علوم گیاهان زراعی ایران
دورهٔ ۴۵، شمارهٔ ۴، زمستان ۱۳۹۳ (ص ۵۱۹-۵۰۹)

بررسی تنوع ژنتیکی لاین‌های نخود با استفاده از نشانگرهای مولکولی ISSR

حیدر نادری[۱]، مجید شکرپور[۲*]، علی اصغری[۳]، همایون کانونی[۴] و عزت‌اله اسفندیاری[۵]
۱ و ۳. کارشناس ارشد و دانشیار، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه محقق اردبیلی
۲. استادیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۴. استادیار، مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی، کردستان
۵. دانشیار، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه مراغه
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۷/۲۹- تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۶/۲۶)

چکیده

در این بررسی برای مطالعهٔ تنوع ژنتیکی ۵۶ لاین نخود زراعی از نشانگر مولکولی ISSR استفاده شد. از ۳۴ آغازگر ارزیابی‌شده برای تکثیر قطعات DNA ژنومی لاین‌های نخود، نه آغازگر با تولید ۳۵ نوار چندشکل، الگوهای نواربندی مناسبی تولید کردند. میانگین درصد چندشکلی برای همهٔ آغازگرها ۶۶/۰۱ درصد با دامنهٔ تغییرات ۲۵ تا ۱۰۰ درصد بود. میانگین تنوع ژنتیکی نی و شاخص اطلاعات شانون در همهٔ آغازگرها به‌ترتیب ۰/۳۲۵ و ۰/۴۹۲ به‌دست آمد. بر مبنای ضریب تشابه جاکارد، لاین‌های FLIP 01-40C و FLIP 02-84 دارای کمترین تشابه ژنتیکی (۰/۱۶۶) و لاین‌های FLIP 03-6C و FLIP 03-8C دارای بیشترین تشابه ژنتیکی (۱) بودند. تجزیهٔ خوشه‌ای به‌روش UPGMA و با استفاده از ماتریس شباهت جاکارد انجام گرفت. برش دندروگرام در فاصلهٔ ۰/۵۱ لاین‌ها را در شش گروه مجزا قرار داد.گروه‌بندی کاملاً متمایز و فواصل شایان توجه لاین‌ها در گروه‌های مختلف در این دندروگرام، بیانگر تنوع مولکولی زیاد لاین‌های نخود مورد بررسی است. نمایش لاین‌ها در یک نمودار سه‌بعدی براساس سه مؤلفهٔ اصلی اول حاصل تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ، تا حدی گروه‌بندی حاصل تجزیهٔ خوشه‌ای را تأیید کرد و توانست لاین‌ها را از هم تفکیک کند.

واژه‌های کلیدی: تجزیهٔ خوشه‌ای، تنوع ژنتیکی، نخود زراعی، نشانگر ISSR.

مقدمه

در حبوبات، پروتئین‌ها از اجزای مهم بذرند و نقش بسزایی در تهیهٔ مواد غذایی دارند. در مجموع ۸۰ درصد وزن خشک بذر نخود را کربوهیدرات و پروتئین تشکیل می‌دهد (Talebi *et al.*, 2008). برطرف کردن نقص پروتئینی غلات از طریق افزودن پروتئین حبوبات، از بهترین راه‌حل‌های رفع کمبود پروتئین و کالری در کشورهای در حال توسعه است. پروتئین نخود در مقایسه با سایر بقولات ارزش بیولوژیکی بیشتری (۵۲ تا ۷۸ درصد) دارد و از پروتئین سایر بقولات مرغوب‌تر است (Samdaliri *et al.*, 2010). نخود در دنیا پس از لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) و نخود فرنگی (*Pisum sativum* L.) رتبهٔ سوم و در جنوب آسیا رتبهٔ اول را در بین حبوبات دارد (Gaur *et al.*, 2010). عملکرد نخود از ۰/۳۵ تن در هکتار در ایران تا ۱/۶۰ تن در هکتار در مکزیک گزارش شده است (Upadhyaya *et al.*, 2007; Aggarwal *et al.*, 2011).

بهبود محصول از طریق استفاده از تنوع ژنتیکی، کلید موفقیت برنامه‌های اصلاحی است (Renganayaki *et al.*, 2001). اختلافات بین ژنوتیپ‌ها با توجه به ویژگی‌های زراعی، مورفولوژیک، بیوشیمیایی و مولکولی به‌طور مستقیم و غیرمستقیم نشان‌دهندهٔ اختلافات در سطح DNA است. بنابراین، کسب اطلاعات در مورد روابط ژنتیکی، اجتناب‌ناپذیر است (Tahir & Karim,

* تلفن: ۰۹۱۴۸۰۴۷۰۲۴
E-mail: shokrpour@ut.ac.ir

Archive of SID
www.SID.ir

2011). دلایل زیادی برای نیاز به ارزیابی صحیح تنوع ژنتیکی درون و بین جمعیت‌های گیاهی وجود دارد. از این دلایل می‌توان به گواهی بذر، حمایت یا نگهداری صحیح تنوع ژنتیکی گیاهان (Dwevdi & Gaibriyal, 2009)، تجزیهٔ تغییرپذیری ژنتیکی در ژنوتیپ‌ها، توزیع و نگهداری ژرم‌پلاسم (Zheleva *et al*., 2007) و انتخاب صحیح والدهای برتر برای تلاقی‌ها (Tahir & Karim, 2011) اشاره کرد. به‌کارگیری منابع ژنتیکی گوناگون در افزایش تنوع ژنتیکی مؤثر است. به‌طور کلی، در دسترس بودن لاین‌های مختلف و تلاقی بین آنها فرصت مناسبی را برای خلق ترکیبات ژنی جدید فراهم می‌کند و احتمال تولید یک ژنوتیپ منحصربه‌فرد، به تناسب والدین با تعداد ژن‌های مختلف افزایش می‌یابد (Upadhyaya *et al*., 2007). نشانگرهای مولکولی، چندشکلی را در سطح DNA آشکار می‌کنند و در نتیجه تحت تأثیر شرایط محیطی یا مراحل رشدی گیاه قرار نمی‌گیرند (Collard *et al*., 2005). استفاده از نشانگرهای مولکولی و تهیهٔ نقشه‌های پیوستگی ژنتیکی، از فعالیت‌های اصلی در زمینهٔ اصلاح مولکولی است. یکی از نشانگرهای مولکولی کارامد، ISSR[1] است. در این روش از توالی‌های ریزماهواره به‌عنوان آغازگر در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای ایجاد نشانگرهای چندشکل استفاده می‌شود. این روش، آسان و سریع است. ماهیت این روش به‌گونه‌ای است که از مزایای ریزماهواره‌ها (SSR[2]ها) و نشانگرهای تصادفی (مانند AFLP[3] و RAPD[4]) شامل اختصاصی بودن، چندشکلی زیاد و تکرارپذیری خوب بهره می‌برد (Vos *et al*., 1995; Virk *et al*., 2000). مهم‌ترین محدودیت این روش‌ها تکرارپذیری اندک RAPD، زیاد بودن هزینهٔ AFLP و نیاز به دانستن توالی‌های جانبی برای طراحی آغازگرهای خاص هر گونه در ریزماهواره است، که نشانگر ISSR بر این محدودیت‌ها غلبه کرده است (Belaj *et al*., 2003). نشانگرهای ISSR بسیار چندشکل بوده و در مطالعات تنوع ژنتیکی، فیلوژنی، نشاندار کردن ژنی، نقشه‌یابی ژنومی و زیست‌شناسی تکاملی سودمندند (Reddy *et al*., 2000). کاربرد نشانگرهای مولکولی در گونهٔ زراعی نخود بسیار کم است که یکی از دلایل احتمالی آن، تنوع ژنتیکی کم در خزانه‌های کشت‌شدهٔ این گونه است (Varshney *et al*., 2007). در واقع یکی از دلایل عملکرد اندک نخود، تنوع ژنتیکی ضعیف آن است (Clarke & Siddique, 2004; Rao, 2007). در یک مطالعه، ارتباط ژنتیکی بین نخود زراعی و شش گونهٔ یکسالهٔ وحشی جنس *Cicer* با استفاده از نشانگر RAPD بررسی شد. در این بررسی از ۴۲ آغازگر تصادفی استفاده شد که فقط نه آغازگر قادر به تولید نوار در همهٔ گونه‌ها بودند. براساس چندشکلی‌های موجود، گونه‌های مورد مطالعه در سه گروه دسته‌بندی شدند (Talebi *et al*., 2009). ارزیابی مولکولی پنج ژنوتیپ نخود با استفاده از نشانگرهای ISSR و RAPD انجام گرفت. در هر روش نشانگری از پنج آغازگر استفاده شد که همهٔ آنها نوار تولید کردند. برای هر آغازگر RAPD میانگین ۵/۸ نوار و برای هر آغازگر ISSR میانگین ۶/۶ نوار مشاهده شد. در نشانگر RAPD، ۵۵/۱۷ درصد و در نشانگر ISSR، ۶۳/۶۳ درصد نوار چندشکل وجود داشت (Tahir & Karim, 2011). در بررسی دیگری با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR ارتباط ژنتیکی بین نوزده ژنوتیپ نخود زراعی و پنج ژنوتیپ از گونهٔ وحشی *Cicer reticulatum* انجام گرفت. در تجزیهٔ RAPD میانگین شش نوار و در تجزیهٔ ISSR میانگین یازده نوار برای هر آغازگر مشاهده شد. در RAPD ژنوتیپ‌های وحشی با ژنوتیپ‌های زراعی ۷۷/۸ درصد و در ISSR ۷۹/۶ درصد نوارهای چندشکل مشاهده شد. در RAPD بین ژنوتیپ‌های وحشی ۵۱/۷ درصد و بین ژنوتیپ‌های زراعی ۵۰/۵ درصد و در ISSR بین ژنوتیپ‌های وحشی ۶۵/۶۳ درصد و بین ژنوتیپ‌های زراعی ۵۶/۲۵ درصد نوارهای چندشکل مشاهده شد. تجزیهٔ ISSR نشان داد که حتی با شش آغازگر چندشکل می‌توان تخمین قابل اعتمادی از تنوع ژنتیکی به‌دست آورد، در حالی‌که در تجزیهٔ RAPD برای این امر حدود ۳۰ آغازگر نیاز بود (Rao, 2007). در آزمایش دیگری از پنج آغازگر ISSR برای بررسی تنوع ژنتیکی ۲۵ ژنوتیپ نخود استفاده شد. نتایج نشان داد که نوارها در دامنهٔ ۰/۳ تا ۱/۵ کیلوباز تولید شدند. همچنین، ارزش ضریب کوفنتیک

1. Inter simple sequence repeat
2. Simple sequence repeats
3. Amplified fragment length polymorphism
4. Random ampliefied polymorphic DNA

Archive of SID

www.SID.ir

(r=۰/۹۲)، نشان‌دهندهٔ تنوع کافی بین ژنوتیپ‌های مورد بررسی بود (Aggrawal *et al.*, 2010).

برای ارزیابی کارایی نشانگرهای مختلف در کشف چندشکلی در سطح DNA، ۱۹ نشانگر RAPD، ۲۲ نشانگر SSR و ۲۰ نشانگر ISSR برای کشف اختلافات ژنتیکی بین دو گیاه مهم حبوبات (لوبیای سودانی[1] و نخود زراعی) با استفاده از صفات مختلف استفاده شدند. توسط نشانگرهای ISSR، SSR و RAPD به‌ترتیب ۹۵، ۹۳ و ۸۷ درصد چندشکلی به‌دست آمد. در کل الگوهای نواربندی DNA نشان داد که تنوع ژنتیکی بین گونه‌ها بیشتر از تنوع درون گونه‌ها بود. محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) نوارها در RAPD، SSR، و ISSR به‌ترتیب ۰/۴۹، ۰/۶۱ و ۰/۷۰ به‌دست آمد (Datta *et al.*, 2010). در یک بررسی نه آغازگر RAPD در هفت ژنوتیپ نخود زراعی استفاده شدند. تعداد نوارهای ایجادشده در هر آغازگر در دامنهٔ ۳-۱۱ قرار داشت. تجزیهٔ خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها را در دو گروه مجزا کرد. بیشترین شباهت بین ژنوتیپ‌ها ۶۵/۱ درصد و کمترین شباهت ۳۳/۳ درصد بود (Mahmood *et al.*, 2011). ۴۹ ژنوتیپ نخود با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره تجزیه شدند. پنج جفت آغازگر استفاده‌شده ۵۰ آلل مختلف را تولید کرد. تنوع ژنتیکی توسط شاخص تنوع (DI) که در دامنهٔ ۰/۸۸۵ تا ۰/۹۰۴ و محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) که در دامنهٔ ۰/۹۷۲ تا ۰/۹۹۱ قرار داشت ارزیابی شد (Jomová *et al.*, 2009). از تجزیهٔ نشانگر AFLP برای ارزیابی تنوع ژنتیکی میان نخود زراعی و گونه‌های وحشی جنس *Cicer* استفاده شد. از مجموع پنج آغازگر استفاده‌شده ۲۱۴ نوار مشاهده شد که ۹۸/۶ درصد از این نوارها چندشکل بودند. تجزیهٔ خوشه‌ای ژنوتیپ‌ها را در سه گروه متمایز قرار داد (Nguyen *et al.*, 2004). در بررسی دیگری تنوع ژنتیکی ۲۸ ژنوتیپ نخود (با مبدأهای مختلف) توسط نشانگر AFLP ارزیابی شد. میانگین سیزده نوار چندشکل در هر آغازگر مشاهده شد. تجزیهٔ خوشه‌ای ژنوتیپ‌های مورد بررسی را در چهار گروه متمایز کرد. نتایج نشان داد که بیشترین تنوع ژنتیکی در ایران، افغانستان و لبنان بود. براساس نشانگرهای DNA می‌توان نتیجه گرفت که سه مرکز اصلی تنوع نخود، افغانستان-پاکستان، ایران-ترکیه و سوریه-لبنان است (Talebi *et al.*, 2008).

در مطالعهٔ حاضر، تنوع مولکولی ۵۶ لاین اصلاح‌شدهٔ نخود زراعی بررسی شد. مطالعهٔ انجام‌گرفته روی این لاین‌ها، حاکی از تنوع فنوتیپی چشمگیر از نظر خصوصیات زراعی و تحمل سرما بوده است (Naderi *et al.*, 2013). به‌طوری‌که از نظر صفات عملکرد دانه، وزن صددانه، ارتفاع بوته و تحمل سرما و یخزدگی تفاوت معنی‌داری بین لاین‌ها وجود داشت. گروه‌بندی لاین‌ها براساس ویژگی‌های تحمل تنش سرما، آنها را به چهار گروه متمایز، حساس تا کاملاً متحمل طبقه‌بندی کرد. با توجه به تأثیر عوامل محیطی در برآوردهای تنوع حاصل از نشانگرهای مورفولوژیک، در این مطالعه از نشانگرهای مولکولی ISSR به‌منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی لاین‌های مذکور استفاده شد. بدیهی است برآوردهای تنوع ژنتیکی با استفاده از چندشکلی‌های بین لاین‌ها در سطح DNA می‌تواند اطلاعات مفیدی در زمینهٔ وضعیت ژنتیکی ژرم‌پلاسم نخود مورد مطالعه ارائه کند.

مواد و روش‌ها

در این بررسی مواد گیاهی شامل ۵۶ لاین نخود تیپ کابلی از مجموعهٔ ژنوتیپ‌های اصلاحی مرکز بین‌المللی تحقیقات کشاورزی در مناطق خشک[2] با عنوان خزانهٔ بین‌المللی نخود متحمل به سرما[3] بود که پیش از این در دانشگاه محقق اردبیلی ارزیابی شده است (جدول ۱). برای استخراج DNA، نمونه‌های برگی از بوته‌های انتخابی در مرحلهٔ چهار تا پنج‌برگی با استفاده از روش CTAB (Doyle & Doyle, 1990) با اندکی تغییر استخراج شد. برای تعیین کمیت و کیفیت نمونه‌های DNA استخراج‌شده از الکتروفورز ژل آگارز ۰/۸ درصد استفاده شد. در نهایت بعد از اطمینان از کمیت و کیفیت DNAهای استخراج‌شده برای استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با غلظتی برابر ۲۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شدند. در این پژوهش برای

1. *Cajanus cajan*

2. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas (ICARDA)
3. Chickpea International Cold Tolerance Nursery (CICTN)

Archive of SID

www.SID.ir

تکثیر قطعات DNA ژنومی از ۳۴ آغازگر ISSR تهیه‌شده از شرکت Bioneer کرهٔ جنوبی استفاده شد (جدول۲). اجزای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای حجم ۲۰ میکرولیتر حاوی بافر PCR۱۰X (۱X) ۲ میکرولیتر، DNA (۲۰ نانوگرم در میکرولیتر) ۴ میکرولیتر، کلرید منیزیم (۲ میلی‌مولار) ۰/۸ میکرولیتر، آغازگر (۰/۴ میکرومولار) ۱/۶ میکرولیتر، dNTP (۰/۱ میلی‌مولار) ۰/۲ میکرولیتر، آنزیم DNA*Taq* پلی‌مراز (۱/۳ واحد) ۰/۲۶ میکرولیتر و آب مقطر دیونیزه ۱۱/۱۴ میکرولیتر بود. تکثیر در دستگاه ترموسایکلر و چرخهٔ PCR به این شرح صورت گرفت: مرحلهٔ اول: واسرشته‌سازی اولیه به‌مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد، مرحلهٔ دوم: ۴۰ چرخهٔ واسرشته‌سازی به‌مدت ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجهٔ سانتی‌گراد، اتصال آغازگرها به رشته‌های الگو به‌مدت ۱ دقیقه در دمای تست‌شده (۴۶-۵۶ درجهٔ سانتی‌گراد) و بسط رشتهٔ DNA توسط پلیمراز به‌مدت ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد، مرحلهٔ سوم: بسط نهایی به‌مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجهٔ سانتی‌گراد.

جدول ۱. نام لاین‌های نخود مورد مطالعه در آزمایش

شماره	لاین	شماره	لاین	شماره	لاین	شماره	لاین
۱	FLIP 00-39C	۱۵	FLIP 03-12C	۲۹	FLIP 02-59C	۴۳	FLIP05-37C
۲	FLIP 01-40C	۱۶	FLIP 03-13C	۳۰	FLIP 02-80C	۴۴	FLIP05-39C
۳	FLIP 02-61C	۱۷	FLIP 03-80C	۳۱	FLIP 02-83	۴۵	FLIP05-45C
۴	FLIP 02-69C	۱۸	FLIP 03-89C	۳۲	FLIP 02-84	۴۶	FLIP05-49C
۵	FLIP 02-81C	۱۹	FLIP 03-133C	۳۳	FLIP 02-85	۴۷	FLIP05-77C
۶	FLIP 03-1C	۲۰	FLIP 99-26C	۳۴	FLIP 03-16C	۴۸	FLIP05-81C
۷	FLIP 03-2C	۲۱	ILC 8262	۳۵	FLIP 03-68C	۴۹	FLIP05-84C
۸	FLIP 03-3C	۲۲	ILC 8617	۳۶	FLIP 03-78C	۵۰	FLIP05-89C
۹	FLIP 03-5C	۲۳	FLIP 97-118C	۳۷	FLIP97-120C	۵۱	FLIP05-91C
۱۰	FLIP 03-6C	۲۴	FLIP 99-45C	۳۸	FLIP04-35C	۵۲	FLIP05-94C
۱۱	FLIP 03-7C	۲۵	FLIP 01-7C	۳۹	FLIP04-36C	۵۳	FLIP05-95C
۱۲	FLIP 03-8C	۲۶	FLIP 02-51C	۴۰	FLIP04-37C	۵۴	FLIP05-101C
۱۳	FLIP 03-9C	۲۷	FLIP 02-52C	۴۱	FLIP04-38C	۵۵	FLIP05-127C
۱۴	FLIP 03-11C	۲۸	FLIP 02-55C	۴۲	FLIP05-13C	۵۶	ILC 533

جدول ۲. توالی آغازگرهای ISSR مورد استفاده در بررسی لاین‌های نخود

شماره	توالی آغازگر	دما	شماره	توالی آغازگر	دما
۱	5′ AGAC AGACGC 3′	۴۷	۱۸	5′ CCACCACCACCACCA 3′	۵۰
۲	5′ GACAGACAGACA GACA 3′	۵۲	۱۹	5′ AGAGAGAGAGAGAGAGT 3′	۵۳
۳	5′ AGAGAGAGAGAGAGAGC 3′	۵۲	۲۰	5′ AATAATAATDG 3′	۵۴
۴	5′ ACAGACAGCG 3′	۵۴	۲۱	5′ ACTCACTCGC 3′	۵۴
۵	5′ AACAACAACGC 3′	۵۲	۲۲	5′ ATGATGATGATGATGATG 3′	۵۱
۶	5′ GATAGATATG 3′	۵۴	۲۳	5′ GTGTGTGTGTGTGTGTYG 3′	۵۴
۷	5′ GAGAGAGAGAGAGAGAT 3′	۴۸	۲۴	5′ GACAGACAGACAGACA 3′	۴۶
۸	5′ GACGACGACGACG 3′	۵۳	۲۵	5′ ATCATCATCCG 3′	۵۱
۹	5′ TCTCTCTCTCTCTCTCC 3′	۵۳	۲۶	5′ GATCGATCGATCGC 3′	۴۸
۱۰	5′ CGTCGTCGTCGT 3′	۴۶	۲۷	5′ CTTCACTTCACTTCA 3′	۴۸
۱۱	5′ GTGGTGGTGGC 3′	۴۶	۲۸	5′ GAGGAGGAGGC 3′	۴۶
۱۲	5′ TTGTTGTTGTTGTTGC 3′	۴۷	۲۹	5′ ACACACACACACACACYT 3′	۴۸
۱۳	5′ ACACACACACACACACYG 3′	۵۴	۳۰	5′ GAGAGAGAGAGAGAGAC 3′	۴۷
۱۴	5′ CACACACACACAGT 3′	۵۲	۳۱	5′ CACCACCACGC 3′	۴۶
۱۵	5′ ACGACGACGACGAAC 3′	۵۲	۳۲	5′ AGAGAGAGAGAGAGAC 3′	۴۷
۱۶	5′ CACACACACACAAG 3′	۵۰	۳۳	5′ AAGAAGAAGGC 3′	۴۶
۱۷	5′ AGAGAGAGAGAGAGAGG 3′	۴۵	۳۴	5′ CACACACACACACACAG 3′	۴۷

Archive of SID

www.SID.ir

فراورده‌های تکثیرشده توسط PCR با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد جداسازی و به‌روش رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید آشکارسازی شدند. برای مشخص شدن اندازهٔ قطعات تکثیرشده از نشانگر وزن مولکولی SM۰۱۹۱ شرکت Fermentas با اندازهٔ قطعات ۵۶۴ تا ۲۱۲۲۶ جفت باز استفاده شد. برای عکس‌برداری از ژل‌ها از دستگاه UV-tec استفاده شد.

هر یک از مکان‌های تکثیرشده توسط آغازگر یک نشانگر در نظر گرفته شد و حضور و نبود آنها به‌ترتیب با اعداد یک و صفر امتیازدهی شد و برای تشکیل ماتریس داده‌های خام سطرها به نوارها و ستون‌ها به لاین‌ها اختصاص یافت. شاخص اطلاعات شانون[1] برای بررسی تنوع درون ژنوتیپ‌ها محاسبه شد (Lewontin, 1972). به‌منظور بررسی کارایی آغازگرها در تمییز بین ژنوتیپ‌ها، محتوای اطلاعات چندشکلی[2] (PIC) و شاخص نشانگر[3] (MI) هر آغازگر محاسبه شد. برای محاسبهٔ PIC از فرمول $2f_i(1-f_i)$ استفاده شد که در آن f_i فراوانی قطعهٔ (آلل) تکثیرشده و $1-f_i$ فراوانی آلل نول (نبود نوار) است (Roldain-Ruiz *et al.*, 2000). این شاخص چندشکلی حاصل نشانگرها یا مکان‌های ژنی تکثیرشده توسط هر آغازگر محاسبه می‌شود. در این شاخص، تعداد نشانگرهای تولیدشده توسط آغازگر تأثیری در برآورد ندارد و تنها چندشکلی‌های درون هر نشانگر اهمیت دارند. ازاین‌رو شاخص نشانگر (MI) نیز محاسبه شد. این شاخص از حاصل‌ضرب PIC در تعداد نوارهای چندشکل هر آغازگر به‌دست آمد (Powell *et al.*, 1996). گروه‌بندی لاین‌ها با استفاده از تجزیهٔ خوشه‌ای به‌روش UPGMA و معیار فاصلهٔ جاکارد انجام گرفت. مناسب بودن روش تجزیهٔ خوشه‌ای با محاسبهٔ ضریب همبستگی کوفنتیک تعیین شد، به‌طوری‌که مقدار چشمگیر و معنی‌دار این همبستگی برای انتخاب روش مناسب مورد توجه قرار گرفت. تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی با استفاده از ماتریس فاصلهٔ ژنتیکی جاکارد به‌منظور تشخیص دقیق‌تر روابط ژنتیکی بین لاین‌ها و تأیید گروه‌بندی تجزیهٔ خوشه‌ای صورت گرفت.

1. Shannon Information Index
2. Polymorphic Information Content
3. Marker Index

تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی (PCoA[4]) یکی از روش‌های چندمتغیره برای گروه‌بندی بر پایهٔ ضریب تشابه یا واریانس/کوواریانس در بین داده‌ها است که اطلاعات مفیدتری دربارهٔ تمایز گروه‌های اصلی ارائه می‌کند. برای محاسبات یادشده از نرم‌افزارهای NTSYS-pc 2.0 (Rohlf, 1987)، Genealex 6.5 (Peakall & Smouse, 2012) و POPGENE 1.32 (Yeh & Yang, 1999) استفاده شد.

نتایج و بحث

از ۳۴ آغازگر ارزیابی‌شده ISSR، ۹ آغازگر با الگوی نواربندی مناسب برای بررسی‌های مولکولی ۵۶ لاین نخود استفاده شد. این آغازگرها در مجموع ۴۸ نوار با میانگین۵/۳۳ نوار به‌ازای هر آغازگر ایجاد کردند که از این تعداد، ۳۵ نوار چندشکل مشاهده شد که میانگین آنها به‌ازای هر آغازگر ۳/۸۸ نوار بود. تعداد قطعات تکثیرشده با آغازگرهای مختلف از سه نوار برای آغازگر ۱۲، تا هشت نوار برای آغازگر ۸ متغیر بود. در بین لاین‌ها بیشترین تعداد نوار در لاین FLIP05-91C با ۴۱ نوار و کمترین تعداد نوار در لاین‌های FLIP05-89C و FLIP 03-5C با ۲۵ نوار مشاهده شد. درصد چندشکلی برای هر آغازگر از ۲۵ درصد برای آغازگرهای ۱۵ و ۲۲ تا ۱۰۰ درصد برای آغازگرهای ۱، ۲ و ۱۱ متغیر و میانگین آن ۶۶/۰۱ درصد بود (جدول ۳). الگوی نواربندی آغازگر ۱۱ در شکل ۱ نشان داده شده است. در یک آزمایش تنوع ژنتیکی بین پنج رقم نخود با استفاده از پنج آغازگر ISSR بررسی شد که میانگین نوارها به‌ازای هر آغازگر ۶/۶ نوار و میزان چندشکلی برابر با ۶۳/۶۳ بود (Tahir & Karim, 2011). در یک مطالعه، به‌کارگیری پنج آغازگر ISSR در نقشه‌یابی ژنومی و ویژگی‌های مقاومت به بیماری برق‌زدگی بر روی ده گونه نخود تأیید شد و اعلام شد که این نشانگر در بین نشانگرهای مبتنی بر PCR از لحاظ اقتصادی مقرون‌به‌صرفه است و در زمان کوتاه نتایج مطلوبی ارائه می‌کند (Vural & Akcin, 2010).

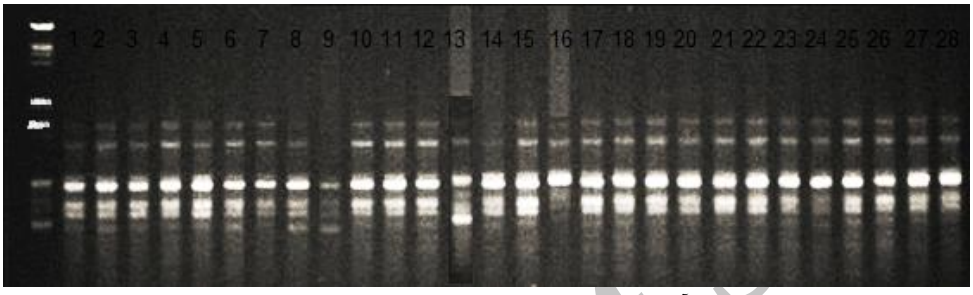
میانگین MI و PIC برای آغازگرهای مورد استفاده به‌ترتیب ۱/۰۱ و ۰/۲۶۶ بود. آغازگر ۳۲ دارای کمترین

4. Principle Coordinate Analysis

Archive of SID

www.SID.ir

مقدار MI (۰/۳۸۲) و آغازگر ۱ دارای بیشترین مقدار MI (۲/۵۲۶) بود که نشان‌دهندهٔ قدرت تفکیک بیشتر این آغازگر در مقایسه با سایر آغازگرها است. آغازگر ۱۵ بیشترین مقدار PIC (۰/۵) و آغازگر ۳۲ کمترین مقدار PIC (۰/۱۹۱) را نشان دادند. معیار PIC توان تمایز هر آغازگر را از طریق تعداد آلل‌ها در یک مکان ژنی و فراوانی نسبی آلل‌ها تعیین می‌کند (Muminovic *et al.*, 2004). حداکثر مقدار PIC در جایگاه‌های دوآللی برابر با ۰/۵ است و فقط زمانی این اتفاق می‌افتد که فراوانی آلل‌ها در جمعیت مساوی باشد (Mateescu *et al.*, 2005). شاخص نشانگر (MI) نیز، از تعداد مکان‌های ژنی چندشکل حاصل از آغازگرها در برآورد کارایی و قدرت تفکیک آنها استفاده می‌کند (Powell *et al.*, 1996). مقادیر به‌دست‌آمده MI و PIC نشان‌دهندهٔ کارایی به‌نسبت خوب این نشانگر در بررسی‌های روابط ژنتیکی در نخود است.



شکل ۱. الگوی نواربندی آغازگر ۱۱ از نشانگرهای ISSR مورد استفاده در لاین‌های مختلف نخود
(برای شماره‌ها به جدول ۱ رجوع شود.)

جدول ۳. کارایی و تعداد نشانگرهای چندشکل تولیدشده توسط آغازگرهای ISSR مورد استفاده در لاین‌های مختلف نخود

آغازگر	شمارهٔ آغازگر	درصد چند شکلی	تعداد نوارهای مونومورف	تعداد نوارهای چندشکل	تعداد کل نوارها	MI	PIC
5' AGACAGACGC 3'	۱	۱۰۰	۰	۶	۶	۲/۵۲۶	۰/۴۲۱
5' GACAGACAGACA GACA 3'	۲	۱۰۰	۰	۷	۷	۱/۲۲۴	۰/۲۰۴
5' GAGAGAGAGAGAGAGAT 3'	۷	۵۰	۲	۲	۴	۰/۸۶۴	۰/۴۳۲
5' GACGACGACGACG 3'	۸	۸۷/۵	۱	۷	۸	۱/۰۷۸	۰/۱۵۴
5' GTGGTGGTGGC 3'	۱۱	۱۰۰	۰	۷	۷	۱/۳۴۴	۰/۱۹۲
5' TTGTTGTTGTTGTTGC 3'	۱۲	۶۶/۶۶	۱	۲	۳	۰/۷۸۴	۰/۳۹۲
5' ACGACGACGACGAAC 3'	۱۵	۲۵	۳	۱	۴	۰/۵	۰/۵
5' ATGATGATGATGATGATG 3'	۲۲	۲۵	۳	۱	۴	۰/۳۹۲	۰/۳۹۲
5' AGAGAGAGAGAGAGAC 3'	۳۲	۴۰	۳	۲	۵	۰/۳۸۲	۰/۱۹۱
میانگین		۶۶/۰۱	۱/۴۴	۳/۸۸	۵/۳۳	۱/۰۱	۰/۲۶۶

بررسی تنوع ژنتیکی براساس شاخص تنوع ژنی نی (Nei, 1973) و شاخص اطلاعات شانون (Lewontin, 1972) در جدول ۴ درج شده است. نتایج نشان داد که میانگین شاخص تنوع نی در همهٔ آغازگرها ۰/۳۲۵ بود. بیشترین مقدار این شاخص در آغازگر ۱۵ (۰/۴۱۴) و کمترین مقدار آن در آغازگر ۳۲ (۰/۱۰۴) مشاهده شد. میانگین شاخص شانون در همهٔ آغازگرها ۰/۴۹۲ بود. بیشترین میزان این شاخص با مقدار ۰/۶۰۴ در آغازگر ۱۵ و کمترین مقدار آن در آغازگر ۳۲ (۰/۲۱۲) وجود داشت.

برای شناسایی و ارزیابی لاین‌های اصلاح‌شده، لاین‌های دارای کروموزوم اضافی، لاین‌های جایگزین‌شدهٔ کروموزومی، قطعات کروموزومی و پی بردن به فاصلهٔ ژنتیکی بین ژنوتیپ‌های گیاهی از نشانگرهای ژنتیکی استفاده می‌شود (Farshadfar, 2005). اطلاع از میزان تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم و ارتباط ژنتیکی بین ژنوتیپ‌ها برای محافظت و استفاده از منابع ژرم‌پلاسم دارای اهمیت زیادی است (Matus & Hayes, 2002). این اطلاعات می‌تواند محققان را در انتخاب ترکیبات والدینی مناسب

www.SID.ir

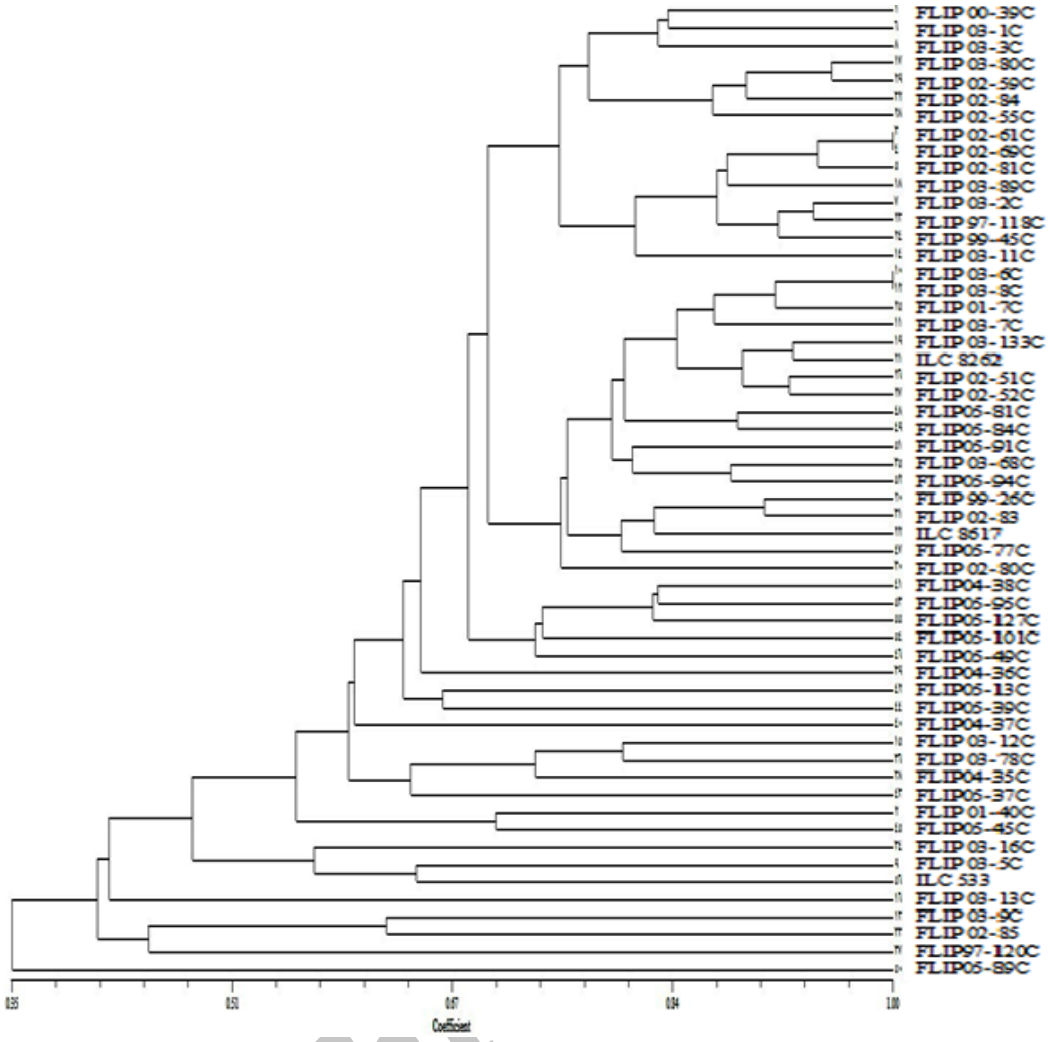
برای بهره‌برداری حداکثر از مواد ژنتیکی موجود برای تولید هیبریدهای پرمحصول و جمعیت‌های در حال تفکیک یاری دهد (Reif *et al.*, 2004). مطالعهٔ تنوع ژنتیکی فرایندی است که تفاوت یا شباهت گونه‌ها، جمعیت‌ها یا افراد را با استفاده از روش‌ها و مدل‌های آماری خاص براساس صفات مورفولوژیک، اطلاعات شجره‌ای یا خصوصیات مولکولی افراد بیان می‌کند (Mohammadi & Prasanna, 2003). بر مبنای ضریب تشابه جاکارد، دامنهٔ تشابه بین لاین‌ها از ۰/۱۶۶ تا ۱ متغیر بود. دو لاین FLIP 01-40C و FLIP 02-84 با کمترین تشابه ژنتیکی (۰/۱۶۶) دارای بیشترین فاصلهٔ ژنتیکی بودند. ازاین‌رو می‌توان این لاین‌ها را در صورت داشتن صفات مطلوب (عملکرد، مقاومت به سرما و یخزدگی) به‌عنوان والد در برنامه‌های دورگ‌گیری برای اصلاح نخود زراعی و به‌دست آوردن حداکثر هتروزیس استفاده کرد. کمترین فاصلهٔ ژنتیکی مربوط به لاین‌های FLIP 03-6C و FLIP 03-8C و نیز لاین‌های FLIP 02-61C و FLIP 02-69C بود. به‌منظور گروه‌بندی لاین‌ها براساس فواصل ژنتیکی، تجزیهٔ خوشه‌ای به‌روش UPGMA با استفاده از ماتریس شباهت جاکارد انجام گرفت (شکل ۲). محققان دیگر نیز برای گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مختلف نخود با استفاده از نشانگرهای ISSR و RAPD از تجزیهٔ خوشه‌ای به روش UPGMA با استفاده از ضریب تشابه جاکارد استفاده کرده‌اند (Rao *et al.*, 2007; Mahmood *et al.*, 2011; Tahir & Karim, 2011). ضریب همبستگی کوفنتیک ۰/۸۶ و با توجه به آزمون مانتل در سطح ۱ درصد معنی‌دار به دست آمد. در این بررسی با برش نمودار درختی در فاصلهٔ ۰/۵۱ لاین‌ها به شش گروه مجزا تقسیم شدند. در گروه اول لاین FLIP 05-89C، در گروه دوم لاین FLIP97-120C، در گروه سوم لاین‌های FLIP 02-85 و FLIP 03-9C، در گروه چهارم لاینFLIP 03-13C، در گروه پنجم لاین‌های ILC 533، FLIP 03-5C و FLIP 03-16C و در گروه ششم دیگر لاین‌ها قرار گرفتند. گروه‌بندی کاملاً متمایز و فواصل شایان توجه لاین‌ها در گروه‌های مختلف در این دندروگرام، بیانگر تنوع مولکولی زیاد در لاین‌های نخود مورد بررسی است. به‌نحوی‌که می‌توان از لاین‌های قرارگرفته در گروه‌های دور از هم مانند گروه اول و لاین‌های گروه دوم با توجه به خصوصیات مورفولوژیک و زراعی مورد نظر (Naderi *et al.*, 2013) در ایجاد جمعیت‌های دارای تنوع ژنتیکی به‌منظور استفاده در برنامه‌های اصلاح نخود بهره جست. در یک بررسی نوزده لاین نخود زراعی و پنج ژنوتیپ از نخود وحشی *Cicer reticulatum* با استفاده از تجزیهٔ خوشه‌ای در سه گروه مجزا قرار گرفتند، به‌طوری‌که ژنوتیپ‌های وحشی در یک گروه و دو لاین از لاین‌های زراعی نیز در گروهی مجزا از دیگر لاین‌ها قرار گرفتند (Rao *et al.*, 2007). ازآنجا که هر چه فاصلهٔ ژنتیکی ژنوتیپ‌ها بیشتر باشد می‌توان به هتروزیس بیشتری دست یافت، می‌توان از لاین‌هایی که در گروه‌های مجزا قرار گرفته‌اند و فاصلهٔ بیشتری از هم دارند در برنامه‌های تلاقی استفاده کرد.

جدول ۴. میانگین تنوع ژنتیکی نشانگرهای ISSR مورد بررسی با استفاده از شاخص تنوع ژنی نی (Nei, 1973) و شاخص شانون (Levontin, 1972)

ترکیب آغازگر	شمارهٔ آغازگر	شاخص اطلاعات شانون	شاخص تنوع نی
5' AGACAGACGC 3'	۱	۰/۵۲۱	۰/۳۴۵
5' GACAGACAGACA GACA 3'	۲	۰/۵۸۰	۰/۳۹۵
5' GAGAGAGAGAGAGAGAT 3'	۷	۰/۴۷۴	۰/۳
5' GACGACGACGACG 3'	۸	۰/۴۶۵	۰/۳۱۴
5' GTGGTGGTGGC 3'	۱۱	۰/۴۸۹	۰/۳۲۴
5'TTGTTGTTGTTGTTGC 3'	۱۲	۰/۴۷۷	۰/۳۱۱
5' ACGACGACGACGAAC 3'	۱۵	۰/۶۰۴	۰/۴۱۴
5' ATGATGATGATGATGATG 3'	۲۲	۰/۴۱۲	۰/۲۴۷
5' AGAGAGAGAGAGAGAC 3'	۳۲	۰/۲۱۲	۰/۱۰۴
میانگین		۰/۴۹۲	۰/۳۲۵

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲. تجزیهٔ خوشه‌ای لاین‌های نخود مورد بررسی براساس داده‌های ISSR با روش UPGMA و فاصلهٔ ژنتیکی جاکارد

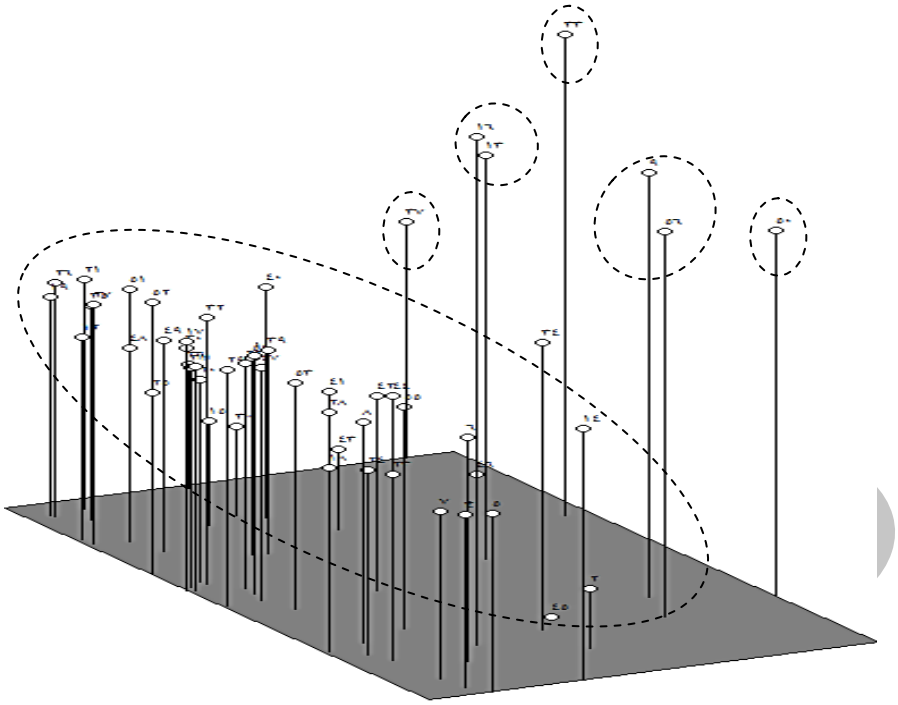
نتایج تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی نشان داد که سه مؤلفهٔ هماهنگ اول حدود ۷۲/۷۴ درصد تغییرات مولکولی بین لاین‌ها را تبیین کردند. مؤلفهٔ اول ۶۳/۶۶ درصد، مؤلفهٔ دوم ۵/۸۳ درصد و مؤلفهٔ سوم ۳/۲۴ درصد از تغییرات کل را تبیین کردند. نمایش لاین‌ها در یک نمودار سه‌بعدی بر اساس سه مؤلفهٔ اصلی اول، تا حدی گروه‌بندی حاصل از تجزیهٔ خوشه‌ای را تأیید کرد و توانست لاین‌ها را تفکیک کند (شکل ۳). با توجه به اینکه بیش از ۲۷ درصد تغییرات مولکولی توسط سه مؤلفهٔ اول تبیین نمی‌شوند، این امر سبب عدم تطابق کامل نتایج گروه‌بندی تجزیهٔ خوشه‌ای و تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی می‌شود. شایان ذکر است که کم بودن درصد تبیین تغییرات مولکولی در تجزیه‌های چندمتغیره مانند تجزیه به مؤلفه‌های هماهنگ اصلی می‌تواند ناشی از توزیع مناسب نشانگرهای مولکولی در سراسر ژنوم و در نتیجه عدم کفایت سه مؤلفهٔ اول برای توجیه حداکثر تغییرات مولکولی باشد. از طرف دیگر توزیع مناسب نشانگرها در سراسر ژنوم به‌مفهوم ارزیابی دقیق‌تر و بهتر تنوع مولکولی به‌دلیل نمونه‌برداری مناسب از کل ژنوم است (Fazeli & Cheghamirza, 2011; Mohammadi & Prassana, 2003).

نتیجه‌گیری کلی

مطالعهٔ حاضر نشان‌دهندهٔ کارایی نشانگر ISSR در بررسی چندشکلی بین لاین‌های به‌کاررفتهٔ نخود بود. اطلاعات مولکولی به‌دست‌آمده از این نشانگر می‌تواند در تمایز لاین‌ها استفاده شود و مکمل اطلاعات به‌دست‌آمده از صفات مورفولوژیک باشد.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۳. نمودار سه‌بعدی لاین‌های نخود مورد بررسی براساس سه مؤلفهٔ اصلی هماهنگ اول حاصل از داده‌های ISSR (نام و شمارهٔ لاین‌ها در جدول ۱ آمده است.)

همچنین نتایج این بررسی می‌تواند به‌طور کارایی در انتخاب لاین‌های والدی متنوع در برنامه‌های اصلاحی نخود و مدیریت مناسب منابع ژنتیکی نخود مفید واقع شود. بر اساس گروه‌بندی مولکولی لاین‌های مورد مطالعه و نتایج حاصل از مطالعهٔ صفات مورفولوژیک و تحمل سرما، لاین‌های قرارگرفته در خوشهٔ سوم مانند ILC533 به‌عنوان ژنوتیپ‌های حساس به سرما با عملکرد کم و لاین‌های موجود در خوشه‌های چهارم و اول به‌عنوان لاین‌های متحمل و پرعملکرد شناخته شده‌اند (Naderi *et al.*, 2013). با توجه به نتایج به‌دست‌آمده توصیه می‌شود که اصلاحگران در انتخاب والدین مناسب برای دورگ‌گیری‌ها علاوه بر صفات مورفولوژی و فیزیولوژی به روابط مولکولی آنها نیز توجه داشته باشند.

REFERENCES

1. Aggarwal, H., Kumar, V., Kumar, A., Singh, J. & Chhokar, V. (2011). *Accessing genetic diversity in chickpea (Cicer arietinum L.) genotypes using ISSR markers*. World Congress on Biotechnology, 21-23 March, page 368.
2. Belaj, A., Satovic, Z., Cipriani, G., Baldoni, L., Testolin, R., Rallo, L. & Trujillo, I. (2003). Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive. *Theoretical and Applied Genetics*, 107, 736-744.
3. Clarke, H.J. & Siddique, K.H.M. (2004). Response of chickpea genotypes to low temperature stress during reproductive development. *Field Crops Research*, 90, 323-334.
4. Collard, B.C.Y., Jahufer, M.Z.Z., Brouwer, J. & Bandpang, E.C.K. (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concept. *Euphytica*, 142, 169-196.
5. Datta, J., Lal, N., Kaashyap, M. & Gupta, P.P. (2010). Efficiency of Three PCR based Marker Systems for Detecting DNA Polymorphism in *Cicer arietinum* L and *Cajanus cajan* L. Millspaugh. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*, 5, 1-15.
6. Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 11-15.
7. Dwevdi, K.K. & Gaibriyal, M. (2009). Assessment of genetic diversity of cultivated chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Asian Journal of Agriculture Science*, 1(1), 7-8.
8. Fazeli, F. & Cheghamirza, K. (2011). Investigation of genetic diversity in iranian landrace chickpea bulks using ISSR marker. *Modern Genetic*, 6 (2), 97-104. (In Farsi)

Archive of SID

www.SID.ir

9. Gaure, P. M., Tripathi, S., Gowda, C. L. L., Ranga, R. G. V., Sharma, H. C., Pande, S. & Sharma, M. (2010). *Chickpea seed production manual*, Andhra Pradesh, India: *International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics.*
10. Jomová, K., Benková, M. & Kraic, J. (2009). Enrichment of Chickpea Genetic Resources Collection Monitored by Microsatellites. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 45 (1), 11-17.
11. Lewontin, R.C. (1972). The apportionment of human diversity. *Evolution of Biology*, 6, 381-398.
12. Mahmood, Z., Athar, M., Aurangzeb, Khan, M.A., Ali, M., Saima, S. & Dasti, A.A. (2011). Analysis of genetic diversity in chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *African Journal of Biotechnology*, 10(2), 140-145.
13. Mateescu, R.G., Zhang, Z., Tsai, K., Phavaphutanon B., Lust, G., Quaas, R., Murphy, K., Acland, G.M. & Todhunter, R.J. (2005). Analysis of allele fidelity polymorphic information content, and density of microsatellites in a genomewide screening for hip dysplasia in a crossbreed pedigree. *Journal of Heredity*, 96(7), 847-853
14. Matus, I.A. & Hayes, P.M. (2002). Genetic diversity in three groups of barley germplasm assessed by simple sequence repeats. *Genome*, 45, 1095-1106.
15. Mohammadi, S.A. & Prasanna, B.M. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plant- salient statistical tools and consideration. *Crop Science*, 43, 1235-1248.
16. Muminovic, J., Melchinger, A.E. & Lubberstedt, T. (2004). Genetic diversity in cornsalad (*Valerianella locusta*) and related species as determined by AFLP markers. *Plant Breeding*, 123, 460-466.
17. Naderi, H., Shokrpour, M., Asghari, A., Kanouni, H. & Esfandiari, E. 2013. Evaluation of cold tolerance in winter sowing of chickpea (*Cicer arietinum* L.) using morphological and phenological traits in Kurdistan region. *Iranian Journal of Pulses Research*, 4(1), 69-80. (In Farsi)
18. Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceeding National *Academic Science*, 70, 3321-3323.
19. Peakall, R. & Smouse, P.E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28, 2537-2539.
20. Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey. S. & Refalski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, 2, 225-238.
21. Rao, L.S., Ran, U.P., Deshmukh, P.S., Kumar, P.A. & Panguluri, S.K. (2007). RAPD and ISSR fingerprinting in cultivated chickpea (*Cicer arietinum* L.) and its wild progenitor Cicer reticulatum Ladizinsky. *Genetic Resource Crop Evolution*, 54, 1235-1244.
22. Reddy, M.P., Sarla, N., Neeraja, C.N. & Siddiq, E.A. (2000). Assessing genetic variation among Asian A-genome Oryza species using inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism. *Fourth International Rice Genetics Symposium*, 22–27 October 2000, IRRI, Philippines. Abstracts p. 212.
23. Reif, J.C., Xia, X.C., Melchinger, A.E., Warburton, M.L., Hoisington, D.A., Beck, D., Bohn, M. & Frisch, M. (2004). Genetic diversity determined within and among CIMMYT maize population of tropical, subtropical, and temperate germplasm by SSR markers. *Crop Science*, 44, 326- 334.
24. Renganayaki, K., Read, J.C. & Fritz, A.K. (2001). Genetic diversity among tegxas bluegrass (*Poa arachnifera* Torr.) revealed by AFLP and RAPD markers. *Theoritical and Applied Genetics*, 2, 1037-1045
25. Rohlf, F. J. (1987). NTSYS-pc: Micro-computer programs for numerical taxonomy and multivariate analysis. *American Statistician*, 41, 330.
26. Roldain-Ruiz, I., Calsyn, E., Gilliand, T.J., Coll., R., van Eijk, M.J.T. & De Loose, M. (2000). Estimating genetic conformity between related ryegrass (*Lolium* sp.) varieties, 2. AFLP characterization. *Molecular Breeding*, 6, 593-602.
27. Samdaliri, M., Saiedsharifi, R. & Esmaielpor, B. (2010). *Pulse Crops*. Islamic Azad University the unit of Challos Publishers. (In Farsi)
28. Setty, N. K., Shokeen, B., Edwards, K. J. & Bhatia, S. (2006). Development of microsatellite markers and analysis of intraspecific genetic variability in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 112, 1416-1428.
29. Singh, R., Sharma, P., Varshney, R.K., Sharma, S. & Singh, N.K. (2008). Chickpea improvement: role of wild species and genetic markers. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 25, 267-314.
30. Tahir, N.A.R. & Karim, H.F.H. (2011). Determination of genetic relationship among some varieties of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in Sulaimani by RAPD and ISSR markers. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 4, 77-86.
31. Talebi, R., Babaeian, N.A., Mardi, M., Fayaz, F., Furman, B.J. & Bagheri, N.A. (2009). Phylogenetic diversity and relationship among annual *Cicer* species using random amplified polymorphic DNA markers. *General and Applied Plant Physiology*, 35, 3-12.

Archive of SID

www.SID.ir

32. Talebi, R., Naji, A.M. & Fayaz, F. (2008). Geographical patterns of genetic diversity in cultivated chickpea (*Cicer arietinum* L.) characterized by amplified fragment length polymorphism. *Plant Soil Environment*, 54(10), 447-452.
33. Taylor, P.W.J., Redden, R.J. & Ford, R. (2004). Genetic diversity estimates in *Cicer* using AFLP analysis. *Plant Breeding*, 123, 173-179.
34. Terzopoulos, P. J. & Bebeli, P. J. (2008). Genetic diversity analysis of Mediterranean faba bean (*Vicia faba* L.) with ISSR markers. *Field Crops Research*, 108, 39-44.
35. Upadhyaya, H. D., Dwivedi, S. L., Gowda, C. L. L. & Singh, S. (2007). Identification of diverse germplasm lines for agronomic traits in chickpea (*Cicer arietinum* L.) core collection for use in crop improvement. *Field Crop Research*, 100, 320-326.
36. Varshney, R.K., Horres, R., Molina, C., Nayak, S., Jungmann, R., Swamy, P., Winter, P., Jayashree, B., Kahl, G. & Hoisington, D.A. (2007). Extending the repertoire of microsatellite markers for genetic linkage mapping and germplasm screening in chickpea. *Journal of SAT Agricultural Resarch*, 5(1), 1-3.
37. Virk, P.S., Zhu, J., Newbury, H.J., Bryan, G.J., Jackson, M.T. & Ford-Lioyd, B.V. (2000). Effectiveness of different classes of molecular markers for classifying and revealing variations in rice (*Oryza sativa*) germplasm. *Euphytica*, 112, 275-284.
38. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Rerjans, M., Van der Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. & Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23, 4407-4414.
39. Vural, H.C. & Akcin, A. (2010). Molecular analysis of chickpea species through molecular markers. *Biotechnology and Biotechnology Equipment*, 24(2), 1828-1832.
40. Yeh, F.C. & Yang, R. (1999). *Popgene Version 1.31*. Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis Quick User Guide. University of Alberta And Tim Boyle, Centre for International Forestry Research.
41. Zheleva, D., Todorovska, E., Chirstov, N., Ivanov, P., Ivanov, I. & Todorov, I. (2007). Assessing the genetic variation in Bulgarian bred wheat varieties by biochemical and moleculars. *Biotechnology and Biotechnology Equipment*, 12, 311-321.

Archive of SID

www.SID.ir