پژوهش و سازندگی
شماره ۶۳، تابستان ۱۳۸۳
در زراعت و باغبانی

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 ریخت شناختی ومولکولی 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 به آب است. مقایسه ضریب تغییرات فنوتیپی و ژنوتیپی بین Ys ، Yp و STI نشان داد که بیشترین تغییرات به‌ترتیب متعلق به STI، Ys، Yp بود که حاکی از تغییرات بیشتر در شرایط دیم است. به علاوه مقایسه ضریب تغییرات فنوتیپی (PCV) و ضریب تغییرات ژنوتیپی (GCV) نشان داد که بیشترین تنوع جنبه ژنتیکی دارد تامحیطی.نتایج حاصل از مقایسه میانگین‌ها نشان داد که بیشترین عملکرد متعلق به لاین شماره۱۱ وبیشترین STI متعلق به لاین‌های شماره۱۱ و ۲۰ بود. بررسی نمودار سه بعدی نشان داد که لاین‌های۴ ، ۷ ، ۸ ، ۱۱ ، ۱۴ و۲۰ 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 به‌کار رفته برای۲۱ لاین نخود در قالب تکنیک ، RAPD-PCR ۶۹ باند پلی‌مورفیک تولید شد که متوسط باندهی برای هر پرایمر ۸/۱۳ باند پلی مورفیک 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. برمبنای دندروگرام حاصل بیشترین فاصله ژنتیکی بین لاین‌های۱۰ و ۱۴ با لاین‌های۲ 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 لاین‌های۴، ۷، ۸ و ۱۱ و رقم محلی بیونیج در یک گروه قرار گرفته‌اند.

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

Archive of SID
Pajouhesh & Sazandegi

www.SID.ir

Pajouhesh & 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 foryield potential (Yp), stress yield (Ys) and stress tolerance index (STI), indicating the existance 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 comparision 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 number11 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 (1014), 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

حبوبات نقش مهمی در تأمین نیازهای غذایی جامعه بشـری به ویژه در کشورهای در حال توسعه ایفاء می‌کنند. دربین حبوبات نخود از نظر سطح زیر کشـت در مقام چهارم جهان قرار دارد. سـهم تولید نخود در ایران معادل۱/۴ 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 اسـت 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 توارثی آن بررسی تنوع موجود بین ارقام نخود از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۵، ۲۲، ۲۵). شناسـایی تنوع ژنتیکی به نژادگران را در امر شناسایی والدین برای انجام تلاقی‌های مطلوب یاری می‌رسـاند (۱). در گذشـته بررسی تنوع ژنتیکی در گیاهان به وسـیله تجزیه صفات مورفولوژیکی و یا بیوشـیمیایی انجام می‌شد. از آنجائی‌که فنوتیپ تحت تأثیر محیط قرار می‌گیرد، لذا تعیین تنوع ژنتیکی به همراه روشهای مولکولی چشم انداز نوینی رابرای ارزیابی تنوع زیسـتی فراهم آورده است(۹، ۲۰، ۲۳). یکی از نشانگرهای مولکولی جهت بررسـی تنوع موجود بین ارقام، نشانگر RAPD است که از قدرت مناسبی برای بررسـی چند شـکلی بین ارقام برخوردار اسـت(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 سـال۱۹۹۵ بیان داشـت که RAPD نسـبت به آلوزایم و نشانگرهای پروتئینی از حساسیت بیشتری برای تعیین تنوع برخوردار است. چنین نتایجی توسط Gaur و Slinhard در سال ۱۹۹۰(۱۴) روی نخود نیز گزارش شده است. Weeden(۲۸). در سال۱۹۹۲ 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 بررسـی تنوع صفات کمی بین لاین‌های نخود، ارزیابـی لاین‌های مقاوم به کمبـود آب و بررسی‌پلی‌مورفیسـم ژنتیکی لاین‌های نخود ایرانی اسـتفاده از نشانگرهای ریخت شناختی و مولکولی RAPD می‌باشد.

www.SID.ir

مواد و روشها

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 دیم 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 سانتی‌متر، فاصله بین بذور بر روی ردیف ۱۰ سانتیمتر 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 دیم هیچ گونه آبیاری صورت نگرفت. هنگامی که ۹۰ درصد بوته‌ها رسید برداشت صورت گرفت و عملکرد آبی (Yp) و دیم (Ys) بدست آمد.

در آزمایش مولکولی، کلیه لاین‌ها در گلدان‌های پلاستیکی کشت گردیدند و برای مدت سه هفته در اطاقک رشد با دوره روشنایی ۱۳/۵ ساعت با درجه حرارت۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره تاریکی ۱۰/۵ساعت با درجه حرارت۱۵درجه سانتی‌گراد 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 میکرولیتر آب مقطر استریل حل شده و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. در این تحقیق از ۵ آغازگر به شرح جدول ۱ استفاده گردید.

واکنش زنجیره پلیمر از (PCR) در حجم ۵۰ میکرولیتر که حاوی۵ واحد آنزیم Taq DNA polymerase ۴۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۹۰ نانوگرم آغازگر، ۰/۴میلی‌مولار dNTPs، ۲ میلی‌مولار $MgCl_2$ ، ۵ میکرولیتر 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 برای۳۵ دور، هر دور شامل یک و نیم دقیقه در ۹۰ درجه، یک و نیم دقیقه در۳۱ درجه، یک و نیم دقیقه در ۷۲ درجه انجام گردید. بعد از تمام۳۵ دور، واکنش در ۷۲ درجه به مدت۴ دقیقه قرارگرفت. محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز گردید. نمونه‌ها پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید توسط اشعه ماوراء بنفش ملاحظه و عکس‌برداری گردید.

محاسبات آماری

ابتدا با استفاده از فرمولFernandez (۱۳) برای کلیه ژنوتیپها شاخص تحمل تنش (STI[1]) 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، Ys عملکرد ژنوتیپ‌ها در آزمایش دیم و Yp میانگین عملکرد کلیه ژنوتیپ ها در محیط بدون تنش است. سپس برای Ys ، Yp و STI تجزیه واریانس صورت گرفت و با استفاده ازنرم افزار آماری SPSS و ترسیم نمودار سه بعدی ژنوتیپها از نظر مقاومت به تنش گروه‌بندی شدند. سپس با استفاده ازاین سه معیار و تجزیه خوشه‌ای با روش UPGMA تنوع ژنتیکی بین ارقام مشخص شد. در بخش مطالعات مولکولی، دندورگرام به روش UPGMA و براساس مهاجرت‌های باندی و برمبنای 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.

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

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

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

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه واریانس لاین‌ها اختلاف بسیار معنی‌داری را برای عملکرد در شرایط آبی (Yp)، عملکرد درشرایط دیم (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 می‌باشد (جدول۱). 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 دیم است. به علاوه مقایسه ضریب تغییرات فنوتیپی (PCV) و ضریب تغییرات ژنوتیپی (GCV) نشان می‌دهد که بیشتراین تنوع ماهیت ژنتیکی دارد (جدول۲).

جدول ۱- ۵ آغازگر استفاده‌شده

نام آغازگر	توالی
آغازگر شماره۱۷۱	۵-´ GAAACAGCGG-۳
آغازگر شماره۱۷۴	۵-´ ACGATCGCGG-۳
آغازگر شماره OPG-۱۷	۵-´ ACGACCGACA-۳
آغازگر شماره OPG-۱۸	۵-´ GGCTCATGTG-۳
آغازگر شماره OPG-۱۹	۵-´ ACGACCCTCA-۳

Archive of SID
www.SID.ir

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

جدول۲ - جدول تجزیه واریانس و ضریب تغییرات فنوتیپی و ژنوتیپی Ys ، Yp و STI

××- معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

وجـود تنوع ژنتیکی بیـن ارقام نخود از نظر عملکرد در شـرایط دیم توسـط پوسـتینی(۳) و بایزید (۲) و عملکرد در شرایط آبی و دیم و نیز شـاخص تحمل تنش توسـط امام جمعه (۱) مورد تأیید قرار گرفته است. نتایج حاصل از مقایسـه میانگین‌ها (جدول ۳) نشـان داد که در شرایط آبی و دیم بیشـترین عملکرد متعلق به لاین شـماره ۱۱(gr = ۲۷۱۲/۵ Yp ،Ys= ۱۸۰۳/۷) و از نظر شـاخص تحمل تنش نیز بیشـترین STI متعلق به لاین۱۱ و ۲۰ بود که به‌ترتیب دارای STI =۱/۲۷ و STI=۱/۲۹ بودنـد و در گـروه (A) قـرار گرفته‌اند. نظر به اینکه مقاومـت به کمبود آبیـک پدیده چند متغیره اسـت و قضاوت پیرامـون لاین‌ها از نظر یک صفت پیچیده و گاهی اوقات با نتایج متناقض همراه اسـت (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 تقسـیم گردیدند.

۱ - گـروه A - ژنوتیپ‌هـای دارای عملکرد بالا در هر دو شـرایط 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 - گـروه D - ژنوتیپ‌های دارای عملکرد پائین در هر دو محیط آبی و دیم.

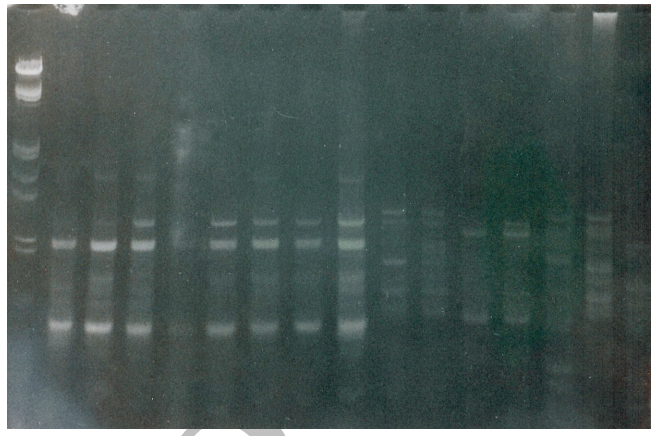
بررسـی نمودار سـه بعدی ((نمودار ۱) نشـان داد که لاین‌های۴، ۷،۸،۱۱،۱۴و۲۰ یعنـی لاین‌هـای ۴، ۷، ۸، ۱۱، ۱۴، ۲۰ یعنـی C ۳۶- C ,FLIP ۹۲ -۴۷ C ,FLIP ۹۲-۹ C ,FLIP ۹۲ -۶۰ C ,FLIP ۹۱ -۱۳۷ C ,FLIP ۸۴ -۴۸ ,FLIP در گروه A قرار گرفته‌اند، یعنی هم دارای مقاومت مناسب و هم محصول مناسب در محیط آبی و دیم هسـتند. توزیع لاین‌ها در چهار گـروه A ، B ، C و Dحاکی از وجود تنوع ژنتیکی بین لاین‌ها از نظر صفات مذکور است. استفاده از نمودار سه بعدی برای تشـخیص گروه A از سایر گروه‌ها در نخود توسط امام جمعه (۱) در لوبیا توسط Fernandez (۱۳)، در گندم توسط حق‌پرست و نورمند مؤید (۴، ۸) و در لاین‌های جایگزینی توسـط معروفی(۷) مورد بررسـی و تأیید قرار گرفته است.

نتایـج حاصـل از تجزیه RAPD مناسـب بودن ایـن تکنیک را برای تعیین پلی‌مرفیسـم در نمونه‌های نخود را موردتأییـد قرار داد. نمونه‌ایی از نتایج حاصل از واکنش‌های RAPD لاین‌های مختلف نخود در شـکل۱ و ۲ نشـان داده شـده اسـت. از ۵ آغازگر به کار رفته برای ۲۱ لاین نخود در قالب تکنیک RAPD ۶۹ باند پلیمورفیک تولید شد که متوسط باندهی برای هـر پرایمر(آغازگر ۱۳/۸ باند پلی‌مورفیک بـود. دندروگرام حاصل از

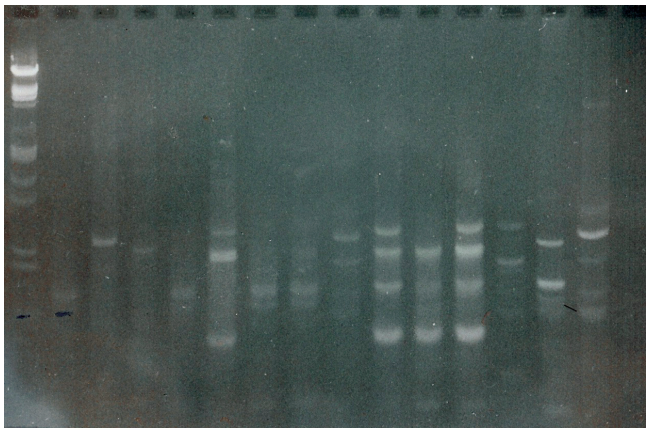
جدول۳- مقایسه میانگین عملکرد آبی و دیم و شاخص کمی مقاومت به خشکی

ردیف	اسم ژنوتیپ‌ها	Y_s	Y_p	STI
۱	92-131CFLIP	۱۰۳۳/۷ DEFG	۱۷۶۶/۸ EFGH	۰/۴۶۸۹ CDEF
۲	FLIP 92-51C	۱۱۹۴ BCDEFG	۲۳۱۹ ABCD	۰/۷۶۷۳ ABCDE
۳	FLIP 92-44C	۱۵۶۹/۲ BCD	۱۹۸۰/۳ BCDEFG	۰/۷۹۰۶ ABCDE
۴	FLIP 92-36C	۱۶۱۰/۲ BCD	۲۴۹۶ ABCDE	۱/۰۲۹۲ F
۵	FLIP 92-99C	۹۲۹/۵ EFG	۱۸۱۵/۳ DEFG	۰/۴۳۳۴ CDEF
۶	بیونیج	۱۱۴۶ ABC	۲۳۳۴/۷ ABCDEFG	۰/۶۹۶۲ ABCDE
۷	FLIP 92-47C	۱۵۱۶ BCDE	۲۴۷۱ ABCD	۰/۹۷۹۵ ABC
۸	FLIP 92-9C	۱۵۰۱/۵ BCDE	۲۳۳۴/۵ AB	۰/۹۴۵۷ ABCD
۹	FLIP 92-67C	۷۵۱/۳۳ FG	۱۶۰۱/۷ GH	۰/۴۰۲۰ DEF
۱۰	FLIP 92-108C	۱۱۷۷/۳ BCDEFG	۲۰۸۳/۳ ABCDEFG	۰/۶۲۲۶ BCDEF
۱۱	FLIP 92-60C	۱۸۰۴/۷ B	۲۷۱۲/۵ A	۱/۲۷۲۳ AB
۱۲	FLIP 92-95C	۵۸۷/۷ G	۲۲۶۹ H	۰/۱۵۶۱ EF
۱۳	FLIP 92-33C	۱۰۴۴ DEFG	۱۷۶۹/۵ CDEFG	۰/۴۶۸۴ CDEF
۱۴	FLIP 91-137C	۱۳۹۶/۲ BCDE	۲۲۹۶ ABC	۱/۰۱۹۴ ABCD
۱۵	FLIP 92-104C	۱۴۱۷ A	۱۷۵۵/۵ ABCDEF	۰/۶۵۲۳ ABCDEF
۱۶	FLIP 91-158C	۱۴۳۳/۷ BCDE	۱۹۷۴/۷ ABCDEFG	۰/۷۳۸۹ 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	۱۲۲۴/۳ EF	۱۶۲۹/۸ FGH	۰/۵۱۵۱ CDEF
۲۰	FLIP 84-48	۱۶۸۴/۲ BC	۲۶۶۴/۲ AB	۱/۲۹۵۸ A
۲۱	FLIP 482	۱۱۲۸ CDEFG	۱۶۷۵/۳ DEFGH	۰/۴۸۵۴ CDEF

www.SID.ir



شکل ۱- ژل مربوط به پرایمر G ۱۹

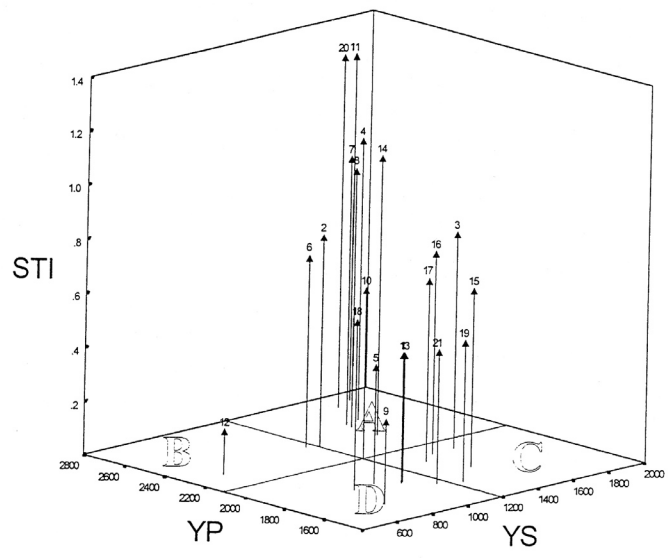


شکل ۲- ژل مربوط به پرایمر ۱۷۴

مهاجرت‌هـای باندی(نمودار ۲) نشـان می‌دهد کـه لاین‌های نخود را می‌توان به سـه گروه که هر گروه خود دارای چندین زیرگروه است تقسیم نمود. گروه اول شامل زیرگروه‌های A (لاین‌های ۱۰، ۱۴ و ۱۵)،B (لاین‌های۱۶، ۱۸و ۲۰) و C (لاین ۱۷)، گروه دوم شـامل زیرگروه‌هـای A (لاین‌های ۳، ۴، ۵ و رقم بیونیچ)، B (لاین‌های ۱۶، ۱۸ و ۲۰)، و C (لاین‌های ۱،۸،۹،۱۱ و ۱۲) و گروه سـوم شـامل دو زیر گروه A (لاین۲) و B (لاین۳) می‌باشد. نمودار ۴ همچنین نشان داد که تشابه لاین‌های (۱۰ و ۱۴)، (۱۸ و ۲۰) و (۱و ۱۲) بسیار زیاد و از بقیه بیشتر است (بیش از ۹۰ درصد). این تشابه زیاد را می‌توان به والد مشابه نسبت داد . ارقام محلی بیونیچ و جم نیز در یک گروه قرار گرفته‌اند که با توجه به اینکه منشـأ هر دو کرمانشاه است امری دوراز انتظار نیسـت. دو لاین۲ و ۱۳ که در مجاورت یکدیگر قرار گرفته‌اند، اختلافی بیش از حد یک گونه را نشـان‌می‌دهند که این امر می‌تواند نشان‌دهنده آن باشد که۵ پرایمر برای شناسایی پلی‌مرفیسم بین این دو لاین کافی نیست، بنابراین به پرایمرهای بیشتری نیاز می‌باشد.

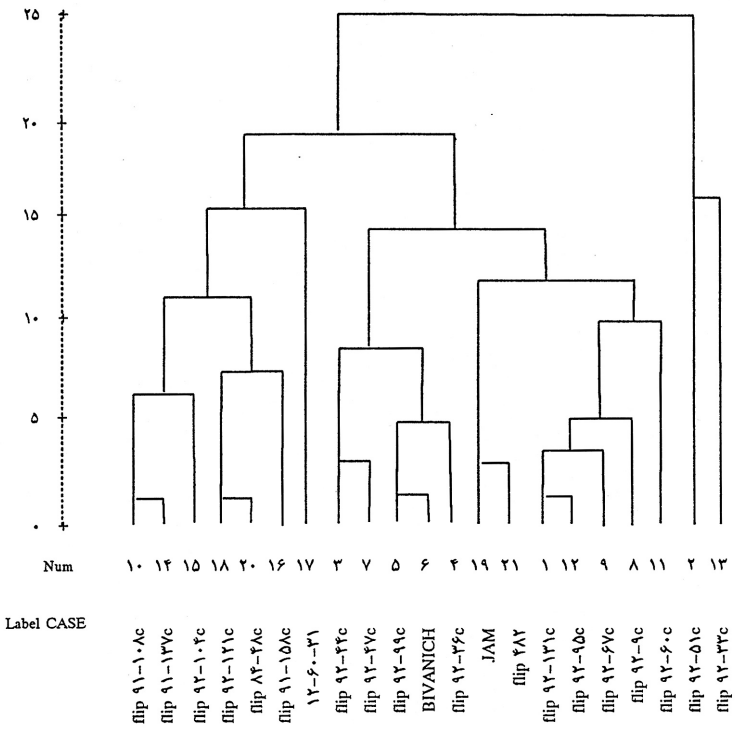
تلاقی بین ارقام دور، به علت وجود پلی‌مرفیسـم بیشـتر، تفاوت ژنتیکـی بالاتـری را از نظر مولکولی ایجاد خواهد کـرد، ضمن اینکه در این تلاقی‌ها امکان ایجاد هتروزیس بیشـتر و یا انتقال صفات نادر نیز وجود دارد. برمبنای دندروگرام حاصل(نمودار ۴) بیشـترین فاصله ژنتیکی بین لاین‌های ۱۰ و ۱۴ با لاین‌های۲ و ۱۳ اسـت، لذا پیشنهاد می‌شود که بر طبق نتایج حاصل از این آزمایش در یک پروژه اصلاحی نخـود تلاقی‌های (۱۴×۲)، (۱۰×۲)، (۱۴×۱۳)، (۱۳×۱۰) مورد توجه قرار گیرند. این تلاقی‌ها سبب بیشترین تفکیک صفات و تفرق ژنی در نسـل F_2 خواهند شـد که در نتیجه به نژادگر را در انتخاب بوته‌های دارای صفات مطلوب از آزادی بیشـتری برخوردار خواهد نمود. نتایج فـوق دلالت بر این دارد که تکنیک RAPD تکنیک مناسـبی برای بررسـی پلی‌مورفیسـم یا چند شـکلی DNA در ارقام مختلف نخود می‌باشد.

همبسـتگی بین ماتریس فاصله برمبنای ضریب تشـابه Nei که از مهاجرت‌های باندهای حاصل شـده بود با ماتریس فاصله اقلیدسی که از اندازه‌های باندی حاصل گردیده بود و برابر (۰/۶۷-) برآورد شـد که نشان‌دهنده همبستگی معنی‌دار و بالایی بین این دو ماتریس است. با توجه به این مقدار همبسـتگی می‌توان از ماتریس حاصل از اندازه‌های باندی نیز برای گروه‌بندی ارقام اسـتفاده نمود. نتایج مربـوط به تبدیل مهاجرت‌های بانـدی به اندازه(نمودار ۵) نشـان داد که الگـوی باندهی برای اندازه های مختلف متفاوت اسـت. پس می‌تـوان برای اندازه‌های بانـدی نیز از تجزیه کلاستراسـتفاده نمـود. دندروگرام اندازه‌هـای باندی نیز بـا دندروگرام مهاجرت‌های باندی مطابقت داشت و لذا همان تلاقی‌های قبل را می‌توان بـرای حصول تفرق ژنی در نسـل‌های تفکیک توصیه نمـود. نظر به اینکه انجام هـر نوع تحلیل آماری بـر روی مهاجرت‌های باندی مسـتلزم وجود



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

www.SID.ir



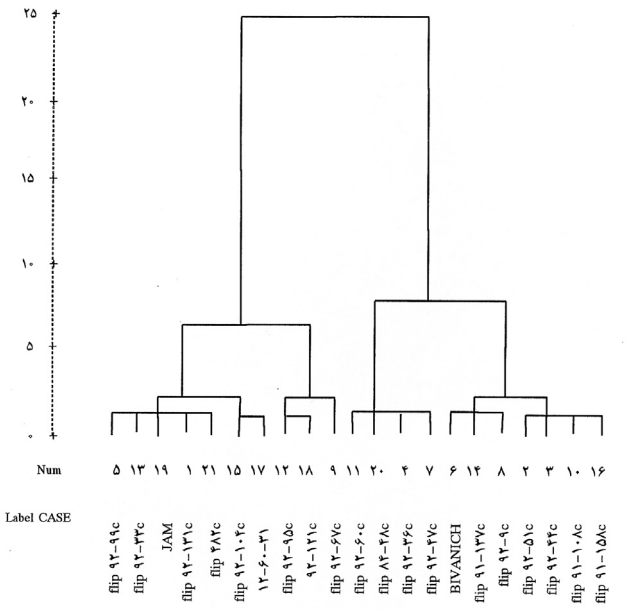
نمودار ۲- دندروگرام فاصله ژنتیکی برای ۲۱ لاین نخود ایرانی با استفاده از روش UPGMA، که از مهاجرت‌های باندی بر مبنای ضریب تشابه نی و اندازه‌های باندی بر مبنای فاصله اقلیدسی حاصل شده است

تفاوت بین ارقام و آغازگرها است، لذا برای پی بردن به وجود این تفاوت‌ها از آزمون مربع کای (χ^2) استفاده شد. در این پژوهش مربع کای محاسبه شده برای ارقام (χ^2=۳۷/۵۷**) و پرایمرها (χ^2=۱۳/۲۸**) و اثر متقابل (χ^2=۱۱۳/۴**) در سطح یک درصد معنی‌دار بود. این مطلب بدان معناست که ارقام از نظر باندهی با یکدیگر متفاوت بوده و پرایمرها نیز باندهی متفاوتی دارند. همچنین چون اثر متقابل رقم، پرایمر معنی‌دار می‌باشد این امر نشان می‌دهد که پرایمرها از نظر نحوه باندهی 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 رابین 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 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 پلی‌مورفیسم را در ارقام نخود ایرانی با استفاده از RAPDs گزارش نمود.

مقایسه دندروگرام حاصل از مهاجرت‌های باندی با دندروگرام حاصل از شاخص‌های مقاومت به خشکی (نمودار۳) در ارقام نشان دادکه لاین‌های۴، ۷، ۸، ۱۱ و رقم محلی بیونیچ (یعنی۵ 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 ۳- دندروگرام حاصل از شاخص‌های مقاومت به خشکی

www.SID.ir

درصد تأیید می‌نماید. به‌عبارت 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 برمبنای 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، دانشگاه‌رازی کرمانشاه.

۲ - بایزید، ب. ۱۳۷۴. بررسی تنوع ژنتیکی ارقام نخود زراعی تحت دو سطح رطوبت و تجزیه همبستگی صفات زراعی. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد. 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، شماره۲ ص۱۱-۱۷ .

۴ - حق‌پرست، ر. ۱۳۷۴. انتخاب برای مقاومت به خشکی در گندم. پایان نامه 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 کارشناسی‌ارشد، 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. پایان نامه 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 وآبی و تعیین بهترین شاخص مقاومت به خشکی. پایان نامه 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 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: Nucleicacids. Bioscientific publishers.

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

17- Lu, J. 1996. Camparative 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 smal lnumber 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 nucleotidetandem 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 temperateforests. Center for international foresty research. pp:177-193.

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

25- Tilman, D. and D. Wedin. 1996. Productivity and sustainability influenced bybiodiversity 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 arbitraryprimers are useful as genetic markers. Nucleic acids research. 18:6531-6535.

Archive of SID
www.SID.ir