



## ارزیابی تنوع ژنتیکی لاین‌های نخود با استفاده از نشانگرهای فیزیولوژیکی و مولکولی RAPD در شرایط آبی و دیم

• عزت‌اله فرشادفر، استاد دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی  
• محسن فرشادفر، استادیار پژوهشی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کرمانشاه

تاریخ دریافت: بهمن ماه ۱۳۸۲ تاریخ پذیرش: آبان ماه ۱۳۸۳

### چکیده

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی، ارزیابی لاین‌های مقاوم به خشکی و بررسی پلی‌مورفیسم ژنتیکی لاین‌های نخود بر اساس نشانگرهای ریخت‌شناختی و مولکولی با استفاده از نشانگر RAPD، تعداد ۲۱ لاین نخود در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در شرایط آبی و دیم در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی و آزمایشگاه تحقیقاتی دانشکده علوم دانشگاه رازی مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج حاصل از تجزیه واریانس لاین‌ها اختلاف معنی‌داری را برای عملکرد در شرایط آبی (Yp)، و شرایط دیم (Ys) و شاخص تحمل تنش (STI) نشان داد که نشان دهنده وجود تنوع ژنتیکی بین لاین‌ها و امکان انتخاب برای مقاومت به کمبود آب است. مقایسه ضریب تغییرات فنوتیپی و ژنوتیپی بین Ys، Yp و STI نشان داد که بیشترین تغییرات به ترتیب متعلق به STI، Ys، Yp بود که حاکی از تغییرات بیشتر در شرایط دیم است. به علاوه مقایسه ضریب تغییرات فنوتیپی (FCV) و ضریب تغییرات ژنوتیپی (GCV) نشان داد که بیشترین تنوع جنبه ژنتیکی دارد تا محیطی. نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین عملکرد متعلق به لاین شماره ۱۱ و بیشترین STI متعلق به لاین‌های شماره ۱۱ و ۲۰ بود. بررسی نمودار سه بعدی نشان داد که لاین‌های ۴، ۷، ۸، ۱۱، ۱۴ و ۲۰ در گروه A قرار گرفتند یعنی هم دارای مقاومت به کمبود آب و هم محصول مناسب در شرایط آبی و دیم هستند. نتایج حاصل از تجزیه RAPD-PCR مناسب بودن تکنیک RAPD را برای تعیین پلی‌مورفیسم بین نمونه‌های نخود مورد تأیید قرار داد. از ۵ آغازگر به کار رفته برای ۲۱ لاین نخود در قالب تکنیک RAPD-PCR ۶۹ باند پلی‌مورفیک تولید شد که متوسط بانددهی برای هر پرایمر ۸/۱۳ باند پلی‌مورفیک بود. دندروگرام حاصل از مهاجرت‌های باندی نشان داد که لاین‌های نخود را می‌توان به سه گروه که هر گروه خود دارای چندین زیرگروه است تقسیم نمود. بر مبنای دندروگرام حاصل بیشترین فاصله ژنتیکی بین لاین‌های ۱۰ و ۱۴ با لاین‌های ۲ و ۱۳ بود. مقایسه دندروگرام حاصل از آزمایش مولکولی و آزمایش مزرعه‌ای نشان داد که نتایج این دو آزمایش حدود ۷۱/۵ درصد یکدیگر را تأکید می‌کنند یعنی لاین‌های ۴، ۷، ۸ و ۱۱ و رقم محلی بیونیچ در یک گروه قرار گرفته‌اند.

کلمات کلیدی: تنوع ژنتیکی، مقاومت به خشکی، شاخص تحمل تنش، نشانگر مولکولی RAPD و نخود

Pajouhesh &amp; Sazandegi: No: 63 pp: 63-69

**Evaluation of genetic diversity in chickpea lines using physiological and RAPD molecular markers**

By: E. Farshadfar, Professor of College of Agriculture, Razi University

M. Farshadfar, Assistant Professor of Agriculture and Natural Resources Research Centre of Kermanshah

To investigate genetic diversity, evaluation of drought resistance and genetic polymorphism of chickpea lines in the field and molecular level using RAPD molecular marker, 21 lines of chickpea were tested in a randomized completely block design with three replications under two irrigated and rainfed conditions in the research station of Faculty of Agriculture; and research laboratory of Faculty of Science Razi University of Kermanshah. The results of analysis of variance exhibited high significant differences among the lines for yield potential (Yp), stress yield (Ys) and stress tolerance index (STI), indicating the existence of genetic variation and possibility of selection for drought resistance. Comparison of phenotypic coefficient of variation and genotypic coefficient of variation among Yp, Ys and STI showed that most of the variation was related to STI, Ys and Yp, respectively, displaying more variation in rainfed conditions. It was also observed that most of this variation was genetic. The results of mean comparison displayed that the highest potential and stress yield were belonged to the line number 11 (FLIP 92-60 C) and the most STI was related to the lines number 11 and 20. Evaluation of three dimensional plot showed that the best drought resistant lines with suitable yield under rainfed and irrigated conditions were the lines 4,7,8,11,14 and 20 (group A). The results of RAPD analysis indicated the appropriateness of this techniques for determination of polymorphism among the samples. From the 5 primer used with RAPD-PCR technique, 69 polymorphic band was produced and the average band produced for each primer was 13.8 polymorphic band. According to the dendrogram resulted from the banding pattern the lines were classified into 3 groups and 8 sub-groups. According to the resulted dendrogram the farthest genetic distance was between the lines (10), and 14 with the lines 2 and 13. It is therefore suggested to get advantage of the crosses (10/14), in a chickpea breeding program., (13) and (2,14), (2,13) Comparison between the obtained dendrogram resulted from molecular experiment and the dendrogram resulted from field experiment indicated that the results of these two experiments were 71.59 in agreement with each other, providing a good background for studying drought tolerance based on the molecular markers.

**Key words:** Genetic University, Drought resistance, RAPD, STi**مقدمه**

برای بررسی چند شکلی بین ارقام برخوردار است (۱، ۲، ۱۹، ۲۲). این تکنیک در سال ۱۹۹۰ توسط William, Kubelik (۲۹) به کار رفت. Hu و Carlos (۱۶) در سال ۱۹۹۱ هفده جمعیت نخود وحشی و زراعی را براساس ویژگی‌های مورفولوژیکی، آلوزایمها و نشانگر RAPD مورد تجزیه خوشه‌ای قرار دادند و در نهایت همبستگی نزدیکی بین گونه‌های وحشی و زراعی گزارش نمودند. Davis (۱۰) در سال ۱۹۹۵ بیان داشت که RAPD نسبت به آلوزایم و نشانگرهای پروتئینی از حساسیت بیشتری برای تعیین تنوع برخوردار است. چنین نتایجی توسط Slinhard و Gaur (۱۴) در سال ۱۹۹۰ روی نخود نیز گزارش شده است. Weeden (۲۸) در سال ۱۹۹۲ و نیز Sharma (۲۱) با استفاده موفقیت آمیز تکنیک RAPD سطح بالایی از پلی‌مرفیسم را در ارقام نخود ایرانی گزارش نمودند.

هدف از این تحقیق بررسی تنوع صفات کمی بین لاین‌های نخود، ارزیابی لاین‌های مقاوم به کمبود آب و بررسی پلی‌مرفیسم ژنتیکی لاین‌های نخود ایرانی استفاده از نشانگرهای ریخت شناختی و مولکولی RAPD می‌باشد.

حبوبات نقش مهمی در تأمین نیازهای غذایی جامعه بشری به ویژه در کشورهای در حال توسعه ایفاء می‌کنند. در بین حبوبات نخود از نظر سطح زیر کشت در مقام چهارم جهان قرار دارد. سهم تولید نخود در ایران معادل ۱/۴ درصد تولید جهانی نخود است که حدود ۵۵ درصد آن محدود به استان‌های نواحی غرب کشور است (۱۲). افزایش عملکرد نخود در ایران از پیشرفت کمی برخوردار بوده است که می‌توان با افزایش تنوع و انجام تلاقی‌های لازم این مشکل را حل کرد (۲۷). برای اصلاح ارقام نخود و نیز نگهداری و حفظ ذخائر تواری آن بررسی تنوع موجود بین ارقام نخود از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۵، ۲۲، ۲۵). شناسایی تنوع ژنتیکی به نژادگران را در امر شناسایی والدین برای انجام تلاقی‌های مطلوب یاری می‌رساند (۱). در گذشته بررسی تنوع ژنتیکی در گیاهان به وسیله تجزیه صفات مورفولوژیکی و یا بیوشیمیایی انجام می‌شد. از آنجائی که فنوتیپ تحت تأثیر محیط قرار می‌گیرد، لذا تعیین تنوع ژنتیکی به همراه روشهای مولکولی چشم انداز نوینی را برای ارزیابی تنوع زیستی فراهم آورده است (۹، ۲۰، ۲۳). یکی از نشانگرهای مولکولی جهت بررسی تنوع موجود بین ارقام، نشانگر RAPD است که از قدرت مناسبی

## مواد و روشها

Ys عملکرد ژنوتیپها در آزمایش دیپم و Yp میانگین عملکرد کلیه ژنوتیپها در محیط بدون تنش است. سپس برای Ys، Yp و STI تجزیه واریانس صورت گرفت و با استفاده از نرم افزار آماری SPSS و ترسیم نمودار سه بعدی ژنوتیپها از نظر مقاومت به تنش گروه بندی شدند. سپس با استفاده از این سه معیار و تجزیه خوشه ای با روش UPGMA نوع ژنتیکی بین ارقام مشخص شد. در بخش مطالعات مولکولی، دندورگرام به روش UPGMA و براساس مهاجرت های باندی و بر مبنای ضریب تشابه Nei (۱۸) و ضریب فاصله اقلیدسی (۶) رسم گردید. سپس این دو روش با هم مقایسه شدند و همبستگی بین آنها تعیین گردید.

$$e_{jk} = \left[ \sum_{i=1}^n (X_{ij} - X_{ik})^2 \right]^{1/2}$$

ضریب فاصله اقلیدسی

$$C_{jk} = \frac{2N}{N_A + N_B}$$

ضریب تشابه نی

که در آن N تعداد باندهای مشترک بین دو فرد A و B و NA و NB و ترتیب تعداد باند تولید شده توسط دو فرد است. پس از تجزیه واریانس، میانگینها به روش دانکن مقایسه و گروه بندی شدند و ضریب تغییرات فنوتیپی و ژنوتیپی نیز محاسبه گردید (۶).

## نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس لاینها اختلاف بسیار معنی داری را برای عملکرد در شرایط آبی (Yp)، عملکرد در شرایط دیپم (Ys) و نیز شاخص تحمل تنش (STI) بیان کرد که نشان دهنده وجود تنوع ژنتیکی بین این لاینها و امکان انتخاب برای مقاومت به کمبود آب می باشد (جدول ۱). مقایسه ضریب تغییرات فنوتیپی و ژنوتیپی برای این سه صفت نشان داد که بیشترین تغییرات به ترتیب متعلق به Ys، STI و Yp است که حاکی از تغییرات بیشتر در شرایط دیپم است. به علاوه مقایسه ضریب تغییرات فنوتیپی (PCV) و ضریب تغییرات ژنوتیپی (GCV) نشان می دهد که بیشترین تنوع ماهیت ژنتیکی دارد (جدول ۲).

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و شناسایی چند شکلی مولکولی تعداد ۲۱ لاین نخود در قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی با سه تکرار در دو شرایط آبی و دیپم در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی مورد آزمایش قرار گرفتند. کاشت بذور به صورت دستی در فروردین ماه ۱۳۷۷ انجام گرفت. فاصله بین ردیفها ۵۰ سانتی متر، فاصله بین بذور بر روی ردیف ۱۰ سانتی متر و عمق بذر حدود ۵ سانتی متر در نظر گرفته شد. هر رقم در دو ردیف کشت گردید و بر روی هر ردیف تعداد ۱۲ عدد بذر مورد استفاده قرار گرفت. در کشت آبی سه نوبت آبیاری صورت گرفت و در کشت دیپم هیچ گونه آبیاری صورت نگرفت. هنگامی که ۹۰ درصد بوتهها رسید برداشت صورت گرفت و عملکرد آبی (Yp) و دیپم (Ys) بدست آمد.

در آزمایش مولکولی، کلیه لاینها در گلدانهای پلاستیکی کشت گردیدند و برای مدت سه هفته در اتاقک رشد با دوره روشنایی ۱۳/۵ ساعت با درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی گراد و دوره تاریکی ۱۰/۵ ساعت با درجه حرارت ۱۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. به منظور استخراج DNA، مقدار ۰/۱ گرم از بافت لیوفیلیزه شده را در ازت مایع به پودر نرم تبدیل نموده و ۳۰۰ میکرو لیتر بافر استخراج به آن اضافه گردید و DNA ژنومی آن به روش Dellaporta (۱۱) استخراج گردید. DNA به دست آمده در ۳۰ میکرو لیتر آب مقطر استریل حل شده و در ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید. در این تحقیق از ۵ آغازگر به شرح جدول ۱ استفاده گردید.

واکنش زنجیره پلیمر از (PCR) در حجم ۵۰ میکرو لیتر که حاوی ۵ واحد آنزیم Taq DNA polymerase ۴۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۹۰ نانوگرم آغازگر، ۰/۴ میلی مولار dNTPs، ۲ میلی مولار MgCl<sub>2</sub>، ۵ میکرو لیتر بافر (x ۱۰) صورت گرفت. قبل از انتقال نمونهها به دستگاه ترموسایکلر (Maxi-Gene, UK) هر یک با یک قطره از روغن پارافین پوشش داده شد. سپس واکنش برای ۳۵ دور، هر دور شامل یک و نیم دقیقه در ۹۰ درجه، یک و نیم دقیقه در ۳۱ درجه، یک و نیم دقیقه در ۷۲ درجه انجام گردید. بعد از تمام ۳۵ دور، واکنش در ۷۲ درجه به مدت ۴ دقیقه قرار گرفت. محصول PCR روی ژل آغاز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید. نمونهها پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید توسط اشعه ماوراء بنفش ملاحظه و عکس برداری گردید.

## محاسبات آماری

ابتدا با استفاده از فرمول Fernandez (۱۳) برای کلیه ژنوتیپها شاخص تحمل تنش (STI) محاسبه گردید.

$$STI = \left( \frac{Y_p}{\bar{Y}_p} \right) \left( \frac{Y_s}{\bar{Y}_s} \right) \left( \frac{\bar{Y}_s}{\bar{Y}_p} \right) = \frac{(Y_p)(Y_s)}{(\bar{Y}_p)^2}$$

که در آن Yp عملکرد ژنوتیپها در شرایط آبی،

جدول ۱- ۵ آغازگر استفاده شده

نام آغازگر	توالی
آغازگر شماره ۱۷۱	۵'-GAAACAGCGG-۳'
آغازگر شماره ۱۷۴	۵'-ACGATCGCGG-۳'
آغازگر شماره ۱۷-OPG	۵'-ACGACCGACA-۳'
آغازگر شماره ۱۸-OPG	۵'-GGCTCATGTG-۳'
آغازگر شماره ۱۹-OPG	۵'-ACGACCCTCA-۳'

منابع تغییرات		درجه آزادی (DF)			میانگین مربعات		صفت
GCV	PCV	STI	Ys	Yp	STI	Ys	
۲۰/۱۶	۲۱/۸۴	Yp	۲/۰۱	۲/۲۳	۲/۴۰۸	۲	بلوک
۲۳/۴۳	۲۶/۰۱	Ys	۱/۰۸xx ۴	۵/۳۰xx	۶/۷۳xx	۲۰	تیمار
۳۷/۵۴	۴۳/۱۸	STI	۰/۰۱	۱/۵۶	۱/۷۴	۴۰	خطا

جدول ۲ - جدول تجزیه واریانس و ضریب تغییرات فنوتیپی و ژنوتیپی Ys، Yp و STI

xx- معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد

جدول ۳- مقایسه میانگین عملکرد آبی و دیم و شاخص کمی مقاومت به خشکی

ردیف	اسم ژنوتیپها	Ys	Yp	STI
۱	92-131CFLIP	۱۰۳۳/۷ DEFG	۱۷۶۶/۸ EFGH	۰/۲۶۸۸ CDEF
۲	FLIP 92-51C	۱۱۱۲ BCDEFG	۱۳۱۹ ABCD	۰/۷۶۷۲ ABCDE
۳	FLIP 92-44C	۱۵۶۷۲ BCD	۱۹۸۰/۳ BCDEFG	۰/۷۹۰۶ ABCDE
۴	FLIP 92-36C	۱۶۱۰/۲ BCD	۲۳۶ ABCDE	۱/۰۲۹۲ F
۵	FLIP 92-99C	۹۲۷۵ EFG	۱۸۱۵/۳ DEFG	۰/۲۳۳۲ CDEF
۶	یونج	۱۱۲۶ ABC	۱۳۳۳/۷ ABCDEFG	۰/۶۹۶۲ ABCDE
۷	FLIP 92-47C	۱۵۱۶ BCDE	۲۳۷۱ ABCD	۰/۸۹۵۵ ABC
۸	FLIP 92-9C	۱۵۰۱/۵ BCDE	۲۳۳۳/۵ AB	۰/۸۴۵۷ ABCD
۹	FLIP 92-67C	۷۵۱/۳۲ FG	۱۶۰۱/۷ GH	۰/۲۰۲۰ DEF
۱۰	FLIP 92-108C	۱۱۷۷/۳ BCDEFG	۲۰۸۲/۳ ABCDEFG	۰/۶۲۲۶ BCDEF
۱۱	FLIP 92-60C	۱۸۰۳/۷ B	۲۷۱۲/۵ A	۱/۲۷۲۲ AB
۱۲	FLIP 92-95C	۵۸۷/۷ G	۲۲۶۹ H	۰/۱۵۶۱ EF
۱۳	FLIP 92-33C	۱۰۲۲ DEFG	۱۷۶۷/۵ CDEFG	۰/۲۶۸۲ CDEF
۱۴	FLIP 91-137C	۱۳۶۷/۲ BCDE	۲۳۶ ABC	۱/۰۱۹۲ ABCD
۱۵	FLIP 92-104C	۱۲۱۷ A	۱۷۵۵/۵ ABCDEF	۰/۶۵۲۳ ABCDEF
۱۶	FLIP 91-158C	۱۳۳۳/۷ BCDE	۱۹۷۲/۷ ABCDEFG	۰/۷۲۸۸ ABCDE
۱۷	12-60-31	۱۳۳۵/۲ BCDEF	۱۹۲۲/۲ ABCDEF	۰/۶۶۵۵ ABCDEF
۱۸	FLIP 92-121C	۸۱۱/۸۳ FG	۱۸۰۸ ABCDEFG	۰/۶۲۰۳ CDEF
۱۹	جم	۱۳۳۳/۳ EF	۱۶۲۷/۸ FGH	۰/۵۱۵۱ CDEF
۲۰	FLIP 84-48	۱۶۸۲/۲ BC	۲۶۶۲/۲ AB	۱/۲۹۵۸ A
۲۱	FLIP 482	۱۱۲۸ CDEFG	۱۶۷۵/۳ DEFGH	۰/۲۸۵۲ CDEF

وجود تنوع ژنتیکی بین ارقام نخود از نظر عملکرد در شرایط دیم توسط پوستینی (۳) و بایزید (۲) و عملکرد در شرایط آبی و دیم و نیز شاخص تحمل تنش توسط امام جمعه (۱) مورد تأیید قرار گرفته است. نتایج حاصل از مقایسه میانگینها (جدول ۳) نشان داد که در شرایط آبی و دیم بیشترین عملکرد متعلق به لاین شماره ۱۱ (۲۷۱۲/۵) gr = ۱۸۰۳/۷، Yp = ۱۱ و STI = ۱/۲۹ و از نظر شاخص تحمل تنش نیز بیشترین STI = ۱/۲۷ و STI = ۱/۲۹ متعلق به لاین ۱۱ و ۲۰ بود که به ترتیب دارای STI = ۱/۲۷ و STI = ۱/۲۹ بودند و در گروه (A) قرار گرفته‌اند. نظر به اینکه مقاومت به کمبود آب یک پدیده چند متغیره است و قضاوت پیرامون لاینها از نظر یک صفت پیچیده و گاهی اوقات با نتایج متناقض همراه است (۶، ۲۲، ۲۳)، لذا بر مبنای سه متغیر Ys، Yp و STI و طبق نظر Fernandez (۱۳) ژنوتیپها به چهار گروه A، B، C و D تقسیم گردیدند.

۱ - گروه A - ژنوتیپهای دارای عملکرد بالا در هر دو شرایط آبی و دیم.

۲ - گروه B - ژنوتیپهای دارای عملکرد بالا در محیط آبی.

۳ - گروه C - ژنوتیپهای دارای عملکرد بالا در محیط تنش و دیم.

۴ - گروه D - ژنوتیپهای دارای عملکرد پائین در هر دو محیط آبی و دیم.

بررسی نمودار سه بعدی (نمودار ۱) نشان داد که لاینهای ۴، ۱۴، ۱۱، ۸، ۷، ۴، ۱۱، ۱۴، ۲۰ یعنی لاینهای ۴، ۷، ۸، ۱۱، ۱۴، ۲۰ یعنی C ۳۶-، ۹۲ FLIP، ۹۲ FLIP، ۴۷-۹۲ C، ۹۲ FLIP، ۹۲-۹۰ C، ۶۰-۹۲ FLIP، ۱۳۷-۹۱ C، ۴۸-۸۴ FLIP، در گروه A قرار گرفته‌اند، یعنی هم دارای مقاومت مناسب و هم محصول مناسب در محیط آبی و دیم هستند. توزیع لاینها در چهار گروه A، B، C و D حاکی از وجود تنوع ژنتیکی بین لاینها از نظر صفات مذکور است. استفاده از نمودار سه بعدی برای تشخیص گروه A از سایر گروهها در نخود توسط امام جمعه (۱) در لوبیا توسط Fernandez (۱۳)، در گندم توسط حق پرست و نورمند مؤید (۴، ۸) و در لاینهای جایگزینی توسط معروفی (۷) مورد بررسی و تأیید قرار گرفته است.

نتایج حاصل از تجزیه RAPD مناسب بودن این تکنیک را برای تعیین پلی مرفیسم در نمونه‌های نخود را مورد تأیید قرار داد. نمونه‌ایی از نتایج حاصل از واکنش‌های RAPD لاینهای مختلف نخود در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است. از ۵ آغازگر به کار رفته برای ۲۱ لاین نخود در قالب تکنیک RAPD ۶۹ باند پلی مورفیک تولید شد که متوسط باندهای برای هر پرایمر (آغازگر ۱۳/۸) باند پلی مورفیک بود. دندروگرام حاصل از



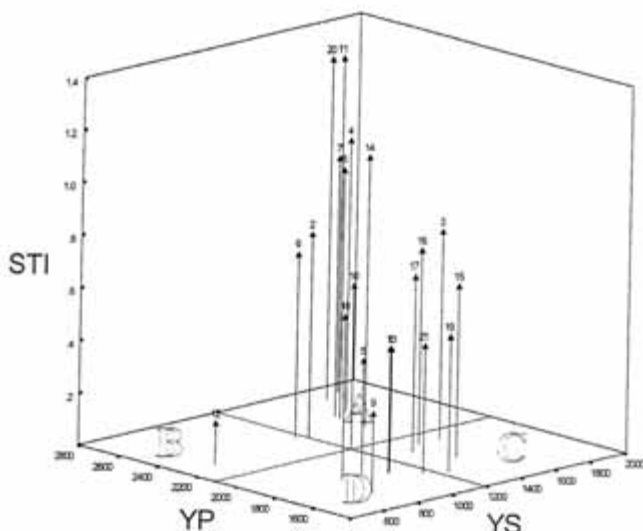
شکل ۲- ژل مربوط به پرایمر ۱۷۴



شکل ۱- ژل مربوط به پرایمر ۱۹ G

که از اندازه‌های بانندی حاصل گردیده بود و برابر ( $0/67^*$ ) برآورد شد که نشان‌دهنده همبستگی معنی‌دار و بالایی بین این دو ماتریس است. با توجه به این مقدار همبستگی می‌توان از ماتریس حاصل از اندازه‌های بانندی نیز برای گروه‌بندی ارقام استفاده نمود. نتایج مربوط به تبدیل مهاجرت‌های بانندی به اندازه (نمودار ۵) نشان داد که الگوی باندهای برای اندازه‌های مختلف متفاوت است. پس می‌توان برای اندازه‌های بانندی نیز از تجربه کلاستر استفاده نمود. دندروگرام اندازه‌های بانندی نیز با دندروگرام مهاجرت‌های بانندی مطابقت داشت و لذا همان تلافی‌های قبل را می‌توان برای حصول تفرق ژنی در نسل‌های تفکیک توصیه نمود. نظر به اینکه انجام هر نوع تحلیل آماری بر روی مهاجرت‌های بانندی مستلزم وجود

مهاجرت‌های بانندی (نمودار ۲) نشان می‌دهد که لاین‌های نخود را می‌توان به سه گروه که هر گروه دارای چندین زیرگروه است تقسیم نمود. گروه اول شامل زیرگروه‌های A (لاین‌های ۱۰، ۱۴ و ۱۵)، B (لاین‌های ۱۶، ۱۸ و ۲۰) و C (لاین ۱۷)، گروه دوم شامل زیرگروه‌های A (لاین‌های ۳، ۴، ۵ و رقم بیونچ)، B (لاین‌های ۱۶، ۱۸ و ۲۰)، و C (لاین‌های ۱۱، ۹، ۱۸ و ۱۲) و گروه سوم شامل دو زیرگروه A (لاین ۲) و B (لاین ۳) می‌باشد. نمودار ۴ همچنین نشان داد که تشابه لاین‌های (۱۰ و ۱۴)، (۱۸ و ۲۰) و (۱۲ و ۱۱) بسیار زیاد و از بقیه بیشتر است (بیش از ۹۰ درصد). این تشابه زیاد را می‌توان به والد مشابه نسبت داد. ارقام محلی بیونچ و جم نیز در یک گروه قرار گرفته‌اند که با توجه به اینکه منشأ هر دو کرمانشاه است امری دور از انتظار نیست. دو لاین ۲ و ۱۳ که در مجاورت یکدیگر قرار گرفته‌اند، اختلافی بیش از حد یک گونه را نشان می‌دهند که این امر می‌تواند نشان‌دهنده آن باشد که ۵ پرایمر برای شناسایی پلی‌مرفیسم بین این دو لاین کافی نیست، بنابراین به پرایمرهای بیشتری نیاز می‌باشد. تلافی بین ارقام دور، به علت وجود پلی‌مرفیسم بیشتر، تفاوت ژنتیکی بالاتری را از نظر مولکولی ایجاد خواهد کرد، ضمن اینکه در این تلافی‌ها امکان ایجاد هتروزیس بیشتر و یا انتقال صفات نادر نیز وجود دارد. بر مبنای دندروگرام حاصل (نمودار ۴) بیشترین فاصله ژنتیکی بین لاین‌های ۱۰ و ۱۴ با لاین‌های ۲ و ۱۳ است، لذا پیشنهاد می‌شود که بر طبق نتایج حاصل از این آزمایش در یک پروژه اصلاحی نخود تلافی‌های (۲×۱۴)، (۲×۱۰)، (۱۳×۱۴)، (۱۳×۱۰) مورد توجه قرار گیرند. این تلافی‌ها سبب بیشترین تفکیک صفات و تفرق ژنی در نسل  $F_2$  خواهند شد که در نتیجه به نژادگر را در انتخاب بوته‌های دارای صفات مطلوب از آزادی بیشتری برخوردار خواهد نمود. نتایج فوق دلالت بر این دارد که تکنیک RAPD تکنیک مناسبی برای بررسی پلی‌مرفیسم یا چند شکلی DNA در ارقام مختلف نخود می‌باشد.



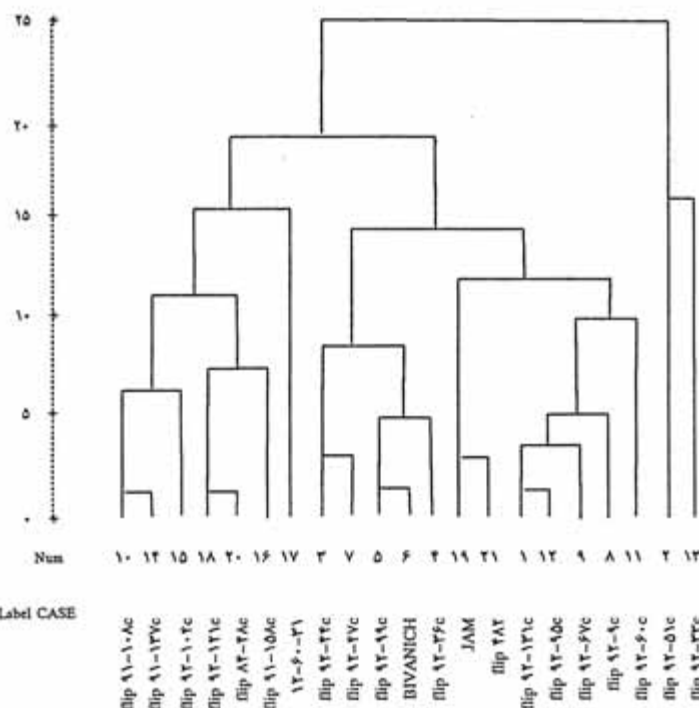
نمودار ۱- نمودار سه بعدی جهت تعیین ارقام مقاومت به خشکی براساس شاخص STI

همبستگی بین ماتریس فاصله بر مبنای ضریب تشابه Nei که از مهاجرت‌های باندهای حاصل شده بود با ماتریس فاصله اقلیدسی

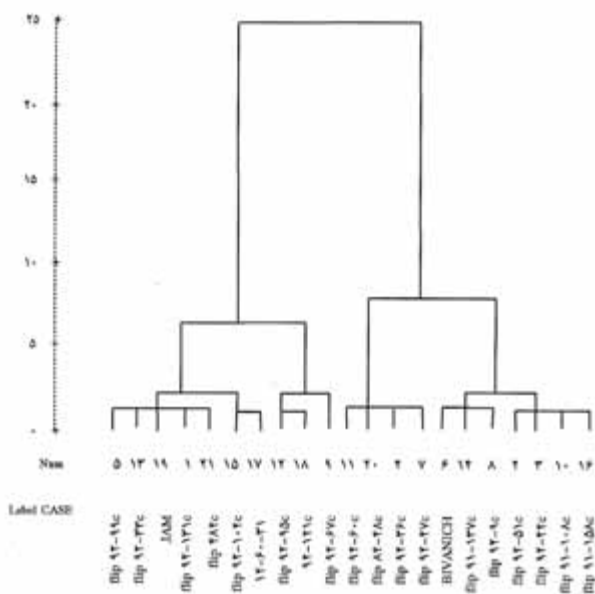
و همکاران (۱۵) و Tatineni (۲۴) نیز کارآیی تعیین تنوع ژنتیکی را با استفاده از نشانگرهای مولکولی مانند RAPDs به اثبات رسانیدند.

پژوهش‌های Undupa (۲۶) نشان داد که نشانگرهای RAPDs و میکروساتلیت از قابلیت بالایی برای تعیین تنوع موفقیت تکنیک RAPD برای DNA ژنومی نخود ایرانی نیز توسط Waden (۲۸) مورد تأیید قرار گرفت. Sharma (۲۱) نیز سطح بالایی از پلی مورفیسم را در ارقام نخود ایرانی با استفاده از RAPDs گزارش نمود.

مقایسه دندروگرام حاصل از مهاجرت‌های بانندی با دندروگرام حاصل از شاخص‌های مقاومت به خشکی (نمودار ۳) در ارقام نشان داد که لاین‌های ۴، ۷، ۸، ۱۱ و رقم محلی بیونیچ (یعنی ۵ ژنوتیپ از ۷ ژنوتیپ مقاوم به کمبود آب) در یک گروه قرار گرفتند. به عبارت دیگر لاین‌های مقاوم به خشکی از طریق نشانگر مولکولی RAPD نیز به یکدیگر شباهت زیادی را نشان دادند. به طور کلی می‌توان گفت که نتایج مطالعات مقاومت به خشکی در مزرعه را به میزان ۷۱/۵



نمودار ۲- دندروگرام فاصله ژنتیکی برای ۲۱ لاین نخود ایرانی با استفاده از روش UPGMA. که از مهاجرت‌های بانندی بر مبنای ضریب تشابه نی و اندازه‌های بانندی بر مبنای فاصله اقلیدسی حاصل شده است



نمودار ۳- دندروگرام حاصل از شاخص‌های مقاومت به خشکی

تفاوت بین ارقام و آغازگرها است، لذا برای پی بردن به وجود این تفاوت‌ها از آزمون مربع کای ( $\chi^2$ ) استفاده شد. در این پژوهش مربع کای محاسبه شده برای ارقام ( $\chi^2=37/57^{**}$ ) و پرایمرها ( $\chi^2=13/28^{**}$ ) و اثر متقابل ( $\chi^2=113/4^{**}$ ) در سطح یک درصد معنی دار بود. این مطلب بدان معناست که ارقام از نظر باندهای با یکدیگر متفاوت بوده و پرایمرها نیز باندهای متفاوتی دارند. همچنین چون اثر متقابل رقم، پرایمر معنی دار می‌باشد این امر نشان می‌دهد که پرایمرها از نظر نحوه باندهای در ارقام مختلف متفاوت هستند، بنابراین ادامه تحلیل‌های آماری بلامانع است.

Lu (۱۷) در سال ۱۹۹۶ روش RFLPs و نشانگرهای متکی بر PCR را برای تعیین تنوع بین ۱۰ لاین نخود فرنگی مورد استفاده قرار دادند و کارآیی این روش‌ها را در تعیین تنوع بررسی نمودند. این پژوهشگران همبستگی بالایی را بین ماتریس حاصل از AFLP، RAPDs، RFLPs و میکروساتلیت گزارش نمودند و پیشنهاد کردند که به جای RFLPs می‌توان از این روش‌ها نیز استفاده نمود. Graham

relations of additional isozyme markers in chickpea. *Theor. Appl. Genet.* 80:648-659.

15- Graham, J., Billigton, P. and P.M. Gilmartin. 1996. Gel electrophoresis: Nucleic acids. Bioscientific publishers.

16- Hu, J and F.Carlos. 1991. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers. *Plant cell reports*. 10: 505-511.

17- Lu, J. 1996. Comparative analysis of genetic diversity in pea assessed by RFLP and PCR based methods. *Theor. Appl. Genet.* 93: 1103-1111.

18- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics.* 89:583-590.

19- O'Toole, J.C. 1989. Breeding for drought resistance in cereals. C.A.B. International.

20- Sharma, D.J and Juda. 1984. Pulse production in semi-arid regions of India. Oxford Publishing Company.

21- Sharma, P.C. 1995. Abundance and polymorphism of di-triand tetra nucleotide tandem repeats in chickpea. *Theor. Appl. Genet.* 90: 90-960.

22- Suzuki, F.K. and S.Kono. 1982. Regional report on grain legumes production in Asia, productivity organization.

23- Szmidt, A.E. 1994: Measuring and monitoring biodiversity in tropical and temperate forests. Center for international forestry research. pp:177-193.

24- Tatineni, V. 1996. Genetic diversity in elite cotton germplasm determined by morphological characteristics and RAPD. *Crop Sci.* 36:186-192.

25- Tilman, D. and D. Wedin. 1996. Productivity and sustainability influenced by biodiversity in grassland ecosystem. *Nature*:718-720.

26- Undupa, J.M. 1994. DNA markers and breeding for resistance to ascochyta blight in Chickpea. ICARDA.

27- Van Rheenen, H.A. 1993. How to accelerate the genetic improvement of a recalcitrant crop species such as chickpea. *Crop Sci.* 65:414-417.

28- Weeden, N.F. 1992. Marker locus, Adh-1, for resistance to pea enation mosaic virus. *Pisum news.* 19:82-83.

29- William, J.G. and A.R. Kubelik. 1997. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research.* 18:6531-6535.

درصد تأیید می‌نماید. به عبارت دیگر نتایج این دو تحقیق ۷۱/۵ درصد با یکدیگر تطابق دارند. این امر زمینه مطالعات مقاومت به خشکی و انتخاب ژنوتیپ‌های مقاوم به خشکی در شرایط آزمایشگاهی و با استفاده از تکنیک انتخاب بر مبنای مارکرهای مولکولی را به دست می‌دهد.

## پاورقی

### 1- Stress tolerance Index

### منابع مورد استفاده

- ۱ - امام جمعه، ع. ۱۳۷۸. تعیین فاصله ژنتیکی توسط RAPD-PCR، ارزیابی شاخص‌های مقاومت به خشکی و تحلیل سازگاری در نخود ایرانی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی کرمانشاه.
- ۲ - بایزید، ب. ۱۳۷۴. بررسی تنوع ژنتیکی ارقام نخود زراعی تحت دو سطح رطوبت و تجزیه همبستگی صفات زراعی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.
- ۳ - پوستینی، ک و بهمن یزدی صمدی. ۱۳۷۱. بررسی عملکرد ارقام نخود در شرایط دیم. مجله علوم کشاورزی ایران، جلد ۲۳، شماره ۲ ص ۱۱-۱۷.
- ۴ - حق پرست، ر. ۱۳۷۴. انتخاب برای مقاومت به خشکی در گندم. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.
- ۵ - سمیع‌زاد لاهیجی، ح، ۱۳۷۵. بررسی تنوع فنوتیپی و ژنوتیپی صفات کمی و همبستگی آنها با عملکرد نخود ایرانی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج.
- ۶ - فرشادفر، ع. ۱۳۷۷. کاربرد ژنتیک کمی در اصلاح نباتات. انتشارات دانشگاه رازی.
- ۷ - معروفی، ا. ۱۳۷۷. تعیین محل کروموزومی شاخص‌های مقاومت به خشکی در گندم. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی کرمانشاه.
- ۸ - نورمندمؤید، ف. ۱۳۷۶. بررسی تنوع صفات کمی و رابطه آنها با عملکرد گندم نان در شرایط دیم و آبی و تعیین بهترین شاخص مقاومت به خشکی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران.
- 9 - Briggs, D.S., M.Walters. 1997. Plant variation and evolution.
- 10- Davis, T.M. 1995. A method of enhancing detection and interpretation of codominant RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 91:582-588.
- 11- Dellaporta, S.L. 1983. A Plant minipreparation. *Plant. Mol. Biol. Rep* 1:19-21.
- 12- FAO production year book. 1995.
- 13- Fernandez, G.C.J. 1992. Effective selection criteria for assessing plant stress tolerance. In *Proceeding of Symposium, Taiwan*, 13-18. pp.257-270.
- 14- Gaur, P.M. and Slinhard. 1990. Genetic control and linkage

