین گروه‌بندی توده‌ی محلی بیونیج در بزرگترین خوشه می‌تواند احتمالاً بیانگر این موضوع باشد که ژنوتیپ‌های اصلاح شده‌ی ایکاردا از یک توده‌ی بومی غرب ایران منشأ گرفته باشند. نتایج این مطالعه می‌تواند در جلوگیری از آسیب‌پذیری ژرم‌پلاسم نخود زراعی، افزایش تنوع ژنتیکی و مستندسازی ژرم‌پلاسم نخود مفید فایده باشد.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، ژرم‌پلاسم، نخود، نشانگر مولکولی RAPD

مقدمه

حبوبات نقش مهمی در تأمین نیازهای غذایی جامعه بشری، به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه ایفاء می‌کنند. در بین حبوبات، نخود[1] نسبت به دیگر حبوبات، سازگاری بیشتری با شرایط اقلیمی ایران دارد و با توجه به محدودیت‌های موجود در تأمین پروتئین‌های حیوانی، این گیاه می‌تواند بخشی از پروتئین مورد نیاز کشور را تأمین نماید (SabaghPour, 1998; Bagheri *et al.,* 1999). آگاهی از چگونگی تنوع ژنتیکی و اطلاع از قرابت فامیلی بین افراد موجود در ژرم‌پلاسم یک گونه، یکی از پیش‌شرط‌های اساسی موفقیت در برنامه‌های به‌نژادی است. این مسئله به مدیریت بهتر منابع ژرم‌پلاسم، تعیین ژنوتیپ‌های تکراری و در نهایت به انتخاب والدین مناسب برای برنامه‌های دورگ‌گیری کمک می‌کند. برای اصلاح ارقام نخود و نیز نگهداری و حفظ ذخایر توارثی، بررسی تنوع موجود بین ارقام نخود از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Sharma *et al.,* 1995; Samizadeh-Lahiji, 1997; Tilman & Wedin, 1996). میزان تولید نخود در ایران پایین است (Millan *et al.,* 2006). تحقیقات متعدد، محدودیت پایه ژنتیکی و ناسازگاری این گیاه با انواع وحشی نخود در تلاقی‌های بین گونه‌ای را از عمده‌ترین علل پایین‌بودن تنوع ژنتیکی و در نهایت عملکرد این گیاه ذکر می‌کنند (Rao *et al.,* 2007). کلکسیون جهانی ژرم‌پلاسم ارقام نخود، تنوع کمی دارد و برای افزایش عملکرد می‌بایست ارقام جدیدی را با پتانسیل بالا معرفی نمود (Collard *et al.,* 2003; Robertson *et al.,* 1997). کمبود ژرم‌پلاسم جهانی نخود نیازمند روش‌های به‌نژادی مؤثر این گیاه است (Robertson *et al.,* 1997). به‌علاوه، فرسایش ژنتیکی نخود به‌واسطه‌ی تنش‌های زنده و غیرزنده به دلایل متعدد سبب شده است تا تنوع ژنتیکی در ژرم‌پلاسم این گیاه کاهش یابد. تولید و به‌نژادی هیبریدهای بین‌گونه‌ای، قادر است میزان تنوع ژنتیکی

*نویسنده مسئول: همراه: ۰۹۱۶۶۶۰۸۱۹۴، Nazarian.f@lu.ac.ir

[1] *Cicer arietinum*

را افزایش داده و در به‌نژادی گیاهی مانند نخود مفید باشد (Singh *et al.,* 1994; Van Rheenen *et al.,* 1993). برنامه‌های به‌نژادی نخود بایستی روی اصلاح پتانسیل ژنتیکی همراه با افزایش عملکرد و مقاومت علیه تنش‌های زنده و غیرزنده متمرکز شوند. به منظور افزایش پتانسیل ژنتیکی، می‌بایست تنوع ژنتیکی کارآمدی را بین گونه‌های موجود و نمونه‌های وحشی ایجاد نمود (Robertson *et al.,* 1997; Collard *et al.,* 2003). اگرچه گزینش مبتنی بر فنوتیپ با تکیه بر داده‌های آماری و طرح‌های آزمایشی امکان‌پذیر است، اما به دلیل ماهیت ژنتیکی صفات و رفتار ژن‌ها در اکثر موارد، انتخاب‌ها با خطا همراه هستند. برای بررسی تنوع ژنتیکی از روش‌های مختلفی از جمله توزیع جغرافیایی مبتنی بر جمع‌آوری نمونه‌ها از مناطق مختلف، اختلافات مورفولوژیکی، آیزوزایم و بررسی‌های سیتولوژیکی استفاده شده است که هریک از این روش‌ها به علت محدودیت‌هایشان قادر به تعیین دقیق و سریع تنوع ژنتیکی نمی‌باشند (Gharhyazi, 1997). بررسی تنوع ژنتیکی به کمک نشانگرهای مولکولی DNA، در ارقام مختلفی از گیاه نخود صورت گرفته است. نشانگر مولکولی RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) یکی از نشانگرهای مولکولی متداول برای بررسی تنوع ژنتیکی موجود بین ارقام و گونه‌های گیاهی است. این نشانگر از قدرت مناسبی برای بررسی چندشکلی بین ارقام برخوردار است (Byazid, 1996; Emamjomeh, 2000). نشانگر RAPD نشانگری کم‌هزینه و مؤثر برای مطالعات تاکسونومی و فیلوژنیک است (Abo-elwafa *et al.,* 1995; Sharma *et al.,* 1995; Friesen *et al.,* 1997; Wolff & Morgan-Richards, 1998). سادگی فنی تکنیک RAPD استفاده از آن را برای بررسی پلی‌مورفیسم، شناسایی ژنوتیپ و اختلاف ژنتیکی در طیف وسیعی از گیاهان فراهم می‌کند (Abo-elwafa *et al.,* 1995; Sharma *et al.,* 1995; Friesen *et al.,* 1997; Wolff & Morgan-Richards, 1998). تاکنون از نشانگر تصادفی RAPD در گیاه نخود برای بررسی تنوع ژنتیکی استفاده شده است (Sant *et al.,* 1999). برای مثال، در تحقیقی ۱۷ جمعیت نخود وحشی و زراعی براساس ویژگی‌های مورفولوژیکی، آلوزایم‌ها و به کمک نشانگر RAPD، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و در نهایت نشان داده شد که همبستگی نزدیکی بین گونه‌های وحشی و زراعی نخود وجود دارد (Hu & Carlos, 1991). براساس نتایج Davis (1995) نشانگر مولکولی RAPD نسبت به آلوزایم و نشانگرهای پروتئینی از کارایی بیشتری برای تعیین تنوع ژنتیکی برخوردار است. چنین نتایجی روی نخود نیز گزارش شده است (Gaur & Slinkard, 1990). نشانگر RAPD توانسته است سطح بالایی از پلی‌مورفیسم را در ارقام نخود ایرانی نشان دهد (Weeden, 1992; Sharma *et al.,* 1995). پژوهشگران همبستگی بالایی را بین ماتریس حاصل از RFLP, RAPD, AFLP و میکروساتلیت گزارش نمودند و پیشنهاد کردند که به‌جای RFLP می‌توان از این روش‌ها نیز استفاده نمود.

علی‌رغم آنکه غرب کشور به‌خصوص استان‌های لرستان و کرمانشاه قطب کشت و کار نخود در کشور هستند، اما متأسفانه در مورد ارقام نخود موجود در این مناطق بررسی و مطالعه جامعی صورت نگرفته است. لذا با توجه به نیاز روش‌های به‌نژادی به شناخت تنوع ژنتیکی بین گونه‌های مختلف گیاهی و با عنایت به این که نخود از نظر اقتصادی از اهمیت بالایی برخوردار است و دارای مصارف و مزایای متعددی است و همچنین این گیاه به شدت در معرض فرسایش ژنتیکی قرار دارد، لازم است تحقیقات بیشتر در زمینه تعیین چندشکلی بین ژنوتیپ‌های مختلف آن صورت گیرد. هدف از اجرای این تحقیق تعیین میزان فاصله ژنتیکی بین ۱۸ ژنوتیپ نخود و میزان تنوع ژنتیکی بین آنها با استفاده از نشانگر RAPD بود.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و شناسایی چندشکلی مولکولی ارقام و ژنوتیپ‌های پیشنهادی برای کشت و کار در غرب ایران، تعداد ۱۸ ژنوتیپ نخود از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان لرستان تهیه شدند (جدول ۱). ژنوتیپ‌های شماره‌ی ۲ تا ۱۸ جزو ژنوتیپ‌های امیدبخشی هستند که از مرکز تحقیقات بین‌المللی ICARDA به ایران ارسال شده‌اند. در این جدول رقم بیونیج (Bivanij) جزو توده‌های بومی استان کرمانشاه است. این رقم سازگاری خوبی به شرایط استان‌های غرب کشور دارد و هنوز هم توسط کشاورزان استان‌های کرمانشاه و لرستان کشت می‌شود. حدود سه هفته بعد از کاشت گلدانی بذور (تعداد ۱۰ عدد بذر)، از تعداد پنج بوته از گیاهان جوان به تصادف سه برگ جوان و تازه جمع‌آوری و بلافاصله در نیتروژن مایع منجمد شدند. سپس نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شده و در ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج DNA نگهداری شدند. به منظور استخراج DNAی ژنومی، حدود ۰/۴ گرم برگ جوان از هر گیاه در نیتروژن مایع پودر شد و DNA ژنومی به روش CTAB استخراج گردید (Murray & Thompson, 1980). پس از بررسی سالم بودن DNAی ژنومی در جریان الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد، غلظت و خلوص آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر تعیین گردید (نتایج نشان داده نشده‌اند). در

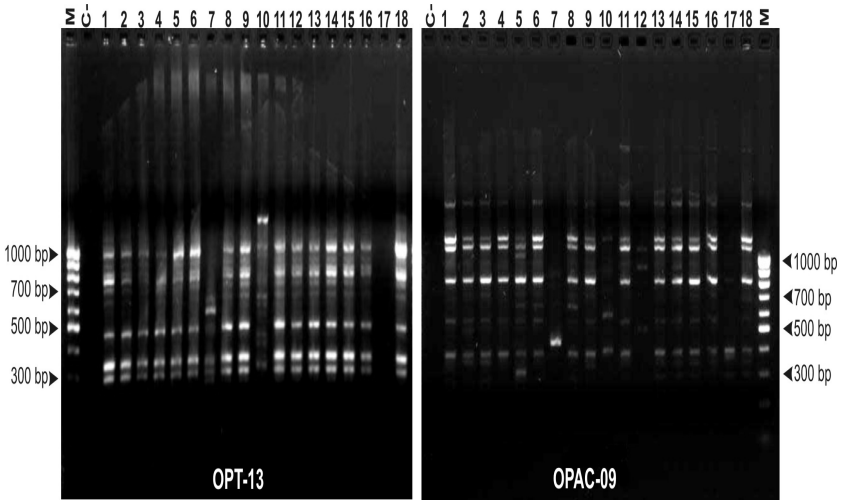
این تحقیق از ۱۸ آغازگر تصادفی استفاده گردید (جدول ۲) که براساس تولید بیشترین چندشکلی براساس مطالعات سایر منابع انتخاب شده بودند. واکنش زنجیره پلیمراز (PCR) در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل یک میکرولیتر آنزیم Tag DNA Polymerase (۱۰ u/ µl) (فزاپژو، تهران)، ۱۰ میکرولیتر DNA ژنومی (۳۰ ng/µl)، یک میکرولیتر از هرکدام از آغازگرها (۱۰۰ pmol /µl)، یک میکرولیتر dNTPs (۰/۲ mM) و ۶میکرولیتر بافر مخصوص آنزیم پلیمراز با غلظت نهایی ۱× صورت گرفت. واکنش PCR بعد از بهینه‌سازی در ۴۰چرخه صورت گرفت. در آغاز کل واکنش به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد (پیش واسرشت سازی) حرارت داده شد. هر چرخه از واکنش، ۳ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد (واسرشت سازی)، یک دقیقه در دمای خاص نشستن آغازگرها (جدول ۲)، دو دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (بسط آغازگرها) انجام گردید. بعد از اتمام ۴۰ چرخه، واکنش برای مدت ۵ دقیقه (بسط نهایی) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد. محصولات حاصل از تکثیر DNAی ژنومی روی ژل آگارز ۱/۵ درصد حاوی اتیدیوم بروماید برای مدت ۲ ساعت در ۱۰۰ولت الکتروفورز گردیدند. واکنش PCR برای تک‌تک آغازگرها بهینه گردید و از تکرارپذیری نسبی (بیش از ۹۵ درصد) باندها پس از سه واکنش PCR اطمینان حاصل گردید. الگوی باندی حاصل از تجزیه RAPD روی ژل آگارز، براساس وجود یا عدم وجود باند خاص در نمونه‌ها، به‌صورت یک یا صفر امتیازدهی گردید. سپس براساس ماتریس صفر و یک حاصل، فاصله یا شباهت ژنتیکی بین افراد با استفاده از ماتریس تشابه بین ژنوتیپ‌های نخود با استفاده از ضریب تشابه Dice و روش UPGMA به کمک نرم‌افزار NTSYSpc 2. محاسبه گردید.

نتایج و بحث

نشانگرهای تصادفی RAPD به دلیل هزینه‌ی کم، سادگی اجرا، عدم نیاز به اطلاعات ترادف DNA و تولید اطلاعات مقدماتی مورد نیاز برای گروه‌بندی ارقام و ژنوتیپ‌ها، از مقبولیت خوبی در بین محققان بر خوردار هستند (Ahmad & Slinkard, 1992). به منظور ارزیابی چند شکلی‌های حاصل از تکثیر DNA در بین ۱۷ ژنوتیپ و یک توده‌ی بومی نخود، از هجده آغازگر تصادفی استفاده شد. از مجموع هجده آغازگر مورد مطالعه، هفده آغازگر در مجموع ۲۰۸ باند واضح بین ۱۰۰bp تا ۱۳۰۰bp تکثیر نمودند. آغازگر OPM-05 علی‌رغم آزمون دماهای مختلف در PCR، هیچ‌گونه باندی تولید نکرد (جدول ۲). میانگین تعداد باندهای تکثیری برای هر آغازگر ۱۲/۲ بود. از مجموع تعداد کل باندها، ۲۰۱ باند چندشکل (۹۶/۶٪) بودند. تعداد قطعات تکثیری بین ۵ و ۱۹ متفاوت بود. در بین آغازگرها، بیشترین تعداد قطعات مربوط به آغازگر OPA-07 با ۱۹ باند و کمترین تعداد مربوط به آغازگر OPA-16 با ۵ باند بود. میزان درصد چندشکلی در بین ۱۷ آغازگر از ۸۱/۸ تا ۱۰۰درصد متغیر بود. همان‌طوری‌که از نتایج برمی‌آید، آغازگرهای مورد مطالعه از نظر کارایی تولید چندشکلی با هم اختلاف داشتند و حتی یکی از آنها به نام OPM-05 نتوانست هیچ قطعه‌ای را تکثیر نماید، علی‌رغم آنکه این آغازگر در مطالعه‌ای از جمله آغازگرهای با کارایی بالا بود (Iruela *et al.,* 2002). اگرچه در مطالعه مذکور کلکسیونی از ۷۵ ژنوتیپ شامل گونه‌های زراعی، یک‌ساله و چندساله و همچنین تعداد بیشتری (۳۰ آغازگر) استفاده شده است، میانگین تعداد قطعات تولیدی در این مطالعه (۸/۵) پایین‌تر از متوسط تعداد قطعات تولیدی در مطالعه‌ی حاضر است. همچنین تعداد قطعات حاصل به‌ازای هر آغازگر و درصد چندشکلی حاصل در مطالعه‌ی اخیر به‌ترتیب بیشتر از تعداد قطعات تولیدی و درصد چندشکلی حاصل (۷۴/۴٪) در مطالعه‌ی مذکور است (Rao *et al.,* 2006). در مطالعه‌ای دیگر، ارقام و توده‌های بومی نیز به ۱۲/۳ باند به‌ازای هر آغازگر رسید که با متوسط تعداد باند تولیدی توسط این مطالعه تفاوتی ندارد (Fazeli & Choghamirza, 2011). درصد چندشکلی بالا را می‌توان به قرابت بالای این ژنوتیپ‌ها نسبت داد، به‌طوری‌که متوسط تعداد قطعات تولیدی به دلیل قرابت ژنوتیپ‌ها و برخورداری از شجره‌ی مشابه، نسبتاً بالاست.

ماتریس تشابه بین ژنوتیپ‌های نخود با استفاده از ضریب تشابه Dice و روش UPGMA تشکیل گردید (جدول ۳). چنان‌که در شکل ۲ دیده می‌شود بین ژنوتیپ‌های نخود، شباهت ژنتیکی وجود دارد. تحقیقات نشان داده‌اند که نشانگرهای بیوشیمیایی (Ahmad & Slinkard, 1992; Labdi *et al.,* 1996) و نشانگرهای مبتنی بر DNA و از آن جمله RAPD (Sant *et al.,* 1999; Iruela *et al.,* 2002; Sudupak *et al.,* 2002) ، تنوع ژنتیکی گیاه نخود را ضعیف ارزیابی کرده‌اند. با این حال سیستم‌های نشانگری مبتنی بر میکروساتلیت‌ها (Sharma, 1995) به‌خوبی می‌توانند تنوع ژنتیکی نخود را آشکار سازند. همان‌طوری‌که از نتایج این تحقیق بر می‌آید، نشانگر RAPD به تنهایی کارایی خوبی در جداسازی و تشخیص تنوع در این ژنوتیپ‌ها ندارد. به رغم مشکلات RAPD و هماهنگ با نتایج دیگران (Sant *et al.,* 1999; Iruela *et al.,* 2002; Sudupak *et al.,* 2002) این نشانگر توانست ژنوتیپ‌های نخود را از همدیگر جدا کند. با این حال قدرت این جداسازی خیلی زیاد نبود. یکی از عمده‌ترین

دلایل در این خصوص ممکن است پیشینه مشترک این ژنوتیپ‌ها باشد که از شجره آنها و محل اصلاح آنها در ICARDA مشخص است. ژنوتیپ بومی Bivanij بیشترین شباهت را با Flip 98-22C (۸۶/۲درصد) و کمترین شباهت را با ژنوتیپ Flip 99-66C نشان داد. با توجه به خاستگاه نخود و شباهت بالای بقیه ژنوتیپ‌ها با این توده محلی، این‌گونه به‌نظر می‌رسد که چنین ژنوتیپ‌هایی ممکن است از این توده و یا توده‌ای ایرانی با خصوصیات مشابه منشأ گرفته باشند.

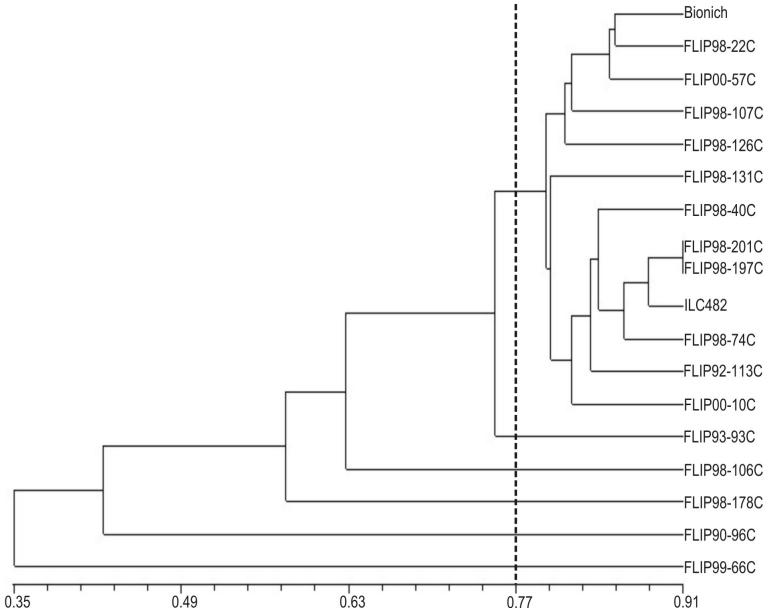


شکل ۱- پروفایل الکتروفورز محصول PCR دو آغازگر تصادفی OPAC-09 و OPT-13

اعداد از ۱ تا ۱۸ شماره‌ی ژنوتیپ‌ها براساس جدول ۱ هستند. M نشانگرbp ۱۰۰ را نشان می‌دهد.

Fig. 1. RAPD fingerprinting of chickpea genotypes generated by two different random primers

M: 100 bp size marker



شکل ۲- دندروگرام روابط ژنتیکی ۱۸ ژنوتیپ نخود

اسامی ژنوتیپ‌ها براساس جدول ۱ است. ماتریس تشابه بین ژنوتیپ‌های نخود با استفاده از ضریب تشابه Dice و روش UPGMA ترسیم شده است.

Fig. 2. Dendrogram representing genetic relationships among 18 chickpea genotypes

The genotype names are the same as those shown in table 1. Similarity matrix among genotypes was created based on Dice similarity coefficient and denderogram was drawn by UPGMA

جدول ۱- اسامی ژنوتیپ‌های نخود به همراه شجره آنها

بیونیچ نام یک توده‌ی محلی استان کرمانشاه است که از روستایی به همین نام در اطراف شهرستان کرند جمع‌آوری شده است.

Table 1. Name and pedigree of chickpea genotypes

Bivanij is a landrace from Kermansha province and has been collected from a village in Kerend suburb

ردیف Row	نام Name	شجره Pedigree	منشأ Origin
1	Bivanij	شاهد محلی	کرمانشاه
2	FLIP98-22C	95TH2/FLIP91-18C*×FLIP90-96C	ICARDA
3	FLIP00-57C	96TH22-2-BH-122/FLIP92-146C*×FLIP93-53C	ICARDA
4	FLIP98-107C	95TH47/(FLIP88-6C×ILC3373)×FLIP89-4C	ICARDA
5	FLIP98-131C	95TH47/(FLIP88-6C×ILC3373)×FLIP89-4C	ICARDA
6	FLIP98-126C	95TH47/(FLIP88-6C×ILC3373)×FLIP89-4C	ICARDA
7	FLIP99-66C	96TH61/(FLIP91-159C×ILC1278)× FLIP91-149C	ICARDA
8	FLIP93-93C	89TH258/(FLIP85-122C×FLIP82-150C) FLIP86-77C	ICARDA
9	FLIP98-40C	95TH70/(FLIP81-77C× PLOT29283)× S93320	ICARDA
10	FLIP90-96C	(ILC5342/FLIP84-93C)	ICARDA
11	FLIP92-113C	89TH141/ILC1934×FLIP85-122C	ICARDA
12	FLIP98-106C	95TH47/(FLIP88-6C×ILC3373)×FLIP89-4C	ICARDA
13	FLIP98-74C	95TH17/FLIP90-100C×S93040	ICARDA
14	FLIP98-201C	95TH4/FLIP91-52C*×FLIP93-65C	ICARDA
15	FLIP98-197C	95TH11/FLIP90-95C*×FLIP92-19C	ICARDA
16	ILC482	-	ICARDA
17	FLIP98-178C	95TH8/FLIP91-124C*×FLIP90-19C	ICARDA
18	FLIP00-10C	96TH7/FLIP90-196C*×FLIP90-15C	ICARDA

جدول ۲- توالی، نام دمای آنیلینگ، تعداد باندهای پلی‌مورف و درصد چندشکلی برای آغازگرها

آغازگرها همگی ۱۰نوکلئوتیدی هستند.

Table 2- Primer sequences, name, Tm, number of polymorphic bands and the percentage of polymorphism

All primes are 10 nucleotides long.

ردیف Row	نام آغازگر Primer	توالی ('3→'5) Sequence	دما آنیلینگ Tm (°C)	تعداد قطعات چند شکل No. Polymorphic bands	درصد پلی‌مورفیسم Polymorphism (%)
1	OPZ-10	CCGACAAACC	34	16	100
2	OPZ-19	GTGCGAGCAA	35	11	90.66
3	OPY-18	GTGGAGTCAG	39	8	100
4	OPY-02	CATCGCCGCA	32	13	100
5	OPY-10	CAAACGTGGG	32	6	100
6	OPS-01	CTACTGCGCT	33	9	100
7	OPJ-20	AAGCGGCCTC	33	15	100
8	OPT-13	AGGACTGCCA	34	17	94.44
9	OPX-14	ACAGGTGCTG	32	11	90.66
10	OPA-07	GAAACGGGTG	31	19	100
11	OPA-08	GTGACGTAGG	29	12	100
12	OPA-16	AGCCAGCGAA	36	5	100
13	OPAB-17	TCGCATCCAG	33	10	90.91
14	OPAC-09	AGAGCGTACC	31	18	100
15	OPM-05	GGGAACGTGT	33	0	0
16	OPI-13	CTGGGGCTGA	35	11	84.61
17	OPC-05	GATGACCGCC	35	9	81.81
18	OPAF-16	TCCCGGTGAG	35	10	100

قرارگرفتن بخش وسیعی از ژنوتیپ‌ها در داخل یک کلاستر بیانگر این است که اگرچه توده‌های تکراری در این ژرم‌پلاسم وجود ندارد ولی اکثر توده‌ها شباهت ژنتیکی نسبتاً بالایی با یکدیگر دارند و در بخش وسیعی از ژنوم خود مشابه هستند.

اگرچه ایران یکی از خاستگاهای این گیاه است، به نظر می‌رسد که گروه‌بندی توده‌ها براساس مارکرهای RAPD تصویر واضحی از پراکنش جغرافیایی آنها نشان نمی‌دهد.

جدول ۳- ضریب تشابه ژنوتیپ‌ها براساس ۱۷ آغازگر RAPD

Table 3- Similarity coefficient among 17 chickpea genotypes based on 17 RAPD markers

ژنوتیپ Genotype	Bivanij	Flip9822	Flip0057	Flip98107	Flip98131	Flip98126	Flip9966	Flip9393	Flip9840	Flip9096	Flip92113	Flip98106	Flip98201	Flip9874	Flip98197	ILC482	Flip98178	Flip0010
Bivanij	1.00																	
Flip9822	0.84	1.00																
Flip0057	0.84	0.84	1.00															
Flip98107	0.80	0.80	0.83	1.00														
Flip98131	0.79	0.78	0.78	0.79	1.00													
Flip98126	0.81	0.79	0.81	0.80	0.80	1.00												
Flip9966	0.29	0.36	0.35	0.34	0.38	0.33	1.00											
Flip9393	0.74	0.70	0.78	0.73	0.77	0.75	0.37	1.00										
Flip9840	0.83	0.78	0.78	0.71	0.79	0.77	0.35	0.77	1.00									
Flip9096	0.42	0.42	0.44	0.39	0.42	0.43	0.27	0.36	0.41	1.00								
Flip92113	0.82	0.81	0.83	0.76	0.82	0.81	0.37	0.78	0.81	0.44	1.00							
Flip98106	0.63	0.63	0.62	0.59	0.62	0.63	0.36	0.56	0.62	0.33	0.63	1.00						
Flip98201	0.85	0.80	0.79	0.74	0.78	0.83	0.30	0.76	0.83	0.44	0.82	0.65	1.00					
Flip9874	0.79	0.79	0.77	0.74	0.78	0.77	0.35	0.71	0.83	0.45	0.82	0.64	0.83	1.00				
Flip98197	0.83	0.78	0.79	0.74	0.79	0.81	0.34	0.72	0.87	0.46	0.83	0.66	0.90	0.88	1.00			
ILC482	0.80	0.80	0.77	0.75	0.80	0.84	0.35	0.71	0.80	0.43	0.83	0.64	0.87	0.84	0.88	1.00		
Flip98178	0.55	0.56	0.65	0.57	0.62	0.58	0.38	0.57	0.55	0.43	0.62	0.39	0.56	0.55	0.57	0.63	1.00	
Flip0010	0.81	0.75	0.78	0.74	0.78	0.79	0.37	0.77	0.79	0.43	0.79	0.57	0.83	0.80	0.83	0.81	0.58	1.00

تنوع ژنتیکی و فاصله ژنتیکی که بین ژنوتیپ‌های نخود مورد مطالعه با استفاده از نشانگرهای تصادفی (RAPD) مشاهده شد، می‌تواند برای انجام تلاقی به منظور بالابردن کمیت و کیفیت عملکرد که هدف نهایی در اصلاح گیاهان است به‌کار رود. با استفاده از برآورد تنوع ژنتیکی حجم تلاقی‌های ممکن کاهش می‌یابد و شانس تولید نتاج برتر از این تلاقی‌ها افزایش خواهد یافت.

منابع

1. Abo-elwafa, A., Murai, K., and Shimada, T. 1995. Intra-and Inter-specific variation in Lens revealed by RAPD markers. Theoretical and Applied Genetics 90: 335-340.
2. Ahmad, F., and Slinkard, A.E. 1992. Genetic relationships in the genus *Cicer* L. as revealed by polyacrylamide gel electrophoresis of seed storage proteins. Theoretical and Applied Genetics 84: 688-692.
3. Bagheri, A., Nezami, A., and Ganjali, A. 1999. Chickpea agronomy and Breeding. Jehad-e-daneshgahi, Mashhad. (In Persian).
4. Bayazid, B. 1996. The study of genetic diversity among cultivated chickpea cultivars under two moisture levels and correlation analysis of agronomical Traits. M.Sc Thesis, Faculty of Agriculture, Tabriz University. (In Persian with English Summary).
5. Collard, B.C.Y., Pang, E.C.K., and Taylor, P.W.J. 2003. Selection of wild *Cicer* accessions for the generation of mapping population segregation to ascochyta blight. Euphytica 130: 1-9.
6. Davis, T.M. 1995. A method of enhancing detection and interpretation of co-dominant RAPD markers. Theoretical and Applied Genetics 91: 582-588.
7. Emamjomeh, A. 2000. Evaluation of genetic distance drought resistance and analysis of adaptation, using RAPD-PCR in Iranian chickpea. M.Sc Thesis, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran. (In Persian with English Summary).
8. Fazeli, F., and Choghamirza, K. 2011. Genetic variation in Iranian chickpea (*Cicer arietinum* L. Kabuli type) based on agronomic traits and RAPD marker. Iranian Journal of Agronomy and Plant Breeding 27(4): 555-579. (In Persian with English Summary).
9. Friesen, N., Fritsch, R., and Bachmann, K. 1997. Hybrid origin of some ornamentals of *allium* subgenus Melanocrommyum verified with GISH and RAPD. Theoretical and Applied Genetics 95: 1229-238.
10. Gaur, P.M., and Slinkard, A.E. 1990. Genetic control and linkage relations of additional isozyme markers in chickpea. Theoretical and Applied Genetics 80: 648-659.
11. Gharhyazi, B. 1997. Application of DNA markers in plant breeding (Abstract). In: Abstract book of the 4th Iranian Agronomy and Plant Breeding Congress. (In Persian).
12. Hu, J., and Carlos, F. 1991. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. Plant Cell Reports 10: 505-511.
13. Iruela, M., Rubio, J., Cubero, J.I., Gill, J., and Millan, T. 2002. Phylogenetic analysis in the genus *Cicer* and cultivated chickpea using RAPD and ISSR markers. Theoretical and Applied Genetics 104: 643-651.
14. Labdi, M., Robertson, L.D., Singh, K.B., and Charrier, A. 1996. Genetic diversity and phylogenetic relationships among the annual *Cicer* species as revealed by isozyme polymorphisms. Euphytica 88: 181-188.
15. Lu, J. 1996. Comparative analysis of genetic diversity in pea assessed by RFLP and PCR based methods. Theoretical and Applied Genetics 93: 1103-1111.
16. Millan, T., Clarke, J., Siddique, H.M., Buhariwalla, K., Gaur, M., Kumar, J., Gill, J., Kahl, G., and Winter, P. 2006. Chickpea molecular breeding: New tools and concepts. Euphytica 147: 81-103.
17. Murray, M.G., and Thompson, W.F. 1980. RAPD isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acid Research 8: 4321-4325.

18. Rao, L.S., UshaRani, P., Deshmukh, P.S., Kumar, P.A., and Panguluri. S.K. 2007. RAPD and ISSR fingerprinting in cultivated chickpea (*Cicer arietinum* L.) and its wild progenitor *Cicer reticulatum* Ladizinsky. Genetic Resources and Crop Evolution 54 (6): 1235-1244.
19. Robertson, L.D., Ocampo, B., and Singh, K.B. 1997. Morphological variation in wild annual *Cicer* species in comparison with the cultigens. Euphytica 95: 309-319.
20. Sabaghpour, S.H. 1998. Chickpea Genetics. Agriculture Education Publisher. (In Persian).
21. Samiezadeh-Lahiji, H. 1997. The assessment of genetypic and phenotypic variation of quantitative traits, their correlation with Iranian chickpea yield. M.Sc. Thesis, Islamic Azad University of Karaj, Karaj, Iran. (In Persian).
22. Sant, V.J., Patankar, A.G., Sarode, N.D., Mhase, L.B., Sainani, M.N., Deshmukh, R.B., Ranjekar, P.K., and Gupta, V.S. 1999. Potential of DNA markers in detecting divergence and in analyzing heterosis in Indian elite chickpea cultivars. Theoretical and Applied Genetics 98: 1217-1225.
23. Sharma, P.C. 1995. Abundance and polymorphism of di-triand tetra nucleotide tandem repeats in chickpea. Theoretical and Applied Genetics 90: 90-960.
24. Sharma, S.K., Dawson, I.K., and Waugh, R. 1995. Relationship among cultivated and wild lentils revealed by RAPD analysis. Theoretical and Applied Genetics 91: 647-654.
25. Singh, K.B., Malhotra, R.S., Halila, M.H., Nights E.J., and Verma, M.M. 1994. Current status and future strategy in breeding chickpea for resistance to biotic and abiotic stresses. Euphytica 73: 137-149.
26. Sudupak, M.A., Akkaya, M.S., and Kencea, K. 2002. Analysis of genetic relationships among perennial and annual *Cicer* species growing in turkey using RAPD markers. Theoretical and Applied Genetics 105(8): 1220-1228.
27. Tilman, D., and Wedin, D. 1996. Productivity and sustainability influenced by biodiversity in grassland ecosystem. Nature 379: 718-720.
28. Van Rheenen, H.A., Pundir, R.P.S., and Miranda, J.H. 1993. How to accelerate the genetic improvement of a recalcitrant crop species such as chickpea. Current Science 65: 414-417.
29. Weeden, N.F. 1992. Marker locus, Adh-1, for resistance to pea enation mosaic virus. Journal of Heredity 79(2): 128-131.
30. Wolff, K., and Morgan-Richards, M. 1998. PCR markers distinguish plantago major subspecies. Theoretical and Applied Genetics 96: 282-286.

Iranian Journal of Pulses Research
Vol. 6, No. 2, 2015, p. 9-18

Assessment of relationship between chickpea genotypes from ICARDA with a western Iranian landrace (Bivanij)

Rahimi[1], R., Nazarian-Firouzabadi[2*], F., & Ismaili[2], A.

1- MSc. Student, Payam-e-Nour University, Alborz, Karaj
2- Associate professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture Lorestan University, Khorramabad

Received: 21 January 2014
Accepted: 15 March 2015

Introduction
Despite the fact that Iran is one of the major chickpea (*Cicer arietinum* L.) center of origins, limited information is available regarding chickpea genetic variation and diversity. Genetic diversity information is crucial for the choice of proper parents to establish new breeding programs. Chickpea germplasm is poor, suggesting the need for gaining enough knowledge of genetic diversity among available chickpea genotypes. A number of molecular techniques have been developed to unveil the genetic potentials of plant materials. Random Amplified Polymorpic DNA (RAPD) seems to be a reliable molecular marker to investigate the genetic diversity of chickpea genotypes in IRAN. The objectives of present research was: (1) to investigate the power of RAPD markers for estimation of genetic diversity among chickpea genotypes in west of Iran, (2) to investigate the genetic relationships between chickpea genotypes, and (3) to determine whether chickpea genotypes could be distinguished by RAPD marker data.

Materials and Methods
Random amplified polymorphic DNA markers (RAPD) were used to assess the genetic relationship between 18 different chickpea genotypes representing the cultivated chickpea cultivars in west of Iran. Genomic DNA was isolated according to Murray & Thompson (1980). Eighteen oligonucleotide primers were selected according to the number of literature published with the highest number of polymorphic bands. Polymerase chain reaction (PCR) was carried out in a total volume of 25 µl including 2 units of Taq DNA polymerase, 30 ng of genomic DNA template, 10 pmol of primers, 0.2 mM of dNTPs, and 2.5 µl of 10 × reaction buffer. DNA amplifications were performed in a thermocycler. The thermal profile was as follow: One time denaturation at 94°C (5 min), followed by 40 cycles of denaturation at 94°C (3 min), annealing at each primer proper T_m (1 min) and extension at 72°C (2 min) and one time final extension at 72°C (5 min). PCR products were analyzed on 1.5 % agarose gels in TBE buffer running at 100 V for 2h. The gels were stained using *ethidium bromide* and visualized with UV light. The reproducibility of the DNA band patterns was evaluated duplicate gel electrophoresis analysis. Only clear and repeatedly amplified RAPD DNA bands were scored as (1) for present bands and (0) for absent ones.

Results and Discussion
Out of 18 random RAPD primers used in this study, 17 primers amplified genomic DNA across all the genotypes. In total, 201 polymorphic bands (96.63%) out of 208 reproducibly scoreable RAPD markers were generated (OPM-05 primer did not produce any band). On average, 12.2 bands per primer were observed in RAPD analysis. Cluster analysis using Dice coefficient of similarity and UPGMA (r=0.98) method based on polymorphic fragments, grouped all eighteen genotypes into 6 groups with 77% accuracy. Based on dendrogram obtained, Bivanij (Landrace genotype) showed the least similarity with the 6th cluster. Although there was no redundancy among the genotypes tested, the majority of genotypes were clustered together. ICARDA genotypes may have been improved from an Iranian landrace.

Conclusions
Genetic diversity among chickpea cultivars using RAPD markers have been studied by a number of researchers. Although in most cases a low level of polymorphism with RAPD markers have been reported, this study showed a considerable amount of polymorphism. Furthermore, our results showed that cultivated chickpea cultivars in west of Iran have many genes in common. We recommend further studies to be

* **Corresponding Author:** Nazarian.f@lu.ac.ir, Mobile: 09166608194

conducted by using more number of chickpea genotypes as well as more robust molecular markers. Results of this study can be used in germplasm management/conservation practices, developing core collections and as guidance to plant geneticist and breeders for planning future explorations, and crop improvement purposes. These findings may help to avoid genetic vulnerability and erosion, keeping chickpea genetic diversity and germplasm.

Key words: Chickpea, DNA, Genetic diversity, Germplasm, RAPD molecular marker