ژنتیک نوین
دوره ششم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۰
صفحه ۱۰۴-۹۷

بررسی تنوع ژنتیکی توده‌های نخود زراعی بومی ایران با استفاده از نشانگر ملکولی ISSR

فرزانه فاضلی*[۱]، کیانوش چقامیرزا[۲]

۱و۲- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد اصلاح نباتات و استادیار گروه پژوهشی بیوتکنولوژی مقاومت به خشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی کرمانشاه
* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: farzanehfazeli@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۸۹/۳/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۲/۸)

چکیده

شناخت تنوع ژنتیکی و طبقه‌بندی ذخایر توارثی (ژرم‌پلاسم) از فعالیت‌های مهم و ضروری در به‌نژادی و مدیریت حفظ ذخایر ژنتیکی گیاهان می‌باشد. به منظور ارزیابی تنوع ژنتیکی در ۹۹ توده بومی ایران و پنج رقم نخود زراعی تکثیر مکان‌های ژنی با استفاده از ۲۱ آغازگر ISSR انجام شد. از تعداد ۳٦۱ قطعه‌ای که در کل توده‌ها و ارقام تولید شدند ۲۵۷ قطعه چند شکل بودند. تعداد باندهای چندشکل از ٦ تا ۲۲ به ازاء هر آغازگر متفاوت بودند و اطلاع بخش‌ترین مکان ژنی مربوط به آغازگر UBC864 بود. مقادیر PIC بین ۰/۱۵ تا ۰/٦ و شاخص نشانگر بین ٦/۴۳ تا ٦۰/۳۱ در هر آغازگر در نوسان بودند. ماتریس تشابه داده‌ها مشخص کرد که توده‌های شماره ۹۳ و ۹٤ دارای بیشترین تشابه به میزان ۹۷ درصد، در حالی‌که کمترین میزان تشابه مربوط به توده‌های شماره ۱۰ و ٦٦ به میزان ٥٤ درصد بود. تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA و با استفاده از ضریب تشابه Jaccard ۱۰٤ توده و رقم را در پانزده گروه مجزا گروه‌بندی کرد. زیر گروه‌های درون خوشه‌های اصلی با مقادیر بالای بوت استراپ تأیید شدند. نتایج حاصل نشان داد که نشانگر ISSR یک سیستم نشانگری قابل اطمینان برای آشکارسازی سطح بالایی از چندشکلی است و از این‌رو می‌تواند بعنوان ابزار مفیدی برای بررسی تنوع ژنتیکی نمونه‌های گیاهی، راهنمایی در مطالعات اصلاحی آینده و مدیریت ژرم‌پلاسم نخود مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی

**بوت‌استراپ،
تنوع ژنتیکی،
چندشکلی،
نخود،
نشانگر ملکولی ISSR**

مقدمه

نخود یکی از گیاهان تیره حبوبات بوده که گفته می‌شود ایران از جمله منشأهای آن است (۱). نخود گیاهی دیپلوئید (۲n =۲x=۱۶) (۲۰) و دارای ۸ کروموزوم مجزا محتوی ۱×۱۰^{۹} جفت باز DNA می‌باشد (۱۸) گل‌های این گیاهان اغلب خودگشن بوده و استثنائاً در بعضی از جنس‌ها که دارای گلبرگ‌های نسبتاً بزرگ و رنگی هستند، به میزان زیادی دگرگشنی هم مشاهده می‌شود (۴). علاوه بر انواع ویتامین‌ها و مواد معدنی، دانه نخود حاوی ۱۵ تا ۲۴/۶ درصد پروتئین بوده و از سطح زیر کشت جهانی ۱۱ میلیون هکتار و تولید سالانه جهانی ۹

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.2.10.0]

میلیون تن (۱۰)، به ترتیب ۶۲۴۸۹۴ هکتار و ۲۲۲۴۶۰ تن متعلق به ایران است (۵). یکی از یافته‌های مهم طی چند دهه گذشته در زمینه اصلاح نباتات، شناخت وجود سرمایه عظیم تنوع ژنتیکی در گیاهان بوده است (۲۸). برای استفاده مناسب از این سرمایه عظیم، اطلاع از ماهیت و میزان تنوع موجود در ژرم‌پلاسم، از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است (۲۱). تخمین میزان تنوع ژنتیکی به عنوان یکی از گام‌های پایه‌ای و اساسی در نگهداری و حفاظت مواد ژنتیکی در بانک بذر و اجرای برنامه به‌نژادی است (۳). به عبارت دیگر ارزیابی تنوع ژنتیکی برای مدیریت مؤثر و حفظ منابع ژرم‌پلاسم و همچنین اجرای برنامه‌های به‌نژادی دارای اهمیت فراوانی می‌باشد (۱۵). والدینی که از لحاظ ژنتیکی متفاوت هستند هیبریدهایی با هتروزیس بیشتر تولید می‌کنند و احتمال به دست آوردن نتاج نوترکیب متجاوز را افزایش می‌دهند. از طرف دیگر تعیین مشخصات و گروه‌بندی ژرم‌پلاسم به اصلاح‌گران امکان می‌دهد تا از دوباره‌کاری در نمونه‌گیری از جمعیت‌ها خوداری نمایند (۲۱). به منظور تخمین این تنوع انواع مختلفی از سیستم‌های نشانگری توسط اصلاح‌گران گیاهی استفاده می‌شوند (۱۷) که از جمله آنها می‌توان به نشانگرهای مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و ملکولی اشاره کرد (۲۲). از جمله نشانگرهایی که تا کنون بکار گرفته شده است می‌توان به ایزوزایم‌ها، AFLPs[1]، RAPDs[2]، RFLPs[3] و میکروساتیلت اشاره کرد (۲). در مطالعه Iruela و همکاران (۲۰۰۲) نتایج حاکی از این بود که نشانگرهای مولکولی به‌طور موفقیت‌آمیزی تنوع ژنتیکی در نخود زراعی را آشکار می‌کنند به‌طوری که این تنوع بزرگ‌تر از تنوعی بود که در مطالعات قبلی توسط ایزوزایم‌ها یا پروتئین‌های ذخیره‌ای بذر آشکار شده بود. Lu و همکاران (۱۹۹۷) نشانگرهای RFLP و نشانگرهای مبتنی بر PCR را برای بررسی تنوع ژنتیکی در ۱۰ ژنوتیپ نخود فرنگی استفاده کردند. نتایج حاکی از این بود که تنوع ژنتیکی به دست آمده از نشانگر RFLP کمتر از تنوع ژنتیکی حاصل از روش‌های مبتنی بر PCR بود. نتایج نشان از آن داشت که روش‌های مبتنی بر PCR می‌توانند جایگزین روش RFLP در بررسی تنوع ژنتیکی شوند. با توجه به اینکه سیستم نشاگری RAPD از یک آزمایشگاه به آزمایشگاه دیگر، تکرارپذیری کمی دارد و سیستم نشاگری AFLP گران و هزینه‌بر است و نیز سیستم نشاگری SSR[4] نیاز به اطلاعات اولیه از توالی مورد هدف دو طرف نواحی تکراری جهت طراحی آغازگر دارد، لذا سیستم نشاگری ISSR[5] می‌تواند بر این محدودیت‌ها غلبه کند و میزان چندشکلی بیشتر و آشکارسازی راحت‌تری نسبت به نشاگرهای ملکولی دیگر داشته باشد (۲۶). نشانگر ISSR الگوی نشانگری پیچیده‌تری نسبت به نشانگر RAPD تولید می‌کند، که برای تعیین خصوصیت نژادهای بانک ژن و تشخیص ارقام زراعی نسبتاً خویشاوند استفاده می‌شود (۶). Terzopoulos و Bebeli (۲۰۰۸) در آنالیز تنوع ژنتیکی جمعیت‌های باقلای مدیترانه‌ای با نشانگر ISSR، از ۴ آغازگر استفاده کردند که درصد باندهای چندشکل مشاهده شده در این مطالعه بیشتر از RAPD و AFLP در مطالعات قبلی بود. Ven Katachalam و همکاران (۲۰۰۸) به منظور آشکارسازی چندشکلی DNA، تشخیص ژنوتیپ و روابط فیلوژنتیک بین ۲۱ رقم تجاری موز هندی[6] از ۵۰ آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی RAPD و ۱۲ آغازگر ISSR استفاده کردند. این آغازگرها بین ارقام به ترتیب ۶۰/۱۵ و ۵۶/۷۳ درصد باندهای چندشکل را برای RAPD و ISSR آشکار کردند که نشان می‌دهد این دو نشانگر مشابهند و قدرت تشخیص بالایی دارند. با وجود این نشانگرهای ISSR قدرتمندتر هستند به‌طوری که فقط ۱۲ آغازگر برای ایجاد داده‌های مجزا مورد نیاز است در حالی‌که ۵۰ آغازگر RAPD برای این منظور استفاده شد. Souframanien و همکاران (۲۰۰۴) در مطالعه‌ای برای بررسی تنوع ژنتیکی ۱۸ ژنوتیپ نخود سیاه، نشانگرهای RAPD و ISSR را مورد استفاده قرار دادند. نتایج نشان داد که چندشکلی آشکار شده توسط ۱۶ آغازگر ISSR (۵۷/۴ درصد) در مقایسه با ۲۵ آغازگر اختیاری RAPD (۴۲/۷ درصد) بیشتر بود. Rao و همکاران (۲۰۰۷) در مطالعه‌ای به منظور آشکارسازی روابط ژنتیکی بین ۱۹ رقم نخود زراعی و ۵ نژاد وحشی، از نشانگرهای RAPD و ISSR استفاده

[1] Amplified Fragment Lenght Polymorphism
[2] Random Amplified Polymorphic DNA
[3] Restriction Fragment Length Polymorphism

[4] Simple Sequence Repeat
[5] Inter Simple Sequence Repeat
[6] Indian Banana

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.2.10.0]

کردند. تجزیه ISSR نشان داد که حتی با ۶ آغازگر چندشکل ارزیابی قابل اعتمادی از تنوع ژنتیکی حاصل می‌شود در حالی‌که تقریباً ۳۰ آغازگر برای RAPD لازم می‌باشد.

در مطالعه Wu و همکاران (۲۰۰۴) به منظور ارزیابی و حفظ گونه‌های وحشی در معرض خطر برنج گونه گرانولاتا، آغازگرهای RAPD و ISSR به ترتیب ۶۰/۱۵ و ۵۶/۷۳ درصد باندهای چندشکل آشکار کردند که نشان داد که این دو نشانگر مشابهند و قدرت تشخیص بالایی دارند. با وجود این نتایج حاکی از این بود که نشانگرهای ISSR قدرتمندتر هستند به‌طوری که فقط ۱۲ آغازگر برای ایجاد داده‌های مجزا مورد نیاز است و در حالی‌که ۵۰ آغازگر RAPD برای این منظور استفاده شد. این حقایق نشان می‌دهد که نشانگر ISSR علاوه بر مناسب بودن برای مطالعه تنوع ژنتیکی، جهت مطالعه روابط درون گونه‌ای و بین گونه‌ای و اصلاح گونه‌های گیاهی با اهمیت است. لذا هدف از این بررسی ارزیابی و تعیین تنوع ژنتیکی موجود در هسته مرکزی توده‌های بومی ایران و برخی ارقام نخود با استفاده از نشانگر ملکولی ISSR بود.

مواد و روش‌ها

در مطالعه حاضر مواد گیاهی این بررسی شامل ۹۹ توده نخود زراعی تیپ کابلی دریافت شده از بانک ژن مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج به همراه ۵ رقم شاهد (آرمان، جم، هاشم، بیونیج و ILC-482) بود. DNA ژنومی به صورت بالک از بافت برگ گیاهچه‌های رشد یافته در گلدان و در مرحله ۴-۳ برگی (۴ گیاهچه از هر نمونه) با استفاده از روش تغییر یافته CTAB[7] (۱۹) استخراج شد. نمونه‌های DNA استخراج شده جهت ارزیابی‌های دقیق کمی و کیفی با اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفتند. بر اساس نتایج روش اسپکتروفتومتری نمونه‌های DNA تا غلظت ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شدند و سپس در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR[8]) مورد استفاده قرار گرفتند. مشخصات کامل ۲۱ آغازگر ISSR مورد استفاده در جدول ۱ درج گردیده است.

[7] Cethyl Trimethyl Ammonium Bromide
[8] Polymerase Chain Reaction

جدول ۱- نتایج حاصل از بررسی ۱۰۴ توده و رقم نخود زراعی با استفاده از نشانگر ISSR

نام آغازگر	توالی آغازگر (۵'→۳')	دمای اتصال آغازگر	تعداد کل باندها	تعداد باند چند شکل	درصد چند شکلی (POL)	محتوای اطلاعاتی چند شکلی (PIC)	شاخص نشانگر
UBC872	$_4$)GATA(	۳۳	۱۳	۷	۵۳.۸٤	۰.۲۵	۱۳.۳۷
UBC808	$(AG)_8C$	۵۸	۱۷	۱٤	۸۲.۳۵	۰.۲۷	۲۲.٦۲
UBC841	$(GA)_8YC$	۵۲	۱۳	۸	٦۱.۵۳	۰.۳۷	۲۲.۷۷
UBC818	$(CA)_8G$	۵٤	۱۳	۱۲	۹۲.۳	۰.۲۳	۲۱.۰۵
UBC873	$(GACA)_4$	۵۷	۲۲	۲۲	۱۰۰	۰.۵۸	۵۷.۷٦
UBC880	$(GGAGA)_3$	۵۳	۱۵	۱۱	۷۳.۳۳	۰.۳۳	۲۵.٦۷
UBC807	$(AG)_8T$	۵۳	۱۷	۱٤	۸۲.۳۵	۰.۵۰	٤۱.۱۸
UBC868	$(GAA)_6$	۵۲	۱۵	۹	٦۰	۰.۳۲	۱۹.۲۰
UBC809	$(AG)_8G$	۵۹	۲۲	۱۷	۷۷.۲۷	۰.۲۸	۲۱.٦٤
UBC864	$(ATG)_6$	۵۸	۱۸	۱۲	٦٦.٦٦	۰.۱۵	۱۰
UBC856	$(AC)_8YA$	۵۵	۱۵	۷	٤٦.٦٦	۰.۲۷	۱۲.٦۰
UBC860	$(TG)_8RA$	٤۸	۱۸	۱۲	٦٦.٦٦	۰.۱۹	۱۲.۸۸
UBC811	$(GA)_8C$	۵٦	۱۹	۱۹	۱۰۰	۰.٤٦	٤٦.٤۸
UBC864	$(ACTG)_4$	۵۳	۱۹	۱۹	۱۰۰	۰.٦۰	٦۰.۳۱
UBC885	$BHB(GA)_7$	۵٦	۱۳	۷	۵۳.۸٤	۰.۳۹	۲۱
UBC825	$(AC)_8T$	٤۷	۲۱	۱۳	٦۱.۹۰	۰.۳٦	۲۲.۲۸
UBC884	$HBH(AG)_7$	۵۲	۱۸	۷	۳۸.۸۸	۰.۱۹	۷.۳۹
UBC841	$(GACAC)_4$	۵۱	۱٤	۱۱	۷۸.۵۷	۰.۲٤	۱۸.۸٦
UBC866	$(CTC)_6$	۵۰	۲۲	۱۰	٤۵.٤۵	۰.۳۲	۱٤.۵٤
UBC855	$(AC)_8YT$	۵٦	۱٤	٦	٤۲.۵۸	۰.۱۵	٦.٤۳
UBC857	$(AC)_8YG$	٤۹	۲۳	۲۰	۸٦.۹۵	۰.٤٤	۳۸.۱۵

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.2.10.0]

اجزای واکنش PCR برای حجم ۲۵ میکرولیتر شامل بافر PCR 10X (۲/۵µl)، DNA (۱۶ng)، کلرید منیزیم (۳/۲mM)، آغازگر (۱µm)، dNTP (۰/۲mM) و آنزیم Taq پلی‌مراز (۱unit) بود. تکثیر در ترموسایکلر مدل Corbett و چرخه PCR به این شرح انجام شد: یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، ۴۰ چرخه واسرشت‌سازی در دمای ۹۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۹-۳۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ ثانیه و مرحله بسط به مدت ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و یک چرخه بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد.

به منظور آشکارسازی چندشکلی بین نمونه‌ها از دستگاه الکتروفورز و ژل آگارز ۱/۲ درصد استفاده شد. بعد از انجام الکتروفورز، ژل‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در محلول اتیدیوم برماید ۰/۵ میکروگرم در میکرولیتر، رنگ‌آمیزی شدند و سپس رنگ‌بری با آب مقطر انجام شد. به منظور عکسبرداری از ژل‌ها از دستگاه فیلم‌برداری با سیستم UVP استفاده شد.

برای بررسی چندشکلی بین توده‌ها و ارقام، حضور و عدم حضور هر باند خاص با اعداد یک و صفر مشخص شد و برای تشکیل ماتریس داده‌های خام، ستون‌ها به توده‌ها یا ارقام و سطرها به باندها اختصاص یافت. از این ماتریس برای به دست آوردن تشابه ژنتیکی (با استفاده از دو شاخص Dice و Jaccard)، رسم دندروگرام و تجزیه مؤلفه‌های متعادل به کمک نرم‌افزار (ver. 2.02) NTSYSpc استفاده شد. برای بررسی محتوای اطلاعاتی چندشکلی نشانگرها و آغازگرها از پارامتر PIC[9] (قدرت تفکیک) استفاده شد. میانگین محتوای اطلاعات چندشکلی بر اساس رابطه Pawell و همکاران (۱۹۹۶) محاسبه شد:

$$PIC=1-\sum f_i^2$$

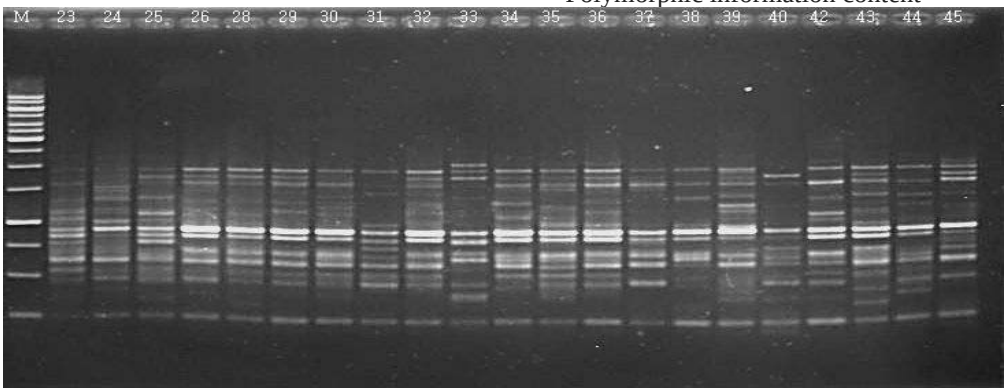
در این رابطه f_i برابر با فراوانی آلل i ام است.

روش بوت‌استراپ جهت تخمین آماری حمایت شاخه‌های داخلی دندروگرام‌های حاصله از گروه‌بندی توده‌ها و ارقام، بر اساس ضریب تشابه Jaccard به روش UPGMA با استفاده از نرم‌افزار Treecon (ver. 1.03) انجام گرفت. تعداد مطلوب خوشه‌ها و بهترین نقطه برش برای داده‌های مولکولی با استفاده از روش ارائه شده توسط Melchinger (۱۹۹۳) بر اساس تجزیه واریانس داخل و بین گروه‌ها و شاخص F رایت، به کمک نرم‌افزار آماری SAS (ver. 8.0) تعیین شد.

نتایج و بحث

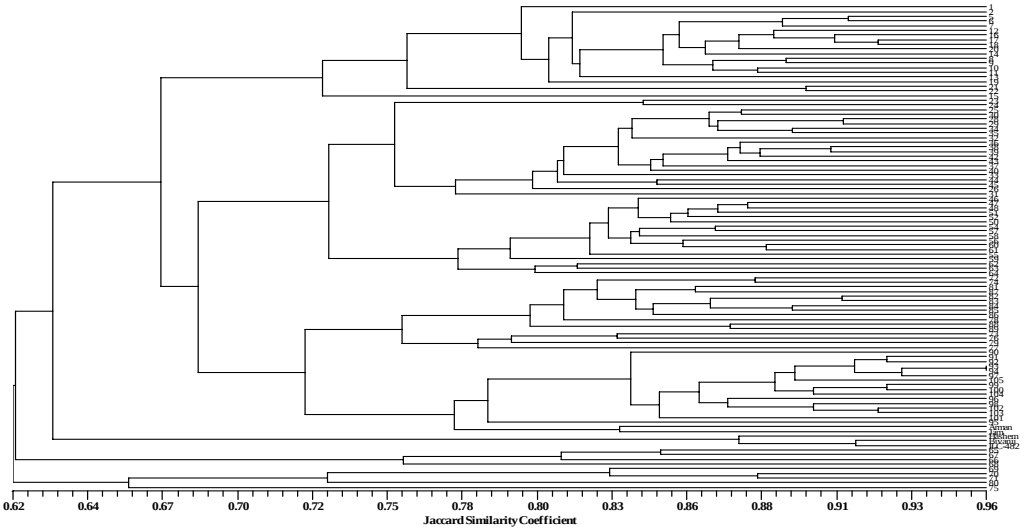
تعداد ۲۷ آغازگر ISSR مورد استفاده قرار گرفت که ۲۱ عدد از آنها باندهای واضح و چندشکلی را تولید کردند. از کل ۳۶۱ باند تولید شده ۱۰۴ تا منومورف و ۲۵۷ تا از آنها چندشکل بودند. اندازه باندها بین ۲۵۰ تا ۳۰۰۰ جفت متغیر بود. تعداد باندها برای هر آغازگر از ۱۳ تا ۲۳ متفاوت بود. درصد چندشکلی برای هر آغازگر از ۳۸/۸۸ درصد برای آغازگر UBC884 تا ۱۰۰ درصد برای آغازگرهای UBC873، UBC811، UBC864 متغیر بود و مقدار متوسط آن ۷۰/۰۶ درصد بود (جدول ۱). متوسط تعداد کل باندها و متوسط تعداد باندهای چندشکل برای هر آغازگر به ترتیب ۱۷/۲ و ۱۲/۲ بود. شکل ۱ الگوی باندی ایجاد شده با آغازگر UBC873 در بین توده‌های ۲۳ تا ۴۵ را به عنوان نمونه نشان می‌دهد.

[9] Polymorphic information content



شکل ۱- الگوی باندی ISSR با استفاده از آغازگر UBC873، M: نشانگر اندازه

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.2.10.0]



شکل ۲- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای به روش UPGMA برای ۹۹ توده نخود بومی ایران با استفاده از نشانگر ISSR بر اساس ضریب تشابه Jaccard

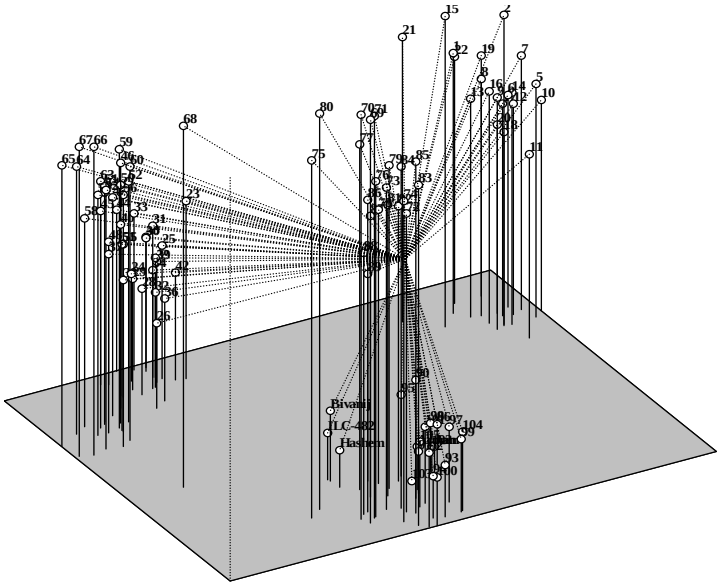
تشابه ژنتیکی ژنوتیپ‌ها با استفاده از نشانگر ISSR و بر اساس ضریب تشابه Jaccard از ۰/۵۴ تا ۰/۹۷ در نوسان بود و متوسط آن ۰/۷۵ بود. بیشترین شباهت بین توده‌های شماره ۹۳ و ۹۴ و کمترین شباهت بین توده‌های شماره ۱۰ و ۶۶ مشاهده شد. بر اساس ضریب تشابه ژنتیکی Dice نیز تشابه ژنتیکی توده‌ها و ارقام از ۰/۶۲ تا ۰/۹۸ و به‌طور متوسط ۰/۸۳ متغیر بود که بیشترین شباهت بین توده‌های شماره ۹۳ و ۹۴ و کمترین شباهت بین توده‌های شماره ۶۶ و ۷۵ به دست آمد. باید توجه نمود که دو توده ممکن است از لحاظ خصوصیات ظاهری متفاوت بوده باشند ولی از لحاظ کل ژنوم با هم شباهت زیادی داشته باشند (حدود ۹۰ درصد کل ژنوم بدون رمز است). کمترین میزان شباهت نیز نشان‌دهنده این است که دو توده دارای اختلاف ژنتیکی زیاد می‌باشند. لذا می‌توان این توده‌ها یا ارقام را در صورت داشتن صفات مطلوب، به عنوان والد در برنامه‌های دورگ‌گیری برای اصلاح ارقام نخود زراعی و به دست آوردن حداکثر هتروزیس استفاده نمود. ضریب تشابه Jaccard بهترین ضریب برای بررسی میزان تنوع ژنتیکی به دست آمده از نشانگرهای غالب است زیرا شباهت را بر اساس وجود باند گروه‌بندی می‌کند (۸، ۱۴، ۱۶ و ۲۳). بنابراین در تجزیه‌های بعدی از این ضریب استفاده شد. توزیع مقادیر PIC بین ۰/۱۵ تا ۰/۶ با میانگین ۰/۳۳ متغیر بود. شاخص نشانگر نیز بر اساس تعداد باندهای چندشکل در هر واحد سنجش (واحد سنجش عبارت از فراورده حاصل از تکثیر به وسیله یک آغازگر می‌باشد) و از حاصل‌ضرب PIC در POL[10] محاسبه شد. مقدار محاسبه شده شاخص نشانگر در آغازگرهای مورد مطالعه بین ۶/۴۳ تا ۶۰/۳۱ قرار داشت. بیشترین مقدار شاخص نشانگر متعلق به آغازگر UBC864:$(ACTG)_4$ بود که نشان‌دهنده قدرت تفکیک بالاتر این آغازگر در مقایسه با سایر آغازگرهاست (جدول ۱). نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضریب تشابه Jaccard در شکل ۲ آورده شده است. نقطه برش دندروگرام مربوط به نقطه‌ای با بالاترین میزان متوسط شاخص F (۴۰/۸۱) بود. توده‌ها و ارقام بر اساس این ضریب تشابه به ۱۵ گروه تقسیم شدند. ضریب همبستگی Cophenetic براساس ضریب تشابه Jaccard، ۰/۸۲ بود که نشان‌دهنده برازش خوب بین دندروگرام و ماتریس شباهت اصلی و نیز کارایی نسبی این روش برای گروه‌بندی توده‌ها و ارقام بود. نتایج حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های متعادل نشان داد که سه مؤلفه ابتدایی توانستند مجموعاً ۳۵ درصد از واریانس کل را توجیه کنند. اولین مؤلفه که بزرگ‌ترین مؤلفه به شمار می‌رود ۱۳/۳، مؤلفه دوم ۱۳/۰۴ و مؤلفه سوم ۸/۶۴ درصد از تنوع کل را توجیه نمودند. همان‌طور که انتظار می‌رفت در این مطالعه، توجیه بخش کمتری از تغییرات

[10] Polymorphism

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.2.10.0]

توسط چند مؤلفه اولیه دلیل بر توزیع مناسب نشانگرهای استفاده شده بر روی ژنوم می‌باشد. بر اساس سه مؤلفه متعادل ابتدایی نمودار الگوی تنوع میان توده‌ها و ارقام نخود رسم شد (شکل۳). نمودار پراکنش توده‌ها و ارقام بر اساس تجزیه به مؤلفه‌های متعادل در شکل ۳ نشان داد که این گروه‌بندی با گروه‌بندی حاصل از تجزیه خوشه‌ای کاملاً مطابقت دارد. طبق نتایج به دست آمده، توده‌های شماره ۱۰ و ۶۶ بر اساس ضریب تشابه Jaccard کمترین شباهت ژنتیکی را داشتند که در گروه‌بندی خوشه‌ای و نمودار حاصل از تجزیه به مؤلفه‌های متعادل هم هر دو توده در گروه‌های جداگانه‌ای قرار گرفتند و توده‌های شماره ۹۳ و ۹۴ که دارای بیشترین ضریب تشابه Jaccard بودند، با همدیگر در یک گروه قرار گرفتند. جهت تأیید زیرگروه‌های دورن کلاستر اصلی، گروه‌بندی به روش بوت‌استراپ و بر اساس ضریب تشابه Jaccard انجام شد. در بیشتر موارد این گروه‌بندی‌ها با مقادیر بالای بوت‌استراپ تأیید شدند. نتایج این تحقیق نشان داد که نشانگر ISSR نشانگری کارا جهت آشکارسازی روابط ملکولی بین توده‌ها و ارقام مورد آزمایش در این بررسی می‌باشد. از بررسی‌های انجام شده برای گروه‌بندی توده‌ها و ارقام هسته مرکزی نخود ایران چنین استنباط می‌شود که سطح تنوع ژنتیکی موجود در آنها در حد مطلوبی است. به این معنی که نشانگر ISSR ابزار مهمی جهت مطالعه تنوع ژنتیکی در نخود می‌باشد.

همچنین این نتایج می‌تواند نقطه عطف مهمی برای برنامه‌های اصلاحی و حفاظت ژرم‌پلاسم توده‌های بومی نخود زراعی باشد. به‌طوری که در آینده می‌توان با برنامه‌های اصلاحی مناسب در جهت افزایش عملکرد، کیفیت و سازگاری این گیاه در کشور گام‌های اساسی برداشت. علاوه بر این روابط ملکولی ایجاد شده از این مطالعه که نشان‌دهنده روابط بین توده‌ها و ارقام نخود زراعی مورد بررسی هستند، ممکن است در برنامه‌های اصلاحی نخود مفید باشند و با دقت و توجه کافی به گروه‌بندی‌های ایجاد شده برای توده‌ها و ارقام موجود، به سهولت می‌توان توده‌ها و ارقام مناسب را جهت برنامه‌های به‌نژادی انتخاب نمود. نتایج حاصل از تجزیه خوشه‌ای بر اساس ضریب تشابه Jaccard نشان داد که دو توده شماره ۱۰ و ۶۶، از نظر ژنتیکی فاصله زیادی با هم دارند. بنابراین می‌توان انتظار داشت با تلاقی بین آنها که در گروه‌های دور از هم قرار گرفته‌اند، نتاج نوترکیب متجاوز جهت انتخاب در برنامه‌های اصلاحی تولید شود. چرا که یکی از راه‌های مطمئن برای دستیابی به هتروزیس بالا، استفاده از موادی است که دارای کمترین خویشاوندی باشند و شناسایی تلاقی‌های حاوی هتروزیس بالا مهم‌ترین قدم در تولید محصولات هیبرید است و معمولاً والدین با قدرت ترکیب‌پذیری بالاتر و فاصله ژنتیکی بیشتر می‌توانند هیبریدهایی با عملکرد بالاتر تولید کنند.



شکل ۳- نمودار پراکندگی افراد در اطراف سه مؤلفه ابتدایی در تجزیه به مؤلفه‌های متعادل بر اساس نشانگر ISSR

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.2.10.0]

لذا با توجه به مطالب فوق توصیه می‌شود که به‌نژادگران در انتخاب والدین مناسب برای انجام دورگ‌گیری‌ها علاوه بر صفات مطلوب ظاهری و زراعی، به طبقه‌بندی ملکولی آنها نیز توجه داشته باشند. چنین ایده‌ای در تحقیقی توسط Rao و همکاران (۲۰۰۷) به منظور آشکار سازی روابط ژنتیکی بین ارقام زراعی و نژادهای وحشی نخود با استفاده از نشانگرهای ISSR و RAPD مورد بررسی قرار گرفت. آنها به این نتیجه رسیدند که برای انتخاب مواد والدینی خوب در برنامه‌های اصلاحی، داده‌های ژنتیکی حاصل از ISSR می‌توانند به منظور تعیین همبستگی و ارتباط این داده‌ها با داده‌های شجره‌ای و صفات مورفولوژیکی به منظور کاهش خطای فردی در نخود مورد استفاده قرار بگیرند. همچنین نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که نشانگر ملکولی ISSR به دلیل میزان چندشکلی بالا می‌تواند جهت شناسایی ملکولی، مطالعه تنوع ژنتیکی و ارزیابی روابط فیلوژنی و تکاملی نخود زراعی مورد استفاده قرار گیرد. که با نتایج Bornet و همکاران (۲۰۰۲) در مطالعه و مقایسهٔ تنوع ژنتیکی ارقام سیب زمینی اروپایی و آمریکایی با استفاده از نشانگر ISSR مطابقت دارد. آنها نشان دادند که این نشانگر چندشکلی بالایی تولید می‌کند که نشان‌دهنده آن است که قابلیت بالایی جهت ارزیابی تنوع ژنتیکی گیاه سیب‌زمینی دارد. البته استفاده همزمان از نشانگرهای اختصاصی از قبیل نشانگر ملکولی SSR همراه با اطلاعات شجره‌ای نتایج صحیح‌تری از روابط ژنتیکی نسبت به هر دو روش به‌طور جداگانه فراهم می‌کند (۲۵). Taran و همکاران (۲۰۰۴) در مطالعه‌ای به منظور تخمین تنوع ژنتیکی بین واریته‌ها و نژادهای گونه‌های وحشی نخود فرنگی از نشانگرهای مولکولی و صفات فیزیولوژیک و مورفولوژیک استفاده کردند. آنالیز مولکولی نشان داد که بیشترین سطح چندشکلی (۵۱ درصد) از آنالیز SSR به دست آمده است و نشانگرهای RAPD و ISSR تقریباً درصد یکسانی از چندشکلی را نشان دادند (به ترتیب ۴۴ و ۳۴ درصد).

با توجه به نتایج به دست آمده، به منظور معرفی توده‌ها و ارقام جدید پیشنهاد می‌شود که تعداد نمونه‌های ایرانی و دامنه جغرافیایی منشأ نمونه‌های مورد مطالعه گسترده شود و ارقام متعلق به کشورهای آسیای جنوب غربی و مدیترانه که به مرکز تنوع و خاستگاه اولیه گیاه نخود نزدیکی بیشتری دارند، به این مجموعه اضافه شوند، تا تفاوت بین مجموعه توده‌ها و ارقام ایرانی، خارجی و ناشناخته از نظر سطح تنوع ژنتیکی مشخص‌تر شده و باعث تسهیل در شناسایی توده‌های ناشناخته شود. در این صورت می‌توان از تنوع ژنتیکی بیشتری که در ژرم‌پلاسم متعلق به این مناطق وجود دارد، در برنامه‌های انتخاب و اصلاح توده‌ها و ارقام بهره‌برداری نمود.

سپاسگزاری

بدینوسیله از مسئولین محترم بانک ژن موسسه تحقیقات، اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج به خاطر در اختیار قرار دادن مواد گیاهی قدردانی می‌شود.

منابع

۱. باقری ع، نظامی ا، گنجعلی ع، و پارسا م (۱۳۷۶) زراعت و اصلاح نخود (ترجمه)، انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.

۲. فلاح س ا، احسان زاده پ، و دانشور م ا (۱۳۸۴) مطالعه اثرات تراکم بوته و آبیاری تکمیلی بر عملکرد و اجزاء عملکرد سه رقم نخود دیم در خرم‌آباد لرستان، مجله علوم کشاورزی ایران، ج ۳۶، شماره ۳: ۷۳۱-۷۱۹.

۳. فلاحتی‌عنبران م، حبشی ع ق، اصفهانی م، محمدی س ا، و قره‌یاضی ب (۱۳۸۵) بررسی تنوع ژنتیکی و روابط خویشاوندی یونجه‌های یکساله دیپلوئید و تتراپلوئید با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره، مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، سال دهم، شماره سوم (ب).

۴. کوچکی ع، بنایان م (۱۳۷۶) زراعت حبوبات. انتشارات جاوید مشهد.

۵. هنری آر جی (۱۳۸۱) کاربردهای عملی بیولوژی ملکولی گیاهی، ترجمه: باقری ع، ایزدی دربندی ع، و ملبوبی م، انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

6. Archak S and Gaikwad A B, Gautam D, Rao E V V B, Swamy K R M, Karihaloo J L (2003) Comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR and AFLP) for genetic analysis of cashew (*Anacardium occidental* L.) accessions of India. Genome 46: 362-369.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.2.10.0]

7. Bornet B, and Goraguers F, Joly G, Branchard M (2002) Genetic diversity in European and Argentinean cultivated potatoes detected by inter- simple sequence repeats (ISSR). Genome 45: 481-484.
8. Demeke T, and Lynch D R, Kawchuck L. M (1996) Genetic diversity of potato determined by RAPD analysis. Plant Cell Reports 15: 662-667.
9. Iruela M, and Rubio J, Cubero J I, Gil J, Millan T (2002) Phylogenetic analysis in the genus *Cicer* and cultivated chickpea using RAPD and ISSR markers. Theoretical and Applied Genetics 104: 643- 651.
10. Kumar J (2001) Chickpea review. WWW. Icrisat. Org/ text/ research/grep/ homepage/chickpea.
11. Lu J, and Knox M R, Ambrose M J, Brown J K M, Ellis T H N (1997) Comparative analysis of genetic diversity in pea assessed by RFLP and PCR- based methods. Theoretical and Applied Genetics 93: 1103-1111.
12. Melchinger A. E (1993) Use of RFLP markers for analysis of genetic performance. p: 621-628. In D. R. Buxton (ed) proceedings of the international crop science congress, 1st, Ames, IA. July 1992, CSSA, Madison, 1993.
13. Pawell W, and Morganet M, Andre C, Hanafey M, vogel J, Tingey S, Rafalaski A (1996). The comparision of RFLP, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding 2: 225-238.
14. Paz M. M, and Veillux R E (1998) Genetic diversity based on RAPD and it s relationship with the performance of diploid potato hybrids. Journal of the American for Horticulture Science 122(6): 740-747.
15. Rao, L S, and Usha Rani P, Deshmukh P. S, Panguluri S. K (2007) RAPD and ISSR fingerprinting in cultivated chickpea (*Cicer arietinum* L.) and its wild progenitor *Cicer reticulatum* Ladizinsky. Genetics Resources and Crop Evolution 54: 1235-1244.
16. Rasmussen J. O, and Rasmussen O S (1995) Characterization of somatic hybrids of potato by use of RAPD markers and Isozyme analysis. Physiological Plantarum 93: 357-394.
17. Ray chadhury P, and Tanveer H, Dixit G. P (2007) Identification and detection of 257-272. genetic relatedness among important varieties of pea (*Pisum sativum* L.) grown in India. Genetica 130: 183- 191.
18. Rubio J, and Flores F, Moreno M T, Cubero J I, Gill J (2004) Effects of the erect/ bushy habit, single/ double pod and late/ early flowering genes on yield and seed size and their stability in chickpea. Field Crops Research 90: 255-262.
19. Saghai Maroof M A, and Solima K M, Jorgenson R A, Allard R W (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America 81: 8014-8018.
20. Setty N K, and 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.
21. Sharma B D, and Hore D K (1993) Multivariate analysis of divergence in upland rice Indian. Journal of Agricultural Science 63: 515-517.
22. Solouki M, and Mehdikhani H, Zeinali H, Emamjomeh A. A (2008) Study of genetic diversity in chamomile (*Matricaria chamomilla*) based on morphological traits and molecular markers. Scientia horticulture 117(3): 281-287.
23. Sosinnski B, and Douches D S (1996) Using PCR based DNA amplification to fingerprinting north American potato cultivars. Horticultural Science 31(1): 130-133.
24. Souframanien J, and T Gopalakrishna (2004) A comparative analysis of genetic diversity in blackgram genotypes using RAPD and ISSR markers. Theoretical andApplied Genetics 109: 1687-1693.
25. Taran B, and Zhang C, Warkentin T, Tullu A, Vandenberg A (2004) Genetic diversity among varieties and wild species accessions of pea (*Pisum sativum* L.) based on molecular markers, and morphological and physiological characters. Genome 48:
26. Terzopoulos P J, and Bebeli P J (2008) Genetic diversity analysis of Mediterranean faba bean (*Vicia faba* L.) with ISSR markers. Field Crops Research 108: 39-44.
27. Ven Katachalam L, and Sreedhar R V, Bhagyalakshmi N (2008) The use of genetic markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and Phylogenetic relationships among banana cultivars. Molecular Phylogenetic and Evolution 47: 974-985.
28. Von Braun J, and Virchow D (1996) Economic evaluation of biotechnology and plant diversity in developing countries. Plant research and development 43: 50-61.
29. Wu C J, and Cheng Z Q, Huang X Q, Yin S H, Cao K M, Sun C R (2004) Genetic diversity among and within population of *Oryza granulata* from Younnan of China revealed by RAPD and ISSR markers. Implications for the endangered species. Plant Science 167: 35-42.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.2.10.0]